

Arbeitsanleitung / Manual

# **IDK<sup>®</sup> Tryptophan ELISA** **high sensitive**

***Zur in-vitro-Bestimmung von L-Tryptophan in Nagern (Plasma, Serum, Hirngewebe), sowie in Zellkulturüberständen und CSF***

***For the in vitro determination of L-tryptophan in rodents (plasma, serum and brain tissue), in cell culture supernatant and CSF***

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

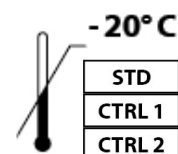
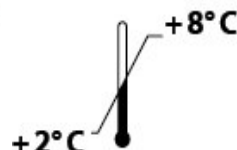
Gültig ab / Valid from 2016-01-12

**REF**

**K 3730**



96



**RUO**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

## Inhalt

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

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist geeignet für die quantitative Bestimmung von L-Tryptophan in EDTA-Plasma, Serum und Hirngewebe von Nagern (Maus, Ratte), sowie in Zellkulturüberständen und CSF (Cerebrospinal-Flüssigkeit). Nur für wissenschaftliche Forschung. Nicht für diagnostische Zwecke.

Für humane Plasma-, Serum-, und Urinproben empfehlen wir Ihnen unseren IDK® Tryptophan ELISA K 7730.

## 2. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Bezeichnung	Kit Komponenten	Menge
K 3730	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 3730	STD	Standards, gebrauchsfertig (0, 2, 8, 30, 80, 250 µM)	6 x 200 µl
K 3730 K 3730	CTRL 1 CTRL 2	Kontrollen, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 200 µl
K 3730	STD	„Cell culture medium“ Standards, gebrauchsfertig (0, 2, 8, 30, 80, 250 µM)	6 x 200 µl
K 3730 K 3730	CTRL 1 CTRL 2	„Cell culture medium“ Kontrollen, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 200 µl
K 3730	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 3730	AB	L-Tryptophan-Antikörper, lyophilisiert	4 x 1 Fläschchen
K 3730	CONJ	Konjugat, Peroxidase-markiert, Konzentrat	1 x 65 µl
K 3730	CONJBUF	Konjugatstabilisierungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 13 ml
K 3730	REABUF	Reaktionspuffer, gebrauchsfertig	1 x 45 ml
K 3730	DER	Derivatisierungsreagenz	2 x 12,5 mg
K 3730	DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 x 2 ml
K 3730	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	1 x 28 ml

K 3730	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 3730	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, 14000 g
- Laborwaage
- Ultraschallhomogenisator
- 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 je nach Probenaufkommen bis zu 2 x bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.

- Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (**100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser**), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das Pufferkonzentrat kann bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die verdünnte Pufferlösung ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die **Standards (STD)** und die **Kontrollen (CTRL1, CTRL2)** werden eingefroren bei **-20°C** gelagert. Für den Test die Standards und Kontrollen auftauen und kurz vortexen. Standards und Kontrollen können bis zu 3x wieder eingefroren werden, das Wiedereinfrieren sollte sofort nach Entnahme erfolgen.
- **DMSO** kristallisiert bei 4 °C aus. Zum Lösen das DMSO bei Raumtemperatur stehen lassen oder im Wasserbad erwärmen.
- Der Inhalt eines Fläschchens **Derivatisierungsreagenz (DER)** (12,5 mg) wird in **750 µl DMSO** gelöst und das Fläschchen für 5 min auf einen Horizontal-schüttler gelegt. Das DER sollte **unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt** werden. Falls mehrere Fläschchen benötigt werden, deren Inhalt vereinen und vor Gebrauch mischen. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen. Durch die Aufteilung des DER in 2 Gefäße ist der ELISA in zwei Ansätze teilbar. **Bitte beachten:** DMSO greift Plastik an, DMSO reagiert nicht mit Polypropylen-Produkten und Glasgefäßen.
- Der Inhalt eines Fläschchens **L-Tryptophan-Antikörper (AB)** wird in **3 ml verdünntem Waschpuffer** gelöst. Werden mehrere Fläschchen benötigt, deren Inhalt vereinen und vor Gebrauch mischen. Durch die Aufteilung des AB in mehrere Gefäße ist der ELISA in zwei Ansätze teilbar. Gelöster L-Tryptophan-Antikörper kann **1 Monat bei -20 °C** aufbewahrt werden.
- Das **Peroxidase-Konjugat (CONJ)** wird **1:201** in Konjugatstabilisierungspuffer (CONJBUF) verdünnt (**z.B. 60 µl CONJ + 12 ml CONJBUF**; nur die benötigte Menge ansetzen). Unverdünntes Konjugat ist bei 2-8 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Verdünntes Konjugat kann **1 Woche bei 2-8 °C** aufbewahrt werden.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 5. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

### EDTA-Plasma, Serum, Zellkulturüberstände, CSF

- Als Probe eignet sich EDTA-Plasma und Serum von Nagern (Maus, Ratte), Zellkulturüberstände und CSF (Cerebrospinal-Flüssigkeit). Die Haltbarkeit der Proben beträgt bei 2-8 °C drei Tage. Zur längeren Lagerung müssen die Proben bei -20 °C oder -80 °C aufbewahrt werden.
- Proben mit sichtbaren Mengen an Feststoff sollten zentrifugiert werden.
- Die Proben werden **unverdünnt** verwendet.

### Hirngewebe

- Auch Hirngewebe von Nagern (Maus, Ratte) ist als Probe geeignet. Dazu die Gewebeprobe in ein Mikroreaktionsgefäß geben und die exakte Masse bestimmen. Pro Milligramm Gewebe werden 40 µl Reaktionspuffer (REABUF) in das Gefäß pipettiert, z. B. **25 mg Gewebe + 1000 µl REABUF**. Mittels Ultraschall die Probe homogenisieren und anschließend 10 min bei 14.000g gekühlt zentrifugieren. Den Überstand in ein frisches Gefäß überführen. 100 µl davon werden im Test eingesetzt (siehe Pipettierschema Probenvorbereitung). Proben und Überstände bei -20 °C oder -80 °C aufbewahren.

Zur weiteren Vorbereitung müssen alle Proben mit einem Derivatisierungsreagenz (DER) zur Derivatisierung des enthaltenen L-Tryptophan versetzt werden (Details siehe Pipettierschema Probenvorbereitung).

## 6. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Testprinzip*

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

Anschließend wird die derivatisierte Probe zusammen mit einem polyklonalen L-Tryptophan-Antiserum in einer mit L-Tryptophan-Derivat (Tracer) beschichteten ELISA-Platte inkubiert. Während der Inkubation kompetitiert das Zielantigen in der Probe mit dem an die Platte gebundenen Tracer um die Bindung der polyklonalen Antikörper. Hierbei verdrängt das Zielantigen in der Probe den Antikörper aus der Bindung an den Tracer. Daher ist die

Konzentration des an den Tracer gebundenen Antikörpers umgekehrt proportional zu der Konzentration des Zielantigens in der Probe.

Beim zweiten Inkubationsschritt wird ein Peroxidase-markierter Sekundärantikörper zugegeben, der an die polyklonalen L-Tryptophan-Antikörper bindet. Nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Komponenten wird das Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration des gemessenen Analyten, d.h. mit steigender L-Tryptophan-Konzentration in der Probe reduziert sich die Konzentration der an den Tracer gebundenen Antikörper und das Signal nimmt ab. Anhand einer mitgeführten Standardkurve - optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

### *Pipettierschema Probenvorbereitung*

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

Die Reagenzien dieses Kits reichen aus für 48 Derivatisierungen, welche jeweils als Doppelbestimmung in die Wells der Platte aufgetragen werden.

Dieser Kit enthält **zwei Standardkurven** mit Kontrollen:

Eine Standardkurve mit Kontrollen ist für Nagerserum, -plasma und -Gehirngewebe sowie CSF geeignet.

Die zweite Standardkurve mit Kontrollen („Cell culture medium“) ist speziell für die Messung von Zellkulturüberständen ausgelegt.

Bitte wählen Sie die für Ihre Proben geeignete(n) Standardkurve(n) mit Kontrollen aus.

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

2. *Standards/Kontrollen, Plasma, Serum, Zellkulturüberstände, CSF:*  
Jeweils **10 µl** Standard (STD), Kontrolle (CTRL), Probe (SAMPLE) in Mikroreaktionsgefäße pipettieren.  
Dazu jeweils **100 µl Reaktionspuffer (REABUF)** pipettieren.  
*Hirngewebe:*  
**100 µl** des Überstandes aus der Zentrifugation in Mikroreaktionsgefäße pipettieren (SAMPLE).

3. **25 µl** frisch angesetztes **Derivatisierungsreagenz (DER)** in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, SAMPLE) pipettieren und **gründlich mischen** (z.B. durch mehrmaliges Umdrehen, oder mehrere Sekunden vortexen). Auf einem Horizontalschüttler (180-240 rpm) **45 min** bei **Raumtemperatur** (15-30 °C) inkubieren

4. Anschließend in alle verwendeten Mikroreaktionsgefäße **250 µl Assaypuffer (ASYBUF)** zugeben, **gründlich mischen** (z.B. durch mehrmaliges Umdrehen oder vortexen) und auf einem Horizontalschüttler (180-240 rpm) **5 min** bei **Raumtemperatur** (15-30°C) inkubieren.

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

### *Pipettierschema Testdurchführung*

5. Positionen für Standards/Kontrollen/Proben (STD/CTRL/SAMPLE) in Doppelbestimmung in einem **Protokollblatt** markieren.
6. Die benötigten Streifen der Mikrotiterplatte (PLATE) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterplattenstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden.  
Bitte beachten: **Platte nicht waschen!**
7. **2 x 25 µl** der vorbereiteten, **derivatisierten Proben (STD, CTRL, SAMPLE)** aus den Mikroreaktionsgefäßen als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
8. **100 µl** gelösten **L-Tryptophan-Antikörper (AB)** in jede Vertiefung pipettieren. Streifen luftdicht abdecken.



9. Über Nacht ( <b>15-20 Stunden</b> ) bei <b>2-8 °C</b> inkubieren
10. Inhalt der Platte verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl</b> verdünntem <b>Waschpuffer</b> waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
11. <b>100 µl</b> verdünntes <b>Peroxidase-Konjugat (CONJ)</b> in alle Vertiefungen pipettieren.
12. Platte abdecken und <b>1 Stunde bei Raumtemperatur</b> (15-30 °C) unter Schütteln (180-240 rpm) inkubieren.
13. Inhalt der Platte verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl</b> verdünntem <b>Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
14. <b>100 µl TMB-Substrat (SUB)</b> in alle Vertiefungen pipettieren.
15. <b>8-12 min bei Raumtemperatur</b> (15-30 °C) im Dunkeln inkubieren*.
16. <b>100 µl Stopplösung (STOP)</b> in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen.
17. <b>Extinktion sofort</b> im Mikrotiterplattenphotometer bei <b>450 nm</b> 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 <b>405 nm</b> 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.

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.

## 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.

### EDTA-Plasma, Serum, CSF

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

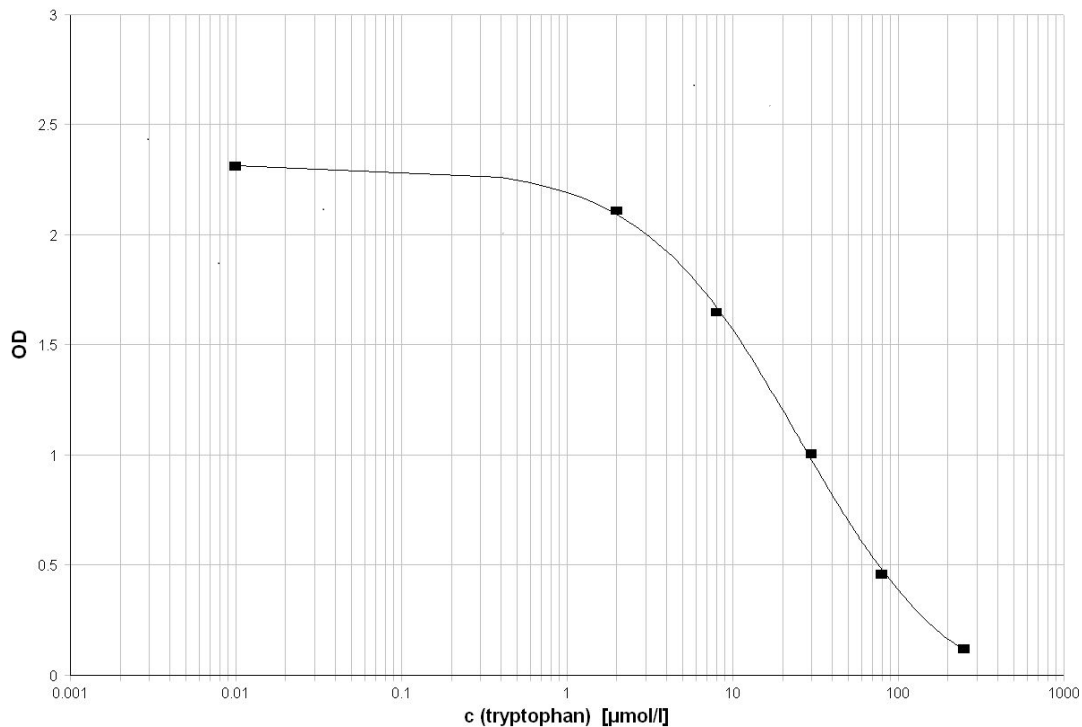
### Zellkulturüberstände

Die Konzentrationen der Proben können direkt aus der „Cell culture medium“-Standardkurve abgelesen werden. Es wird **kein Faktor** benötigt.

### Hirngewebe

Die ermittelte Konzentration muss mit dem **Faktor 4** multipliziert werden

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



## 8. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben, deren OD niedriger ist als die des höchsten Standards, sollten mit Reaktionspuffer (REABUF) 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*

**CSF:** Yan, E.B. et al., 2015. Activation of the kynurenine pathway and increased production of the excitotoxin quinolinic acid following traumatic brain injury in humans. *Journal of Neuroinflammation*, 12(1):110.

**Plasma (Maus):** Murray, C. et al., 2015. Interdependent and independent roles of type I interferons and IL-6 in innate immune, neuroinflammatory and sickness behaviour responses to systemic poly I:C. *Brain, Behavior, and Immunity*, 48:274-286.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

## 10. TESTCHARAKTERISTIKA

### *Präzision und Reproduzierbarkeit*

#### **Intra-Assay (n = 23)**

Probe	L-Tryptophan [ $\mu\text{mol/l}$ ]	VK [%]
1	26,45	5,8
2	55,70	4,5

#### **Inter-Assay (n = 9)**

Probe	L-Tryptophan [ $\mu\text{mol/l}$ ]	VK [%]
1	29,74	7,4
2	62,13	9,2

### *Spike-Wiederfindung*

Zwei Proben wurden mit unterschiedlichen Mengen an L-Tryptophan versetzt und gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug 104,6 % (n = 2).

Spike [ $\mu\text{mol/l}$ ]	L-Tryptophan erwartet [ $\mu\text{mol/l}$ ]	L-Tryptophan gemessen [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Wiederfindung [%]
Probe 1		73,63	
25	98,63	107,28	108,7
50	123,63	136,82	110,7
Probe 2		90,85	
25	115,85	106,01	91,5
50	140,85	151,29	107,4

### Wiederfindung in der Verdünnung

Zwei Proben wurden jeweils mit Reaktionspuffer verdünnt. Die mittlere Wiederfindung betrug 111,4 % (n = 2).

Verdünnung	erwartet [µmol/l]	gemessen [µmol/l]	Wiederfindung [%]
Probe 1		73,63	
1:2	36,82	40,42	109,8
1:4	18,41	21,26	115,5
Probe 2		90,85	
1:2	45,42	48,25	106,2
1:4	22,71	25,86	114,0

### Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als  $B_0 - 2 \text{ SD}$ . Gemessen wurde 58 x der Standard Null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 1,46 µmol/l. Bei Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors liegt die Nachweisgrenze für Hirngewebe bei 5,84 µmol/l.

Standard Null Mittelwert [OD]	2 Standard- abweichungen (2 x SD)	Nachweisgrenze [µmol/l]	Nachweisgrenze Hirngewebe [µmol/l]
2,372	0,208	1,46	5,84

### Spezifität

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

5-HTP (5-Hydroxy-Tryptophan)	< 0,5 %
L-Phenylalanin	< 0,1 %
L-Tyrosin	< 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ist eine starke Säure und muss auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht benutzt werden. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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

Brandacher G, Hoeller E, Fuchs D, Weiss HG. Chronic immune activation underlies morbid obesity: is IDO a key player. *Curr Drug Metab.* 2007; **8** (3): 289-95.

Chuang SC, Fanidi A, Ueland PM et al: Circulating biomarkers of tryptophan and the kynurenine pathway and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014 Mar;**23**(3):461-8

Ciorba MA: Indoleamine 2,3 dioxygenase in intestinal disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2013 Mar;**29**(2):146-52

Creelan BC, Antonia S, Bepler G, Garrett TJ, Simon GR, Soliman HH: Indoleamine 2,3-dioxygenase activity and clinical outcome following induction chemotherapy and concurrent chemoradiation in Stage III non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology.* 2013 Mar 1;**2**(3):e23428










Gupta NK, Thaker AI, Kanuri N, Riehl TE, Rowley CW, Stenson WF, Ciorba MA: Serum analysis of tryptophan catabolism pathway: correlation with Crohn's disease activity. *Inflamm Bowel Dis.* 2012 Jul;**18**(7):1214-20.

Murray C, Griffin ÉW, O'Loughlin E, Lyons A, Sherwin E, Ahmed S, Stevenson N J, et al. Interdependent and independent roles of type I interferons and IL-6 in innate immune, neuroinflammatory and sickness behaviour responses to systemic poly I:C. *Brain, Behavior, and Immunity.* 2015, **48**: 274-286.

Suzuki Y, Suda T, Asada K, Miwa S, Suzuki M, Fujie M, Furuhashi K, Nakamura Y, Inui N, Shirai T, Hayakawa H, Nakamura H, Chida K: Serum Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity Predicts Prognosis of Pulmonary Tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2012 March; **19**(3): 436–442

Yan EB, Frugier T, Lim C K, Heng B, Sundaram G, Tan M, Rosenfeld J V, et al. Activation of the kynurenine pathway and increased production of the excitotoxin quinolinic acid following traumatic brain injury in humans. *Journal of Neuroinflammation.* 2015, **12**(1), 110.

### Verwendete Symbole:

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



Manual

# **IDK® Tryptophan ELISA high sensitive**

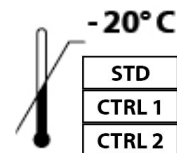
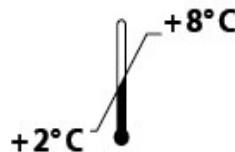
***For the in vitro determination of L-tryptophan in rodents (plasma, serum and brain tissue), in cell culture supernatant and CSF***

***For research use only***

Valid from 2016-01-12

**REF**

**K 3730**



**RUO**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

## Table of Contents

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>18</b>
<b>2. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>18</b>
<b>3. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>19</b>
<b>4. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b>	<b>19</b>
<b>5. PREPARATION AND STORAGE OF SAMPLES</b>	<b>20</b>
<b>6. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>21</b>
<i>Principle of the test</i>	21
<i>Sample preparation procedure</i>	22
<i>Test procedure</i>	23
<b>7. RESULTS</b>	<b>24</b>
<b>8. LIMITATIONS</b>	<b>25</b>
<b>9. QUALITY CONTROL</b>	<b>26</b>
<i>Reference Range</i>	26
<b>10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>26</b>
<i>Precision and reproducibility</i>	26
<i>Spiking recovery</i>	27
<i>Dilution recovery</i>	28
<i>Analytical sensitivity</i>	28
<i>Specificity</i>	28
<b>11. PRECAUTIONS</b>	<b>28</b>
<b>12. TECHNICAL HINTS</b>	<b>29</b>
<b>13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>29</b>
<b>14. REFERENCES</b>	<b>30</b>

## 1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is intended for the quantitative determination of L-tryptophan in EDTA plasma, serum and brain tissue of rodents (mouse, rat), and in cell culture supernatant and CSF. For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

For human plasma, serum, and urine samples we recommend our IDK® Tryptophan ELISA K 7730.

## 2. MATERIAL SUPPLIED

Catalog No	Label	Kit Components	Quantity
K 3730	PLATE	Holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 3730	STD	Standards, ready to use (0, 2, 8, 30, 80, 250 µM)	6 x 200 µl
K 3730 K 3730	CTRL 1 CTRL 2	Controls, ready to use (see specification for range)	2 x 200 µl
K 3730	STD	Cell culture medium standards, ready to use (0, 2, 8, 30, 80, 250 µM)	6 x 200 µl
K 3730 K 3730	CTRL 1 CTRL 2	Cell culture medium controls, ready to use (see specification for range)	2 x 200 µl
K 3730	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 3730	AB	L-tryptophan antibody, lyophilized	2 x 1 vial
K 3730	CONJ	Conjugate (peroxidase-labeled), concentrate	1 x 65 µl
K 3730	CONJBUF	Conjugate stabilizing buffer, ready to use	1 x 13 ml
K 3730	REABUF	Reaction buffer, ready to use	1 x 45 ml
K 3730	DER	Derivatization reagent	2 x 12.5 mg
K 3730	DMSO	Dimethylsulfoxide (DMSO)	1 x 2ml
K 3730	ASYBUF	Assay buffer, ready to use	1 x 28 ml
K 3730	SUB	TMB substrate (tetramethylbenzidine),	1 x 15 ml

		ready to use	
K 3730	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, 14000 x g
- Laboratory balance
- Ultrasonic homogenizer
- 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 2 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- Dilute the **wash buffer concentrate (WASHBUF)** with ultra pure water **1:10** before use (**100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water**), mix well. Crystals may occur due to high salt concentration in the stock solution. The crystals must be redissolved at room temperature or at 37 °C using a water bath before dilution. The wash buffer concentrate is stable at **2-8 °C** until the

expiry date stated on the label. Diluted buffer solution can be stored in a closed flask at **2-8 °C for one month**.

- Store **Standards (STD) and controls (CTRL1, CTRL2)** frozen at **-20 °C**, thaw before use in the test and mix well. Re-freeze standards and controls immediately after use. They can be re-frozen up to 3 times.
- **DMSO** could crystallize at 4°C. Dissolve the crystals at room temperature or in a water bath.
- Dissolve the content of one vial of **derivatization reagent (DER)** (12.5 mg) in **750 µl DMSO**. Put the vial on a horizontal shaker for 5 min. DER must be **prepared immediately before use**. When more than one vial is to be used, combine the contents and mix prior to use. Discard any rest of the reagent after use. The ELISA kit can be separated into two performances by providing two DER vials. **Please note:** DMSO attacks all plastics but not polypropylene products and laboratory glass.
- Dissolve the content of one vial of **L-tryptophan antibody (AB)** in **3 ml of diluted wash buffer**. When more than one vial is to be used, combine the contents and mix prior to use. The ELISA kit can be separated into two performances by providing several AB vials. Diluted L-tryptophan antibody can be stored at **-20 °C for one month**.
- Dilute the **peroxidase conjugate (CONJ) 1:201** with conjugate stabilizing buffer (CONJBUF) (**e.g. 60 µl CONJ + 12 ml CONJBUF**, prepare only the required amount). The undiluted POD conjugate is stable at 2-8 °C until the expiry date stated on the label. Diluted POD conjugate can be stored at **2-8 °C for 1 week**.
- 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

### EDTA plasma, serum, cell culture supernatant, CSF

- EDTA-Plasma and serum of rodents (mouse, rat), cell culture supernatant and CSF (cerebrospinal fluid) is suited for this test system. The samples are stable for 3 days at 2-8 °C. For longer storage samples must be frozen at -20 °C or -80 C.
- Samples with visible amounts of precipitates should be centrifuged.

- Samples are used **undiluted**.

### **Brain tissue**

- Brain tissue of rodents (mouse, rat) can be tested in this assay. Place the tissue sample in a microcentrifuge tube and determine the exact wet mass. Add 40 µl of reaction buffer (REABUF) per milligram of tissue to the tube, e.g. **25 mg tissue + 1000 µl REABUF**. Homogenize the sample by sonication and centrifuge at 14,000 x g for 10 min at 4 °C. Transfer the supernatant to a clean tube. 100 µl of the supernatant are used in the test (see sample preparation procedure). Store samples and supernatants at -20 °C or -80 °C.

For sample preparation, a derivatization reagent (DER) for derivatization of L-tryptophan is added to all samples (details are given in the sample preparation procedure).

## **6. ASSAY PROCEDURE**

### *Principle of the test*

This assay is based on the method of competitive enzyme linked immunoassays. The sample preparation includes the addition of a derivatization reagent for L-tryptophan derivatization. Afterwards, the treated samples and a polyclonal L-tryptophan antiserum are incubated in the wells of a microtiter plate coated with L-tryptophan derivative (tracer).

During the incubation period, the target L-tryptophan in the sample competes with the tracer immobilized on the wall of the microtiter wells for the binding of the polyclonal antibodies. The L-tryptophan in the sample displaces the antibodies out of the binding to the tracer. Therefore the concentration of the tracer-bound antibody is inverse proportional to the L-tryptophan concentration in the sample.

During the second incubation step a peroxidase-conjugated antibody is added to each microtiter well to detect the L-tryptophan antibodies. After washing away the unbound components tetramethylbenzidine (TMB) is added as a peroxidase substrate. Finally, the enzymatic reaction is terminated by an acidic stop solution. The color changes from blue to yellow and the absorbance is measured in a photometer at 450 nm. The intensity of the yellow color is inverse proportional to the tryptophan concentration in the sample; this means, high L-tryptophan concentration in the sample reduces the concentration of tracer-bound antibodies 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 standard. L-tryptophan present in the patient samples is determined directly from this curve.

### *Sample preparation procedure*

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

The reagents provided with this kit are sufficient for up to 48 derivatizations, which are transferred in duplicate determinations to the wells of the microtiter plate.

The kit provides **two standard curves** with controls:

One is for plasma, serum and brain tissue of rodents and for CSF.

The second standard curve with controls ("Cell culture medium") is intended to measure cell culture supernatants.

Please choose the appropriate standard curve(s) and controls for your purposes.

1. Bring all reagents and samples to **room temperature** (15-30 °C) and mix well.
2. *Standards/controls, plasma, serum, cell culture supernatant, CSF:*  
Add **10 µl** of standards (STD), controls (CTRL), samples (SAMPLE) in the corresponding vials.  
Add **100 µl** of **reaction buffer (REABUF)** into each vial (STD, CTRL, SAMPLE).  
*Brain tissue:*  
Add **100 µl** of supernatant after centrifugation into the corresponding vial (SAMPLE).
3. Add **25 µl** of freshly prepared **derivatization reagent (DER)** into each vial (STD, CTRL, SAMPLE) and **mix thoroughly** by repeated inversion or several seconds on a vortex mixer. Incubate for **45 min at room temperature** (15-30 °C) on a horizontal **shaker** (180-240 rpm).

4. Afterwards add **250 µl of assay buffer (ASYBUF)** into each vial, **mix thoroughly** by repeated inversion or on a vortex mixer and incubate for **5 min at room temperature** (15-30 °C) on a horizontal **shaker** (180-240 rpm).

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

### *Test procedure*

5. Mark the positions of standards/ controls/ samples (STD/ CTRL/ SAMPLE) in duplicate on a **protocol sheet**.
6. Take as many microtiter plate strips (PLATE) as needed from kit. Store unused strips covered at 2-8°C. Strips are stable until the expiry date stated on the label.  
Please note: **Do not wash the plate!**
7. For the analysis in duplicate, take **2 x 25 µl** of the **derivatized standards/ controls/ samples (STD/ CTRL/ SAMPLE)** out of the vials and add into the respective wells of the microtiter plate.
8. Add **100 µl** of **L-tryptophan antibody (AB)** into each well. Cover the plate tightly.
9. Incubate overnight (**15-20 hours**) at **2-8 °C**.
10. Discard the contents of each well. Wash each well **5 x** with **250 µl** of **diluted wash buffer**. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
11. Add **100 µl** of diluted **peroxidase conjugate (CONJ)** into each well.
12. Cover the plate tightly and incubate for **1 hour at room temperature** (15-30°C) on a horizontal **shaker** (180-240 rpm).
13. Discard the contents of each well. Wash each well **5 x** with **250 µl** of **diluted wash buffer**. After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.



14. Add **100 µl** of **TMB substrate (SUB)** into each well.
15. Incubate for **8-12 min at room temperature** (15-30 °C) in the dark\*.
16. Add **100 µl of stop solution (STOP)** into each well, mix thoroughly.
17. 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.

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.

## 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.

### EDTA plasma, serum, CSF

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

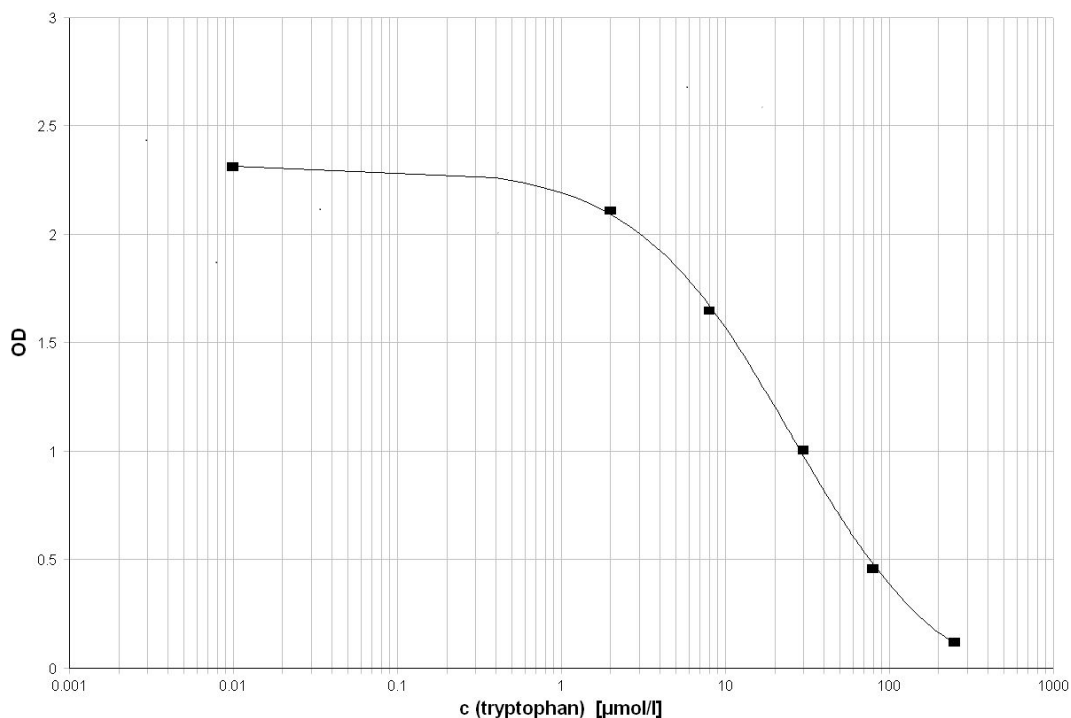
### Cell culture supernatant

The concentrations can be determined directly from the Cell culture medium standard curve. **No factor** is needed.

### Brain tissue

The obtained L-tryptophan levels of brain tissue samples have to be multiplied by the **factor of 4**.

In the following, an example of a standard curve is given; do not use it for the calculation of your results.



## 8. LIMITATIONS

Samples with an OD lower than the OD of the highest standard should be diluted with reaction buffer (REABUF) 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*

**CSF:** Yan, E.B. et al., 2015. Activation of the kynurenine pathway and increased production of the excitotoxin quinolinic acid following traumatic brain injury in humans. *Journal of Neuroinflammation*, 12(1):110.

**Plasma (mice):** Murray, C. et al., 2015. Interdependent and independent roles of type I interferons and IL-6 in innate immune, neuroinflammatory and sickness behaviour responses to systemic poly I:C. *Brain, Behavior, and Immunity*, 48:274-286.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

## 10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Precision and reproducibility*

#### **Intra-Assay (n = 23)**

Sample	L-tryptophan [ $\mu\text{mol/l}$ ]	CV [%]
1	26.45	5.8
2	55.70	4.5

#### **Inter-Assay (n = 9)**

Sample	L-tryptophan [ $\mu\text{mol/l}$ ]	CV [%]
1	29.74	7.4
2	62.13	9.2

### *Spiking recovery*

Two samples were spiked with different L-tryptophan concentrations and measured in this assay. The mean recovery rate was 104.6 % (n = 2).

<b>Spike [μmol/l]</b>	<b>L-tryptophan expected [μmol/l]</b>	<b>L-tryptophan measured [μmol/l]</b>	<b>Recovery [%]</b>
sample 1		73.63	
25	98.63	107.28	108.7
50	123.63	136.82	110.7
sample 2		90.85	
25	115.85	106.01	91.5
50	140.85	151.29	107.4

### *Dilution recovery*

Two samples were diluted with reaction buffer and measured in this assay. The mean recovery rate was 111.4 % (n = 2).

Dilution	L-tryptophan expected [µmol/l]	L-tryptophan measured [µmol/l]	Recovery [%]
sample 1		73.63	
1:2	36.82	40.42	109.8
1:4	18.41	21.26	115.5
sample 2		90.85	
1:2	45.42	48.25	106.2
1:4	22.71	25.86	114.0

### *Analytical sensitivity*

The zero-standard was measured 58 times. The detection limit was set as  $B_0 - 2 \text{ SD}$  and estimated to be 1.46 µmol/l. Considering the dilution factor, the detection limit for brain tissue samples is calculated to be 5.48 µmol/l.

Zero standard mean value [OD]	2 x standard deviation (SD)	detection limit [µmol/l]	detection limit brain tissue [µmol/l]
2.372	0.208	1.46	5.84

### *Specificity*

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

5-HTP (5-Hydroxy-Tryptophan)	< 0.5 %
L-Phenylalanine	< 0.1 %
L-Tyrosine	< 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 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

Brandacher G, Hoeller E, Fuchs D, Weiss HG. Chronic immune activation underlies morbid obesity: is IDO a key player. *Curr Drug Metab.* 2007; **8** (3): 289-95.

Chuang SC, Fanidi A, Ueland PM et al: Circulating biomarkers of tryptophan and the kynurenine pathway and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014 Mar;**23**(3):461-8

Ciorba MA: Indoleamine 2,3 dioxygenase in intestinal disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2013 Mar;**29**(2):146-52

Creelan BC, Antonia S, Bepler G, Garrett TJ, Simon GR, Soliman HH: Indoleamine 2,3-dioxygenase activity and clinical outcome following induction chemotherapy and concurrent chemoradiation in Stage III non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology.* 2013 Mar 1;**2**(3):e23428

Gupta NK, Thaker AI, Kanuri N, Riehl TE, Rowley CW, Stenson WF, Ciorba MA: Serum analysis of tryptophan catabolism pathway: correlation with Crohn's disease activity. *Inflamm Bowel Dis.* 2012 Jul;**18**(7):1214-20.

Murray C, Griffin ÉW, O'Loughlin E, Lyons A, Sherwin E, Ahmed S, Stevenson N J, et al. Interdependent and independent roles of type I interferons and IL-6 in innate immune, neuroinflammatory and sickness behaviour responses to systemic poly I:C. *Brain, Behavior, and Immunity.* 2015, **48**: 274-286.

Suzuki Y, Suda T, Asada K, Miwa S, Suzuki M, Fujie M, Furuhashi K, Nakamura Y, Inui N, Shirai T, Hayakawa H, Nakamura H, Chida K: Serum Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity Predicts Prognosis of Pulmonary Tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2012 March; **19**(3): 436–442

Yan EB, Frugier T, Lim CK, Heng B, Sundaram G, Tan M, Rosenfeld JV, et al. Activation of the kynurenine pathway and increased production of the excitotoxin quinolinic acid following traumatic brain injury in humans. *Journal of Neuroinflammation.* 2015,**12**(1), 110.

**Used symbols:**

Temperature limitation



Catalogue Number



For research use only



To be used with



Manufacturer



Contains sufficient for &lt;n&gt; tests



Lot number



Use by



Attention