

Arbeitsanleitung / Manual

Glutamin Kit

Zur Bestimmung von Glutamin in humanem EDTA-Plasma und
Serum

Glutamine Kit

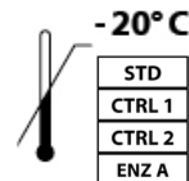
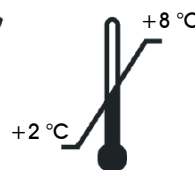
For the determination of glutamine in human EDTA plasma and
serum

Nur zu Forschungszwecken / For research use only

Gültig ab / Valid from 09.06.2010



K 7732



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 / Table of content	Seite /page
1. VERWENDUNGSZWECK	3
2. EINLEITUNG	3
3. TESTPRINZIP	4
4. INHALT DER TESTPACKUNG	5
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	5
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	6
7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	6
8. PROBENVORBEREITUNG	7
9. TESTDURCHFÜHRUNG	7
PIPETTIERSHEMA TESTDURCHFÜHRUNG	8
10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	10
ERWARTETE ERGEBNISSE	10
11. TESTCHARAKTERISTIKA	11
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	11
SENSITIVITÄT	12
WIEDERFINDUNG	12
LINEARITÄT	13
12. EINSCHRÄNKUNGEN	13
13. LITERATUR	13
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	13

1. INTENDED USE	16
2. INTRODUCTION	16
3. PRINCIPLE OF THE TEST	17
4. MATERIAL SUPPLIED	17
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	18
7. PRECAUTIONS	19
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	19
9. ASSAY PROCEDURE	19
TEST PROCEDURE	20
10. EVALUATION OF RESULTS	22
EXPECTED VALUES	22
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	23
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	23
SENSITIVITY	24
RECOVERY	24
LINEARITY	25
12. LIMITATIONS	25
13. REFERENCES	25
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	25

1. VERWENDUNGSZWECK

Dieser Enzym-Test ist für die Bestimmung von Glutamin in humanem EDTA-Plasma und Serum geeignet. Nur zu Forschungszwecken.

2. EINLEITUNG

Mit einem Mengenanteil von 20% ist Glutamin Hauptbestandteil des Pools an freien Aminosäuren im Blutplasma (500-900 $\mu\text{mol/l}$). Glutamin kommt in der höchsten Konzentration in den Muskelzellen (ca. 35 mmol/l) vor. Es ist unter anderem für die Wassereinlagerung in die Zelle verantwortlich und bewirkt bei körperlicher Belastung eine Vergrößerung des Zellvolumens, was als anaboles, die Proliferation unterstützendes Signal zu betrachten ist. Das heißt, die Protein- und Glykogenbildung wird gefördert. Hyperkatabole und hypermetabole Krankheitszustände gehen stets mit ausgeprägter Glutaminverarmung in der Muskulatur einher. Charakteristisch für die Reaktion auf ein Trauma oder eine Infektion ist die Reduktion von freiem Glutamin in der Muskulatur um etwa 50%. Dieser Verlust von intrazellulärem Glutamin wurde sowohl nach selektiven Operationen, Polytraumen und Verbrennungen als auch bei Infektionen und Pankreatitis unabhängig von der Ernährung festgestellt. Glutamin stellt nicht nur einen Baustein für die Proteinsynthese, sondern u. a. auch für die Zellen des Gastrointestinaltraktes (Enterozyten, Kolonozyten) ein wichtiges Energiesubstrat dar. Untersuchungen haben erbracht, dass alle sich schnell vermehrenden Zellen, hauptsächlich diejenigen des Immunsystems, strikt auf die Verfügbarkeit von Glutamin angewiesen sind. Das Organ, welches hauptsächlich Glutamin verbraucht, ist der Dünndarm. Interessant ist die Tatsache, dass die Morbidität nach Knochenmarktransplantationen mit Glutaminsupplementierung erniedrigt war. Das Auftreten von Infektionen, die Gesamtzahl und die Zahl der örtlich begrenzten mikrobiellen Besiedlung und die Dauer des Krankenhausaufenthaltes waren im Vergleich zu den Kontrollpatienten reduziert bzw. verkürzt. Als Praxistipp insbesondere im Bereich der kraftorientierten Hobbysportler gilt, dass Glutamin nicht nur anabol, sondern zusätzlich antikatabol wirke, indem es bei körperlicher Anstrengung den Abbau von Muskelgewebe hemmt. Ebenso verbessere sich die körperliche Regenerationsfähigkeit während des Schlafes. Einen stringenten wissenschaftlichen Nachweis für diese Wirkungsweise gibt es noch nicht.

Glutamin ist chemisch eng verwandt mit der exzitatorischen Aminosäure Glutaminsäure (häufig wird nur von der ionisierten Form, dem Glutamat, gesprochen), die als Neurotransmitter bei glutamatergen Synapsen im zentralen Nervensystem vorkommt. An diesen Synapsen wird ein Teil des Glutamats nach der Ausschüttung in den synaptischen Spalt in benachbarte Gliazellen aufgenommen. Um das aufgenommene Glutamat zurück in die präsynaptischen Neuronen zu transportieren, wird es in den Gliazellen in

Glutamin umgewandelt, da Glutamin keine exzitatorische Auswirkung auf die postsynaptische Membran aufweist. In den Neuronen wird Glutamin dann wieder in Glutamat umgewandelt.

Für die Zellkultur von vielen Tumorzellen ist Glutamin in hohem Überschuss notwendig. Wie bereits oben erwähnt hat das menschliche Blut eine Konzentration von 500-900 $\mu\text{mol/l}$ Glutamin, in der Zellkultur wird allerdings meist mit 2000-4000 $\mu\text{mol/l}$ gearbeitet. Das liegt daran, dass viele Arten von Tumorzellen wesentlich mehr Glutamin aufnehmen und verstoffwechseln als normale Körperzellen.

3. TESTPRINZIP

Es handelt sich bei dem vorliegenden Test um einen photometrischen Test zur Bestimmung von L-Glutamin in Flüssigkeiten über eine enzymatische Deaminierung von L-Glutamin und anschließender Dehydrierung von L-Glutamat, bei der NAD^+ zu NADH überführt wird.

Die Messung von L-Glutamin ist eine Reaktion in 2 Stufen:

- A) Deaminierung von L-Glutamin zu L-Glutamat, und
- B) Dehydrierung von L-Glutamat zu α -Ketoglutarat unter Reduktion von NAD^+ zu NADH . Diese Reaktion kann photometrisch bei 340 nm gemessen werden und ist proportional zum oxidierten Glutamat und damit auch zur Menge an Glutamin, was zu Glutamat umgesetzt worden ist.

In dem Test wird auf diese Weise (A und B) der Gesamt-Glutamat- und Glutamingehalt der Probe bestimmt. In einem zweiten Schritt wird der „natürliche“ Glutamatgehalt der Probe bestimmt (nur B). Der Glutamingehalt der Probe ergibt sich dann aus der Differenz dieser Werte.

Die D-Isomere werden von dem vorliegenden Test nicht detektiert.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K7732MTP	PLATE	Mikrotiterplatte	2 x 12 x 8 Vertiefungen
K7732ST	STD	Standards	2 x 1 Fläschchen
K7732KO	CTRL1 CTRL2	Kontrollen	2 x 1 Fläschchen
K7732SP	SAMPLEBUF	Probenpuffer	6 ml
K7732EA	ENZ A	Glutaminase	2 x 1 Fläschchen
K7732AP	ASYBUF	Assaypuffer	16 ml
K7732RP	REABUF	Reaktionspuffer	2 x 1 Fläschchen
K7732EB	ENZ B	Glutamat-Dehydrogenase	2 x 1 Fläschchen

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 10000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 340 nm
- Wärmeschrank 37°C

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.
- Die **Standards (STD)** und die **Kontrollen (CTRL)** sind lyophilisiert und werden in jeweils 300 µl bidestilliertem Wasser rekonstituiert. Nach Gebrauch können die Standards und die Kontrollen bei -20°C gelagert und bis zu 2 x wieder aufgetaut werden. Das Wiedereinfrieren der Standards und Kontrollen sollte sofort nach Entnahme erfolgen.
- Der Inhalt eines Fläschchens **Reaktionspuffer (REABUF)** wird vor Gebrauch in **3 ml bidestilliertem Wasser (aqua bidest.)** gelöst und gut gemischt. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen. Durch die Aufteilung des REABUF in 2 Gefäße ist der Enzymtest in zwei Ansätze teilbar.
- Der Inhalt eines Fläschchens **Glutaminase (ENZ A)** wird in **225 µl Probenpuffer (SAMPLEBUF)** und **1,3 ml bidestilliertem Wasser** gelöst und gut gemischt. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen. Durch die Aufteilung des ENZ A in 2 Gefäße ist der Enzymtest in zwei Ansätze teilbar.
- Der Inhalt eines Fläschchens **Glutamat-Dehydrogenase (ENZ B)** wird mit **2,6 ml Assaypuffer (ASYBUF)** aufgefüllt und gut gemischt. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen. Durch die Aufteilung des ENZ B in 2 Gefäße ist der Enzymtest in zwei Ansätze teilbar.
- 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.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

EDTA-Plasma und Serum

- Als Probe eignet sich venöses Nüchternblut. Die Haltbarkeit der frischen Probe ist sehr begrenzt, sie sollte bei 2-8°C gelagert und innerhalb 48 h gemessen werden. Zur längeren Lagerung sollte die Probe bei -20°C aufbewahrt werden.
- Lipämische und hämolytische Proben beeinflussen das Testergebnis und sollten nicht verwendet werden.
- Falls weniger als 50 µl Probe vorhanden ist, empfehlen wir eine 1:2 Verdünnung in SAMPLEBUF (Probenpuffer) (25 µl Probe + 25 µl SAMPLEBUF). 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.

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 Testdurchführung

A) Messung der Summe der Konzentrationen von Glutamin und Glutamat

1. Positionen für Standard /Kontrollen /Probe (STD/ CTRL/ SAMPLE) in Doppelbestimmung am Protokollblatt markieren.
2. Die benötigten Streifen der Mikrotiterplatte (PLATE) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterplattenstreifen können abgeklebt bei Raumtemperatur gelagert werden.
3. 2 x 50 µl Standards (STD)/ Kontrollen (CTRL)/ Proben (SAMPLE) werden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte (PLATE) pipettiert.
4. 50 µl Probenpuffer (SAMPLEBUF) pro verwendeter Vertiefung pipettieren.
5. 25 µl rekonstituierte Glutaminase (ENZ A) in jede verwendete Vertiefung geben. Streifen luftdicht abdecken.
6. 1 Stunde bei 37°C inkubieren.
7. 100 µl Assaypuffer (ASYBUF) in jede verwendete Vertiefung pipettieren.
8. 50 µl Reaktionspuffer (REABUF) in jede verwendete Vertiefung geben und die Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 340 nm messen (OD _{BLANK}).
9. 50 µl verdünnte Glutamat-Dehydrogenase (ENZ B) in alle verwendeten Vertiefungen pipettieren. Streifen luftdicht abdecken.
10. 15 min bei 37°C inkubieren.
11. Extinktion im Mikrotiterplattenphotometer bei 340 nm messen(OD _{SAMPLE}).
12. Die Auswertung der Rohdaten erfolgt wie unter Punkt 10 Auswertung beschrieben.

B) Messung der Konzentration von Glutamat

13.	Positionen für Standard /Kontrollen /Probe (STD/ CTRL/ SAMPLE) in Doppelbestimmung am Protokollblatt markieren.
14.	Die benötigten Streifen der Mikrotiterplatte (PLATE) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterplattenstreifen können abgeklebt bei Raumtemperatur gelagert werden.
15.	2 x 50 µl Standards (STD)/ Kontrollen (CTRL)/ Proben (SAMPLE) werden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte (PLATE) pipettiert.
16.	Jeweils 50 µl bidestilliertes Wasser in alle verwendeten Vertiefungen pipettieren.
17.	100 µl Assaypuffer (ASYBUF) in jede Vertiefung geben.
18.	50 µl Reaktionspuffer (REABUF) in jede Vertiefung geben und die Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 340 nm messen (OD _{BLANK}).
19.	50 µl Glutamat-Dehydrogenase (ENZ B) in alle Vertiefungen pipettieren. Streifen luftdicht abdecken.
20.	15 min bei 37°C inkubieren.
21.	Extinktion im Mikrotiterplattenphotometer bei 340 nm messen (OD _{SAMPLE}).
22.	Die Auswertung der Rohdaten erfolgt wie unter Punkt 10 Auswertung beschrieben.

10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

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

^{**}Bei einer 1:2 Verdünnung muss der Verdünnungsfaktor mit berechnet werden.

Die Konzentration an umgesetztem Glutamin zu Glutamat wird berechnet, indem die OD-Werte des Blank von den OD-Werten nach Enzymzugabe abgezogen werden.

Δ OD der Standards wird gegen die Standard-Konzentrationen (siehe QC-Datenblatt) in einem Diagramm aufgetragen. Mittels der erhaltenen Steigung werden die Glutamat-Konzentrationen berechnet:

$$\text{Glutamat} = \frac{(OD_{\text{Sample}} - OD_{\text{Blank}}) - \text{Achsenabschnitt}}{\text{Steigung}} \quad [\mu\text{mol/l}]$$

Von der erhaltenen Konzentration (Gesamt-Glutamin- und Glutamat-Konzentration, aus Pipettierschema A) wird anschließend die Konzentration aus der Glutamat-Messung (Pipettierschema B) abgezogen und man erhält die Konzentration an enthaltenem Glutamin in der Probe.

Erwartete Ergebnisse

Anhand einer laborinternen Studie mit Proben von augenscheinlich Gesunden (**n=24**) wurde ein Mittelwert von 510 $\mu\text{mol/l}$ ermittelt, bei einer Standardabweichung von 82 $\mu\text{mol/l}$.

Serum/Plasma-Mittelwert $\pm$ 2 Standardabweichungen: 510 $\pm$ 164 $\mu\text{mol/l}$

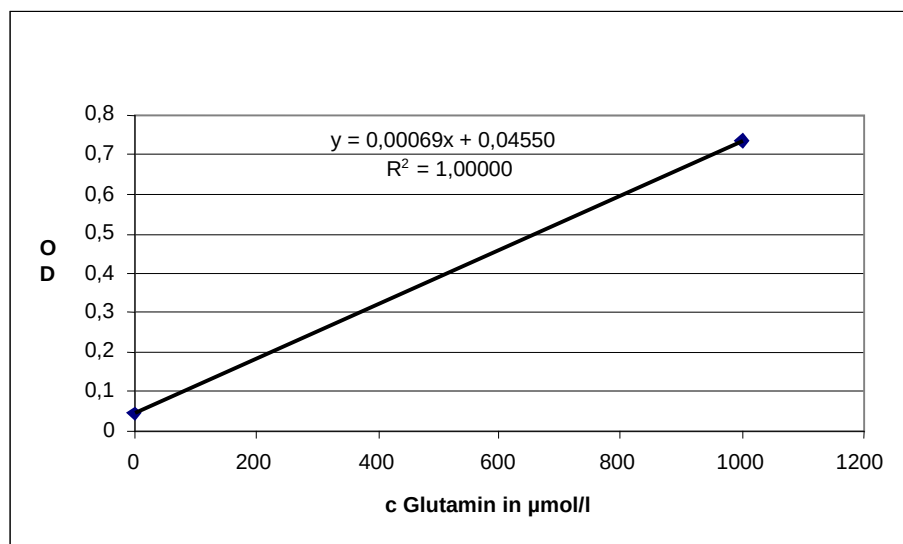
Wir empfehlen jedem Labor seinen eigenen Normalwerte-Bereich zu erstellen, weil Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Normalbereichs dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

Kontrollen

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

Die Konzentrationen der Kontrolle und der 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

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n=12)		
Probe	Glutamin [$\mu\text{mol/l}$]	Standardabweichung (SD) [%]
1	505,3	1,7
2	736,0	1,0

Inter-Assay (n=6)		
Probe	Glutamin [μmol/l]	Standardabweichung (SD) [%]
1	192,9	5,4
2	516,6	4,2

Sensitivität

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

Probe	Glutamin Mittelwert [OD]	2 Standard- abweichungen (2 x SD)[%]	Nachweis- grenze [μmol/l]
Standard Null	0,05	18,3	18,6

Wiederfindung

Unterschiedliche Mengen an Glutamin wurden zu einer Serumprobe gegeben (Spike) und anschließend im Test gemessen. Die analytische Wiederfindung von Glutamin 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 100,8 % (n=6).

Spike [μmol/l]	Glutamin erwartet [μmol/l]	Glutamin gemessen [μmol/l]	Wiederfindung [%]
0	X	x=346	100,0
150	346+150=496	493	99,4
250	346+250=596	614	103

Linearität

Die Linearität des Tests wurde durch Verdünnen einer aufgestockten Serumprobe bestimmt. Die mittlere Linearität betrug 104,6 %.

Verdünnung	Messwert [$\mu\text{mol/l}$]	Erwartet [$\mu\text{mol/l}$]	Wiederfindung [%]
original	346	346	100,0
1+1	183	173	105,8
1+3	94	87	108

12. EINSCHRÄNKUNGEN

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

13. LITERATUR

Coëffier M, Déchelotte P: Combined infusion of glutamine and arginine: does it make sense? Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2010 Jan; 13(1): 70-4

Agostini F, Biolo G: Effect of physical activity on glutamine metabolism. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2010 Jan; 13(1): 58-64

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 Immundiagnostik 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

Glutamine Kit

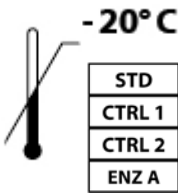
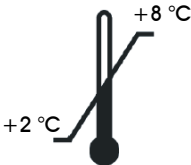
For the determination of glutamine in human EDTA plasma and serum

For research use only

Valid from 09.06.2010



K 7732



1. INTENDED USE

This enzyme test is intended for the determination of glutamine in human EDTA plasma and serum. It is for research use only.

2. INTRODUCTION

Glutamine is the most abundant free amino acid, with a concentration of about 500-900 $\mu\text{mol/l}$ in human blood. The most relevant glutamine-producing tissue is the muscle mass, accounting for about 90% of all glutamine synthesized. The most eager consumers of glutamine are the cells of intestines, the kidney cells for the acid base balance, activated immune cells and many cancer cells.

In catabolic states of injury and illness, glutamine becomes conditionally-essential (requiring intake from food or supplements). It is also known that glutamine has various effects in reducing healing time after operations. Clinical trials have revealed that providing parenteral nutrition regimes containing high amounts of glutamine to patients improve nitrogen balance, maintain the intracellular Gln pool, preserve intestinal permeability and absorption, and reduce hospital-stay times.

Glutamine is also marketed as a supplement used for muscle growth in weightlifting, bodybuilding, endurance, and other sports, yet there is still no scientific evidence of its "muscle-growing" properties. In biological research, L-glutamine is commonly added to the media in cell culture.

Glutamine is closely related to the excitatory amino acid glutamate. By the glutamate-glutamine cycle adequate supply of the neurotransmitter glutamate is maintained in the central nervous system: Glial cells release glutamine, which is then taken up into presynaptic terminals, metabolized into glutamate, and packaged into synaptic vesicles by the glutamate transporter VGLUT. Once the vesicle is released, glutamate is removed from the synaptic cleft by excitatory amino acid transporters (EAAT) into glial cells, where it is then converted into glutamine and transported out of the cells into the nerve terminal.

At GABAergic synapses, the cycle is called the GABA-glutamine cycle. Here the glutamine taken up by neurons is converted to glutamate, which is then metabolized into GABA. Upon release, GABA is taken up by glial cells via GABA transporters, metabolized in a series of steps back to glutamine via glutamate.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This assay is a photometric test intended for the determination of L-glutamine. In this test L-glutamine is enzymatically deaminated to L-glutamate, which subsequently is dehydrated by transforming NAD^+ to NADH.

The measurement of L-glutamine is a two-step reaction:

- A) Deamination of L-glutamine to L-glutamate, and
- B) Dehydration of L-glutamate to α -ketoglutarate by reducing NAD^+ to NADH. This reaction can be measured at 340 nm. It is proportional to the amount of oxidized L-glutamate, and therefore also to the amount of L-glutamine which has been transformed to glutamate.

In this way the assay measures total glutamine/glutamate content of the sample (step A and B). Measuring subsequently the natural glutamate content of the sample (only step B) allows calculation of original glutamine content of the sample

D-isomers are not detected by this assay.

4. MATERIAL SUPPLIED

Catalog No	Content	Kit Components	Quantity
K7732MTP	PLATE	Microtiter plate	2 x 12 x 8 wells
K7732ST	STD	Standards	2 x 1 vial
K7732KO	CTRL 1 CTRL 2	Controls	2 x 1 vial
K7732SP	SAMPLEBUF	Sample buffer	6 ml
K7732EA	ENZ A	Glutaminase	2 x 1 vial
K7732AP	ASYBUF	Assay buffer	16 ml
K7732RP	REABUF	Reaction buffer	2 x 1 vial
K7732EB	ENZ B	Glutamate dehydrogenase	2 x 1 vial

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Double distilled water (bidest. water)
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000 µl
- Foil to cover the microtiter plate
- 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 340 nm
- Incubator 37°C

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.
- **Standards (STD) and controls (CTRL1, CTRL2)** are lyophilized and must be reconstituted in **300 µl bidest. water**. After use standards and controls can be stored at -20°C and can be re-frozen up to 2 times. Re-freeze immediately after use.
- The content of one vial of **reaction buffer (REABUF)** must be dissolved in **3 ml bidest. water**, mix well. Discard any remaining quantity after use. By providing two REABUF vials the kit can be separated into two performances.
- The content of one vial of **glutaminase (ENZ A)** must be dissolved in **225 µl reaction buffer (SAMPLEBUF) and 1.3 ml bidest. water**, mix well. Discard any remaining quantity after use. By providing two ENZ A vials the kit can be separated into two performances.
- To the content of one vial of **glutamate dehydrogenase (ENZ B) 2.6 ml assay buffer (ASYBUF)** must be added, mix well. Discard any remaining quantity after use. By providing two ENZ B vials the kit can be separated into two performances.
- All other test reagents are stable until date of expiry (see label) when stored at 2-8°C.

7. PRECAUTIONS

- For research use only.
- Reagents should not be used beyond the expiry date shown on kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

EDTA plasma and serum

- Venous fasting blood is suited for this test system. As stability of fresh blood samples is very limited, they should be stored at 2-8°C and measured within 48 h. For longer storage samples should be stored frozen at -20°C.
- Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results and should not be used for analysis.
- If less than 50 µl of sample is provided we recommend diluting the sample 1:2 in SAMPLEBUF (25 µl sample + 25 µl SAMPLEBUF). This dilution factor must be considered in 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.

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.

Test procedure

A) Total concentration of Glutamine and Glutamate

1.	Mark the positions of standards (STD)/ controls (CTRL)/ samples (SAMPLE) in duplicate on a protocol sheet
2.	Take as many microtiter strips (PLATE) as needed from kit. Store unused strips covered at room temperature.
3.	Add 2 x 50 µl of standards (STD)/ controls (CTRL)/ samples (SAMPLE) into the respective well of the microtiter plate (PLATE)
4.	Add 50 µl of assay buffer (ASYBUF) into each well.
5.	Add 25 µl of reconstituted glutamines (ENZ A) into each well. Cover the plate tightly
6.	Incubate at 37°C for 1 hour .
7.	Add 100 µl assay buffer (ASYBUF) into each well
8.	Add 50 µl reaction buffer (REABUF) into each well, and determine absorption immediately with an ELISA reader at 340 nm (OD _{BLANK}).
9.	Add 50 µl diluted glutamate dehydrogenase (ENZ B) into each well. Cover plate tightly.
10.	Incubate at 37°C for 15 minutes .
11.	Determine absorption at 340 nm (OD _{SAMPLE}).
12.	For analysis of obtained data see chapter 10 “evaluation of results”.

B) Determination of Glutamate

13.	Mark the positions of standards (STD)/controls (CTRL)/ samples (SAMPLE) in duplicate on a protocol sheet
14.	Take as many microtiter strips (PLATE) as needed from kit. Store unused strips covered at room temperature.
15.	Add 2 x 50 µl of standards (STD) / controls (CTRL) / samples (SAMPLE) into the respective well of the microtiter plate (PLATE)
16.	Add 50 µl of bidest. water into each well.
17.	Add 100 µl assay buffer (ASYBUF) into each well
18.	Add 50 µl reaction buffer (REABUF) into each well, and determine absorption immediately with an ELISA reader at 340 nm (OD _{BLANK}).
19.	Add 50 µl diluted glutamate dehydrogenase (ENZ B) into each well. Cover plate tightly.
20.	Incubate at 37°C for 15 minutes .
21.	Determine absorption at 340 nm (OD _{SAMPLE}).
22.	For analysis of obtained data see chapter 10 “evaluation of results”.

10. EVALUATION OF RESULTS

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

**If samples are diluted 1:2, the results must be multiplied by 2.

For calculation of results subtract OD values of the blank (OD_{BLANK}) from OD values after the addition of enzyme (OD_{SAMPLE}).

To generate a standard curve ΔOD of the standards are plotted against the standard concentrations (see quality control protocol). With the obtained slope and y-intercept glutamate concentrations of the samples can be calculated:

$$\text{glutamate concentration} = \frac{(OD_{\text{Sample}} - OD_{\text{Blank}}) - \text{intercept}}{\text{slope}} [\mu\text{mol/l}]$$

Subsequently, from the total glutamine/glutamate concentration of the sample (see test procedure A), the glutamate concentration of the sample (see test procedure B) is subtracted, which gives the original concentration of glutamine in the sample.

Expected values

Based on internal studies with serum samples of evidently healthy persons (**n=24**) a mean value of 510 $\mu\text{mol/l}$ was estimated. The standard variation was 82 $\mu\text{mol/l}$.

Normal range: mean value $\pm$ 2 $\times$ standard variation: 510 $\pm$ 164 $\mu\text{mol/l}$

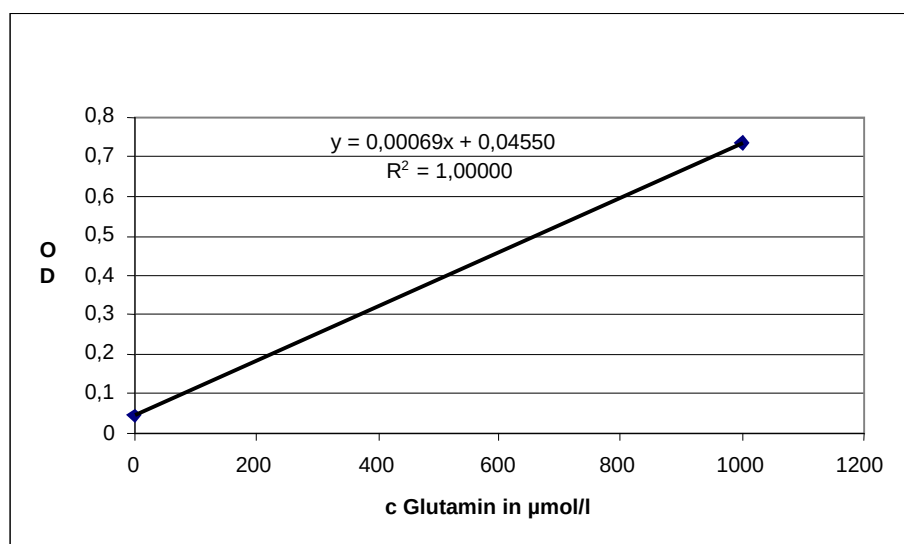
We recommend each laboratory to develop its own normal range. The values mentioned above are only for orientation and can deviate from other published data.

Controls

Control samples should be analyzed with each run. Results generated from the analysis of 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 samples are outside the acceptable limits.

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

Example of calibration curve



11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n=12)		
Sample	Glutamine [µmol/l]	Standard variation (SD) [%]
1	505,3	1,7
2	736,0	1,0

Inter-Assay (n=6)		
Sample	Glutamine [μmol/l]	Standard variation (SD) [%]
1	192,9	5,4
2	516,6	4,2

Sensitivity

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

Sample	Glutamine mean value [OD]	2 x Standard variation (2 x SD) [%]	Detection limit [μmol/l]
0	0,05	18,3	18,6

Recovery

One sample was spiked with different glutamine concentrations and measured in this assay. The analytical recovery rate was determined by the expected and measured glutamine levels. The expected levels were calculated as the sum of the measured glutamine concentration in the original sample and the spiked glutamine amount. The mean recovery rate for all concentrations was 100,8 % (n=6).

Spike [μmol/l]	Glutamine expected [μmol/l]	Glutamine measured [μmol/l]	Recovery [%]
0	x	x=346	100,0
150	346+150=496	493	99,4
250	346+250=596	614	103

Linearity

Linearity of the test was determined by diluting a spiked patient sample. The mean linearity was 104,6 %.

Dilution	Measured [μmol/l]	Expected [μmol/l]	Recovery [%]
original	346	346	100,0
1+1	183	173	105,8
1+3	94	87	108,0

12. LIMITATIONS

Hemolytic and lipemic samples may give erroneous results. Do not measure hemolytic and lipemic samples.

13. REFERENCES

Coëffier M, Déchelotte P: Combined infusion of glutamine and arginine: does it make sense? Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2010 Jan; 13(1): 70-4

Agostini F, Biolo G: Effect of physical activity on glutamine metabolism. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2010 Jan; 13(1): 58-64

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.
- The 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