

Arbeitsanleitung / Manual

# Tyrosin ELISA Kit

*Zur Bestimmung von Tyrosin in humanem EDTA-Plasma und Serum*

# Tyrosine ELISA Kit

*For the determination of tyrosine in human EDTA plasma and serum*

**Nur zu Forschungszwecken / For research use only**

Gültig ab / Valid from 25.06.2012



K 7015



+2 °C



-20 °C

|        |
|--------|
| STD    |
| CTRL 1 |
| CTRL 2 |



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

---

| Inhaltsverzeichnis / table of contents              | Seite / page |
|---|--------------|
| <b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>                          | <b>3</b>     |
| <b>2. TESTPRINZIP</b>                               | <b>3</b>     |
| <b>3. INHALT DER TESTPACKUNG</b>                    | <b>4</b>     |
| <b>4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b> | <b>4</b>     |
| <b>5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN</b>  | <b>5</b>     |
| <b>6. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN</b>          | <b>6</b>     |
| <b>7. PROBENVORBEREITUNG</b>                        | <b>6</b>     |
| <b>8. TESTDURCHFÜHRUNG</b>                          | <b>7</b>     |
| <i>PIPETTIERSCHEMA PROBENVORBEREITUNG</i>           | <i>7</i>     |
| <i>PIPETTIERSCHEMA TESTDURCHFÜHRUNG</i>             | <i>8</i>     |
| <b>9. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE</b>                 | <b>10</b>    |
| <i>ERWARTETE ERGEBNISSE</i>                         | <i>11</i>    |
| <b>10. TESTCHARAKTERISTIKA</b>                      | <b>11</b>    |
| <i>KREUZREAKTION</i>                                | <i>11</i>    |
| <i>PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT</i>             | <i>12</i>    |
| <i>SENSITIVITÄT</i>                                 | <i>12</i>    |
| <i>WIEDERFINDUNG</i>                                | <i>12</i>    |
| <i>LINEARITÄT</i>                                   | <i>13</i>    |
| <b>11. EINSCHRÄNKUNGEN</b>                          | <b>13</b>    |
| <b>12. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>             | <b>13</b>    |

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTENDED USE</b>                                  | <b>16</b> |
| <b>2. PRINCIPLE OF THE TEST</b>                         | <b>16</b> |
| <b>3. MATERIAL SUPPLIED</b>                             | <b>17</b> |
| <b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>            | <b>17</b> |
| <b>5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b>           | <b>18</b> |
| <b>6. PRECAUTIONS</b>                                   | <b>19</b> |
| <b>7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION</b>           | <b>19</b> |
| <b>8. ASSAY PROCEDURE</b>                               | <b>20</b> |
| <i>SAMPLE PREPARATION PROCEDURE</i>                     | 20        |
| <i>TEST PROCEDURE</i>                                   | 21        |
| <b>9. EVALUATION OF RESULTS</b>                         | <b>22</b> |
| <i>EXPECTED RESULTS</i>                                 | 24        |
| <b>10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>                  | <b>24</b> |
| <i>CROSS REACTIVITY</i>                                 | 24        |
| <i>PRECISION AND REPRODUCIBILITY</i>                    | 24        |
| <i>SENSITIVITY</i>                                      | 25        |
| <i>RECOVERY</i>   | 25        |
| <i>LINEARITY</i>  | 25        |
| <b>11. LIMITATIONS</b>                                  | <b>26</b> |
| <b>12. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b> | <b>26</b> |

## 1. VERWENDUNGSZWECK

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

## 2. TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays. Zur Vorbereitung wird die zu untersuchende Probe mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen Tyrosin versetzt.

Anschließend wird die derivatisierte Probe mit einem polyklonalen Anti-Tyrosin-Antiserum in einer mit Tyrosin-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 Tyrosin-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 Konzentration von Tyrosin in der Probe reduziert sich die Konzentration der an den Tracer 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.

### 3. INHALT DER TESTPACKUNG

| Artikel Nr.          | Inhalt           | Kit Komponenten                       | Menge               |
|----------------------|------------------|---------------------------------------|---------------------|
| K7015MTP             | PLATE            | Mikrotiterplatte, vorbeschichtet      | 12 x 8 Vertiefungen |
| K7015ST              | STD              | Standards (0, 3, 10, 30, 100, 300 µM) | 6 x 200 µl          |
| K7015KO1<br>K7015KO2 | CTRL 1<br>CTRL 2 | Kontrollen                            | 2 x 200 µl          |
| K7015WP              | WASHBUF          | Waschpufferkonzentrat (10-fach)       | 2 x 100 ml          |
| K7015AK              | AB               | Anti-Tyrosin-Antikörper (Iyo.)        | 2 x 1 Fläschchen    |
| K7015K               | 2.AB             | POD-Antikörper (Konzentrat 200-fach)  | 65 µl               |
| K7015CSP             | 2.ABDIL          | Konjugatstabilisierungspuffer         | 12 ml               |
| K7015RP              | REABUF           | Reaktionspuffer                       | 2x 100 ml           |
| K7015DR              | DER              | Derivatisierungsreagenz               | 2 x 13,3 mg         |
| K7015LM              | DMSO             | Dimethylsulfoxid (DMSO)               | 2 ml                |
| K7015AP              | ASYBUF           | Assaypufferkonzentrat (10-fach)       | 2 x 3 ml            |
| K7015TMB             | SUB              | TMB-Substrat                          | 15 ml               |
| K7015AC              | STOP             | Stopplösung                           | 15 ml               |

### 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser\*
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

- \* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln  $> 0,2 \mu\text{m}$ ) mit einer elektrischen Leitfähigkeit  $< 0,055 \mu\text{S/cm}$  bei  $25^\circ\text{C}$  ( $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ).

## 5. 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 2x bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100  $\mu\text{l}$**  sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (**100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser**), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  auf. Das Pufferkonzentrat kann bei **2-8 $^\circ\text{C}$**  bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die verdünnte Pufferlösung ist bei **2-8 $^\circ\text{C}$  einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die **Standards (STD)** und die **Kontrollen (CTRL1, CTRL2)** werden eingefroren bei **-20 $^\circ\text{C}$**  gelagert. Für den Test die Standards und Kontrollen auftauen und kurz vortexen. Standards und Kontrollen können bis zu 3x wieder eingefroren werden, das Wiedereinfrieren sollte sofort nach Entnahme erfolgen.
- **DMSO** kristallisiert bei  $4^\circ\text{C}$  aus. Zum Lösen das DMSO bei Raumtemperatur stehen lassen oder im Wasserbad erwärmen.
- Der Inhalt eines Fläschchens **Derivatisierungsreagenz (DER) (13,3 mg)** wird in **0,8 ml DMSO** gelöst und das Fläschchen für 5 min auf einen Horizontalschüttler gelegt. Das DER sollte **unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt** werden. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen. 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.
- Das **Assaypufferkonzentrat (ASYBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** mit Reaktionspuffer (REABUF) verdünnt werden: **27 ml REABUF** zu den **3 ml**

**ASYBUF Konzentrat** in der Flasche geben, gut mischen. Durch die Aufteilung des ASYBUF in 2 Gefäße ist der ELISA in zwei Ansätze teilbar. Verdünnter Assaypuffer ist stabil und kann **4 Wochen bei 2-8°C** aufbewahrt werden.

- Der Inhalt eines Fläschchens **anti-Tyrosin-Antikörper (AB)** wird in **5,5 ml verdünntem Waschpuffer** gelöst. Durch die Aufteilung des AB in 2 Gefäße ist der ELISA in zwei Ansätze teilbar. Verdünnter Tyrosin-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 (**z.B. 60 µl 2.AB + 12 ml 2.ABDIL; nur die benötigte Menge ansetzen**). Unverdünnter POD-Antikörper ist bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Verdünnter POD-Antikörper 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.

## 6. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zu Forschungszwecken.
- 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  $H_2SO_4$ .  $H_2SO_4$  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.

## 7. PROBEVORBEREITUNG

- Als Probe eignet sich Serum und EDTA-Plasma. Die Haltbarkeit der Proben beträgt bei 2-8°C bis zu 6 Stunden. Zur längeren Lagerung müssen die Proben bei -20°C aufbewahrt werden.

- Lipämische und hämolytische Proben beeinflussen das Testergebnis und sollten nicht verwendet werden.
- Proben mit sichtbaren Mengen an Feststoff sollten zentrifugiert werden.
- Serum- und EDTA-Plasmaproben werden für die Derivatisierung vorverdünnt (siehe Pipettierschema Probenvorbereitung).
- Zur weiteren Vorbereitung muss die Probe mit einem Derivatisierungsreagenz (DER) zur Derivatisierung des enthaltenen Tyrosin versetzt werden (Details siehe Pipettierschema Probenvorbereitung).

## 8. TESTDURCHFÜHRUNG

### Hinweise

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettierolumina 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*

Standards (STD), Kontrollen (CTRL) und Proben (SAMPLE) werden im Faktor **1:41** wie folgt verdünnt:

**25 µl STD/CTRL/Probe + 1000 µl REABUF (Reaktionspuffer)**

Bitte beachten: Proben von Patienten mit Tyrosin-Supplementierung (z.B. im Rahmen von Depletionsstudien) müssen eventuell höher verdünnt werden.



Die Derivatisierung der Standards (STD), der Kontrollen (CTRL) und der Proben (SAMPLE) wird als Einzelbestimmung in Mikroreaktionsgefäßen (z.B. 1,5 ml-Reaktionsgefäße) wie folgt durchgeführt:

1. Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche **Raumtemperatur (18-26°C)** aufweisen.
2. Jeweils **100 µl der verdünnten Standards (STD), Kontrollen (CTRL) bzw. Proben (SAMPLE)** in Mikroreaktionsgefäße pipettieren.
3. **25 µl** frisch angesetztes **Derivatisierungsreagenz (DER)** in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, SAMPLE) pipettieren, **gut mischen** und auf einem Horizontalschüttler (180-240 rpm) **45 min bei Raumtemperatur (18-26°C)** inkubieren.
4. Anschließend in alle verwendeten Mikroreaktionsgefäße **1000 µl verdünnten Assaypuffer (ASYBUF)** zugeben, gut mischen und auf einem Horizontalschüttler (180-240 rpm) **45 min bei Raumtemperatur (18-26°C)** inkubieren.

**2 x 25 µl der so vorbereiteten Proben (STD, CTRL, SAMPLE)** werden im ELISA als Doppelbestimmung eingesetzt.

### *Pipettierschema Testdurchführung*

5. Positionen für Standards/Kontrollen/Proben (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 Resten von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8. **2 x 25 µl** der vorbereiteten derivatisierten **Proben (STD, CTRL, SAMPLE)** aus den Mikroreaktionsgefäßen in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren.

|   |
|---|
| 9. <b>100 µl</b> verdünnten <b>anti-Tyrosin-Antikörper (AB)</b> in jede Vertiefung pipettieren. Platte luftdicht abdecken.  |
| 10. Über Nacht ( <b>15-20 Stunden</b> ) bei <b>2-8°C</b> inkubieren.  |
| 11. Inhalt der Platte verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.   |
| 12. <b>100 µl</b> verdünnten <b>POD-AK (2. AB)</b> in alle Vertiefungen pipettieren.  |
| 13. Platte abdecken und <b>1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C)</b> unter Schütteln (180-240 rpm) inkubieren.  |
| 14. Inhalt der Platte verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer (WASHBUF)</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.   |
| 15. <b>100 µl TMB-Substrat (SUB)</b> in alle Vertiefungen pipettieren.  |
| 16. <b>8-12 min bei Raumtemperatur (18-26°C)</b> im Dunkeln inkubieren*   |
| 17. <b>100 µl Stopplösung (STOP)</b> in alle Vertiefungen pipettieren und im Mikrotiterplattenphotometer im Schüttelmodus mischen.  |
| 18. <b>Extinktion</b> sofort im Mikrotiterplattenphotometer mit einer Messwellenlänge von <b>450 nm</b> messen. Sofern die höchste Extinktion der Standards ( <b>STD</b> ) den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte die Messung sofort bei einer Messwellenlänge von <b>405 nm</b> wiederholt und diese Ergebnisse für eine Auswertung herangezogen werden. Wenn möglich, sollten bei jeder Messung die Extinktionen der Messwellenlänge mit den Extinktionen einer Referenzwellenlänge verglichen werden. Zulässige Referenzwellenlängen sind z.B.: 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm und 690 nm. |

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

## 9. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

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

Ausnahme: Falls einzelne Proben stärker verdünnt wurden, muss diese Abweichung des Verdünnungsfaktors berücksichtigt 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, 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).

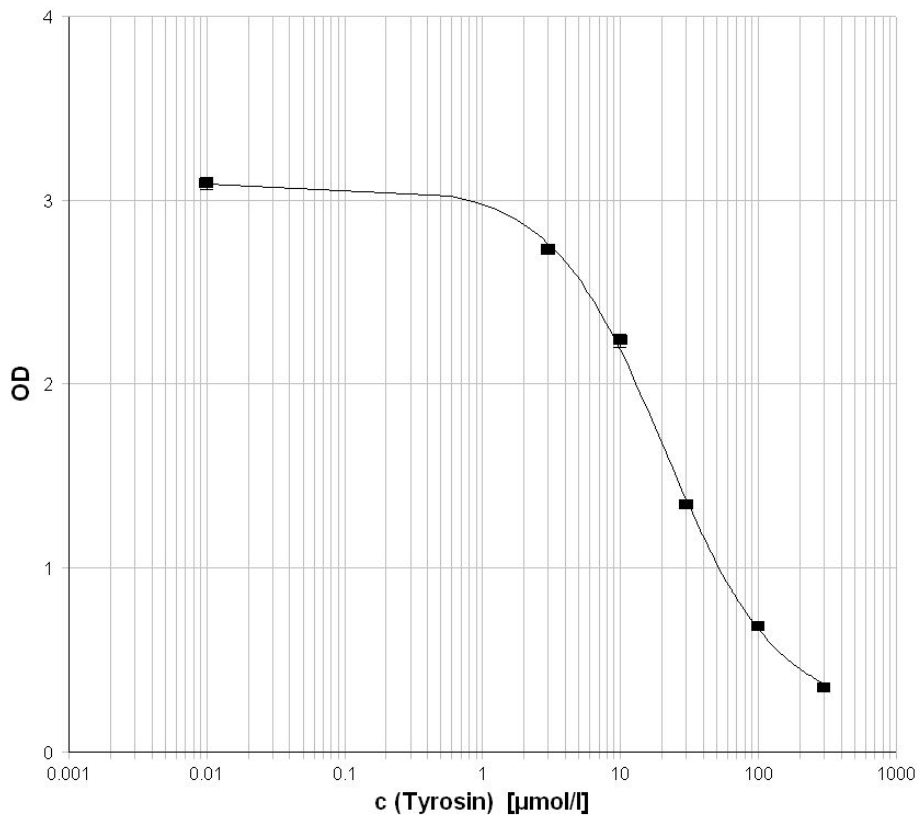
Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

### 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. Sie darf nicht zur Auswertung der Messwerte benutzt werden.

### Musterkalibrierkurve



### Erwartete Ergebnisse

Anhand einer laborinternen Studie mit Proben von augenscheinlich Gesunden (n=146) wurde ein Mittelwert von 58 µmol/l ermittelt, bei einer Standardabweichung von 14,4 µmol/l.

**Plasma-Mittelwert ± 2 Standardabweichungen** **58 ± 28,8 µmol/l**

**Normalbereich:** **29 – 87 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.

## 10. TESTCHARAKTERISTIKA

### Kreuzreaktion

|                |         |
|----------------|---------|
| L-Phenylalanin | < 2 %   |
| L-Tryptophan   | < 0,5 % |

### Präzision und Reproduzierbarkeit

| Intra-Assay (n=19) |                                  |                                   |
|--------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Probe              | Tyrosin<br>[ $\mu\text{mol/l}$ ] | Variationskoeffizient<br>(CV) [%] |
| 1                  | 31,4                             | 7,6                               |
| 2                  | 125,3                            | 7,4                               |

| Inter-Assay (n=8) |                                  |                                   |
|-------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Probe             | Tyrosin<br>[ $\mu\text{mol/l}$ ] | Variationskoeffizient<br>(CV) [%] |
| 1                 | 69,7                             | 5,8                               |
| 2                 | 104,6                            | 4,6                               |

### Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde als  $B_0 + 2 \text{ SD}$  festgelegt. Gemessen wurde 82 x der Standard Null.

| Probe         | Tyrosin<br>Mittelwert<br>[OD] | 2 Standard-<br>abweichungen<br>(2 x SD) | Nachweis-<br>grenze<br>[ $\mu\text{mol/l}$ ] |
|---------------|-------------------------------|---|--|
| Standard Null | 1,24                          | 0,15                                    | 3,6  |

### Wiederfindung

Unterschiedliche Mengen an Tyrosin wurden zu zwei Plasmaproben gegeben (Spike) und anschließend im ELISA gemessen. Die analytische Wiederfindung von Tyrosin wurde bei zwei verschiedenen Konzentrationen aus den theoretisch erwarteten und den praktisch gemessenen Werten ermittelt. Die mittlere Wiederfindung für alle Konzentrationen der Plasmaproben betrug 93,2 % (n=5).

| Probe [ $\mu\text{mol/l}$ ] | Spike [ $\mu\text{mol/l}$ ] | Tyrosin erwartet [ $\mu\text{mol/l}$ ] | Tyrosin gemessen [ $\mu\text{mol/l}$ ] | Wiederfindung [%] |
|-----------------------------|-----------------------------|--|--|-------------------|
| 76,8                        | 25                          | 101,8                                  | 94,5                                   | 92,8              |
| 76,8                        | 50                          | 126,8                                  | 123,3                                  | 97,2              |
| 108,8                       | 25                          | 133,8                                  | 116,1                                  | 86,8              |
| 108,8                       | 50                          | 158,8                                  | 152,4                                  | 96,0              |

### Linearität

Die Linearität des ELISAs wurde durch Verdünnen von zwei aufgestockten Plasmaproben bestimmt. Die mittlere Linearität betrug 97,1 % (n=5).

| Probe [ $\mu\text{mol/l}$ ] | Verdünnung | Tyrosin erwartet [ $\mu\text{mol/l}$ ] | Tyrosin gemessen [ $\mu\text{mol/l}$ ] | Wiederfindung [%] |
|-----------------------------|------------|--|--|-------------------|
| 76,8                        | 1:2        | 38,4                                   | 34,0                                   | 88,4              |
| 76,8                        | 1:4        | 19,2                                   | 20,0                                   | 103,9             |
| 108,8                       | 1:2        | 54,4                                   | 50,6                                   | 93,0              |
| 108,8                       | 1:4        | 27,2                                   | 28,0                                   | 102,9             |

## 11. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Tyrosin-Konzentrationen über 300  $\mu\text{mol/l}$  müssen stärker verdünnt und gegebenenfalls nochmals im Assay gemessen werden.

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

## 12. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- 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 Pipettiervolumina 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

# Tyrosine ELISA Kit

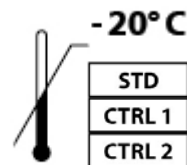
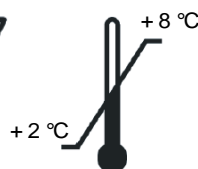
*For the determination of tyrosine in human EDTA plasma and serum*

**For research use only**

Valid from 25.06.2012



K 7015





## 1. INTENDED USE

This ELISA Kit is intended for the quantitative determination of tyrosine in human EDTA plasma and serum. It is for research use only.

## 2. 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 tyrosine derivatization.

Afterwards, the treated samples and a polyclonal tyrosine antiserum are incubated in wells of a microtiter plate coated with tyrosine-derivative (tracer). During the incubation period, the target tyrosine in the sample competes with the tracer immobilized on the wall of the microtiter wells for the binding of the polyclonal antibodies. The tyrosine 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 tyrosine concentration in the sample.

During the second incubation step, a peroxidase conjugate is added to each microtiter well to detect the anti-tyrosine antibodies. After washing away the unbound components tetramethylbenzidine (TMB) is added as 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 a photometer at 450 nm. The intensity of the yellow color is inverse proportional to the tyrosine concentration in the sample; this means, high tyrosine concentration in the sample reduces the concentration of tracer-bound antibody 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 standards. Tyrosine present in the patient samples is determined directly from this curve.

### 3. MATERIAL SUPPLIED

| Catalog No           | Content          | Kit Components                             | Quantity        |
|----------------------|------------------|--|-----------------|
| K7015MTP             | PLATE            | One holder with precoated strips           | 12 x 8 wells    |
| K7015ST              | STD              | Standards (0, 3, 10, 30, 100, 300 $\mu$ M) | 6 x 200 $\mu$ l |
| K7015KO1<br>K7015KO2 | CTRL 1<br>CTRL 2 | Controls                                   | 2 x 200 $\mu$ l |
| K7015WP              | WASHBUF          | Wash buffer concentrate (10-fold)          | 2 x 100 ml      |
| K7015AK              | AB               | Anti-tyrosine antibody (lyo.)              | 2 x 1 vial      |
| K7015K               | 2.AB             | POD antibody (concentrate 200-fold)        | 65 $\mu$ l      |
| K7015CSP             | 2.ABDIL          | Conjugate stabilizing buffer               | 12 ml           |
| K7015RP              | REABUF           | Reaction buffer                            | 2 x 100 ml      |
| K7015DR              | DER              | Derivatization reagent                     | 2 x 13.3 mg     |
| K7015LM              | DMSO             | Dimethylsulfoxide (DMSO)                   | 2 ml            |
| K7015AP              | ASYBUF           | Assay buffer concentrate (10-fold)         | 2 x 3 ml        |
| K7015TMB             | SUB              | TMB substrate                              | 15 ml           |
| K7015AC              | STOP             | Stop solution                              | 15 ml           |

### 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water\*
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000  $\mu$ l
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 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)

- \* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25°C (≤18.2 MΩ cm).

## 5. 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.
- Dilute the **wash buffer concentrate (WASHBUF)** with ultra pure water **1:10** before use (**100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water**), mix well. Crystals may occur due to high salt concentration in the stock solution. The crystals must be redissolved at room temperature or at 37°C using a water bath before dilution. The wash 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**.
- Store **Standards (STD) and controls (CTRL1, CTRL2)** frozen at **-20°C**, thaw before use in the test and mix well. Re-freeze standards and controls immediately after use. They can be re-frozen up to 3 times.
- **DMSO** could crystallize at 4°C. Dissolve the crystals at room temperature or in a water bath.
- Dissolve the content of one vial of **derivatization reagent (DER) (13.3 mg) in 0.8 ml DMSO**. Put the vial on a horizontal shaker for 5 min. DER must be **prepared immediately before use**. Discard any rest of the reagent after use. The ELISA kit can be separated into two performances by providing two DER vials. **Please note:** DMSO attacks all plastics but not polypropylene products and laboratory glass.
- Dilute the **assay buffer concentrate (ASYBUF)** with reaction buffer (REABUF) **1:10** before use: Add **27 ml REABUF** to the **3 ml ASYBUF concentrate** in the bottle, mix well. The ELISA kit can be separated into two performances by providing 2 x 3 ml assay buffer concentrate. Diluted assay buffer can be stored at **2-8°C for 4 weeks**.

- Dissolve the content of one vial of **anti-tyrosine antibody (AB)** in **5.5 ml of diluted wash buffer**. The ELISA kit can be separated into two performances by providing two AB vials. Diluted anti-tyrosine antibody can be stored at **2-8°C for 4 weeks**.
- Dilute the **POD antibody (2.AB) 1:200** with conjugate stabilizing buffer (2.ABDIL) (e.g. **60 µl 2.AB + 12 ml 2.ABDIL, prepare only the required amount**). The undiluted POD antibody (2.AB) is stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label. Diluted POD antibody can be stored at **2-8°C for 5 days**.
- All other test reagents are ready for use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at 2-8°C.

## 6. PRECAUTIONS

- It is for research use only.
- Kit reagents contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- 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.

## 7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum and EDTA-Plasma is suited for this test system. The samples are stable for up to 6 hours at 2-8°C. For longer storage keep samples frozen at -20°C.
- Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results and should not be used for analysis.
- Samples with visible amounts of precipitates should be centrifuged.
- The EDTA plasma and serum samples are diluted for derivatization (see sample preparation procedure).
- For sample preparation, a derivatization reagent (DER) for derivatization of tyrosine is added (details are given in the sample preparation procedure).

## 8. ASSAY PROCEDURE

### Procedural notes

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- 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*

Dilute standards (STD), controls (CTRL) and samples (SAMPLE) by factor **1:41** as follows:

#### **25 µl STD/ CTRL/ SAMPLE + 1000 µl REABUF (reaction buffer)**

Please note: Samples from patients with tyrosine supplementation (e.g. in depletion studies) may have to be more diluted.

Derivatization of standards (STD), controls (CTRL) and samples (SAMPLE) is carried out in single analysis in vials (e.g. 1.5 ml vials) as follows:

|   |
|---|
| 1. Bring all reagents and samples to <b>room temperature (18-26°C)</b> .  |
| 2. Add <b>100 µl of diluted standards (STD)/ controls (CTRL)/ samples (SAMPLE)</b> in the corresponding vial.   |
| 3. Add <b>25 µl</b> of freshly prepared <b>derivatization reagent (DER)</b> into each vial (STD, CTRL, SAMPLE), <b>mix well</b> and incubate for <b>45 min at room temperature (18-26°C)</b> on a shaker (180-240 rpm). |
| 4. Afterwards add <b>1000 µl of assay buffer (ASYBUF)</b> into each vial, mix well and incubate for <b>45 min at room temperature (18-26°C)</b> on a shaker (180-240 rpm).  |

**2 x 25 µl of each treated sample (STD, CTRL, SAMPLE)** are used in the ELISA as duplicates.

### *Test procedure*

|     |  |
|-----|--|
| 5.  | Mark the positions of standards (STD)/ controls (CTRL)/ samples (SAMPLE) in duplicate on a protocol sheet.   |
| 6.  | Take as many microtiter plate 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.  | <b>Wash the microtiter plate strips 5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer (WASHBUF) into each well.</b> After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution.                |
| 8.  | For the analysis in duplicate, take <b>2 x 25 µl</b> of derivatized <b>standards/ controls/ samples (STD/ CTRL)/ SAMPLE</b> out of the vials and add into the respective wells of the microtiter plate.  |
| 9.  | Add <b>100 µl</b> of diluted <b>anti-tyrosine antibody (AB)</b> into each well. Cover the plate tightly.   |
| 10. | Incubate overnight ( <b>15-20 hours</b> ) at <b>2-8°C</b> .  |
| 11. | Aspirate the contents of each well. Wash each well <b>5 times</b> by dispensing <b>250 µl of diluted wash buffer</b> into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution. |
| 12. | Add <b>100 µl</b> of diluted <b>POD antibody (2. AB)</b> into each well.   |
| 13. | Cover the plate and incubate for <b>1 hour at room temperature</b> (18-26°C) on a horizontal shaker (180-240 rpm).   |
| 14. | Aspirate the contents of each well. Wash each well <b>5 times</b> by dispensing <b>250 µl of diluted wash buffer</b> into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution. |

|     |   |
|-----|---|
| 15. | Add <b>100 µl</b> of <b>TMB substrate (SUB)</b> into each well.   |
| 16. | Incubate for <b>8-12 min at room temperature</b> (18-26°C) in the dark*.  |
| 17. | Add <b>100 µl of stop solution (STOP)</b> into each well, mix thoroughly.   |
| 18. | Determine <b>absorption</b> immediately with an ELISA reader at <b>450 nm</b> . If the highest extinction of the standards ( <b>STD</b> ) is above the range of the photometer, absorption must be measured immediately at <b>405 nm</b> and the obtained results used for evaluation. If possible, the extinctions from each measurement should be compared with extinctions obtained at a reference wavelength, e. g. 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm and 690 nm can be used |

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

## 9. 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, samples, and with correct sample treatment), standards, controls, and blood samples are equally diluted. Therefore, **no dilution factor is required for the calculation of results.**

Exception: For samples with higher dilutions the deviating factor must 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).

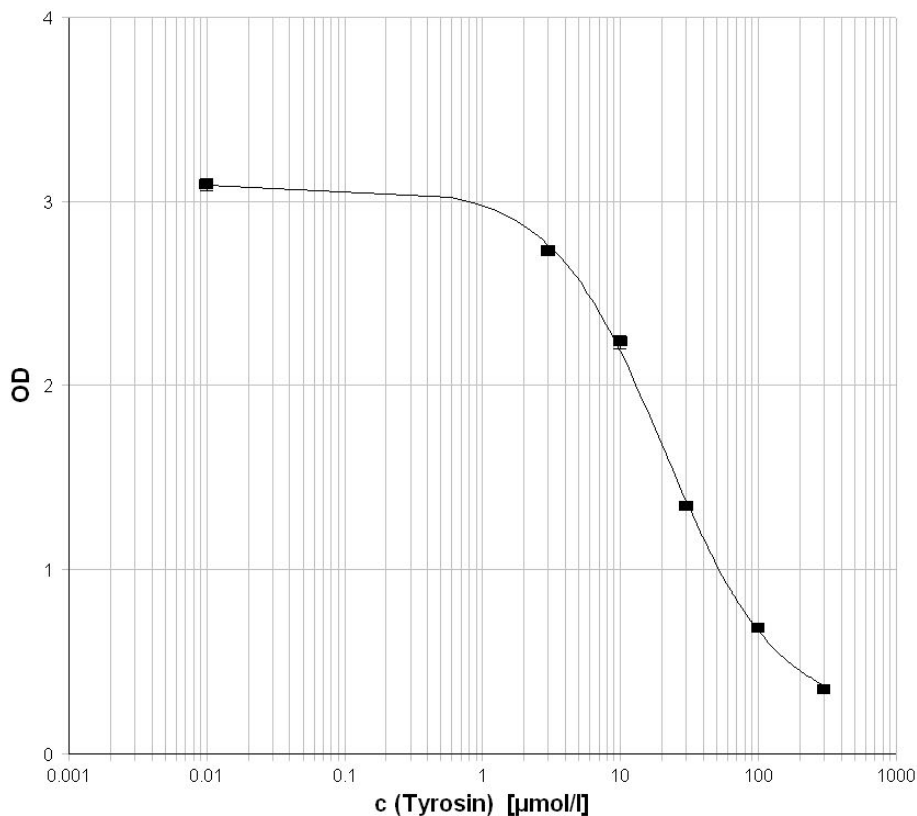
Plausibility of the measured pairs of values should be examined before automatically evaluating the results. If this option is not available in the used program, the pairs of values should be controlled manually.

#### 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  $\mu\text{mol/l}$ . In the following, an example of a calibration curve is given, do not use it for the calculation of your results.

#### Example of calibration curve





### Expected results

Based on internal studies with plasma samples of evidently healthy persons (n=146) a mean value of 58  $\mu\text{mol/l}$  was calculated. The standard deviation was 14.4  $\mu\text{mol/l}$ .

**Plasma mean value  $\pm$  2 x standard deviation:** **58  $\pm$  28.8  $\mu\text{mol/l}$**   
**Normal range:** **29 – 87  $\mu\text{mol/l}$**

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

## 10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### Cross reactivity

L-Phenylalanine < 2 %  
 L-Tryptophan < 0.5 %

### Precision and reproducibility

| Intra-assay (n=19) |                                |                                   |
|--------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| Sample             | Tyrosine [ $\mu\text{mol/l}$ ] | coefficient of variation (CV) [%] |
| 1                  | 31.4                           | 7,6                               |
| 2                  | 125.3                          | 7.4                               |

| Inter-assay (n=8) |                                |                                   |
|-------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| Sample            | Tyrosine [ $\mu\text{mol/l}$ ] | coefficient of variation (CV) [%] |
| 1                 | 69.7                           | 5.8                               |
| 2                 | 104.6                          | 4.6                               |

### Sensitivity

The sensitivity was set as  $B_0 + 2SD$ . The zero-standard was measured 82 times.

| Sample        | Tyrosine mean value [OD] | 2 x standard deviation (SD) | Detection limit [ $\mu\text{mol/l}$ ] |
|---------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| Zero-standard | 21.24                    | 0.15                        | 3.6                                   |

### Recovery

Two plasma samples were spiked with different tyrosine concentrations and measured in this assay. The analytical recovery rate was determined by the expected and measured tyrosine levels. The mean recovery rate for all concentrations was 93.2 % (n=5).

| Sample [ $\mu\text{mol/l}$ ] | Spike [ $\mu\text{mol/l}$ ] | Tyrosine expected [ $\mu\text{mol/l}$ ] | Tyrosine measured [ $\mu\text{mol/l}$ ] | Recovery [%] |
|------------------------------|-----------------------------|---|---|--------------|
| 76.8                         | 25                          | 101.8                                   | 94.5                                    | 92.8         |
| 76.8                         | 50                          | 126.8                                   | 123.3                                   | 97.2         |
| 108.8                        | 25                          | 133.8                                   | 116.1                                   | 86.8         |
| 108.8                        | 50                          | 158.8                                   | 152.4                                   | 96.0         |

### Linearity

The linearity of the ELISA was determined by the dilution of two spiked plasma samples. The mean linearity was 97.1 % (n=5).

| Sample [ $\mu\text{mol/l}$ ] | Dilution | Expected [ $\mu\text{mol/l}$ ] | Measured [ $\mu\text{mol/l}$ ] | Recovery [%] |
|------------------------------|----------|--------------------------------|--------------------------------|--------------|
| 76.8                         | 1:2      | 38.4                           | 34.0                           | 88.4         |
| 76.8                         | 1:4      | 19.2                           | 20.0                           | 103.9        |
| 108.8                        | 1:2      | 54.4                           | 50.6                           | 93.0         |
| 108.8                        | 1:4      | 27.2                           | 28.0                           | 102.9        |

## 11. LIMITATIONS








Samples with tyrosine concentrations above 300 µmol/l should be further diluted and re-assayed.

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

## 12. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- 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             |   |                                   |