

Carbonylproteine ELISA

*Zur in-vitro-Bestimmung von proteingebundenen Carbonylen
in humanem Serum und Plasma*

Carbonyl Protein ELISA

*For the in vitro determination of protein-bound carbonyls
in human serum and plasma*

Gültig ab / Valid from 2022-08-22

REF K 7870

Σ
96

$\pm 8^{\circ}\text{C}$
 $+2^{\circ}\text{C}$

IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	2
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG	5
<i>Lagerung</i>	5
<i>Derivatisierung der Proben</i>	5
<i>Probenverdünnung</i>	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	8
10. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Referenzwerte</i>	8
11. TESTCHARAKTERISTIKA	9
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	9
<i>Spike-Wiederfindung</i>	9
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	10
13. TECHNISCHE MERKMALE	10
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
15. LITERATUR	11

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von proteingebundenen Carbonylen in humanem Serum und Plasma geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können in der Zelle Proteine, Lipide und DNA oxidieren und sie dabei strukturell und funktionell schädigen. Die Proteine werden durch freie Radikale oxidiert, wobei ihre Aminosäuren auf verschiedene Weise modifiziert oder degradiert werden. Dabei erhalten die Proteine neue funktionelle Gruppen wie Carbonyl- oder Hydroxylgruppen, was in Proteinfragmentierung, Crosslinks-Bildung, Zerstörung der Tertiärstruktur und Funktionalitätsverlust resultieren kann. Zudem stehen ROS in direktem Zusammenhang mit Krankheiten wie z.B. Arteriosklerose, Alzheimer, Parkinson und rheumatoide Arthritis sowie mit Alterungsprozessen und Kanzerogenese.

Proteingebundene Carbonyle entstehen durch verschiedene Oxidationsmechanismen und stellen einen sensitiven Marker für oxidative Schädigung dar. Der Gehalt proteingebundener Carbonyle kann mittels Derivatisierung mit Dinitrophenylhydrazin (DNPH) und anschließender Bestimmung des gebundenen anti-DNPH-Antikörpers ermittelt werden. Die ELISA-Methode ermöglicht eine quantitative Carbonyl-Bestimmung mit Proteinmengen im Mikrogramm-Bereich.

Indikationen

- Arteriosklerose
- Alzheimer
- Parkinson
- Rheumatoide Arthritis
- Urämie
- Diabetes
- Alterungsprozesse
- Kanzerogenese

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 7870	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	1 x 100 ml

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 7870	STD	Standards, lyophilisiert (Konzentrationen der Spezifikation entnehmen)	4 x 5 vials
K 7870	CTRL 1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vials
K 7870	CTRL 2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vials
K 7870	CONJ	Konjugatkonzentrat, peroxidase markiert	1 x 200 µl
K 7870	CONJBUF	Konjugatverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 7870	AB	Detektionsantikörperkonzentrat (2. Antikörper)	1 x 200 µl
K 7870	ABBUF	Antikörperverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 7870	DER	Derivatisierungsreagenz	2 x 5 ml
K 7870	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	2 x 100 ml
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 0,5–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* 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 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die **lyophilisierten und derivatisierten Standards (STD)** und **Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch müssen die Standards und Kontrollen rekonstituiert werden; die **Rekonstitutionsvorgaben** sind dem **Spezifikationsdatenblatt** zu entnehmen. **Standards und Kontrollen** (rekonstituierte STD und CTRL) **sind nicht stabil und können nicht gelagert werden**.
- Das **Derivatisierungsreagenz (DER)** stellt eine gesättigte Lösung dar, weshalb es zu Kristallbildungen kommen kann. **Wichtig:** Das Derivatisierungsreagenz wird verwendet ohne die Kristalle zu entfernen oder zu pipettieren.
- **Vorbereitung des 2. Antikörpers:** Der **konzentrierte 2. Antikörper (AB)** wird unmittelbar vor Gebrauch **1:101** in **Antikörperverdünnungspuffer (ABBUF)** verdünnt (z. B. 100 µl AB + 10 ml ABBUF). Der **AB** ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. **2. Antikörper** (1:101 verdünnter AB) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden**.
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird unmittelbar vor Gebrauch **1:101** in **Konjugatverdünnungspuffer (CONJBUF)** verdünnt (z. B. 100 µl CONJ + 10 ml CONJBUF). Das **CONJ** ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. **Konjugat** (1:101 verdünntes CONJ) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden**.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

Als Probe eignen sich Serum und Plasma.

Lagerung

Die Probe sollte gekühlt versendet werden, ist aber bei Raumtemperatur bis zu 24 Stunden stabil.

Derivatisierung der Proben

1.	Beschriften Sie Röhrchen für die Proben (SAMPLES).
2.	In das jeweilige Röhrchen 25 µl Probe (SAMPLE) vorlegen.
3.	Zu jedem Röhrchen 100 µl Derivatisierungsreagenz (DER) hinzugegeben.
4.	Die Röhrchen schließen und auf dem Vortexer mischen.
5.	Zur Derivatisierung 30 min bei 37 °C inkubieren*.

* Alternativ kann über Nacht bei 4 °C inkubiert werden.

Probenverdünnung

Die derivatisierten Proben müssen vor Einsatz im Test **1:20 000 mit Assaypuffer** verdünnt werden:

- **30 µl** derivatisierte Probe + **570 µl** Assaypuffer, mischen
= **1:20 (Verdünnung I)**
- **30 µl** Verdünnung I + **570 µl** Assaypuffer, mischen
= **1:20 (Verdünnung II)**
- **20 µl** Verdünnung II + **980 µl** Assaypuffer, mischen
= **1:50 (Verdünnung III)**.

Diese entspricht nun einer Gesamtverdünnung von 1:20 000.

100 µl der **Verdünnung III** werden im Test pro Vertiefung eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von proteingebundenen Carbonylen.

Patientenproben werden derivatisiert und anschließend mit den rekonstituierten Standards und Kontrollen in die vorbeschichtete Mikrotiterplatte pipettiert. Die

Quantifizierung der gebundenen Proteine erfolgt durch Zugabe eines 2. Antikörpers, der biotinyliert ist. Dieser wird mit peroxidase markiertem Streptavidin detektiert. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem Carbonylprotein-Gehalt direkt proportional. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

Vor Gebrauch **alle Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (15–30 °C) bringen, gut mischen.

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der verschlossenen Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Die Vertiefungen vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	100 µl Standards/Kontrollen/vorbereitete Proben (Verdünnung III) in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen luftdicht mit Folie abkleben und 1 Stunde bei 37 °C inkubieren..
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	100 µl des 2. Antikörpers (verdünnter AB) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen luftdicht mit Folie abkleben und 1 Stunde bei 37 °C inkubieren..

7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl Konjugat (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	Streifen luftdicht mit Folie abdecken und 1 Stunde bei 37 °C inkubieren.
10.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
11.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
12.	10–20 min* bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
13.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung 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 gemessen. 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. 0,001).

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

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.

Serum- und Plasmaproben

Da die Probenverdünnung in der Standardkurve bereits berücksichtigt wurde, ist der Verdünnungsfaktor gleich 1.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben, deren OD höher ist als die des höchsten Standards, können stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bei der folgenden Auswertung ist der veränderte Verdünnungsfaktor zu beachten.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

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

Referenzwerte

Anhand einer laborinternen Studie mit Serum- und Plasmaproben von augenscheinlich Gesunden (n = 41) wurde ein Referenzbereich von 70–200 U/ml ermittelt.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 26)

Probe	Mittelwert Carbonylproteine [U/ml]	Standardabweichung (SD) [%]
1	280,9	6,5
2	553,4	5,2

Inter-Assay (n = 11)

Probe	Mittelwert Carbonylproteine [U/ml]	Standardabweichung (SD) [%]
1	77,9	12,5
2	170,2	6,2
3	127,7	7,9

Spike-Wiederfindung

Probe	Ungespikte Probe [U/ml]	Spike [U/ml]	erwartet [U/ml]	gemessen [U/ml]
A	66,5	33,0	99,5	90,7
	66,5	90,0	156,5	148,6
	66,5	280,0	346,5	340,6
B	140,4	33,0	173,4	171,6
	140,4	90,0	230,4	243,0
	140,4	280,0	420,4	400,0
C	116,8	33,0	149,8	130,5
	116,8	90,0	206,8	168,2
	116,8	280,0	396,8	375,2

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet 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 zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind gesundheitsgefährdend und umweltschädlich. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen können zu Haut- und/oder Atemwegsreizungen führen. Jeder Kontakt mit den Substanzen ist zu vermeiden. Weiterführende Sicherheitsinformationen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen, welches Sie auf Anfrage bei der Immundiagnostik AG erhalten.
- Das 10x Waschpufferkonzentrat (WASHBUF) enthält Tenside, welche bei Augenkontakt zu schweren Augenreizungen führen können.

Achtung: Verursacht schwere Augenreizung. **BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN:** Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt 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 Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der dem 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.
- 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, zurückzusenden.













15. LITERATUR

1. Beal, M. F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free radical biology & medicine* **32**, 797–803 (2002).
2. Berlett, B. S. & Stadtman, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* **272**, 20313–6 (1997).
3. Buss, H., Chan, T. P., Sluis, K. B., Domigan, N. M. & Winterbourn, C. C. Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free radical biology & medicine* **23**, 361–6 (1997).

4. Cao, G. & Cutler, R. G. Protein oxidation and aging. I. Difficulties in measuring reactive protein carbonyls in tissues using 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Archives of biochemistry and biophysics* **320**, 106–14 (1995).
5. Davies, K. J., Delsignore, M. E. & Lin, S. W. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *The Journal of biological chemistry* **262**, 9902–7 (1987).
6. Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R. & Davies, M. J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *The Biochemical journal* **324** (Pt 1, 1–18 (1997).
7. Descamps-Latscha, B. & Witko-Sarsat, V. Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure. *Kidney international. Supplement* **78**, S108–13 (2001).
8. Galli, F. Protein damage and inflammation in uraemia and dialysis patients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **22** Suppl 5, v20–36 (2007).
9. Gladstone, I. M. & Levine, R. L. Oxidation of proteins in neonatal lungs. *Pediatrics* **93**, 764–8 (1994).
10. Lenz, a G. et al. Oxidatively modified proteins in bronchoalveolar lavage fluid of patients with ARDS and patients at-risk for ARDS. *The European respiratory journal* **13**, 169–74 (1999).
11. Levine, R. L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free radical biology & medicine* **32**, 790–6 (2002).
12. Levine, R. L. & Stadtman, E. R. Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental gerontology* **36**, 1495–502 (2001).
13. Marnett, L. J., Riggins, J. N. & West, J. D. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *The Journal of clinical investigation* **111**, 583–93 (2003).
14. Matzi, V. et al. The impact of preoperative micronutrient supplementation in lung surgery. A prospective randomized trial of oral supplementation of combined alpha-ketoglutaric acid and 5-hydroxymethylfurfural. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* **32**, 776–82 (2007).
15. Reznick, A. Z. et al. Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. *The Biochemical journal* **286** (Pt 2, 607–11 (1992).

16. Smith, C. D. et al. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 10540–3 (1991).
17. Stadtman, E. R. & Oliver, C. N. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *The Journal of biological chemistry* **266**, 2005–8 (1991).
18. Starke-Reed, P. E. & Oliver, C. N. Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Archives of biochemistry and biophysics* **275**, 559–67 (1989).
19. Wiseman, H. & Halliwell, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *The Biochemical journal* **313** (Pt 1, 17–29 (1996).

Verwendete Symbole:

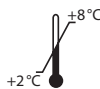
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Reizend

Carbonyl protein ELISA

*For the in vitro determination of protein-bound carbonyls
in human serum and plasma*

Valid from 2022-08-22

REF **K 7870**



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	17
2. INTRODUCTION	17
3. MATERIAL SUPPLIED	17
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	19
6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	20
<i>Storage</i>	20
<i>Derivatisation of samples</i>	20
<i>Sample dilution</i>	20
7. ASSAY PROCEDURE	20
<i>Principle of the test</i>	20
<i>Test procedure</i>	21
8. RESULTS	22
9. LIMITATIONS	23
10. QUALITY CONTROL	23
<i>Reference range</i>	23
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	23
<i>Spiking Recovery</i>	23
<i>Precision and reproducibility</i>	24
12. PRECAUTIONS	24
13. TECHNICAL HINTS	25
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	25
15. REFERENCES	26

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of protein carbonyls in human serum and plasma. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS) can oxidise proteins, lipids, and DNA, causing damage of their structure and function as well as cell injury. Proteins are oxidised by free radicals, whereby the constituent amino acids are variously modified or degraded. The modifications result in new functional groups such as carbonyl or hydroxyl groups, which may lead to protein fragmentation, formation of protein-protein cross-linkages, disruption of the tertiary structure and loss of functional activity. In addition, ROS are directly associated with diseases like atherosclerosis, rheumatoid arthritis, Alzheimer's and Parkinson's disease as well as ageing and cancerogenesis.

Protein carbonyls are formed by a variety of oxidative mechanisms and are sensitive indices of oxidative injury. The quantity of protein carbonyls in a protein sample can be determined by derivatising with dinitrophenyl-hydrazine (DNPH) and measuring the bound anti-DNPH antibodies. The ELISA method enables carbonyls to be measured quantitatively with microgram quantities of protein.

Indications

- Atherosclerosis
- Alzheimer's disease
- Parkinson's disease
- Rheumatoid arthritis
- Uremia
- Diabetes
- Ageing
- Cancerogenesis

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 7870	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml
K 7870	STD	Standards, lyophilised (see specification for concentrations)	4 x 5 vials

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 7870	CTRL 1	Control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial
K 7870	CTRL 2	Control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial
K 7870	CONJ	Conjugate concentrate, peroxidase-labelled	1 x 200 µl
K 7870	CONJBUF	Conjugate dilution buffer, ready-to-use	1 x 15 ml
K 7870	AB	Detection antibody concentrate, (secondary antibody)	1 x 200 µl
K 7870	ABBUF	Antibody dilution buffer, ready-to-use	1 x 15 ml
K 7870	DER	Derivatisation reagent	2 x 5 ml
K 7870	ASYBUF	Assay buffer, ready-to-use	2 x 100 ml
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure 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 the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 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.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37°C. The **WASHBUF** is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8°C for 1 month**.
- The **lyophilised and derivatised standards (STD)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Reconstitution** details are given in the **specification data sheet**. **Standards and controls** (reconstituted STD and CTRL) **are not stable and cannot be stored**.
- The **derivatisation reagent (DER)** is prepared as a saturated solution. Crystals can occur due to the high salt concentration. **Important:** the derivatisation reagent is used as such, without removing or pipetting the crystals.
- **Preparation of the detection antibody:** Immediately before use, the **detection antibody concentrate (AB)** has to be diluted **1:101** in **antibody dilution buffer (ABBUF)** (e.g. 100 µl AB + 10 ml ABBUF). The **AB** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2–8°C**. **Detection antibody** (1:101 diluted AB) **is not stable and cannot be stored**.
- **Preparation of the conjugate:** Immediately before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:101** in **conjugate dilution buffer (CONJBUF)** (e.g. 100 µl CONJ + 10 ml CONJBUF). The **CONJ** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2–8°C**. **Conjugate** (1:101 diluted CONJ) **is not stable and cannot be stored**.
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2–8°C**.

6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum and plasma samples are suited for this test system.

Storage

Samples should be sent cooled; they are stable for 24 h at room temperature.

Derivatisation of samples

1.	Label a tube for each sample .
2.	Add 25 µl sample into each tube
3.	Add 100 µl derivatisation reagent (DER) into each tube.
4.	Close the tubes and vortex the content well.
5.	For derivatisation, incubate for 30 min at 37 °C* .

* Alternatively, incubate over night at 4 °C.

Sample dilution

The derivatised samples must be diluted **1:20 000 in assay buffer** before use in the test:

- **30 µl** derivatised sample + **570 µl** assay buffer, mix well
= **1:20 (dilution I)**
- **30 µl** dilution I + **570 µl** assay buffer, mix well
= **1:20 (dilution II)**
- **20 µl** dilution II + **980 µl** assay buffer, mix well
= **1:50 (dilution III)**.

This results in a final dilution of 1:20 000.

For analysis, pipet **100 µl** of **dilution III** per well.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of protein-bound carbonyls.

Reconstituted standards, controls and derivatised patient samples are added into the wells of precoated microplate. The quantification of the bound proteins is performed by adding of second antibody which is biotinylated and detected by peroxidase

labelled streptavidin. Tetramethylbenzidin (TMB) is used as a peroxidase substrate. The intensity of the colour is directly proportional to the concentration of carbonyl proteins. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. Carbonyl proteins in the patient samples are determined directly from this curve.

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15–30 °C) and mix well.

Mark the positions of standards/controls/samples on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips as needed from the kit. Store unused strips together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging at 2–8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Before use , wash the wells 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add each 100 µl standards/controls/prepared samples (dilution III) into the respective wells.
3.	Cover plate airtightly and incubate for 1 hour at 37 °C .
4.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add 100 µl detection antibody (diluted AB) into each well.
6.	Cover the airplate tightly and incubate for 1 hour at 37 °C .
7.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
8.	Add 100 µl conjugate (diluted CONJ) into each well.
9.	Cover the plate airtightly and incubate for 1 hour at 37 °C .

10.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
11.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
12.	Incubate for 10–20 min** at room temperature (15–30 °C) in the dark .
13.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix well using the shake mode of the 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 observing the colour change and stopping 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 standard must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

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 linear abscissa for the concentration.

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

Plasma and serum samples

Since the sample dilution is already considered in the calibration curve, the dilution factor is 1.

9. LIMITATIONS

Samples with an OD higher than the OD of the highest standard can be further diluted and re-assayed. Please consider this higher dilution when calculating the results.

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed 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.

Reference range

Based on Immundiagnostik AG studies of matrix samples of apparently healthy persons (n = 41), a reference range of 70–200 U/ml was estimated.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Spiking Recovery

Sample	Unspiked Sample [U/ml]	Spike [U/ml]	expected [U/ml]	measured [U/ml]
A	66.5	33.0	99.5	90.7
	66.5	90.0	156.5	148.6
	66.5	280.0	346.5	340.6
B	140.4	33.0	173.4	171.6
	140.4	90.0	230.4	243.0
	140.4	280.0	420.4	400.0

Sample	Unspiked Sample [U/ml]	Spike [U/ml]	expected [U/ml]	measured [U/ml]
C	116.8	33.0	149.8	130.5
	116.8	90.0	206.8	168.2
	116.8	280.0	396.8	375.2

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 26)

Sample	Carbonyl proteins mean value [U/ml]	Standard deviation (SD) [%]
1	280.9	6.5
2	553.4	5.2

Inter-Assay (n = 14)

Sample	Carbonyl proteins mean value [U/ml]	Standard deviation (SD) [%]
1	77.9	12.5
2	170.2	6.2
3	127.7	7.9

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were 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.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide or ProClin are hazardous to health and the environment. Substrates for enzymatic colour reactions may also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances must be avoided. Further safety information can

be found in the safety data sheet, which is available from Immundiagnostik AG on request.

- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact.

Warning: Causes serious eye irritation. **IF IN EYES:** Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: get medical Advice/attention.

- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on 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.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to 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.
- 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 incorrect use.













- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Beal, M. F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free radical biology & medicine* **32**, 797–803 (2002).
2. Berlett, B. S. & Stadtman, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* **272**, 20313–6 (1997).
3. Buss, H., Chan, T. P., Sluis, K. B., Domigan, N. M. & Winterbourn, C. C. Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free radical biology & medicine* **23**, 361–6 (1997).
4. Cao, G. & Cutler, R. G. Protein oxidation and aging. I. Difficulties in measuring reactive protein carbonyls in tissues using 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Archives of biochemistry and biophysics* **320**, 106–14 (1995).
5. Davies, K. J., Delsignore, M. E. & Lin, S. W. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *The Journal of biological chemistry* **262**, 9902–7 (1987).
6. Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R. & Davies, M. J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *The Biochemical journal* **324** (Pt 1, 1–18 (1997).
7. Descamps-Latscha, B. & Witko-Sarsat, V. Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure. *Kidney international. Supplement* **78**, S108–13 (2001).
8. Galli, F. Protein damage and inflammation in uraemia and dialysis patients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **22** Suppl 5, v20–36 (2007).
9. Gladstone, I. M. & Levine, R. L. Oxidation of proteins in neonatal lungs. *Pediatrics* **93**, 764–8 (1994).
10. Lenz, a G. et al. Oxidatively modified proteins in bronchoalveolar lavage fluid of patients with ARDS and patients at-risk for ARDS. *The European respiratory journal* **13**, 169–74 (1999).

11. Levine, R. L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free radical biology & medicine* **32**, 790–6 (2002).
12. Levine, R. L. & Stadtman, E. R. Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental gerontology* **36**, 1495–502 (2001).
13. Marnett, L. J., Riggins, J. N. & West, J. D. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *The Journal of clinical investigation* **111**, 583–93 (2003).
14. Matzi, V. et al. The impact of preoperative micronutrient supplementation in lung surgery. A prospective randomized trial of oral supplementation of combined alpha-ketoglutaric acid and 5-hydroxymethylfurfural. *European journal of cardiothoracic surgery: official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* **32**, 776–82 (2007).
15. Reznick, A. Z. et al. Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. *The Biochemical journal* **286** (Pt 2, 607–11 (1992).
16. Smith, C. D. et al. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 10540–3 (1991).
17. Stadtman, E. R. & Oliver, C. N. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *The Journal of biological chemistry* **266**, 2005–8 (1991).
18. Starke-Reed, P. E. & Oliver, C. N. Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Archives of biochemistry and biophysics* **275**, 559–67 (1989).
19. Wiseman, H. & Halliwell, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *The Biochemical journal* **313** (Pt 1, 17–29 (1996).

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Irritant