

Carbonylproteine ELISA

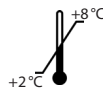
*Zur Bestimmung von proteingebundenen Carbonylen
in biologischen Proben*

Carbonyl protein ELISA

*For the determination of protein carbonyls
in biological samples*

Gültig ab / Valid from 2020-08-25

REF KR7822



RUO



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	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	4
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Hinweise</i>	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Probenvorbereitung und Derivatisierung</i>	5
<i>Verdünnung I</i>	6
<i>Verdünnung II</i>	6
<i>Verdünnung III</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	7
8. ERGEBNISSE	8
9. EINSCHRÄNKUNGEN	9
10. QUALITÄTSKONTROLLE	9
<i>Referenzwerte</i>	9
11. TESTCHARAKTERISTIKA	10
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	10
<i>Analytische Sensitivität</i>	10
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	10
13. TECHNISCHE MERKMALE	11
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
15. LITERATUR	12

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von proteingebundenen Carbonylen in biologischen Proben wie EDTA-Plasma, bronchoalveolärer Lavage und cerebrospinaler Flüssigkeit, Zellextrakten und anderen löslichen Proteinproben. Nur zur wissenschaftlichen Forschung. Nicht für diagnostische Zwecke.

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, Crosslink-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 Carbonylbestimmung mit Proteinmengen im Mikrogrammbereich.

Mögliche Forschungsgebiete

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

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KR7822	PLATE	Mikrotitermodul	12 x 8 Vertiefungen
KR7822	ID WASH	Waschpufferkonzentrat, 10x	1 x 100 ml
KR7822	STD	Standardkonzentrat, gebrauchsfertig	1 x 50 µl
KR7822	CTRL	Kontrolle, gebrauchsfertig	1 x 50 µl
KR7822	CONJ	Konjugat, peroxidase markiert, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
KR7822	AB	Detektionsantikörperkonzentrat, biotinyliert	1 x 240 µl
KR7822	ABBUF	Antikörperverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 30 ml
KR7822	DER	Derivatisierungsreagenz, gebrauchsfertig	1 x 9 ml
KR7822	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	2 x 100 ml
KR0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	2 x 15 ml
KR0003.15	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 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Inkubator 37 °C (optional)
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 11 000 g
- Laborübliche Reaktionsgefäße (Einmalartikel) aus Polypropylen
- Zentrifugenfiltrationsröhrchen (z. B. Artikelnr. KR7822ZR)
- Proteinbestimmungstest (z. B. Artikelnr. KR7822BCA)

- 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 $> 0,2\mu\text{m}$) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von $0,055\mu\text{S/cm}$ bei 25°C ($\geq 18,2\text{M}\Omega\text{cm}$).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG 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 $100\mu\text{l}$** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (ID WASH)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden ($100\text{ml ID WASH} + 900\text{ml Reinstwasser}$), 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 **ID WASH** kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes ID WASH) ist **1 Monat bei 2–8°C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Das **Derivatisierungsreagenz (DER)** ist eine gesättigte Lösung. Aufgrund der hohen Konzentration kann es zu Kristallbildungen kommen. Dies beeinträchtigt die Verwendung des Derivatisierungsreagenz nicht.
- **Vorbereitung des Detektionsantikörpers:** Das **Detektionsantikörperkonzentrat (AB)** wird vor Gebrauch **1:101** in **Antikörperverdünnungspuffer** verdünnt (z. B. $220\mu\text{l AB} + 22\text{ml ABBUF}$). Das **AB** ist, bei **2–8°C** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. **Detektionsantikörper** (1:101 verdünntes AB) ist **2 Tage bei 2–8°C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8°C** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Als Probe eignen sich Plasma, bronchoalveoläre Lavage und cerebrospinale Flüssigkeit, Zellextrakte und andere lösliche Proteinproben.

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

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

Der Carbonylproteingehalt wird auf den Gesamtproteingehalt der Probe bezogen. **Es muss daher eine parallele Proteinbestimmung durchgeführt werden.**

Testprinzip

Die Proteine in der Probe werden mit DNPH derivatisiert. Anschließend werden die Nicht-Protein-Komponenten bzw. das überschüssige DNPH mittels Ultrafiltration entfernt und die Proteine adsorbtiv auf eine ELISA-Platte gebunden. Die adsorbierten Proteine werden mit anti-DNPH-Antikörpern und anschließend mit peroxidasekonjugiertem Antikörper inkubiert. Die optische Dichte wird gemessen und die Carbonyl-Konzentration anhand einer mitgeführten Standardkurve bestimmt. Die Erstellung der Standardkurve erfolgt mit Hilfe von carbonyliertem Serumalbumin.

Zur Ermittlung des Carbonylproteingehaltes wird die ermittelte Carbonylkonzentration auf den Gesamtproteingehalt der Probe bezogen. Es muss daher eine parallele Proteinbestimmung durchgeführt werden.

Probenvorbereitung und Derivatisierung

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

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Die Zentrifugenfiltrationsröhrchen für Standard, Kontrolle, Blank und Proben beschriften und in die Auffanggefäße stecken.
2.	In jedes Zentrifugenfiltrationsröhrchen 80 µl Derivatisierungsreagenz (DER) vorlegen.
3.	Je 4 µl Standard (STD), Kontrolle (CTRL), Blank (Assaypuffer) und Probe in die entsprechenden Zentrifugenfiltrationsröhrchen mit dem vorgelegten Derivatisierungsreagenz pipettieren. Durch mehrmaliges Aufziehen mischen und verschließen.

4.	Zur Derivatisierung 45 min bei Raumtemperatur stehen lassen.
5.	Derivatisierungsansätze 15 min bei 11 000 g zentrifugieren.
6.	60 µl Assaypuffer (ASYBUF) in alle Zentrifugenröhrchen pipettieren.
7.	Schritte 5 und 6 vier mal wiederholen.

Verdünnung I

1:4-Verdünnung

- 180 µl Assaypuffer + 60 µl Überstand der **Probe** aus der Derivatisierung
- 180 µl Assaypuffer + 60 µl Überstand der **Kontrolle** aus der Derivatisierung
- 180 µl Assaypuffer + 60 µl Überstand des **Blank** aus der Derivatisierung
- 180 µl Assaypuffer + 60 µl Überstand des **Standards** aus der Derivatisierung

Verdünnung II

1:20-Verdünnung

- 40 µl Verdünnung I + 760 µl Assaypuffer

Diese Verdünnung wird für die **Proteinbestimmung von Standard, Kontrolle und den jeweiligen Proben** verwendet. Es wird empfohlen den **Proteinbestimmungstest** (BCA-Test) bei **37 °C** für **3 Stunden** zu inkubieren.

Verdünnung III

1:100-Verdünnung

- 10 µl Verdünnung II + 990 µl Assaypuffer

Standardverdünnungsreihe

- S6 = verdünnter Standard aus der Derivatisierung (siehe Abschnitt Verdünnung III)
- S5 = 500 µl S6 + 500 µl Assaypuffer
- S4 = 500 µl S5 + 500 µl Assaypuffer
- S3 = 500 µl S4 + 500 µl Assaypuffer
- S2 = 500 µl S3 + 500 µl Assaypuffer
- S1 = verdünnter Blank aus der Derivatisierung

Diese Verdünnungen werden im **ELISA** eingesetzt.

Pipettierschema

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

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

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Je 200 µl Verdünnung III von Standards, Kontrollen, Leerwert und Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
2.	Streifen abdecken und über Nacht bei 2–8 °C oder 3 h bei 37 °C inkubieren.
3.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
4.	200 µl Detektionsantikörper (verdünntes AB) in alle Vertiefungen pipettieren.
5.	Streifen abdecken und 20 min bei Raumtemperatur inkubieren. Wichtig: Nicht schütteln!
6.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
7.	200 µl Konjugat (CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
8.	Streifen abdecken und 20 min bei Raumtemperatur inkubieren. Wichtig: Nicht schütteln!
9.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
10.	200 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
11.	10–20 min* bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
12.	50 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.

- | | |
|-----|---|
| 13. | Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden. |
|-----|---|

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

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.

Carbonylgehalt

Der Carbonylgehalt wird mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$CP_{\text{Probe}} \text{ [pmol/mg] normiert} = \frac{CP_{\text{Probe}} \text{ [pmol/mg]} \times \text{Proteine}_{\text{Standard}} \text{ [mg/ml]}}{\text{Proteine}_{\text{Probe}} \text{ [mg/ml]}}$$

CP_{Probe} : Carbonylproteingehalt der Probe in pmol/mg, ermittelt anhand der Standardkurve im Assay

$\text{Proteine}_{\text{Standard}}$: Proteingehalt des höchsten Standards (S6), ermittelt mit dem BCA-Test in mg/ml aus Verdünnung II

Proteine_{Probe}: Proteingehalt der Probe, ermittelt mit dem BCA-Test in mg/ml aus Verdünnung II

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Standardkurve × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

Analytische Sensitivität × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Analytische Sensitivität siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

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

EDTA-Plasma

75–200 pmol/mg

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 4)

Probe	Carbonylproteine [pmol/mg]	Standardabweichung (SD) [%]
1	70	9,86
2	140	8,40
3	830	5,80
4	1140	8,40

Inter-Assay (n = 4)

Probe	Carbonylproteine [pmol/mg]	Standardabweichung (SD) [%]
1	60	7,37
2	170	9,72
3	730	7,19
4	1130	6,36

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde als 20 pmol/mg ermittelt.

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur wissenschaftlichen Forschung 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 giftig. Auch Substrate

für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H₂SO₄). H₂SO₄ ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. Die Derivatisierungslösung stellt eine verdünnte Säuren dar, die auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht verwendet werden muss. H₂SO₄ und DER verursachen bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

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 beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Für die Qualitätskontrolle sind die für 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 MF. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free radical biology & medicine*. 2002 May 1;32(9):797–803.
2. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*. 1997 Aug 15;272(33):20313–6.
3. Buss H, Chan TP, Sluis KB, Domigan NM, Winterbourn CC. Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free radical biology & medicine*. 1997 Jan;23(3):361–6.
4. Cao G, Cutler RG. Protein oxidation and aging. I. Difficulties in measuring reactive protein carbonyls in tissues using 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1995 Jun 20;320(1):106–14.
5. Davies KJ, Delsignore ME, Lin SW. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *The Journal of biological chemistry*. 1987 Jul 15;262(20):9902–7.
6. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *The Biochemical journal*. 1997 May 15;324 (Pt 1):1–18.
7. Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V. Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure. *Kidney international Supplement*. 2001 Mar;78:S108-13.
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*. 2007 Jul;22 Suppl 5:v20-36.
9. Gladstone IM, Levine RL. Oxidation of proteins in neonatal lungs. *Pediatrics*. 1994 May;93(5):764–8.
10. Lenz AG, Jorens PG, Meyer B, De Backer W, Van Overveld F, Bossaert L, et al. Oxidatively modified proteins in bronchoalveolar lavage fluid of patients with ARDS and patients at-risk for ARDS. *The European respiratory journal*. 1999 Jan;13(1):169–74.

11. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free radical biology & medicine*. 2002 May 1;32(9):790–6.
12. Levine RL, Stadtman ER. Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental gerontology*. 2001 Sep;36(9):1495–502.
13. Marnett LJ, Riggins JN, West JD. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *The Journal of clinical investigation*. 2003 Mar;111(5):583–93.
14. Matzi V, Lindenmann J, Muench A, Greilberger J, Juan H, Wintersteiger R, 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*. 2007 Nov;32(5):776–82.
15. Reznick AZ, Cross CE, Hu ML, Suzuki YJ, Khwaja S, Safadi A, et al. Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. *The Biochemical journal*. 1992 Sep 1;286 (Pt 2):607–11.
16. Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd R a, 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*. 1991 Dec 1;88(23):10540–3.
17. Stadtman ER, Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *The Journal of biological chemistry*. 1991 Mar 5;266(4):2005–8.
18. Starke-Reed PE, Oliver CN. Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1989 Dec;275(2):559–67.
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*. 1996 Jan 1;313 (Pt 1(2):17–29.

Verwendete Symbole:

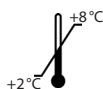
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	Nur für Forschungszwecke		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		

Carbonyl protein ELISA

*For the determination of protein carbonyls
in biological samples*

Valid from 2020-08-25

REF **KR7822**



RUO



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	18
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	19
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	19
7. ASSAY PROCEDURE	20
<i>Procedural notes</i>	20
<i>Principle of the test</i>	20
<i>Sample preparation and derivatisation</i>	20
<i>Dilution I</i>	21
<i>Dilution II</i>	21
<i>Dilution III</i>	21
<i>Test procedure</i>	21
8. RESULTS	23
9. LIMITATIONS	23
10. QUALITY CONTROL	24
<i>Reference range</i>	24
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	24
<i>Precision and reproducibility</i>	24
<i>Analytical sensitivity</i>	25
12. PRECAUTIONS	25
13. TECHNICAL HINTS	25
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	26
15. REFERENCES	26

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is intended for the determination of protein carbonyls in biological samples such as EDTA plasma, bronchoalveolar lavage fluid and cerebrospinal fluid, cell extracts and other soluble protein samples. For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

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 dinitrophenylhydrazine (DNPH) and measuring the bound anti-DNPH antibodies. The ELISA method enables carbonyls to be measured quantitatively with microgram quantities of protein.

Possible research areas

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

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KR7822	PLATE	Microtiter plate	12 x 8 wells
KR7822	ID WASH	Wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml
KR7822	STD	Standard concentrate, ready-to-use	1 x 50 µl
KR7822	CTRL	Control, ready-to-use	1 x 50 µl
KR7822	CONJ	Conjugate, peroxidase-labelled, ready-to-use	1 x 22 ml
KR7822	AB	Detection antibody concentrate, biotinylated	1 x 240 µl
KR7822	ABBUF	Antibody dilution buffer, ready-to-use	1 x 30 ml
KR7822	DER	Derivatisation reagent, ready-to-use	1 x 9 ml
KR7822	ASYBUF	Assay buffer, ready-to-use	2 x 100 ml
KR0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	2 x 15 ml
KR0003.15	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
- Inkubator 37 °C
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 11 000 g
- Vortex
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc. made of polypropylene
- Centrifugal filtration concentrators (cat. no KR7822ZR)
- Protein quantification test (cat. no KR7822BCA)
- 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. STORAGE AND PREPARATION 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 (ID WASH)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100 ml ID WASH + 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 **ID WASH** is can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2–8 °C**. **Wash buffer** (1:10 diluted ID WASH) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for 1 month**.
- The **derivatisation reagent (DER)** is a saturated solution. Crystals can occur due to the high salt concentration. The derivatisation reagent is used as such, without removing the crystals.
- **Preparation of the detection antibody:** Before use, the **detection antibody concentrate (AB)** is diluted **1:101** in **antibody dilution buffer** (e.g. 220 µl AB + 22 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) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for 2 days**.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents can be used until the expiry date (see label) when stored at **2–8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Plasma, bronchoalveolar lavage fluid and cerebrospinal fluid, cell extracts and other soluble protein samples are suited for this test system.

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

7. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

The carbonyl protein content is calculated from the estimated carbonyl concentration and the total protein content of the sample. For this reason, a **parallel determination of the protein content is required**.

Principle of the test

Samples containing protein are reacted with DNPH; then the non-protein constituents and unconjugated DNPH are separated by ultracentrifugation. The proteins are adsorbed to an ELISA plate and incubated with anti-DNPH antibody followed by antibody-linked horseradish peroxidase. Absorbances are related to a standard curve prepared with carbonylised serum albumin.

The carbonyl protein content is calculated from the estimated carbonyl concentration and the total protein content of the sample. For this reason, a parallel determination of the protein content is required.

Sample preparation and derivatisation

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

Take as many microtiter strips as needed from the kit. Store unused strips covered at 2–8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Label the centrifugal filtration concentrators for standard, control, blank and samples and place them in the collecting vials.
2.	Add into each centrifugal filtration concentrator 80 µl derivatisation reagent (DER).
3.	Add each 4 µl standard (STD), control (CTRL), blank (assay buffer) and sample in the corresponding centrifugal filtration concentrator containing the derivatisation reagent. Mix by repeated pipetting up and down and close the centrifugal filtration concentrator.
4.	Allow the derivatisation to proceed for 45 min at room temperature.
5.	Centrifuge all centrifugal filtration concentrators at 11 000 g for 15 min .
6.	Add 60 µl assay buffer (ASYBUF) in all centrifugal filtration concentrators.

7. Repeat steps 5 and 6 four times.
--

Dilution I

1:4 dilution

- 180 µl assay buffer + 60 µl **sample** supernatant after derivatisation
- 180 µl assay buffer + 60 µl **control** supernatant after derivatisation
- 180 µl assay buffer + 60 µl **blank** supernatant after derivatisation
- 180 µl assay buffer + 60 µl **standard** supernatant after derivatisation

Dilution II

1:20 dilution

- 40 µl dilution I + 760 µl assay buffer

This dilution is used for **protein determination of standard, control and the respective samples**. We recommend incubating the **protein determination test** (BCA test) at **37 °C** for **3 hours**.

Dilution III

1:100 dilution

- 10 µl dilution II + 990 µl assay buffer

Standard dilution series

- S6 = diluted standard concentrate from derivatisation (see section dilution III)
- S5 = 500 µl S6 + 500 µl assay buffer
- S4 = 500 µl S5 + 500 µl assay buffer
- S3 = 500 µl S4 + 500 µl assay buffer
- S2 = 500 µl S3 + 500 µl assay buffer
- S1 = diluted blank from derivatisation

These dilutions are used for the **ELISA** test.

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.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Add each 200 µl dilution III of standards/controls/blank/samples into the respective wells.
2.	Cover the strips and incubate over night at 2–8 °C or for 3 h at 37 °C .
3.	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.
4.	Add 200 µl detection antibody (diluted AB) into each well.
5.	Cover the strips and incubate for 20 min at room temperature. Important: Do not shake!
6.	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.
7.	Add 200 µl conjugate (CONJ) into each well.
8.	Cover the strips and incubate for 20 min at room temperature. Important: Do not shake!
9.	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.
10.	Add 200 µl substrate (SUB) into each well.
11.	Incubate for 10–20 min* at room temperature (15–30 °C) in the dark .
12.	Add 50 µl stop solution (STOP) into each well and mix well.
13.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. 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 program used, the duplicate values should be evaluated manually.

Protein carbonyl content

The protein carbonyl content is calculated according to the following formula:

$$CP_{\text{Probe}} [\text{pmol/mg}] \text{ standardised} = \frac{CP_{\text{sample}} [\text{pmol/mg}] \times \text{proteins}_{\text{standard}} [\text{mg/ml}]}{\text{proteins}_{\text{sample}} [\text{mg/ml}]}$$

CP_{sample} : Carbonyl protein content of the sample in pmol/mg, estimated from the standard curve in the assay

$\text{proteins}_{\text{standard}}$: Protein content of dilution Ii of the highest standard (S6), estimated with the BCA test in mg/ml

$\text{proteine}_{\text{sample}}$: Protein content of the sample dilution II, estimated with the BCA test in mg/ml

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) can be further diluted and re-assayed. Please consider this higher dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range (see definition below) cannot be clearly quantified.

The upper limit of the measurement range can be calculated as:

highest concentration of the standard curve × sample dilution factor to be used

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

LoB × sample dilution factor to be used

Analytical sensitivity × sample dilution factor to be used

Analytical sensitivity see chapter "Performance Characteristics".

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 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

EDTA plasma

75–200 pmol/mg

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 4)

Sample	Carbonyl proteins [pmol/mg]	Standard deviation (SD) [%]
1	70	9.86
2	140	8.40
3	830	5.80
4	11140	8.40

Inter-Assay (n = 4)

Sample	Carbonyl proteins [pmol/mg]	Standard deviation (SD) [%]
1	60	7.37
2	170	9.72
3	730	7.19
4	1130	6.36

Analytical sensitivity

The detection limit was estimated to be 20 pmol/mg.

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for research 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 and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Derivatisation solution is composed of strong acid. Although diluted, they still should be handled with care. They 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 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.
- 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

- The guidelines for 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 MF. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free radical biology & medicine*. 2002 May 1;32(9):797–803.
2. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*. 1997 Aug 15;272(33):20313–6.
3. Buss H, Chan TP, Sluis KB, Domigan NM, Winterbourn CC. Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free radical biology & medicine*. 1997 Jan;23(3):361–6.
4. Cao G, Cutler RG. Protein oxidation and aging. I. Difficulties in measuring reactive protein carbonyls in tissues using 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1995 Jun 20;320(1):106–14.
5. Davies KJ, Delsignore ME, Lin SW. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *The Journal of biological chemistry*. 1987 Jul 15;262(20):9902–7.

6. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *The Biochemical journal*. 1997 May 15;324 (Pt 1:1–18.
7. Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V. Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure. *Kidney international Supplement*. 2001 Mar;78:S108-13.
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*. 2007 Jul;22 Suppl 5:v20-36.
9. Gladstone IM, Levine RL. Oxidation of proteins in neonatal lungs. *Pediatrics*. 1994 May;93(5):764–8.
10. Lenz AG, Jorens PG, Meyer B, De Backer W, Van Overveld F, Bossaert L, et al. Oxidatively modified proteins in bronchoalveolar lavage fluid of patients with ARDS and patients at-risk for ARDS. *The European respiratory journal*. 1999 Jan;13(1):169–74.
11. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free radical biology & medicine*. 2002 May 1;32(9):790–6.
12. Levine RL, Stadtman ER. Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental gerontology*. 2001 Sep;36(9):1495–502.
13. Marnett LJ, Riggins JN, West JD. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *The Journal of clinical investigation*. 2003 Mar;111(5):583–93.
14. Matzi V, Lindenmann J, Muench A, Greilberger J, Juan H, Wintersteiger R, 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*. 2007 Nov;32(5):776–82.
15. Reznick AZ, Cross CE, Hu ML, Suzuki YJ, Khwaja S, Safadi A, et al. Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. *The Biochemical journal*. 1992 Sep 1;286 (Pt 2:607–11.
16. Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd R a, 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*. 1991 Dec 1;88(23):10540–3.
17. Stadtman ER, Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *The Journal of biological chemistry*. 1991 Mar 5;266(4):2005–8.

18. Starke-Reed PE, Oliver CN. Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. Archives of biochemistry and biophysics. 1989 Dec;275(2):559–67.
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. 1996 Jan 1;313 (Pt 1(2):17–29.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	For research use only		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

