

Arbeitsanleitung / Manual

Tryptophan ELISA Kit

*Zur Bestimmung von Tryptophan in humanem EDTA-Plasma,
Serum und Urin*

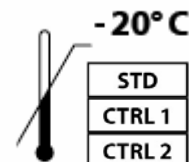
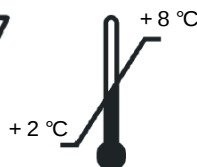
*For the determination of Tryptophan in human EDTA-plasma,
serum and urine*

Nur zu Forschungszwecken / For research use only

Gültig ab / Valid from 17.03.2010



K 7730



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. VERWENDUNGSZWECK	3
2. EINLEITUNG	3
3. TESTPRINZIP	4
4. INHALT DER TESTPACKUNG	5
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	6
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	6
7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	7
9. TESTDURCHFÜHRUNG	8
<i>PIPETTIERSCHEMA TESTDURCHFÜHRUNG</i>	9
10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	11
<i>ERWARTETE ERGEBNISSE</i>	11
11. TESTCHARAKTERISTIKA	13
<i>KREUZREAKTION</i>	13
<i>SENSITIVITÄT</i>	13
<i>WIEDERFINDUNG</i>	14
<i>LINEARITÄT</i>	14
12. EINSCHRÄNKUNGEN	14
13. LITERATUR	15
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	16

1. INTENDED USE	18
2. INTRODUCTION	18
3. PRINCIPLE OF THE TEST	19
4. MATERIAL SUPPLIED	20
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	21
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	21
7. PRECAUTIONS	22
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	22
9. ASSAY PROCEDURE	23
SAMPLE PREPARATION PROCEDURE	23
TEST PROCEDURE	24
10. EVALUATION OF RESULTS	26
EXPECTED VALUES	26
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	28
CROSS REACTIVITY	28
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	28
SENSITIVITY	28
RECOVERY	29
LINEARITY	29
12. LIMITATIONS	29
13. REFERENCES	30
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	31

1. VERWENDUNGSZWECK

Dieser ELISA Test ist für die Bestimmung von Tryptophan in humanem EDTA-Plasma, Serum und Urin geeignet. Nur zu Forschungszwecken.

2. EINLEITUNG

Tryptophan ist eine essentielle Aminosäure. Sie wird vom menschlichen Körper nicht gebildet und muss mit der Nahrung zugeführt werden. Eine wesentliche Rolle spielt das Tryptophan bei der Serotoninsynthese. Es ist die einzige Substanz aus der Serotonin synthetisiert werden kann. (siehe Abbildung 1).

Serotonin selbst wird an den Fortsätzen eines weit ausgebreiteten Transmittersystems freigesetzt, das global-modulatorische Wirkungen besitzt und dessen Aktivität sich deshalb in unterschiedlichen Lebensbreichen auswirkt. Diese Aktivität ist nicht zuletzt auch auf den aktuellen Spiegel von Tryptophan zurückzuführen. Bei manchen Krankheitsbildern wird ein Tryptophanmangel ermittelt, der in einigen Fällen die Aktivierung des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) als Ursache hat. Die IDO Aktivierung bewirkt, dass Tryptophan in den Kynureninweg eingeschleust und abgebaut wird (siehe Abbildung 1).

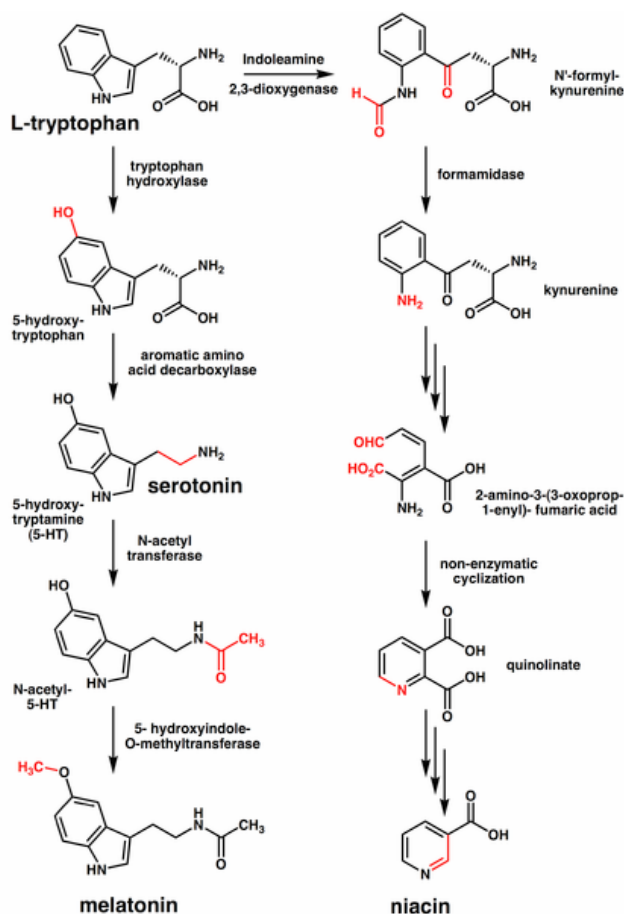


Abbildung 1: Synthese von Serotonin und Melatonin aus Tryptophan (links) und Einschleusung des Tryptophans in den Kynurenin-Weg über das Enzym Indolamin- 2,3-Dioxygenase (rechts)

Kommt es hierdurch zu einer Absenkung des Tryptophans im Plasma, so steht dieses nicht mehr der Serotonin- und im Folgenden auch nicht der Melatoninsynthese zur Verfügung. Die Resultate sind Stimmungsschwankungen oder affektive Störungen, Aggressivität, Schlafstörungen, Essstörungen oder Depressionen.

In den letzten Jahren wurden zunehmend Krankheitsbilder bekannt, bei denen aufgrund der Aktivierung der IDO oder aus anderen Gründen der Tryptophanspiegel signifikant absinkt oder ein ungünstiges Tryptophan Kynurenin-Verhältnis besteht. Im ersten Fall geht der Mangel an Tryptophan mit der Erhöhung von Entzündungsmarkern einher. Einige Indikationen sollen nachfolgend genannt sein:

- Bei **Reizdarm** aktiviert Interferon-Gamma das Enzym IDO, wodurch es zu Tryptophanmangel kommt
- Bei **adipösen Menschen** sind ebenfalls inflammatorische Marker erhöht, die eine chronische Immunaktivierung anzeigen. Auch hier ist IDO aktiviert, es sind niedrige Tryptophan-Plasmawerte zu verzeichnen
- Bei **Stress** wird die IDO ebenfalls aktiviert und begünstigt so den Tryptophanabbau über den Kynurenin-Weg

Darüber hinaus wird bei gastrointestinalen Störungen wie **Fructose-unverträglichkeit**, als Folge der Resorptionsstörungen in Dick- und Dünndarm, Tryptophan nur mangelhaft aufgenommen.

Bei diesen Krankheitsbildern sind Stimmungsschwankungen, Essstörungen, Schlafstörungen oder Depressionen bekannt.

Durch die Gabe von Tryptophan könnten diese Krankheitssymptome gemildert werden. Eine Tryptophangabe macht jedoch nur bei Kenntnis des Spiegels Sinn. Mit dem vorliegenden Test lässt sich dieser elegant bestimmen.

3. TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays. Zur Vorbereitung wird die zu untersuchende Probe mit einem Derivatisierungsreagenz zur Kopplung des enthaltenen Tryptophan versetzt. Anschließend wird die derivatisierte Probe mit einem polyklonalen Tryptophan-Antiserum in einer mit Tryptophan-Derivat (Tracer) beschichteten ELISA-Platte inkubiert. Während der Inkubation kompetitiert das Zielantigen in der Probe mit dem an die Platte gebundenen Tracer um die Bindung der polyklonalen Antikörper. Hierbei verdrängt das Zielantigen in der Probe den Antikörper aus der Bindung an den Tracer. Daher ist die Konzentration des an den Tracer gebundenen Antikörpers

umgekehrt proportional zu der Konzentration des Zielantigens in der Probe. Beim zweiten Inkubationsschritt wird ein Peroxidase-markierter Sekundärantikörper zugegeben, der an die polyklonalen Anti-Tryptophan-Antikörper bindet. Nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Komponenten wird das Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration des gemessenen Analyten, d.h. mit steigender Tryptophan-Konzentration in der Probe reduziert sich die Konzentration der an den Biotintracer gebundenen Antikörper und das Signal nimmt ab. Parallel dazu wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K7730MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K7730ST	STD	Standards	6 x 1 Fläschchen
K7730KO	CTRL 1 CTRL 2	Kontrollen	2 x 1 Fläschchen
K7730WP	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat (10-fach)	2 x 100 ml
K7730AK	AB	Anti-Tryptophan-Antikörper (lyophilisiert)	2 x 1 Fläschchen
K7730K	2.AB	POD-Antikörper (Konzentrat)	120 µl
K7730CSP	2.ABDIL	Konjugatstabilisierungspuffer	24 ml
K7730RP	DERBUF	Reaktionspuffer	25 ml
K7730DR	DER	Derivatisierungsreagenz	2 x 6 mg
K7730LM	DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO)	2 ml
K7730AP	ASYBUF	Assaypufferkonzentrat (10-fach)	11 ml
K7730TMB	SUB	TMB-Substrat	25 ml
K7730AC	STOP	Stopplösung	15 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 10000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so je nach Probenaufkommen bis zu 2 x bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8°C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die **Standards (STD)** und die **Kontrollen (CTRL1, CTRL2)** sind bereits in **Reaktionspuffer (DERBUF)** verdünnt und werden bei -20°C gelagert. Für den Test werden die Standards und Kontrollen aufgetaut und können bis zu 3 mal wieder eingefroren werden. Das Wiedereinfrieren der Standards und Kontrollen sollte sofort nach Entnahme erfolgen.
- **DMSO** kristallisiert bei 4°C aus. Zum Lösen das DMSO im Wasserbad bei 20-25°C erwärmen.

- Der **Assaypuffer (ASYBUF)** muss vor Gebrauch in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (11 ml Konzentrat + 100 ml aqua bidest.), gut mischen.
- Der Inhalt eines Fläschchens **Derivatisierungsreagenz (DER) (6 mg)** wird in **0,75 ml DMSO** gelöst und das Fläschchen für 5 min auf einen Horizontalschüttler gelegt. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen. Das DER sollte **unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt** werden. Durch die Aufteilung des DER in 2 Gefäße ist der ELISA in zwei Ansätze teilbar. Bitte beachten: **DMSO greift Plastik an, DMSO reagiert nicht mit Polypropylen-Produkten und Glasgefäßen.**
- Der Inhalt eines Fläschchens **anti-Tryptophan-Antikörper (AB)** wird in **8 ml verdünnten Assaypuffer** gelöst. Durch die Aufteilung des AB in 2 Gefäße ist der ELISA in zwei Ansätze teilbar. **Verdünnter Tryptophan-Antikörper ist stabil und kann 4 Wochen bei 2-8 °C aufbewahrt werden.**
- Der **POD-Antikörper (2.AB)** wird **1:200** in **Konjugatstabilisierungspuffer (2.ABDIL)** verdünnt (110 µl 2.AB + 22 ml 2.ABDIL). Unverdünnter POD-Antikörper (2.AB) ist bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünnter POD-Antikörper (2.AB) ist bedingt stabil und kann 5 Tage bei 2-8°C aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei 2-8°C zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zu Forschungszwecken.
- Standards und Kontrollen sind auf Humanplasma aufgebaut. Sie sind auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befunden worden. Jedoch sollten die Testkomponenten immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter H_2SO_4 . H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht verwendet werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

EDTA-Plasma, Serum und Urin

- Als Probe eignet sich venöses Nüchternblut und Morgenurin. Die Haltbarkeit der Plasma- bzw. Serumprobe beträgt bei 2-8°C eine Woche. Die Urinprobe sollte gekühlt versendet werden, ist aber bis 24 Stunden bei Raumtemperatur stabil. Die Haltbarkeit der Urinprobe beträgt zwei Tage bei 2-8°C. Zur längeren Lagerung sollte die Plasma-, Serum- und Urin-Probe bei -20°C aufbewahrt werden.
- Lipämische und hämolytische Proben beeinflussen das Testergebnis und sollten nicht verwendet werden.
- **EDTA-Plasma-, Serum- und Urinproben** werden für die Derivatisierung vorverdünnt.*

*Falls weniger als 50 µl Probe vorhanden ist, empfehlen wir eine 1:1 Verdünnung in DERBUF (Reaktionspuffer) (25 µl Probe + 25 µl DERBUF). Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Auswertung berücksichtigt werden.

Proben mit sichtbaren Mengen an **Feststoff** (meist Kryoproteine) sollten vor Einsatz mind. 5 min bei 10000 x g **zentrifugiert** werden. Der resultierende Überstand wird im Test eingesetzt.

- Zur weiteren Vorbereitung muss die Probe mit einem **DER** (Derivatisierungsreagenz) zur Kopplung des enthaltenen Trp versetzt werden (Details siehe Pipettierschema Probenvorbereitung).

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik AG übernimmt keine Haftung.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

Pipettierschema Probenvorbereitung

Die Proben (SAMPLE) werden im Faktor **1 + 10** vorverdünnt. Dafür werden jeweils 50 µl Probe mit 500 µl DERBUF (Reaktionspuffer) verdünnt.

Die Derivatisierung der Standards (STD), der Kontrollen (CTRL) und der Proben (SAMPLE) wird als Einzelbestimmung in Mikroreaktionsgefäßen durchgeführt.

1. Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen
2. Je 100 µl gebrauchsfertiger Standard (STD) bzw. 100 µl gebrauchsfertige Kontrollen (CTRL) bzw. 100 µl vorverdünnte Probe (SAMPLE) in Mikroreaktionsgefäße pipettieren
3. 25 µl frisch angesetztes Derivatisierungsreagenz (DER) in alle Reaktionsgefäße (Standards, Kontrollen und Proben) pipettieren, gut mischen und sofort auf einem Horizontalschüttler (180-240 rpm) 60 min bei Raumtemperatur (18-26°C) inkubieren
4. Anschließend in alle verwendeten Mikroreaktionsgefäße 1800 µl verdünnten Assaypuffer zugeben, gut mischen und auf einem Horizontalschüttler (180-240 rpm) 60 min bei Raumtemperatur (18-26°C) inkubieren

2 x 50 µl der so vorbereiteten Proben (STD, CTRL, SAMPLE) werden im ELISA als Doppelbestimmung eingesetzt.

Pipettierschema Testdurchführung

5. Positionen für Standard/Kontrolle /Probe (STD/CTRL/SAMPLE) in Doppelbestimmung am Protokollblatt markieren
6. Die benötigten Streifen der Mikrotiterplatte (PLATE) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterplattenstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8°C gelagert werden
7. Mikrotiterplattenstreifen 5 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
8. 2 x 50 µl der vorbereiteten derivatisierten Proben (STD, CTRL, SAMPLE) werden aus den Mikroreaktionsgefäßen in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte (PLATE) pipettiert

9. 150 µl verdünnter anti-Tryptophan-Antikörper (AB) pro Vertiefung pipettieren. Streifen luftdicht abdecken
10. Über Nacht (15-20 Stunden) bei 2-8°C inkubieren
11. Inhalt der Platte verwerfen und 5 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
12. 200 µl verdünnten POD-AK (2. AB) in alle Vertiefungen pipettieren
13. Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln (180-240 rpm) inkubieren
14. Inhalt der Platte verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von WASHBUF durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
15. 200 µl TMB-Substrat (SUB) in alle Vertiefungen pipettieren
16. 8-12 min bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren*
17. 100 µl Stopplösung (STOP) in alle Vertiefungen pipettieren und im Mikrotiterplattenphotometer im Schüttelmodus mischen
18. Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (alternativ 690 nm) messen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden

*Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Bei einer Durchführung des Tests unter strikter Einhaltung der Volumenangaben für Standards, Kontrollen und Probenbehandlung sind Standards, Kontrollen sowie Proben gleich verdünnt, deshalb wird **bei der Auswertung der Ergebnisse kein Verdünnungsfaktor mit berechnet**.^{**}

^{**}Bei einer 1:1 Verdünnung muss der Verdünnungsfaktor mit berechnet werden.

Auswertungsfunktionen

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion.

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden, wir empfehlen 0.01).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Erwartete Ergebnisse

Anhand einer laborinternen Studie mit Proben von augenscheinlich Gesunden (**n=40**) wurde ein Mittelwert von 54 µmol/l ermittelt, bei einer Standardabweichung von 12 µmol/l.

Serum/Plasma Mittelwert ± 2 Standardabweichungen: 54 ± 24 µmol/l

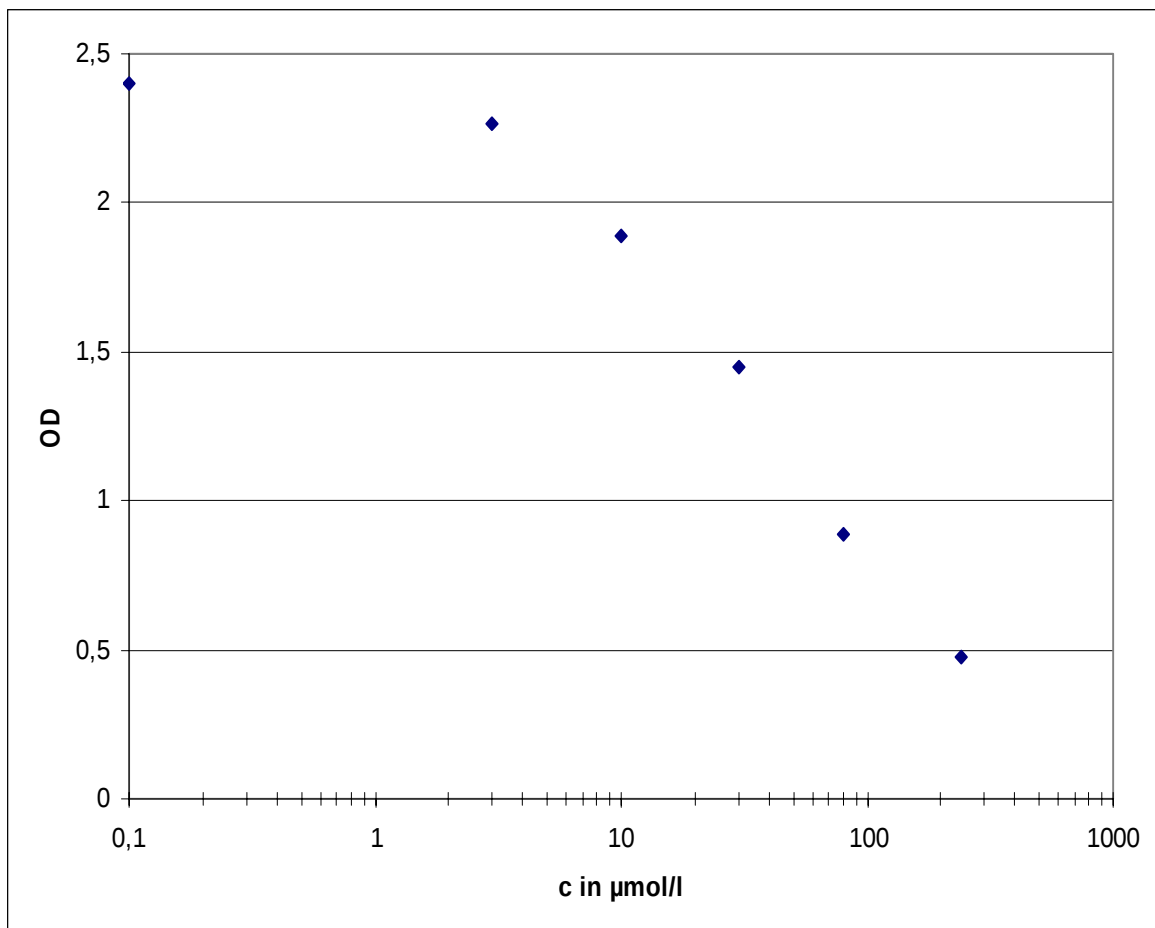
Wir empfehlen jedem Labor seinen eigenen Normalwerte-Bereich zu erstellen, weil Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Normalbereichs dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

Kontrollen

Zur Überwachung der Qualität der Analyse sollten bei jedem Testansatz Kontrollen mitgeführt werden. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen ein oder mehrere Werte außerhalb des angegebenen Bereiches, ist es möglich, dass auch die Patientenproben falsch ermittelt wurden.

Die Konzentrationen der Kontrollen und Patientenproben können direkt aus der Kalibrierkurve in $\mu\text{mol/l}$ abgelesen werden. Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve.

Musterkalibrierkurve



11. TESTCHARAKTERISTIKA

Kreuzreaktion

5-HTP (5-Hydroxy-Tryptophan)	< 0,5 %
L-Phenylalanin	< 0,1 %
L-Thyrosin	< 0,1 %

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n=12)		
Probe	Tryptophan [μmol/l]	Standardabweichung (SD)
1	17,7	11,4 %
2	56,7	4,1 %

Inter-Assay (n=6)		
Probe	Tryptophan [μmol/l]	Standardabweichung (SD)
1	19,4	6,9 %
2	59,1	4,0 %

Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde als $B_0 + 2 \text{ SD}$ festgelegt. Gemessen wurde 20-mal der Standard Null.

Probe	Tryptophan Mittelwert [OD]	2 Standard- abweichungen (2 x SD)	Nachweis- grenze [μmol/l]
Standard Null	2,3	0,05 %	7

Wiederfindung

Unterschiedliche Mengen an Tryptophan wurden zu einer Serumprobe gegeben (Spike) und anschließend im ELISA gemessen. Die analytische Wiederfindung von Tryptophan wurde bei 2 verschiedenen Konzentrationen aus den theoretisch erwarteten und den praktisch gemessenen Werten ermittelt. Die theoretisch erwarteten Werte wurden dabei aus der Summe der gemessenen Konzentration in der Probe ohne Spike und der zugegebenen Menge ermittelt. Die mittlere Wiederfindung für alle Konzentrationen der Serumprobe betrug 100,5 % (n=6).

Spike [μmol/l]	Tryptophan erwartet [μmol/l]	Tryptophan gemessen [μmol/l]	Wiederfindung [%]
0	x	x=44,8	100,0
25	44,8+25=69,8	74,7	107,0
50	44,8+50=94,8	89,5	94,4

Linearität

Die Linearität des ELISAs wurde durch Verdünnen einer aufgestockten Serumprobe bestimmt. Die mittlere Linearität betrug 99,8 %.

Verdünnung	Messwert [μmol/l]	Erwartet [μmol/l]	Wiederfindung [%]
original	44,8	44,8	100,0
1+1	22,5	22,4	100,4
1+3	11,1	11,2	99,1

12. EINSCHRÄNKUNGEN

Stark hämolysierte oder lipämische Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Wir empfehlen solche Proben nicht zu analysieren.

13. LITERATUR

Wilson ST, Stanley B, Brent DA, Oquendo MA, Huang YY, Mann JJ: The tryptophan hydrolase-1 A218C polymorphysmus is assoziated with diagnosis, but not suicidal behavior, in borderline personality disorder. *AM J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2009 Mar 5; 150B (2): 202-8.

Richard DM, Dawes MA, Mathias CW, Acheson A, Hill-Kapturczak N, Dougherty DM: L-Tryptophan: Basic metabolic functions, behavioural research and therapeutic indications. *International Journal of Tryptophan Research* 2009; 2 45-60.

Demisch K, Bauer J, Georgi K, Demisch L. Treatment of severe chronic insomnia with L-tryptophan: Results of a double blind cross-over study. *Pharmacopsychiatry.* 1987 Nov; 20 (6): 242-4.

Komer E, Bertha G, Flooh E, et al. Sleep inducing effect of L-tryptophane. *Er Neurol.* 1986 ; 25 (Supl 2): 107-13.

Gendall KA, Joyce PR. Meal induced changes in tryptophan:LNAAs ratio: effects on craving and binge eating. *Eat Beh* 2000; 1 (1): 53-62.

Brandacher G, Hoeller E, Fuchs D, Weiss HG. Chronic immune activation underlies morbid obesity: is IDO a key player. *Curr Drug Metab.* 2007; 8 (3): 289-95.

Breum L, Rasmussen MH, Hilsted J, Femstrom JD. Twenty-four-hour plasma tryptophan concentrations and ratio are below normal in obese subjects and are not normalised by substantial weight reduction. *Am J Clin Nutr.* 2003; 77 (5): 1112-8.

Porter RJ, Mulder RT, Joyce PR, Miller AL, Kennedy M. Tryptophan hydrolase gene (TPH1) and peripheral tryptophan level in depression. *J Affect Disord.* 1;109(1-2):209-12.

Almeida-Montes LG, Valles-Sanches V, Moreno-Aguilar J et al. Relation of serum cholesterol, lipid, serotonin and tryptophan levels to severity of depression and suicide attempts. *J Psychiatry Neurosci.* 2000 Sep; 25 (4): 371-7.

Fitzgerald P et al: tryptophan catabolism in females with irritable bowel syndrome: relationship to interferon gamma, severity of symptoms and psychiatric co-morbidity; *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 1291-7

Hideki Miura et al: A link between stress and depression: Shifts in the balance between the kynurenine and serotonin pathways of tryptophan metabolism and the etiology and pathophysiology of depression; *Stress*, Volume 11, Issue 3 2008, 198-209.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.
- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zu Forschungszwecken eingesetzt werden.
- Die Reagenzien sollten nach Ablauf des angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden (Haltbarkeitsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen sollten nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die dafür erstellten Richtlinien für medizinische Laboratorien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Pipettivolumina der verschiedenen Komponenten und der Aufbereitung der Proben wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immunodiagnostik AG übernimmt für direkt daraus resultierende Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



Nur für Forschungszwecke



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Manual

Tryptophan ELISA Kit

*For the determination of Tryptophan in human EDTA-plasma,
serum and urine*

For research use only

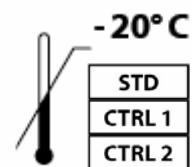
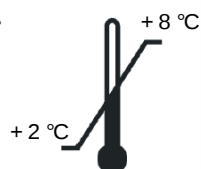
Valid from 17.03.2010



K 7730



96



1. INTENDED USE

The Tryptophan ELISA Kit is intended for the quantitative determination of Tryptophan in human EDTA-plasma, serum and urine. It is for research use only.

2. INTRODUCTION

Tryptophan is an essential amino acid, which can not be synthesised by humans and, therefore, must be obtained from diet. Tryptophan plays an important role in the synthesis of serotonin, as it is the only source for synthesizing serotonin (see figure 1).

Serotonin itself is released from the appendices of a widespread transmitter system with global modulating effects on different areas of life. The activity of this system depends not least on the actual tryptophan level. In some disease patterns a tryptophan deficiency is found, which is induced by an activation of the enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). The activation of IDO causes shifting the metabolism of tryptophan to the kynurenine pathway and its degradation (see figure 1).

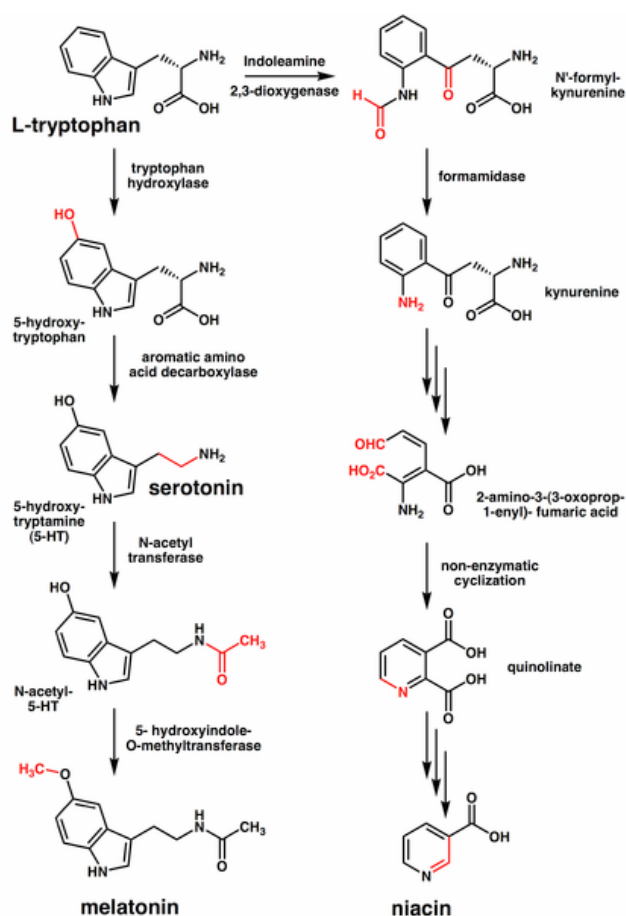


Figure 1: Synthesis of serotonin and melatonin via tryptophan (left) and shifting the metabolism of tryptophan to the kynurenine-pathway via the enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (right)

As a consequence of that, the tryptophan level in plasma is reduced; it is not available for serotonin synthesis and in the following, for the melatonin production. As a result, fluctuations of mood, aggression, sleep and eating disorder or depression can occur.

In recent years, an increasing number of disease patterns has been detected, in which either the tryptophan level is significantly lowered due to the activation of IDO or for other reasons, or which show an adverse ratio of tryptophan-to-kynurenine levels. In the former case, the tryptophan deficiency is associated with an increase in inflammation markers. Some indications are mentioned in the following:

- In case of **irritable bowel syndrome** (IBS) interferone-gamma activates the enzyme IDO, causing a tryptophan deficiency,
- In **obese patients**, inflammation markers, which show a chronic activation of the immune system, are increased as well. IDO is also activated here, and the plasma tryptophan levels are low,
- **Stress** activates IDO likewise and facilitates the degradation of tryptophan *via* the kynurenine pathway.

In addition, gastrointestinal dysfunctions like **fructose intolerance** are associated with difficulties in absorbing tryptophan from the gut.

In all these disease patterns fluctuation of mood, sleep and eating disorder or depression are known.

The symptoms of these diseases can be eased by administration of tryptophan. However, such a treatment requires the knowledge of the tryptophan level, which can be determined appropriately with the now available test.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This assay is based on the method of competitive enzyme linked immunoassays. The sample preparation includes the addition of a derivatization-reagent for tryptophan coupling. Afterwards, the treated samples and the polyclonal tryptophan-antiserum are incubated in wells of microplate coated with a tryptophan-derivative (tracer). During the incubation period, the target tryptophan in the sample competes with the tracer immobilized on the wall of the microtiter wells for the binding of the polyclonal antibodies. The tryptophan in the sample displaces the antibodies out of the binding to the tracer. Therefore the concentration of the tracer-bound antibody is inverse proportional to the tryptophan concentration in the sample. During the second incubation step, a peroxidase-conjugated antibody is added to each microtiter well to detect

the anti-tryptophan antibodies. After washing away the unbound components, tetramethylbenzidine (TMB) is added as a peroxidase substrate. Finally, the enzymatic reaction is terminated by an acidic stop solution. The color changes from blue to yellow and the absorbance is measured in the photometer at 450 nm. The intensity of the yellow color is inverse proportional to the tryptophan concentration in the sample; this means, high tryptophan concentration in the sample reduces the concentration of tracer-bound antibodies and lowers the photometric signal.

A dose response curve of absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from the standard. Tryptophan present in the patient samples is determined directly from this curve.

4. MATERIAL SUPPLIED

Catalog No	Content	Kit Components	Quantity
K7730MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K7730ST	STD	Standards	6 x 1 vial
K7730KO	CTRL 1 CTRL 2	Controls	2 x 1 vial
K7730WP	WASHBUF	Wash buffer concentrate (10 fold)	2 x 100 ml
K7730AK	AB	Anti-tryptophan antibody (lyophilized)	2 x 1 vial
K7730K	2.AB	POD antibody (concentrate)	120 µl
K7730CSP	2.ABDIL	Conjugate stabilizing buffer	24 ml
K7730RP	DERBUF	Reaction buffer	25 ml
K7730DR	DER	Derivatization reagent	2 x 6 mg
K7730LM	DMSO	Dimethylsulfoxide (DMSO)	2 ml
K7730SL	ASYBUF	Assay buffer concentrate (10-fold)	11 ml
K7730TMB	SUB	TMB substrate	25 ml
K7730AC	STOP	Stop solution	15 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidist.)
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000 μl
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 10000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 nm
(reference wave length 620 or 690 nm)

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 2 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 μl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **Wash buffer concentrate (WASHBUF)** should be diluted with aqua bidist. **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidist.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or at 37°C using a water bath before dilution of the buffer solutions. The **WASHBUF** is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month**.
- **Standards (STD) and Controls (CTRL1, CTRL2)** are already diluted in the **reaction buffer (DERBUF)**. Store Standards and controls frozen at -20°C, thaw before use in the test, and re-freeze immediately after use. Standards and Controls can be re-frozen up to 3 times.
- **DMSO** could crystallize at 4°C. Dissolve the crystals at 20-25°C in a water bath.
- The **Assay buffer (ASYBUF)** should be diluted with aqua bidest. before use (11 ml concentrate + 100 ml aqua bidest.), mix well.

- The content of one vial of **derivatization reagent (DER) (6 mg)** must be dissolved in **0,75 ml DMSO**. Put the vial on a horizontal shaker for 5 min. After use, the rest of the reagent should be discarded. DER must be **prepared immediately before use**. The ELISA kit can be separated into two performances by the two DER vials. Please note: **DMSO attacks all plastics but not polypropylene products and laboratory glass**.
- The **anti-tryptophan antibody (AB)** must be dissolved in **8 ml of diluted assay buffer**. The ELISA kit can be separated into two performances by the two AB vials. **Diluted anti-tryptophan antibody is stable over a longer period. It can be stored at 2-8°C for 4 weeks**.
- The **POD antibody (2.AB)** must be diluted **1:200** in **conjugate stabilizing buffer (2.ABDIL)** (110 µl 2.AB + 22 ml 2.ABDIL). The undiluted POD antibody (2.AB) is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. **Diluted POD antibody (2.AB) is not stable over a longer period. It can be stored at 2-8°C for only 5 days**.
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at 2-8°C.

7. PRECAUTIONS

- For research use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV and Hepatitis B. However, for safety reasons, all kit components should be treated as if potentially infectious.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

EDTA-plasma, serum and urine

- Venous fasting blood and urine are suited for this test system. Blood samples are stable for one week at 2-8°C. Urine samples should be sent cooled, but they are stable for 24 h at room temperature. Otherwise they are stable for two days at 2-8°C. For longer storage, blood- and urine samples should be frozen at -20°C up to the measurement.
- Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results and should not be used for analysis.

- The **EDTA-plasma-, serum- and urine** samples are analyzed without any dilution.*

*If the sample volume is less than 50 µl, a 1:1 dilution in DERBUF (reaction buffer) is recommended (25 µl sample + 25 µl DERBUF). This dilution factor should be considered for data evaluation.

Samples with visible amounts of **precipitates** should be **centrifuged** at least for 5 min at 10000 x g. The resulting supernatant is used in the assay.

- For sample preparation, a DER for coupling of tryptophan is added (details are given in the sample preparation procedure).

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the test results. Immundiagnostik AG can therefore not be held reliable for any damage resulting from this.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

Sample preparation procedure

Samples need to be diluted in DERBUF (reaction buffer) by factor **1 + 10**. Therefore, 50 µl of sample should be diluted with 500 µl of DERBUF (reaction buffer).

Coupling of standards (STD), controls (CTRL) and samples (SAMPLE) is carried out in single analysis.

1.	Bring all reagents and samples to room temperature (18-26°C)
2.	Add 100 µl of ready to use standards (STD) , 100 µl of ready to use controls (CTRL) and 100 µl of diluted samples (SAMPLE) in the corresponding vial
3.	Add 25 µl of freshly prepared derivatization reagent (DER) into each vial (standards, controls and samples), mix well and incubate for 60 min on a shaker (180-240 rpm) at room temperature (18-26°C)

4. Afterwards add **1800 µl of diluted assay buffer** into each vial, mix well and incubate for **60 min on a shaker (180-240 rpm) at room temperature (18-26°C)**

2 x 50 µl of each treated sample (STD, CTRL, SAMPLE) are used in the ELISA in duplicate.

Test procedure

5. Mark the positions of **standards (STD)/controls (CTRL)/ samples (SAMPLE)** in duplicate on a protocol sheet
6. Take as many microtiter strips (PLATE) as needed from kit. Store unused strips covered at 2-8°C. Strips are stable until the expiry date stated on the label
7. Wash each well **5 times** by dispensing **250 µl of diluted wash buffer** into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate (PLATE) should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution
8. For the analysis in duplicate, take **2 x 50 µl of standard (STD)/control (CTRL)/samples (SAMPLE)** out of the vial and add into the respective well of the microtiter plate (PLATE)
9. Add **150 µl diluted anti-tryptophan antibody (AB)** into each well. Cover the plate tightly
10. Incubate overnight **(15-20 hours) at 2-8°C**
11. Aspirate the contents of each well. Wash each well **5 times** by dispensing **250 µl of diluted wash buffer** into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate (PLATE) should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution

12.	Add 200 µl diluted POD antibody (2. AB) into each well
13.	Cover plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) on a horizontal shaker (180-240 rpm)
14.	Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate (PLATE) should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution
15.	Add 200 µl of TMB substrate (SUB) into each well
16.	Incubate for 8-12 min at room temperature (18-26°C) in the dark*
17.	Add 100 µl of stop solution (STOP) into each well, mix thoroughly
18.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference

*The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend to observe the color change and to stop the reaction upon good differentiation.

10. EVALUATION OF RESULTS

If the test is performed in strict compliance with the manufacturer's instructions, e.g. with the exact volumes for standards, controls and samples/sample treatment, standards, controls and samples are equally diluted. Therefore, **no dilution factor is required for calculation of the results.** **

**At a 1:1 dilution, the dilution factor should be considered.

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the "4-parameter-algorithm".

1. 4-parameter-algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

2. Point-to-point-calculation

We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for concentration.

3. Spline-algorithm

We recommend a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

Expected values

Based on internal studies of evidently healthy persons (**n=40**) a mean value of 54 µmol/l was estimated. The standard variation was 12 µmol/l.

Normal range: Serum/Plasma mean value ± 2 standard variation: 54 ± 24 µmol/l

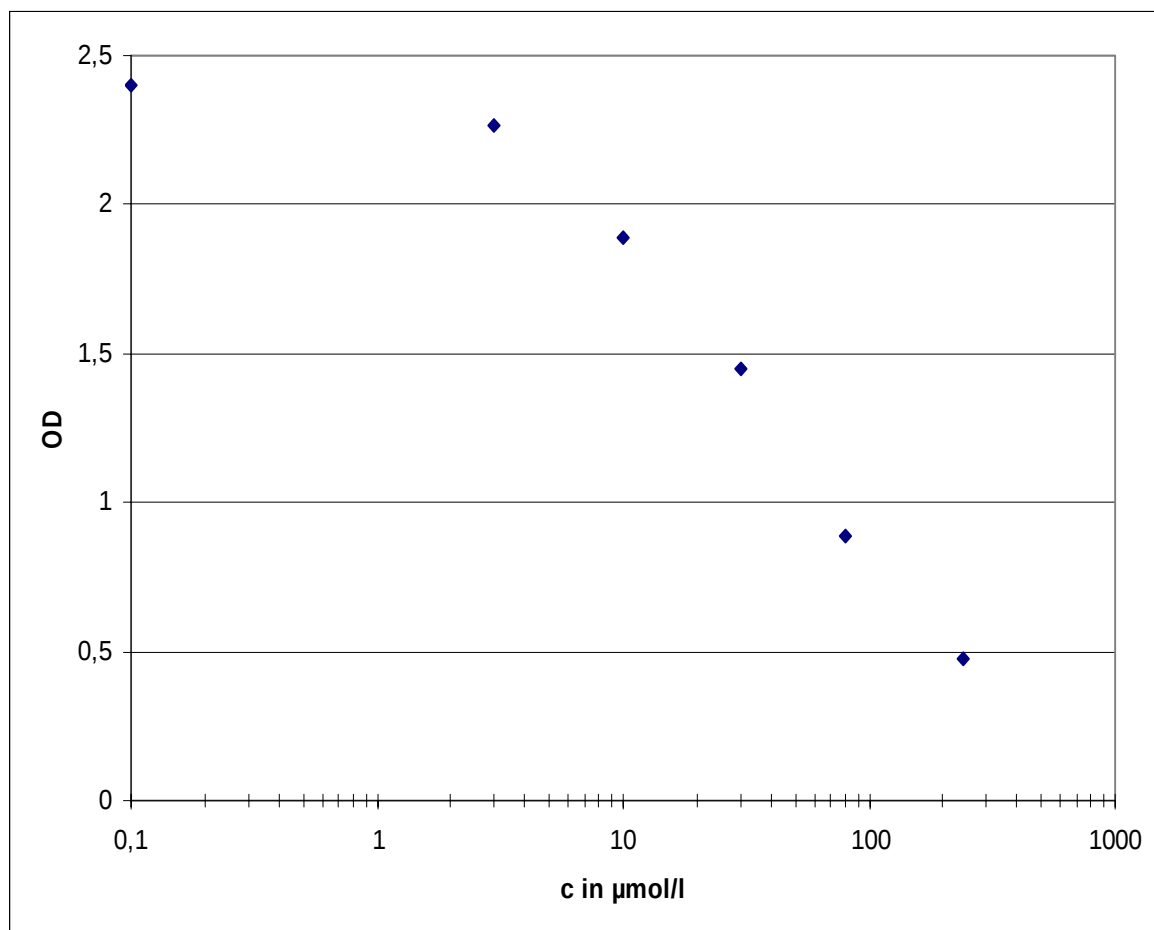
We recommend each laboratory to develop its own normal range. The values mentioned above are only for orientation and can deviate from other published data.

Controls

Control samples or serum pools should be analyzed with each run. Results, generated from the analysis of the control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid, if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

The concentration of controls and patient samples can be determined directly from calibration curve. In the following an example of a calibration curve is given.

Example of calibration curve



11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Cross reactivity

5-HTP (5-Hydroxy-Tryptophan)	< 0,5 %
L-Phenylalanine	< 0,1 %
L-Thyrosine	< 0,1 %

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n=12)		
Sample	Tryptophan [μmol/l]	Standard variation (SD)
1	17,7	11,4 %
2	56,7	4,1 %

Inter-Assay (n=6)		
Sample	Tryptophan [μmol/l]	Standard variation (SD)
1	19,4	6,9 %
2	59,1	4,0 %

Sensitivity

The sensitivity was set as $B_0 + 2SD$. The zero-standard was measured 6 times.

Sample	Tryptophan mean value [OD]	Standard variation (SD)	Detection limit [μmol/l]
0	2,3	0,05 %	7

Recovery

One sample was spiked with different tryptophan concentrations and measured using this assay. The analytical recovery rate was determined by the expected and measured tryptophan levels. The expected levels were calculated as the sum of the measured tryptophan concentration in the original sample and the spiked tryptophan amount. The mean recovery rate for all concentrations was 100.5 % (n=6).

Spike [μmol/l]	Tryptophan expected [μmol/l]	Tryptophan measured [μmol/l]	Recovery [%]
0	x	x=44,8	100,0
25	44,8+25=69,8	74,7	107,0
50	44,8+50=94,8	89,5	94,4

Linearity

The linearity of the ELISA was determined by the dilution of a spiked patient sample. The mean linearity was 99.8 %.

Dilution	Measured [μmol/l]	Expected [μmol/l]	Recovery [%]
original	44,8	44,8	100,0
1+1	22,5	22,4	100,4
1+3	11,1	11,2	99,1

12. LIMITATIONS

Strong hemolytic and lipemic samples often show wrong concentrations. Do not measure hemolytic and lipemic samples.

13. REFERENCES

Wilson ST, Stanley B, Brent DA, Oquendo MA, Huang YY, Mann JJ: The tryptophan hydrolase-1 A218C polymorphysmus is assoziated with diagnosis, but not suicidal behavior, in borderline personality disorder. *AM J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2009 Mar 5; 150B (2): 202-8.

Richard DM, Dawes MA, Mathias CW, Acheson A, Hill-Kapturczak N, Dougherty DM: L-Tryptophan: Basic metabolic functions, behavioural research and therapeutic indications. *International Journal of Tryptophan Research* 2009; 2 45-60.

Demisch K, Bauer J, Georgi K, Demisch L. Treatment of severe chronic insomnia with L-tryptophan: Results of a double blind cross-over study. *Pharmacopsychiatry.* 1987 Nov; 20 (6): 242-4.

Komer E, Bertha G, Flooh E, et al. Sleep inducing effect of L-tryptophane. *Er Neurol.* 1986 ; 25 (Suppl 2): 107-13.

Gendall KA, Joyce PR. Meal induced changes in tryptophan:LNAAs ratio: effects on craving and binge eating. *Eat Beh* 2000; 1 (1): 53-62.

Brandacher G, Hoeller E, Fuchs D, Weiss HG. Chronic immune activation underlies morbid obesity: is IDO a key player. *Curr Drug Metab.* 2007; 8 (3): 289-95.

Breum L, Rasmussen MH, Hilsted J, Femstrom JD. Twenty-four-hour plasma tryptophan concentrations and ratio are below normal in obese subjects and are not normalised by substantial weight reduction. *Am J Clin Nutr.* 2003; 77 (5): 1112-8.

Porter RJ, Mulder RT, Joyce PR, Miller AL, Kennedy M. Tryptophan hydrolase gene (TPH1) and peripheral tryptophan level in depression. *J Affect Disord.* 1;109(1-2):209-12.

Almeida-Montes LG, Valles-Sanches V, Moreno-Aguilar J et al. Realtion of serum cholesterin, lipid, serotonin and tryptophan levels to severity of depression and suicide attempts. *J Psychiatry Neurosci.* 2000 Sep; 25 (4): 371-7.

Fitzgerald P et al: tryptophan catabolism in females with irritable bowel syndrome: relationship to interferon gamma, severity of symptoms and psychiatric co-morbidity; *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 1291-7

Hideki Miura et al: A link between stress and depression: Shifts in the balance between the kynurenine and serotonin pathways of tryptophan metabolism and the etiology and pathophysiology of depression; *Stress*, Volume 11, Issue 3 2008, 198-209.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- Test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.
- All reagents in the test package are for research use only.
- Reagents should not be used after the date of expiry stated on the label.
- Single components with different lot numbers should not be mixed or exchanged.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



For research use only



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number