

Arbeitsanleitung / Manual

Nitrotyrosin ELISA

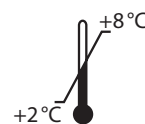
Zur in vitro Bestimmung von Nitrotyrosin in humanem EDTA-Plasma und Serum

Nitrotyrosine ELISA

For the in vitro determination of nitrotyrosine in human EDTA-plasma and serum

Gültig ab / Valid from: 2017-04-27

REF K 7829



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

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	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	5
8. ERGEBNISSE	6
9. EINSCHRÄNKUNGEN	7
10. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Referenzwerte</i>	8
11. TESTCHARAKTERISTIKA	8
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	8
<i>Spike-Wiederfindung</i>	9
<i>Analytische Sensitivität</i>	9
<i>Linearität</i>	9
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	10
13. TECHNISCHE MERKMALE	10
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
15. LITERATUR	11

1. VERWENDUNGSZWECK

Dieser ELISA ist für die Bestimmung von proteingebundenem Nitrotyrosin in humanem Serum und EDTA-Plasma geeignet. Zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Nitrotyrosin ist die nitrierte Form der Aminosäure Tyrosin. Proteingebundene Nitrotyrosine sind bei kardiovaskulären und inflammatorischen Krankheiten in der Zirkulation erhöht (z. B. Atherosklerose, Myokardinfarkt, diabetische Vaskulopathie, Bluthochdruck oder koronare Herzkrankheit). Auch neurologische Erkrankungen werden in einen Zusammenhang mit erhöhten Nitrotyrosinwerten gebracht (z. B. Alzheimer Krankheit, Multiple Sklerose).

Im Rahmen von Entzündungsreaktionen werden aus L-Arginin große Mengen Stickstoffmonoxid ($\bullet\text{NO}$) lokal durch das Enzym NO-Synthase (NOS) freigesetzt. Weitere Ursachen für die vermehrte $\bullet\text{NO}$ -Bildung sind Fremdstoffexpositionen (Chemikalien, Schwermetalle), Medikamente, Nikotin, physischer und psychischer Stress und eine starke körperliche Belastung mit erhöhtem Sauerstoffverbrauch. Stickstoffmonoxid ($\bullet\text{NO}$) in hohen Konzentrationen, welches nicht mehr ausreichend von der mitochondrialen Superoxiddismutase (MnSOD) abgefangen wird, reagiert mit einem Sauerstoffradikal ($\bullet\text{OO}^-$) schließlich zu Peroxynitrit (ONOO^-). Peroxynitrit besitzt eine starke Affinität zu aromatischen Aminosäuren. Es reagiert mit dem Phenolring des Tyrosins zu Nitrotyrosin. Proteingebundenes Nitrotyrosin ist ein stabiles Endprodukt mit einer relativ langen Halbwertszeit *in vivo* und stellt somit einen geeigneten Marker für nitrosativen Stress dar.

Indikationen

- Kardiovaskuläre Erkrankungen
- Neuronale Erkrankungen
- Schilddrüsenfunktionsstörungen
- Stoffwechselblockaden
- Mitochondriopathie

Biochemische Folgen von nitrosativem Stress

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

- Aktivierung von Apoptoseprozessen

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 7829	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 7829	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat, 10x	1 x 100 ml
K 7829	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
K 7829	STD	Standards, lyophilisiert	2 x 6 vials
K 7829	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	2 vials
K 7829	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	2 vials
K 7829	CONJ	Konjugatkonzentrat (Ziege anti-human-Serumproteine, Peroxidase-markiert)	1 x 200 µl
K 7829	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 7829	STOP	ELISA 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
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- 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. LAGERUNG UND VORBEREITUNG 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 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 Standards (STD) und Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. STDs und CTRLs werden mit **500 µl Reinstwasser** rekonstituiert, zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. **Standards und Kontrollen** (rekonstituierte STDs und CTRLs) **sind bei -20 °C vier Wochen haltbar. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.**
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:101** in **Assaypuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Assaypuffer). Das CONJ ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:101 verdünntes CONJ) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- **Nicht verwendete Mikrotiterstreifen** können im verschlossenen Alubeutel mit Trockenmittelbeutel bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei **2–8 °C** gelagert werden.
- Alle anderen gebrauchsfertigen Testreagenzien sind bei **2–8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

EDTA-Plasma oder Serum

15 µl frische Probe in 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettieren, mit **885 µl ASYBUF** (Assay-puffer) versetzen und gut mischen (entspricht einer **1:60** Verdünnung).

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf der "Sandwich"-ELISA Technik.

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

Primärantikörper – nitriertes Protein – Peroxidase-Konjugat.

Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem Nitrotyrosin-Gehalt direkt proportional. Aus den ermittelten Standardwerten wird eine Standardkurve - optische Dichte (Absorption bei 450 nm) gegen Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben berechnet werden.

Pipettierschema

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

Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können in der 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 der Mikrotiterstreifen 5x mit je 250 µl ELISA Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	Pipettieren Sie 100 µl STD/SAMPLE/CTRL (Standards/Proben/Kontrollen) in die Mikrotiterstreifen.
3.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30°C) unter Schütteln inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	100 µl verdünntes CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30°C) unter Schütteln inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl SUB (TMB- Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren.
9.	10-20 min* bei Raumtemperatur (15-30°C) im Dunkeln inkubieren.
10.	100 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen, gut mischen.
11.	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.

EDTA-Plasma- und Serumproben

Die ermittelte Nitrotyrosinkonzentration wird mit dem **Faktor 60** multipliziert.

Kontrollen

Die Nitrotyrosinkonzentration wird direkt anhand der Standardkurve ausgewertet. Der Gültigkeitsbereich ist der mitgeführten Spezifikation zu entnehmen.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs müssen stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs 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:

LoB × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor

10. 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 Serumproben von augenscheinlich Gesunden (n = 78) wurde folgender Referenzbereich ermittelt:

Min: **264 nM**

Max: **3311 nM**

Median: **549 nM**

Bei 95% dieses Kollektives (95 Percentile) wurde eine Nitrotyrosinkonzentration von 1674 nM und weniger gemessen.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 24)

Zwei Seren wurden jeweils 24 mal von einer Person innerhalb einer Messung getestet.

Probe	Nitrotyrosin [nM]	VK [%]
1	2268	2,8
2	859	3,7

Inter-Assay (n = 15)

Zwei Seren wurden jeweils an drei aufeinanderfolgenden Tagen von fünf verschiedenen Personen gemessen.

Probe	Nitrotyrosin [nM]	VK [%]
1	2393	10,3
2	931	8,7

Spike-Wiederfindung

Zwei verschiedene Seren wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Nitrotyrosin-Standardmaterial versetzt und gemessen (n = 2).

Probe	Ungespikte Probe [nM]	Spike [nM]	Nitrotyrosin erwartet [nM]	Nitrotyrosin gemessen [nM]
A	14,5	22,2	36,7	36,2
		66,6	81,1	82,4
		111,1	125,6	137,2
B	7,2	22,2	29,4	28,1
		66,6	73,8	70,0
		111,1	118,3	113,7

Analytische Sensitivität

Die berechnete Nachweisgrenze (LoB; Limit of Blank) wurde festgelegt als $B_0 + 1.645 \cdot SD$. Gemessen wurde 320 mal der Standard 1 (Leerwert).

LoB = 0,853 nM

Dieser LoB wurde ermittelt in Bezug auf die Konzentration der Kalibrationskurve ohne Berücksichtigung des Probenverdünnungsfaktors.

Linearität

Zwei Seren wurden seriell verdünnt und gemessen. Gegenübergestellt sind die erwarteten (berechneten) und die gemessenen Nitrotyrosin Konzentrationen (n=2).

Probe	Verdünnung	Nitrotyrosin erwartet [nM]	Nitrotyrosin gemessen [nM]
1	1:60		2999
	1:120	1500	1497
	1:240	750	825
2	1:60		2774
	1:120	1387	1339
	1:240	694	687

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 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 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 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.

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. Peluffo, Gonzalo, and Rafael Radi. 2007. "Biochemistry of Protein Tyrosine Nitration in Cardiovascular Pathology." *Cardiovascular Research* **75** (2) (July 15): 291–302. doi:10.1016/j.cardiores.2007.04.024.
2. Gonsette, R E. 2008. "Neurodegeneration in Multiple Sclerosis: The Role of Oxidative Stress and Excitotoxicity." *Journal of the Neurological Sciences* **274** (1-2) (November 15): 48–53. doi:10.1016/j.jns.2008.06.029.
3. Ischiropoulos, Harry. 2009. "Protein Tyrosine Nitration--an Update." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **484** (2) (April 15): 117–21. doi:10.1016/j.abb.2008.10.034.
4. Köse, Fadime Aydın, Meltem Seziş, Fehmi Akçiçek, and Aysun Pabuççuoğlu. 2011. "Oxidative and Nitrosative Stress Markers in Patients on Hemodialysis and Peritoneal Dialysis." *Blood Purification* **32** (3) (January): 202–8. doi:10.1159/000328030.

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer

*In-Vitro*-Diagnostikum

Zu verwenden mit



Hersteller

Inhalt ausreichend für <n
Prüfungen

Chargenbezeichnung



Verwendbar bis

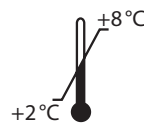
Manual

Nitrotyrosine ELISA

*For the in vitro determination of nitrotyrosine in human
EDTA-plasma and serum*

Valid from 2017-04-27

REF K 7829



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	15
2. INTRODUCTION / CLINICAL RELEVANCE	15
3. MATERIAL SUPPLIED	16
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	17
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	17
7. ASSAY PROCEDURE	18
<i>Principle of the test</i>	18
<i>Test procedure</i>	18
8. RESULTS	19
9. LIMITATIONS	20
10. QUALITY CONTROL	20
<i>Reference range</i>	21
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	21
<i>Precision and reproducibility</i>	21
<i>Spiking Recovery</i>	21
<i>Analytical Sensitivity</i>	22
<i>Linearity</i>	22
12. PRECAUTIONS	22
13. TECHNICAL HINTS	23
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	23
15. REFERENCES	24

1. INTENDED USE

The described Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) is intended for the quantitative determination of protein-bound nitrotyrosine in human EDTA-plasma, serum and stool. It is for *in vitro* use only.

2. INTRODUCTION / CLINICAL RELEVANCE

Nitrotyrosine is the nitrated form of the amino acid tyrosine. The accumulation of protein bound nitrotyrosine is associated with cardiovascular diseases that are based on inflammatory processes (e.g., atherosclerosis, myocardial infarction, diabetic vasculopathy, hypertension, or coronary heart diseases). A growing number of studies have also associated the accumulation of nitrotyrosine with neurological diseases (Alzheimer's disease, Parkinson's disease, multiple sclerosis, stroke).

With treatment of some of the associated diseases the levels of nitrated tyrosines have been shown to decrease, so nitrotyrosine has been stated to be a marker of nitrosative stress. During inflammatory processes, large amounts of nitric oxide ($\bullet\text{NO}$) are locally released from L-arginine. This reaction is catalyzed by the enzyme NO-synthase (NOS). Other causes for the increased $\bullet\text{NO}$ production are exposure to chemicals or heavy metals, drugs, nicotine, or physical and psychological stress, as well as extraordinary physical strain with increased oxygen consumption. In high concentrations, $\bullet\text{NO}$ that is not trapped by mitochondrial superoxide dismutase (MnSOD) reacts with superoxide ($\bullet\text{OO}^-$) to form peroxynitrite (ONOO^-). Peroxynitrite is implicated as a key oxidant species in several pathologies and is known to be cytotoxic (nitrosative stress). Peroxynitrite is highly reactive and shows a high affinity to aromatic amino acids, e.g., to the phenolic ring of tyrosine. The nitration of tyrosine in general is a natural process within the post-translational protein modification. Nitrotyrosine is a stable product and might be seen as a correlate of peroxynitrite production, and its accumulation in cells and tissues is a marker of oxidative stress and nitrosative stress, respectively.

Indications

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

Consequences of nitrosative stress

- Modification of lipids and proteins (for example structural proteins in mitochondria)

- Inhibition of respiratory chain enzymes in the mitochondria
- Glutamate overload
- Disturbances in ion channels
- Calcium overload
- Initiation of apoptosis processes

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 7829	PLATE	Microtiter plate, precoated	12 x 8 wells
K 7829	WASHBUF	ELISA wash concentrate, 10x	1 x 100 ml
K 7829	ASYBUF	Assay buffer, ready-to-use	1 x 100 ml
K 7829	STD	Standards, lyophilized	2 x 6 vials
K 7829	CTRL	Control, lyophilized	2 vials
K 7829	CTRL	Control, lyophilized	2 vials
K 7829	CONJ	Conjugate (goat anti-human-serum proteins, peroxidase-labeled)	1 x 200 µl
K 7829	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine),	1 x 15 ml
K 7829	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.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 g
- Vortex
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

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

5. 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 (WASHBUF)** has to be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure 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 standards (STD)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. Before use, the STDs and CTRLs have to be reconstituted with **500 µl of ultra pure water.** Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly to ensure complete reconstitution. **Standards and controls** (reconstituted STDs and CTRLs) **can be stored at -20°C for 4 weeks. Avoid repeated thawing and freezing.**
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:101** in **assay buffer** (100 µl CONJ + 10 ml assay-buffer). The CONJ is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Conjugate** (1:101 diluted CONJ) **is not stable and cannot be stored.**
- Store **unused microtiter strips** sealed in the aluminium foil bag with desiccant at 2-8° C. Strips are stable until the expiry date stated on the label.
- 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.**

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

EDTA-plasma or serum samples

Pipet **15 µl** of fresh EDTA-plasma or serum sample in a 1.5 ml reaction vial, add **885 µl ASYBUF** (assay buffer) and mix well (dilution **1:60**).

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

The assay utilizes the “sandwich” technique.

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

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

Test procedure

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

Take as many **microtiter strips** as needed from kit. Store unused strips at **2–8 ° C** in the aluminium bag with desiccating. 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.	Wash the pre-coated microtiter plate 5 x with 250 µl ELISA wash buffer . After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add 100 µl of STD/SAMPLE/CTRL (standard/sample/controls) into respective well.
3.	Cover plate or strips with foil tightly and incubate for 1 h at room temperature (15 - 30 °C) on the horizontal shaker.

4.	Discard the contents of each well. Wash 5 x with 250 µl ELISA wash buffer . After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add 100 µl conjugate into each well.
6.	Cover plate or strips with foil tightly and incubate for 1 h at room temperature (15 - 30°C) on the horizontal shaker.
7.	Discard the contents of each well. Wash 5 x with 250 µl ELISA wash buffer . After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
8.	Add 100 µl of SUB (TMB substrate) into each well.
9.	Incubate for 10-20* min at room temperature (15-30°C) in the dark .
10.	Add 100 µl of STOP (stop solution) into each well, mix thoroughly in a microtiter plate reader.
11.	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 color change is temperature sensitive. We recommend observing the color 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.

EDTA-plasma and serum samples

The obtained nitrotyrosine concentration must be multiplied by the **dilution factor of 60**.

Controls

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

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range must be further diluted and re-assayed. Please consider this greater dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range 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

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik 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 studies of serum samples of apparently healthy persons (n = 78), the following values were estimated:

Min: 264 nM

Max: 3311 nM

Median: 549 nM

For 95% of this collective (95 percentile) a nitrotyrosine concentration of 1674 nM and less was obtained.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 24)

Each of two serum samples was measured 24 times by one technician within the same assay.

Sample	Nitrotyrosine [nM]	CV [%]
1	2268	2.8
2	859	3.7

Inter-Assay (n = 15)

Each of two serum sample was independently measured by five different technicians on three different days.

Sample	Nitrotyrosine [nM]	CV [%]
1	2393	10.3
2	931	8.7

Spiking Recovery

Two samples were spiked with different nitrotyrosine concentrations and measured using this assay (n = 2).

Sample	Unspiked Sample [nM]	Spike [nM]	Nitrotyrosine expected [nM]	Nitrotyrosine measured [nM]
A	14.5	22.2	36.7	36.2
		66.6	81.1	82.4
		111.1	125.6	137.2
B	7.2	22.2	29.4	28.1
		66.6	73.8	70.0
		111.1	118.3	113.7

Analytical Sensitivity

The calculated detection limit (LoB; Limit of Blank) was set as $B_0 + 1.645 \cdot SD$. Standard 1 (blank) was measured 320 times.

LoB = 0.853 nM

This LoB value was estimated based on the concentration of the calibration curve without considering the sample dilution factor.

Linearity

Two patient serum samples were diluted and analyzed. The results are shown below: (n=2).

Sample	Dilution	Nitrotyrosine expected [nM]	Nitrotyrosine measured [nM]
1	1:60		2999
	1:120	1500	1497
	1:240	750	825
2	1:60		2774
	1:120	1387	1339
	1:240	694	687

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 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 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 analyzed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Substrate solution should remain colorless 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 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 send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Peluffo, Gonzalo, and Rafael Radi. 2007. "Biochemistry of Protein Tyrosine Nitration in Cardiovascular Pathology." *Cardiovascular Research* **75** (2) (July 15): 291–302. doi:10.1016/j.cardiores.2007.04.024.
2. Gonsette, R E. 2008. "Neurodegeneration in Multiple Sclerosis: The Role of Oxidative Stress and Excitotoxicity." *Journal of the Neurological Sciences* **274** (1-2) (November 15): 48–53. doi:10.1016/j.jns.2008.06.029.
3. Ischiropoulos, Harry. 2009. "Protein Tyrosine Nitration--an Update." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **484** (2) (April 15): 117–21. doi:10.1016/j.abb.2008.10.034.
4. Köse, Fadime Aydın, Meltem Seziş, Fehmi Akçiçek, and Aysun Pabuççuoğlu. 2011. "Oxidative and Nitrosative Stress Markers in Patients on Hemodialysis and Peritoneal Dialysis." *Blood Purification* **32** (3) (January): 202–8. doi:10.1159/000328030.

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