

Arbeitsanleitung/Manual

Nitrotyrosin ELISA

Zur in vitro Bestimmung von Nitrotyrosin in humanem Probenmaterial, z.B. Stuhl

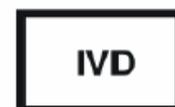
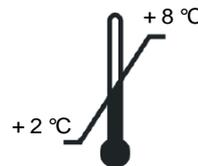
Nitrotyrosine ELISA

For the in vitro determination of Nitrotyrosine in human sample material, e.g. stool

Gültig ab/valid from 23.10.2009



K 7824



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

Inhalt / Content

1. Deutsch
2. English

Weitere Informationen zu unseren Produkten finden Sie auf unserer
Homepage

Additional information about our products is available on our homepage

www.immundiagnostik.com

1. VERWENDUNGSZWECK

Dieser ELISA Test ist für die Bestimmung von Nitrotyrosin in humanem Probenmaterial, z.B. Stuhl. Zur *in vitro* Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Nitrotyrosin ist die nitrierte Form der Aminosäure Tyrosin. Proteingebundene Nitrotyrosine sind bei kardiovaskulären und inflammatorischen Krankheiten in der Zirkulation erhöht (z. B. Atherosklerose, Myokardinfarkt, Diabetische Vaskulopathie, Bluthochdruck oder koronare Herzkrankheit).

Auch neurologische Erkrankungen werden in einen Zusammenhang mit erhöhten Nitrotyrosinwerten gebracht (z. B. Alzheimer Krankheit, Multiple Sklerose)

Im Rahmen von Entzündungsreaktionen werden aus L-Arginin große Mengen Stickstoffmonoxid (NO) lokal durch das Enzym NO-Synthase (NOS) freigesetzt. Weitere Ursachen für die vermehrte NO-Bildung sind Fremdstoffexpositionen (Chemikalien, Schwermetalle), Medikamente, Nikotin, physischer und psychischer Stress und eine starke körperliche Belastung mit erhöhtem Sauerstoffverbrauch.

Stickstoffmonoxid (NO) in hohen Konzentrationen, welches nicht mehr ausreichend von der mitochondrialen Superoxiddismutase (MN-SOD) abgefangen wird, reagiert mit einem Sauerstoffradikal ($O_2^{\cdot -}$) schließlich zu Peroxynitrit.

Peroxynitrit besitzt eine starke Affinität zu aromatischen Aminosäuren. Es reagiert mit dem Phenolring des Tyrosins zu Nitrotyrosin. Proteingebundenes Nitrotyrosin ist ein stabiles Endprodukt mit einer relativ langen Halbwertszeit *in vivo* und stellt somit einen geeigneten Marker für nitrosativen Stress dar.

Mit dem Sandwich-ELISA wird proteingebundenes Nitrotyrosin detektiert.

Indikationen

- Kardiovaskuläre Erkrankungen
- Neuronale Erkrankungen
- Schilddrüsenfunktionsstörungen
- Stoffwechselblockaden
- Mitochondropathie

Biochemische Folgen von nitrosativem Stress

- Lipid- und Proteinmodifizierung (z. B. von Strukturproteinen in Mitochondrien)
- Hemmung von Atmungskettenenzymen in den Mitochondrien
- Glutamatüberladung
- Inonenkanal-Störung
- Kalzium-Überladung
- Mitochondriopathie
- Aktivierung von Apoptoseprozessen

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 7824MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 7824WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	1 x 100 ml
K 7824K	CONJ	POD-Antikörper (Konzentrat)	1 x 150 µl
K 7824ST	STDKONZ	Standard (Konzentrat)	1 x 240 µl
K 7824AP	ASYBUF	Assaypuffer	1 x 50 ml
K 7824KO1	CTRL POS	Positivkontrolle	4 x 250 µl
K 7824KO2	CTRL NEG	Negativkontrolle	4 x 250 µl
K 7824TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 7824AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Laborübliche Reaktionsgefäße aus Polypropylen (1.5 ml)
- Laborübliches Reaktionsgefäß (15 ml)
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Vortex-Mixer
- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Reagenzien mit einem Volumen kleiner als 100 µl sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- Der **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) 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 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 Kontrollen (**CTRL POS und CTRL NEG**) werden mit 500 µl **ASYBUF** rekonstituiert und ohne weitere Verdünnung in den Test eingesetzt.
- Das **CONJ** (POD-Antikörper) wird **1:100** in verdünntem Waschpuffer verdünnt. Es sollte für jeden Testansatz frisch angesetzt und unmittelbar verwendet werden. Reste der Verdünnung sind zu verwerfen.
- Für Standard 1 **50 µl STD Konz** (Standardstocklösung) in 450 µl **ASYBUF** verdünnen. Dies entspricht einer Standardkonzentration von 1250 nM Nitrotyrosin.

Mit Hilfe des folgenden Pipetierschemas wird eine **1 : 2.5** Standardverdünnungsreihe angefertigt.

Standard 1 : 1250 nM	50 µl STD Konz (Standardstock) + 450 µl ASYBUF
Standard 2 : 500 nM	200 µl Standard 1 + 300 µl ASYBUF
Standard 3 : 200 nM	200 µl Standard 2 + 300 µl ASYBUF
Standard 4 : 80 nM	200 µl Standard 3 + 300 µl ASYBUF
Standard 5 : 32 nM	200 µl Standard 4 + 300 µl ASYBUF
Standard 6 : 0 nM	200 µl ASYBUF

Wichtig: Es ist darauf zu achten, dass zur Verdünnung Behältnisse aus Polypropylen verwendet werden.

Die Standardkurve sollte für jeden Testansatz frisch angesetzt und unmittelbar verwendet werden. Reste der Verdünnung sind zu verwerfen.

- Alle anderen Testreagenzien sind bei 2-8 °C zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG

Flüssige Proben werden mit ASYBUF (Assaypuffer) entsprechend verdünnt, wobei die optimalen Verdünnungen auszutesten sind. Wir empfehlen alle Proben mindestens 1:5 zu verdünnen.

Serum, Plasma: 1:5 in ASYBUF (Assaypuffer)

Stuhlprobenextraktion

Der Assaypuffer wird als Probenextraktionspuffer verwendet. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

1. Es wird ein Stuhlaufarbeitungssystem (z. B. Probenvorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics/Mannheim (Best. Nr. 754 804)) verwendet, das 100 mg dosiert. In diesem Stuhlaufarbeitungssystem wird die Stuhlprobe in 5 ml ASYBUF (Assaypuffer) suspendiert. Dies entspricht einem Verdünnungsfaktor von 1:50
2. Anschließend wird die Stuhlprobe mit dem Puffer gut gemischt (z. B. Vortexer für mindestens 30 sec., je nach Stuhlkonsistenz).
3. Danach wird ca. 1 ml von der Suspension in ein verschließbares Einweggefäß (z. B. von Eppendorf) überführt und ca. 5 Min bei 13000 rpm zentrifugiert.

Die Stuhlprobensuspension ist nicht haltbar. Wir empfehlen für jeden Ansatz die Probe frisch einzuwiegen.

Der Überstand nach der Zentrifugation wird mit ASYBUF (Assaypuffer) entsprechend weiter verdünnt. Wir empfehlen eine weitere Verdünnung von 1:2 bis 1:10, was einer **Endverdünnung der Stuhlprobe von 1:100 – 1:500** entspricht.

100 µl dieser Endverdünnung werden im Test eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf der "Sandwich"-ELISA Technik. Es werden polyklonale Antikörper, die gegen nitrierte Proteine generiert wurden, verwendet.

Standards, Kontrollen und verdünnte Patientenproben, die auf Nitrotyrosin zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem polyklonalen Kaninchen anti-Nitrotyrosin Antikörper beschichtet sind. In diesem ersten Inkubationsschritt werden nitrierte Proteine aus der Probe von dem Primärantikörper an die Mikrotiterplatte gebunden. Dann wird das Konjugat, ein Peroxidase-markierter Kaninchen anti-Nitrotyrosin Antikörper, zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte:

Primärantikörper – nitriertes Protein – Peroxidase-Konjugat.

Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. 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 dem Nitrotyrosin-Gehalt direkt proportional. Parallel dazu wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

Pipettierschema

- | |
|--|
| 1. Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen |
| 2. Die Positionen für STD (Standard), CTRL POS (Positivkontrolle), CTRL NEG (Negativkontrolle) und SAMPLE (Probe) im Protokollblatt markieren |
| 3. Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden |
| 4. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen |

5. Für eine Doppelbestimmung werden 2x je 100 µl der vorbereiteten STD (Standard), CTRL POS (Positivkontrolle), CTRL NEG (Negativkontrolle) und SAMPLE (Probe) in MTP (Mikrotiterplatte) pipettiert
6. Streifen abdecken und 2.5 Stunden bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren
7. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
8. 100 µl verdünntes CONJ (POD-Antikörper) in alle Vertiefungen pipettieren
9. Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren
10. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
11. 100 µl SUB (TMB- Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren
12. 10-20 min bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren.
13. 100 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren und im Mikrotiterplattenphotometer im Schüttelmodus mischen
14. Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gelesen. 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.

8. ERGEBNISSE

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 z. B. 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.

Proben

Die ermittelte Nitrotyrosin Konzentration wird mit dem entsprechendem Verdünnungsfaktor multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu erhalten.

Kontrollen

Die Nitrotyrosin Konzentration wird direkt anhand der Standardkurve ausgewertet. Der Kontrollbereich ist der mitgeführten Spezifikation zu entnehmen.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit hohen Nitrotyrosin Konzentrationen, die **außerhalb der Standardkurve** liegen, werden mit ASYBUF (Assaypuffer) stärker verdünnt und nochmals analysiert.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen Kontrollen bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen einer oder mehrere Werte außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Werte nicht gewährleisten.

Erwartete Ergebnisse

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Sensitivität

Nachweisgrenze: 34,1 nM

Gemessen wurde 8 mal der Standard 0, ($B_0 + 3SD$).

Kreuzreaktivität

Albumin behandelt mit Nitrierungsreagenz: 100 %

Albumin unbehandelt: < 0,1 %

12. VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten Natriumazid oder Thimerosal zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien sollte vermieden werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in vitro* Diagnostik verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurück zu senden.

15. LITERATUR

Gonsette RE (2008) Neurodegeneration in multiple sclerosis : The role of oxidative stress and excitotoxicity. J Neurol Sci, Vol 274, Issue 1-2, 48-53

Ischiropoulos H (2008) Protein tyrosine nitration – An update. Arch Biochem Biophys Oct 30

Peluffe G, Radi R (2007) Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. Cardiovasc Res. Jul 15 : 75(2) :291-302

Souza JM et al. (2008) Protein tyrosine nitration- functional alteration or just a biomarker ? Free Radic Biol Med. Aug 15 ; 45 (4) :357-356

Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Hersteller		Verwendbar bis
	Chargenbezeichnung		Nur für Forschungszwecke

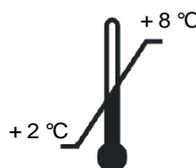
Nitrotyrosine ELISA

For the in vitro determination of Nitrotyrosine in human sample material, e.g. stool

Valid from 23.10.2009



K 7824



1. INTENDED USE

The described Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) is intended for the quantitative determination of Nitrotyrosine in human sample material, e.g. stool. It is for *in vitro* use only.

2. INTRODUCTION

Nitrotyrosine is the nitrated form of the amino acid tyrosine. The accumulation of protein bound nitrotyrosine is associated with cardiovascular diseases that are based on inflammatory processes (e.g., atherosclerosis, myocardial infarction, diabetic vasculopathy, hypertension, or coronary heart diseases). A growing number of studies have also associated the accumulation of nitrotyrosine with neurological diseases (Alzheimer´s disease, Parkinson´s disease, multiple sclerosis, stroke). With treatment of some of the associated diseases the levels of nitrated tyrosines have been shown to decrease, so nitrotyrosine has been stated to be a marker of nitrosative stress.

During inflammatory processes, large amounts of nitric oxide ($\bullet\text{NO}$) are locally released from L-arginine. This reaction is catalyzed by the enzyme NO-synthase (NOS). Other causes for the increased $\bullet\text{NO}$ production are exposure to chemicals or heavy metals, drugs, nicotine, or physical and psychological stress, as well as extraordinary physical strain with increased oxygen consumption.

In high concentrations, $\bullet\text{NO}$ that is not trapped by mitochondrial superoxide dismutase (SOD) reacts with superoxide ($\text{O}_2\bullet^-$) to form peroxynitrite (ONOO^-). Peroxynitrite is implicated as a key oxidant species in several pathologies and is known to be cytotoxic (nitrosative stress).

Peroxynitrite is highly reactive and shows a high affinity to aromatic amino acids, e.g., to the phenolic ring of tyrosine. The nitration of tyrosine in general is a natural process within the post-translational protein modification.

Nitrotyrosine is a stable product and might be seen as a correlate of peroxynitrite production, and its accumulation in cells and tissues is a marker of oxidative stress and nitrosative stress, respectively (Ischiropoulos 2008).

Indications

- Cardiovascular diseases
- Neurological diseases
- Thyroid disturbances
- Blockade of biochemical pathways
- Mitochondriopathy

Consequences of nitrosative stress

- Modification of lipids and proteins (for example structural proteins in mitochondria)
- Inhibition of respiratory chain enzymes in the mitochondria
- Glutamate overload
- Disturbances in ion channels
- Calcium overload
- Initiation of apoptosis processes

3. MATERIAL SUPPLIED

Catalogue No	Content	Kit Components	Quantity
K 7824MTP	PLATE	Microtiter plate, precoated	12 x 8 wells
K 7824WP	WASHBUF	ELISA wash concentrate 10x	1 x 100 ml
K 7824K	CONJ	HRP-antibody (concentrate)	1 x 150 µl
K 7824ST	STDKONZ	Standard (concentrate)	1 x 240 µl
K 7824AP	ASYBUF	Assay buffer	1x 50 ml
K 7824KO1	CTRL POS	Positive control	4 x 250 µl
K 7824KO2	CTRL NEG	Negative control	4 x 250 µl
K 7824TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 7824AC	STOP	ELISA stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Standard laboratory polypropylene reaction vessels (1.5 ml)
- Standard laboratory reaction vessel (15 ml)
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Vortex mixer
- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Microtiter plate reader at 450 nm (reference wave length 620 or 690 nm)

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- Reagents with a volume less than 100 μL should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at 37°C using a water bath before dilution. The **buffer concentrate** 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**.
- The controls (**CTRL POS** and **CTRL NEG**) must be reconstituted with 500 μl of **ASYBUF** and used in the assay without any further dilution.
- The **CONJ** (HRP-antibody) must be diluted **1:100** with diluted wash buffer. It should be freshly prepared for each run. The remainder of the diluted conjugate should be discarded.
- For Standard 1, pipet **50 μl** of **STD** (Standard stock solution) into 450 μl **ASYBUF**. It corresponds to a concentration of 1250 nM nitrotyrosine.

A standard curve is prepared in **1 : 2.5** dilution steps according to the following pipetting scheme.

Standard 1 : 1250 nM	50 μl STD (Standard stock) + 450 μl ASYBUF
Standard 2 : 500 nM	200 μl Standard 1 + 300 μl ASYBUF
Standard 3: 200 nM	200 μl Standard 2 + 300 μl ASYBUF
Standard 4: 80 nM	200 μl Standard 3 + 300 μl ASYBUF
Standard 5: 32 nM	200 μl Standard 4 + 300 μl ASYBUF
Standard 6: 0 nM	ASYBUF

Important: Polypropylene reaction vessels should be used for the standard dilution series.

The standard curve should be freshly prepared for each run. The remainder should be discarded.

- All other test reagents are ready to use. The test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8°C**.

6. SAMPLE PREPARATION

Liquid samples are diluted with ASYBUF (assay buffer). A working dilution of 1:5 is advised but optimal dilution should be determined by experimentation.

Serum, Plasma: 1:5 in ASYBUF (assay buffer)

Extraction of stool samples

The assay buffer is used as a sample extraction buffer. We recommend the following sample preparation:

1. Use of the stool sample preparation kit for dosing a 100 mg stool sample (e.g. Sample preparation kit from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany; cat # 745804). The stool sample must be suspended in 5 ml ASYBUF (assay buffer). This corresponds to a dilution factor of 1:50.
2. Afterwards, mix stool sample and buffer; vortex for at least 30 sec. depending on the stool consistency.
3. Thereafter, transfer ca. 1 ml of the stool suspension into a closable vial, e.g. Eppendorf-tube and centrifuge for 5 minutes at 13000 rpm.

The stool suspension is not stable. It is recommended to use a fresh sample for each run.

After the centrifugation, the supernatant is further diluted with ASYBUF (assay buffer). We recommend a dilution of 1:2 to 1:10, which corresponds to a **final dilution of 1:100 – 1:500** of the stool sample.

For analysis, pipette **100 µl of the final dilution** per well.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

The assay utilizes the “sandwich” technique with two polyclonal antibodies against nitrated proteins.

Standards, controls and diluted samples which are assayed for nitrotyrosine are added into the wells of a micro plate coated with polyclonal rabbit anti-nitrotyrosine antibody. During the first incubation step, nitrated proteins are bound by the immobilized primary antibody. Then a peroxidase-conjugated polyclonal rabbit anti- nitrotyrosine antibody is added into each microtiter well and a “sandwich” of

primary antibody - nitrated protein – peroxidase-conjugate

is formed. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as peroxidase substrate. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The colour changes from blue to yellow. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the concentration of nitrotyrosine. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. standard concentration is generated, using the values obtained from the standard.

Test procedure

1. Prior to use in the assay allow all reagents and samples to come to room temperature (18-26 °C) and mix well
2. Mark the positions of STD (Standard), CTRL POS (positive control), CTRL NEG (negative control) and SAMPLE (sample) on a protocol sheet
3. Take microtiter strips out of the kit. Store unused strips covered at 2-8° C. Strips are stable until the expiry date stated on the label
4. Wash each well 5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper

5.	Add 2 x 100 µL of the prepared STD (Standard), CTRL POS (positive control), CTRL NEG (negative control) and SAMPLE (sample) in duplicate into respective well
6.	Cover plate or strips with foil tightly and incubate for 2.5 h at room temperature (18 - 26°C) on the horizontal shaker
7.	Discard the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 µL of diluted wash buffer into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper
8.	Pipette 100 µL of diluted CONJ (HRP-antibody) into each well
9.	Cover plate or strips with foil tightly and incubate for 1h at room temperature (18 - 26°C) on the horizontal shaker.
10.	Discard the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 µL of diluted wash buffer into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper
11.	Add 100 µL of SUB (TMB substrate) into each well
12.	Incubate for 10-20 min at room temperature (18-26°C) in the dark.
13.	Add 100 µL of STOP (stop solution) into each well, mix thoroughly in a microtiter plate reader
14.	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 colour change is temperature sensitive. We recommend to observe the colour change and to stop the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

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 the optical density and a logarithmic abscissa for the 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 the optical density and a linear abscissa for the concentration.

3. Spline-algorithm

We recommend a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the 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.

Samples

The obtained nitrotyrosine concentration must be multiplied by the corresponding dilution factor.

Controls

The nitrotyrosine concentration can be read directly from the calibration curve. The concentration range is given on the enclosed data sheet specification.

9. LIMITATIONS

Samples with nitrotyrosine concentrations **outside the standard curve range** should be diluted further with ASYBUF (assay buffer) to obtain readings within the standard curve and re-assayed.

10. QUALITY CONTROL

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 sample are outside the acceptable limits.

Expected values

It is recommended that each laboratory should determine its own normal range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Sensitivity

Detection limit: 34,1 nM

The sensitivity limit was set as $B_0 + 3 \text{ SD}$. The Zero-standard was measured 8 times.

Cross reactivity

Albumin treated with nitrating agents: 100 %

Albumin non-treated: < 0,1 %

12. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- The quality control guidelines should be followed.
- Human material used in the kit components was tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Reagents of the kit package contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. The substrates for the enzymatic colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulphuric 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 spill should be wiped out immediately with copious quantities of water.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- 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.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be lodged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

15. REFERENCES

Gonsette RE (2008) Neurodegeneration in multiple sclerosis : The role of oxidative stress and excitotoxicity. J Neurol Sci, Vol 274, Issue 1-2, 48-53

Ischiropoulos H (2008) Protein tyrosine nitration – An update. Arch Biochem Biophys Oct 30

Peluffe G, Radi R (2007) Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. Cardiovasc Res. Jul 15 : 75(2) :291-302

Souza JM et al. (2008) Protein tyrosine nitration- functional alteration or just a biomarker ? Free Radic Biol Med. Aug 15 ; 45 (4) :357-356

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		Contains sufficient for <n> tests
	Manufacturer		Use by
	Lot number		For research use only