

Arbeitsanleitung / Manual

IDK[®] Kynureninsäure (KynA)

ELISA

Zur in-vitro-Bestimmung von Kynureninsäure in Urin

IDK[®] kynurenic acid (KynA)

ELISA

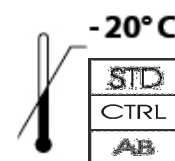
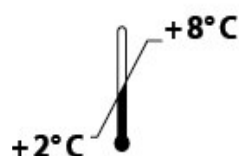
For the in vitro determination of kynurenic acid in urine

Nur zu Forschungszwecken / For research use only

Gültig ab / Valid from 2016-06-19

REF

K 7735



RUO



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

Tel.: ++49 6251 70190-0

Fax: ++ 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. INHALT DER TESTPACKUNG	2
3. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	2
4. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	3
5. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG	4
<i>Probenlagerung</i>	4
<i>Vorbereitung der Proben, Standards und Kontrollen</i>	4
6. TESTDURCHFÜHRUNG	4
<i>Testprinzip</i>	4
<i>Pipettierschema</i>	5
7. ERGEBNISSE	6
8. EINSCHRÄNKUNGEN	7
9. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Referenzwerte</i>	8
10. TESTCHARAKTERISTIKA	8
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	8
<i>Spike-Wiederfindung</i>	9
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	9
<i>Analytische Sensitivität</i>	10
<i>Spezifität</i>	10
11. VORSICHTSMASSNAHMEN	10
12. TECHNISCHE MERKMALE	11
13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
14. LITERATUR	12

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die quantitative Bestimmung von Kynureninsäure in Urin geeignet. Nur für wissenschaftliche Forschung. Nicht für diagnostische Zwecke.

2. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Bezeichnung	Kit Komponenten	Menge
K 7735	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 7735	STD	Standards, gebrauchsfertig (0; 1,5; 6; 15; 45;150 µM)	6 x 200 µl
K 7735	CTRL 1	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 200 µl
K 7735	CTRL 2	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 200 µl
K 7735	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 7735	AB	Kynureninsäure-Antikörper, peroxidase markiert, lyophilisiert	4 x 1 Fläschchen
K 7735	ABBUF	Antikörperverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 8 ml
K 7735	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	2 x 30 ml
K 7735	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 7735	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

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

3. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl

- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 6)

* 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).

4. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits 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 bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert 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 der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Der **WASHBUF** kann bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünnter WASHBUF) ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Standards (STD)** und **Kontrollen (CTRL1, CTRL2)** werden eingefroren bei **-20 °C** gelagert. Für den Test die Standards und Kontrollen auftauen und kurz vortexen. Die Standards und Kontrollen nach Gebrauch sofort wieder einfrieren.
- Der **lyophilisierte** peroxidase markierte **Kynureninsäure-Antikörper (AB)** wird bei **-20 °C** gelagert. Für den Einsatz im Test wird der AB mit **1,5 ml Antikörperverdünnungspuffer (ABBUF)** rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen 10 min stehen gelassen. Der Antikörperverdünnungspuffer muss dazu vorher auf **Raumtemperatur** gebracht werden. Wenn mehrere

Fläschchen benötigt werden, deren Inhalt vereinen und vor Gebrauch mischen. Nach Gebrauch ist der Rest zu verwerfen.

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

5. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

Probenlagerung

Die Haltbarkeit der Urinproben beträgt 24 h bei Raumtemperatur oder 4 Tage bei 2-8 °C. Zur längeren Lagerung müssen die Proben bei -20 °C aufbewahrt werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren ist zu vermeiden.

Vorbereitung der Proben, Standards und Kontrollen

1.	Je 50 µl Standard (STD)/ Kontrolle (CTRL)/ Urinprobe in entsprechend beschriftete Reaktionsgefäße pipettieren.
2.	500 µl Assaypuffer (ASYBUF) in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, Proben) pipettieren, gut mischen.

50 µl der so vorbereiteten Standards, Kontrollen und Proben werden im Test pro Vertiefung eingesetzt.

6. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays. Die zu untersuchenden Proben, Standards und Kontrollen werden zusammen mit einem peroxidasemarkierten polyklonalen anti-Kynureninsäure-Antikörper in einer mit Kynureninsäure (Antigen) beschichteten Mikrotiterplatte inkubiert.

Während der Inkubation kompetitiert das freie Zielantigen in der Probe mit dem an die Platte gebundenen Antigen um die Bindung der peroxidasemarkierten polyklonalen Antikörper.

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 gemessen. Die Intensität der Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration des gemessenen Analyten, d.h. mit steigender Kynureninsäure-Konzentration in der Probe reduziert sich die Konzentration der an die beschichtete Platte gebundenen Antikörper und das Signal nimmt ab. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentrationen der Proben ermitteln.

Pipettierschema

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

Markieren Sie die Positionen für Standards/ Kontrollen/ Proben in einem Protokollblatt.

Die benötigten Streifen der Mikrotiterplatte (PLATE) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt 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.	Mikrotiterstreifen 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen und nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	50 µl der vorbereiteten Standards/ Kontrollen/ Proben in die jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
3.	50 µl Kynureninsäure-Antikörper in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettieren.
4.	Streifen luftdicht abdecken und über Nacht (15-20 Stunden) bei 2-8 °C inkubieren.

5.	Inhalt der Platte verwerfen und 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
6.	100 µl Substrat (SUB) in alle Vertiefungen pipettieren.
7.	10-15 min* bei Raumtemperatur (15-30 °C) im Dunkeln inkubieren.
8.	100 µl Stopplösung (STOP) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen.
9.	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.

7. 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.

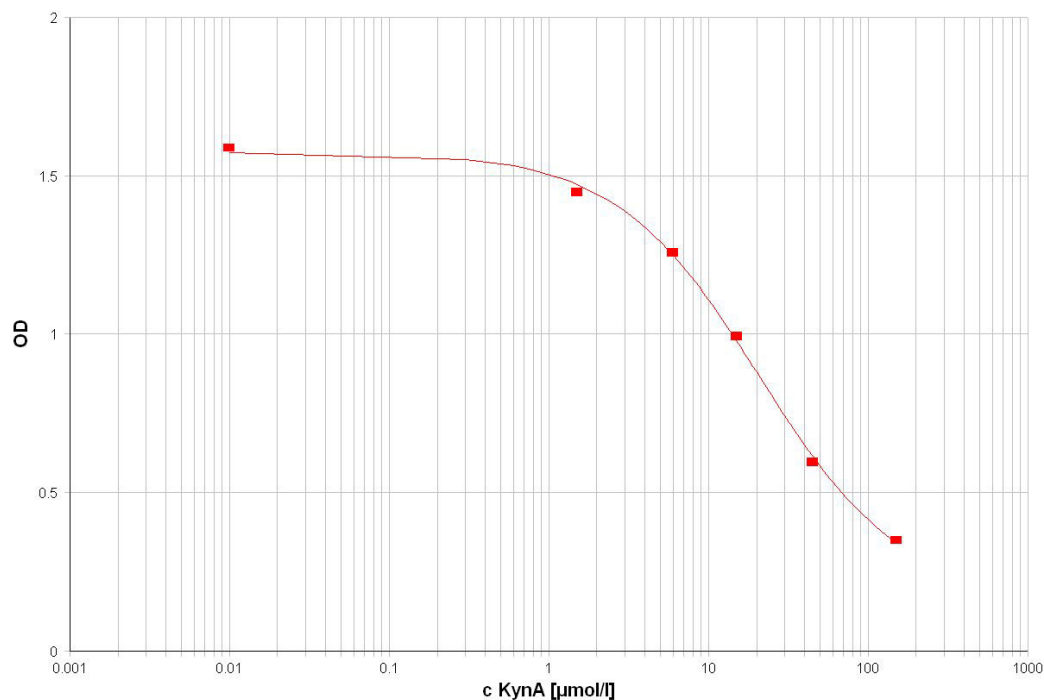
Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Urinproben

Die Konzentrationen der Proben können direkt aus der Standardkurve in $\mu\text{mol/l}$ abgelesen werden. Es wird **kein Faktor** benötigt.

Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve. Sie darf nicht zur Auswertung der Messwerte benutzt werden.

Musterkalibrierkurve



8. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben, deren OD niedriger ist als die des höchsten Standards, sollten mit Assaypuffer (ASYBUF) stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diesen Verdünnungsfaktor bei der Ergebnisberechnung.

9. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik 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 die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzwerte

Anhand einer laborinternen Studie mit Urinproben von augenscheinlich gesunden Personen wurde ein Mittelwert von 22 µmol/l ermittelt (n = 41), bei einer Standardabweichung von 10 µmol/l (MW ± 2 SD = 22 ± 20 µM).

Normalbereich Urin: **2 – 42 µM** , bzw. **0,34 – 2,58 µM / mmol Kreatinin**

Normalbereich Urin, *M. P. Turski et al.*: **4 - 40 µM** *

*Turski MP, Turska M, Paluszkiwicz P, Parada-Turska J, Oxenkrug GF. Kynurenic Acid in the digestive system-new facts, new challenges. *International journal of tryptophan research : IJTR* 6, 47-55 (2013)

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

10. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 24)

Probe	Kynureninsäure [µmol/l]	VK [%]
1	28,8	5,7
2	26,9	8,0

Inter-Assay (n = 6)

Probe	Kynureninsäure [µmol/l]	VK [%]
1	15,9	11,4
2	33,0	9,6

Spike-Wiederfindung

Drei Urinproben wurden mit unterschiedlichen Mengen an Kynureninsäure versetzt und gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug 95,8 % (n = 2).

Probe	Spike [$\mu\text{mol/l}$]	Kynureninsäure erwartet [$\mu\text{mol/l}$]	Kynureninsäure gemessen [$\mu\text{mol/l}$]	Wiederfindung [%]
A			21,71	
	10	31,71	33,69	106,2
	20	41,71	44,60	106,9
B			18,73	
	10	28,73	28,32	98,6
	20	38,73	33,79	87,3
C			17,18	
	10	27,18	24,28	89,3
	20	37,18	32,20	86,6

Wiederfindung in der Verdünnung

Drei Urinproben wurden jeweils mit Assaypuffer verdünnt und gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug 106,8 % (n = 2).

Probe	Verdünnung	Kynureninsäure erwartet [$\mu\text{mol/l}$]	Kynureninsäure gemessen [$\mu\text{mol/l}$]	Wiederfindung [%]
A			10,64	
	1:2	5,32	6,00	112,7
	1:3	3,55	3,88	109,4
B			4,04	
	1:2	2,02	1,94	95,9
	1:3	1,35	1,39	103,0
C			44,46	
	1:2	22,23	22,23	100,0
	1:3	14,82	17,76	119,8

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 - 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 48 x der STD 1 (Null-Standard). Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 0,3 $\mu\text{mol/l}$.

Probe	Mittelwert [OD]	2 Standardabweichungen (2 x SD)	Nachweisgrenze [$\mu\text{mol/l}$]
STD 1	2,197	0,14	0,3

Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter Substanzen. Die Kreuzreaktivität wird angegeben in Prozent, bezogen auf die Kynureninsäure-Reaktivität:

Quinolinsäure	< 0,01 %
Serotonin	< 0,01 %
Indol-3-essigsäure	< 0,01 %
L-Tryptophan	< 0,1 %
L-OH-Kynurenin	< 0,1 %
L-Kynurenin	< 0,1 %

11. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu Forschungszwecken 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 Natriumazid oder ProClin zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. 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 (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch im verdünnten Zustand 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.

12. 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 Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den 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 im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- *IDK®* ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- 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.

14. LITERATUR

Agudelo LZ, Femenía T, Orhan F, Porsmyr-Palmertz M, Goiny M, Martinez-Redondo V, et al. Skeletal Muscle PGC-1 α 1 Modulates Kynurenine Metabolism and Mediates Resilience to Stress-Induced Depression. *Cell*. 2014;159(1):33-45. doi:10.1016/j.cell.2014.07.051.










DiNatale BC, Murray IA, Schroeder JC, Flaveny CA, Lahoti TS, Laurenzana EM, et al. Kynurenic Acid Is a Potent Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand that Synergistically Induces Interleukin-6 in the Presence of Inflammatory Signaling. *Toxicological Sciences*. 2010;115(1):89-97. doi:10.1093/toxsci/kfq024.

Linderholm KR, Skogh E, Olsson SK, Dahl M-L, Holtze M, Engberg G, et al. Increased Levels of Kynurenine and Kynurenic Acid in the CSF of Patients With Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*. 2012;38(3):426-432. doi:10.1093/schbul/sbq086.

Milart P, Sikorski R. Kynurenic acid concentration in blood and urine during normal pregnancy. *Ginekologia polska*. 1998;69(12):968-973. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10224760>.

Turski MP, Turska M, Paluszkiewicz P, Parada-Turska J, Oxenkrug GF. Kynurenic Acid in the digestive system-new facts, new challenges. *International journal of tryptophan research : IJTR*. 2013;6:47-55. doi:10.4137/IJTR.S12536.

Verwendete Symbole:

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

Manual

IDK® kynurenic acid (KynA)

ELISA

For the in vitro determination of kynurenic acid in urine

For research use only

Valid from 2016-06-19



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 849430

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

Table of Contents

1. INTENDED USE	17
2. MATERIAL SUPPLIED	17
3. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	17
4. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	18
5. PREPARATION AND STORAGE OF SAMPLES	19
<i>Storage of samples</i>	19
<i>Preparation of samples, controls and standards</i>	19
6. ASSAY PROCEDURE	19
<i>Principle of the test</i>	19
<i>Test procedure</i>	20
7. RESULTS	21
8. LIMITATIONS	22
9. QUALITY CONTROL	22
<i>Reference Range</i>	23
10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	23
<i>Precision and reproducibility</i>	23
<i>Spiking recovery</i>	23
<i>Dilution recovery</i>	24
<i>Analytical sensitivity</i>	24
<i>Specificity</i>	25
11. PRECAUTIONS	25
12. TECHNICAL HINTS	26
13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	26
14. REFERENCES	26

1. INTENDED USE

The described IDK® kynurenic acid (KynA) is intended for the quantitative determination of kynurenic acid in urine. For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

2. MATERIAL SUPPLIED

Catalog No	Label	Kit Components	Quantity
K 7735	PLATE	Holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 7735	STD	Standards, ready to use (0, 1.5, 6, 15, 45, 150 µM)	6 x 200 µl
K 7735	CTRL 1	Control, ready to use (see specification for range)	1 x 200 µl
K 7735	CTRL 2	Control, ready to use (see specification for range)	1 x 200 µl
K 7735	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 7735	AB	kynurenic acid antibody, peroxidase-labeled, lyophilized	4 x 1 vial
K 7735	ABBUF	Antibody dilution buffer, ready to use	1 x 8 ml
K 7735	ASYBUF	Assay buffer, ready to use	2 x 30 ml
K 7735	SUB	TMB substrate (tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K 7735	STOP	ELISA 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.

3. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Calibrated precision pipets and 10-1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets

- Vortex
- Centrifuge, 3000 x *g*
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 6)

* 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).

4. 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 assay.** 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:** 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 in a water bath at 37 °C before dilution of the buffer solutions. The **WASHBUF** is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. **Washbuffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2-8 °C for 1 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.
- Store the **lyophilized** peroxidase conjugated **kynurenic acid antibody antibody (AB)** at **-20°C**. Reconstitute the AB with **1.5 ml** of **antibody dilution buffer (ABBUF)**. Allow the antibody dilution buffer to reach **room temperature** before use. Allow the content of the vial to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to ensure complete reconstitution. When more than one vial is to be used, combine the contents and mix prior to use. Discard any rest after use.
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8 °C**.

5. PREPARATION AND STORAGE OF SAMPLES

Storage of samples

Urine samples can be stored for 24 h at room temperature or for 4 days at 2-8 °C. For longer storage keep the samples frozen at -20 °C. Avoid repeated thawing and freezing.

Preparation of samples, controls and standards

1.	Add 50 µl of standards (STD)/ controls (CTRL)/ urine samples in labeled 1.5 ml reaction vials.
2.	Add 500 µl of assay buffer (ASYBUF) into each vial (STD/ CTRL/ samples), mix well.

For analysis, **50 µl** of the prepared standards, controls and samples are used per well.

6. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

The assay is based on the method of competitive enzyme linked immunoassays. Samples, standards and controls are incubated in wells of a microtiter plate coated with kynurenic acid (antigen), together with a peroxidase labeled polyclonal anti-kynurenic acid antibody. During the incubation period the free target antigen in the sample competes with the antigen immobilized on the wall of the microtiter wells for the binding of the peroxidase-labeled polyclonal antibodies.

After a washing step to remove the unbound components, the peroxidase substrate tetramethylbenzidine (TMB) is added. Finally, the enzymatic reaction is terminated by an acidic stop solution. The color changes from blue to yellow and the absorbance is measured in the photometer at 450 nm. The intensity of the yellow color is inverse proportional to the kynurenic acid concentration in the sample; this means, high antigen concentration in the sample reduces the concentration of antibodies bound to the antigen on the plate 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. Kynurenic acid present in the patient samples is 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 (PLATE) as needed from the kit. Store unused strips covered at 2-8 °C. Strips are stable until the 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.	Wash each well 5 times with 250 µl of wash buffer before use. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
2.	Add 50 µl of the prepared standards/ controls/ samples into the respective wells of the microtiter plate.
3.	Add 50 µl of kynurenic acid antibody into each well.
4.	Cover the plate tightly and incubate overnight (15-20 hours) at 2-8 °C .
5.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl of wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
6.	Add 100 µl of TMB substrate (SUB) into each well.
7.	Incubate for 10-15 minutes* at room temperature (15-30 °C) in the dark.
8.	Add 100 µl of ELISA stop solution (STOP) into each well, mix thoroughly.

9.	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 (690 nm) as a reference.
----	--

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

7. 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 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. 0.001).

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 linear abscissa for concentration.

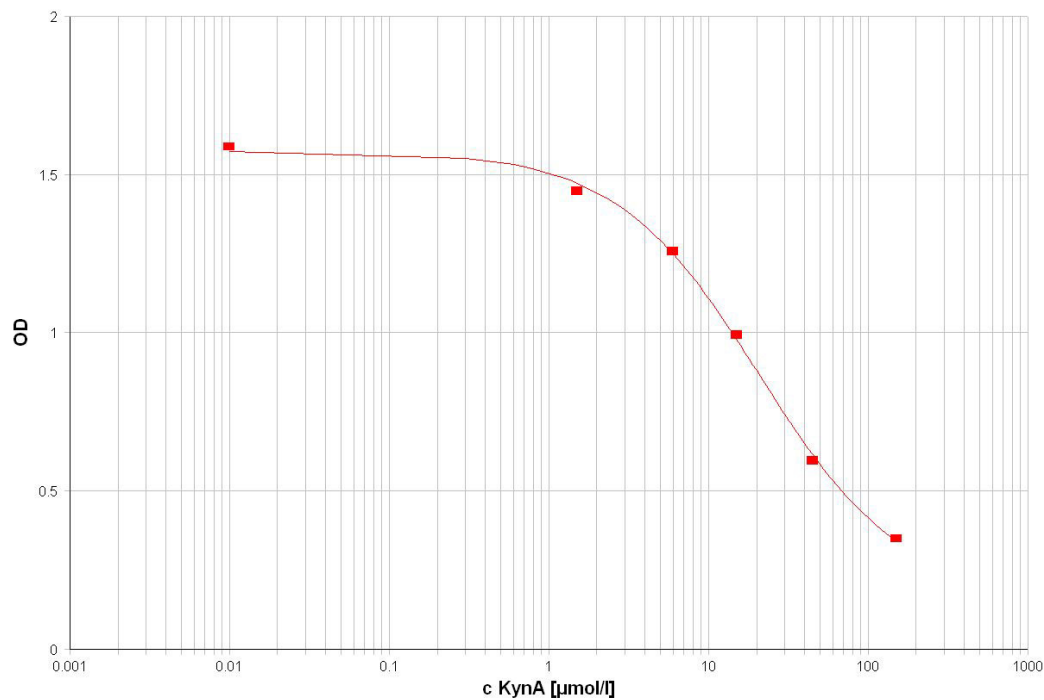
The plausibility of the duplicate values should be examined before automatically evaluating the results. If this option is not available within the used program, the duplicate values should be evaluated manually.

Urine samples

The concentrations can be determined directly from the standard curve in $\mu\text{mol/l}$. **No factor** is required.

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



8. LIMITATIONS

Samples with an OD lower than the OD of the highest standard should be diluted with assay buffer (ASYBUF) and re-assayed. Please consider this dilution factor when calculating the results.

9. QUALITY CONTROL

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

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 of the acceptable limits.

Reference Range

Based on internal studies with urine samples of apparently healthy persons a mean value of 22 $\mu\text{mol/l}$ was estimated ($n = 41$). The standard deviation was 10 $\mu\text{mol/l}$ ($MV \pm 2 SD = 22 \pm 20 \mu\text{M}$):

Normal range in urine: **2 – 42 μM** , or **0.34 – 2.58 μM / mmol creatinine**

Normal range in urine, *M. P. Turski et al.*: **4 - 40 μM** *

*Turski MP, Turska M, Paluszkiwicz P, Parada-Turska J, Oxenkrug GF. Kynurenic Acid in the digestive system-new facts, new challenges. *International journal of tryptophan research : IJTR* 6, 47-55 (2013)

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-assay (n = 24)

sample	kynurenic acid [$\mu\text{mol/l}$]	CV [%]
1	28.8	5.7
2	26.9	8.0

Inter-assay (n = 6)

sample	kynurenic acid [$\mu\text{mol/l}$]	CV [%]
1	15.9	11.4
2	33.0	9.8

Spiking recovery

Three urine samples were spiked with different kynurenic acid concentrations and measured in this assay The mean recovery rate 95.8 % ($n = 2$).

sample	spike [$\mu\text{mol/l}$]	kynurenic acid expected [$\mu\text{mol/l}$]	kynurenic acid measured [$\mu\text{mol/l}$]	recovery [%]
A			21.71	
	10	31.71	33.69	106.2
	20	41.71	44.60	106.9
B			18.73	
	10	28.73	28.32	98.6
	20	38.73	33.79	87.3
C			17.18	
	10	27.18	24.28	89.3
	20	37.18	32.20	86.6

Dilution recovery

Three urine samples were diluted with assay buffer and measured in this assay. The mean recovery rate was 106.8 % (n = 2).

sample	dilution	kynurenic acid expected [$\mu\text{mol/l}$]	kynurenic acid measured [$\mu\text{mol/l}$]	recovery [%]
A			10.64	
	1:2	5.32	6.00	112.7
	1:3	3.55	3.88	109.4
B			4.04	
	1:2	2.02	1.94	95.9
	1:3	1.35	1.39	103.0
C			44.46	
	1:2	22.23	22.23	100.0
	1:3	14.82	17.76	119.8

Analytical sensitivity

STD 1 (zero-standard) was measured 48 times. The detection limit was set as $B_0 - 2 \text{ SD}$ and estimated to be 0.3 $\mu\text{mol/l}$.

Sample	L-kynurenine mean value [OD]	2 x standard deviation (SD)	Detection limit [$\mu\text{mol/l}$]
STD 1	2.197	0.14	0.3

Specificity

Specificity was tested by measuring the cross-reactivity against compounds with structural similarity to kynurenic acid. The specificity is calculated in percent in relation to the kynurenic acid binding activity.

Quinolinic acid	< 0.01 %
Serotonin	< 0.01 %
Indole-3-acetic acid	< 0.01 %
L-tryptophan	< 0.1 %
L-OH-kynurenine	< 0.1 %
L-kynurenine	< 0.1 %

11. 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 color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes
- The stop solution consists of sulfuric acid, which is a strong acid. Although 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 up immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapour and avoid inhalation.

12. 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 analyzed 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.

13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- *IDK®* is a trademark of Immundiagnostik AG.
- Incubation time, incubation temperature, and pipetting volumes of the different 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.

14. REFERENCES

Agudelo LZ, Femenía T, Orhan F, Porsmyr-Palmertz M, Goiny M, Martinez-Redondo V, et al. Skeletal Muscle PGC-1 α 1 Modulates Kynurenine Metabolism and Mediates Resilience to Stress-Induced Depression. *Cell*. 2014;159(1):33-45. doi:10.1016/j.cell.2014.07.051.










DiNatale BC, Murray IA, Schroeder JC, Flaveny CA, Lahoti TS, Laurenzana EM, et al. Kynurenic Acid Is a Potent Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand that Synergistically Induces Interleukin-6 in the Presence of Inflammatory Signaling. *Toxicological Sciences*. 2010;115(1):89-97. doi:10.1093/toxsci/kfq024.

Linderholm KR, Skogh E, Olsson SK, Dahl M-L, Holtze M, Engberg G, et al. Increased Levels of Kynurenine and Kynurenic Acid in the CSF of Patients With Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*. 2012;38(3):426-432. doi:10.1093/schbul/sbq086.

Milart P, Sikorski R. Kynurenic acid concentration in blood and urine during normal pregnancy. *Ginekologia polska*. 1998;69(12):968-973. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10224760>.

Turski MP, Turska M, Paluszkiewicz P, Parada-Turska J, Oxenkrug GF. Kynurenic Acid in the digestive system-new facts, new challenges. *International journal of tryptophan research : IJTR*. 2013;6:47-55. doi:10.4137/IJTR.S12536.

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		