

# Tyrosin ELISA

*Zur in-vitro-Bestimmung von L-Tyrosin in EDTA-Plasma und Serum*

# Tyrosine ELISA

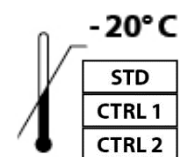
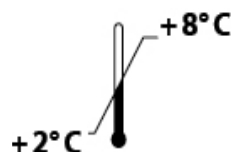
*For the in vitro determination of L-tyrosine in EDTA plasma and serum*

*Nur zu Forschungszwecken / For research use only*

Gültig ab / Valid from 2019-02-05

**REF**

**KR7015**



**RUO**



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

Tel.: + 49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

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. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>3</b>
<b>5. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG</b>	<b>4</b>
<b>6. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>5</b>
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema Probenvorbereitung</i>	5
<i>Pipettierschema Testdurchführung</i>	6
<b>7. ERGEBNISSE</b>	<b>7</b>
<b>8. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>9</b>
<b>9. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>9</b>
<i>Referenzwerte</i>	9
<b>10. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>10</b>
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	10
<i>Spike-Wiederfindung</i>	10
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	10
<i>Analytische Sensitivität</i>	11
<i>Spezifität</i>	11
<b>11. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>11</b>
<b>12. TECHNISCHE MERKMALE</b>	<b>12</b>
<b>13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>12</b>
<b>14. LITERATUR</b>	<b>13</b>
<i>Allgemeine Literatur</i>	13
<i>Literatur mit Immundiagnostik AG Tyrosin ELISA [KR7015]</i>	13
<i>Literature using Immundiagnostik AG Tyrosine ELISA [KR7015]</i>	26

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die quantitative Bestimmung von Tyrosin in EDTA-Plasma und Serum geeignet. Nur für wissenschaftliche Forschung. Nicht für diagnostische Zwecke.

## 2. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KR7015	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
KR7015	STD	Standards, gebrauchsfertig (0, 6, 20, 60, 200, 600 µmol/l),	6 x 200 µl
KR7015	CTRL 1	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 200 µl
KR7015	CTRL 2	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 200 µl
KR0006.C.100	WASHBUF A	Waschpufferkonzentrat, 10 x	2 x 100 ml
KR7015	AB	L-Tyrosin-Antikörper, lyophilisiert	2 x 1 vial
KR7015	CONJ	Konjugatkonzentrat, peroxidase markiert	1 x 65 µl
KR0010.13	CONJBUF	Konjugatstabilisierungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 13 ml
KR7015	REABUF	Reaktionspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
KR7015	DER	Derivatisierungsreagenz	2 x 13,3 mg
KR008.04	DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 x 4 ml
KR0011.28	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	2 x 28 ml
KR0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
KR0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

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

### 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. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett 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.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF A)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF A + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehaltes im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF A** kann bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF A) ist **1 Monat bei 2-8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die **Standards und Kontrollen (STD/CTRL)** werden bei **-20°C** gelagert. Sie sind so bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch die Standards und Kontrollen auftauen und kurz vortexen. Nach Gebrauch wieder einfrieren.

- **DMSO** kristallisiert bei 2-8 °C aus. Vor Gebrauch das DMSO auf Raumtemperatur bringen, um die Kristalle zu lösen.
- Der Inhalt eines Fläschchens **Derivatisierungsreagenz (DER)** (13,3 mg) wird mit **0,8 ml DMSO** rekonstituiert, zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. Das Derivatisierungsreagenz 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. Bitte beachten: DMSO greift Plastik an, DMSO reagiert nicht mit Polypropylen-Produkten und Glasgefäßen.
- Der **lyophilisierte L-Tyrosin-Antikörper (AB)** ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Der Inhalt eines Fläschchens AB wird mit **5,5 ml Waschpuffer** rekonstituiert. Werden mehrere Fläschchen benötigt, deren Inhalt vereinen und vor Gebrauch mischen. **L-Tyrosin-Antikörper** (rekonstituierter AB) **kann 1 Monat bei -20 °C gelagert werden.**
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:201** in **Konjugatstabilisierungspuffer (CONJBUF)** verdünnt (z.B. 60 µl CONJ + 12 ml CONJBUF). Das CONJ ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:201 verdünntes CONJ) **kann 1 Monat bei 2-8 °C gelagert werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2-8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 5. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

### Serum und EDTA-Plasma

- Die Haltbarkeit der Proben beträgt bei 2-8°C bis zu 6 Stunden. Zur längeren Lagerung müssen die Proben bei -20°C aufbewahrt werden.
- Serum- und EDTA-Plasmaproben werden für die Derivatisierung vorverdünnt (siehe Pipettierschema Probenvorbereitung).
- Zur weiteren Vorbereitung muss die Probe mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen L-Tyrosin versetzt werden (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-Tyrosin versetzt.

Anschließend wird die derivatisierte Probe mit einem polyklonalen Anti-L-Tyrosin-Antiserum in einer mit L-Tyrosin-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.

Beim zweiten Inkubationsschritt wird ein Peroxidase-markierter Sekundärantikörper zugegeben, der an die L-Tyrosin-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 Konzentration von L-Tyrosin 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 – lassen sich die Konzentrationen der Proben ermitteln.

### *Pipettierschema Probenvorbereitung*

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

Standards (STD), Kontrollen (CTRL) und Proben werden **1:41** mit Reaktionspuffer wie folgt verdünnt:

**25 µl STD / CTRL / Probe + 1000 µl REABUF (Reaktionspuffer)**

**Bitte beachten:** Proben von Patienten, die L-Tyrosin-Supplementierung erhalten (z.B. im Rahmen von Depletionsstudien), müssen sehr wahrscheinlich höher verdünnt werden. Wir empfehlen, diese Proben zusätzlich 1:2 mit REABUF vorzuverdünnen.

Die Derivatisierung der verdünnten Standards, Kontrollen und Proben wird 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.

1.	Jeweils <b>100 µl der verdünnten Standards, Kontrollen bzw. Proben</b> in Mikroreaktionsgefäße pipettieren.
2.	<b>25 µl</b> frisch angesetztes <b>Derivatisierungsreagenz</b> in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, Probe) pipettieren und <b>gründlich mischen</b> , z.B. durch mehrmaliges Umdrehen, oder mehrere Sekunden vortexen. Anschließend auf einem <b>Horizontalschüttler 45 min</b> bei <b>Raumtemperatur</b> (15-30 °C) inkubieren.
3.	<b>1000 µl Assaypuffer</b> (ASYBUF) in alle Reaktionsgefäße pipettieren, gut mischen und auf einem <b>Horizontalschüttler 45 min</b> bei Raumtemperatur (15-30°C) inkubieren.

2 x 25 µl der derivatisierten Standards/Kontrollen/Proben werden im ELISA als Doppelbestimmung eingesetzt.

### *Pipettierschema Testdurchführung*

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

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

4.	Die Vertiefungen <b>vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	<b>2 x 25 µl der derivatisierten Standards/Kontrollen/Proben</b> als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren.
6.	<b>100 µl L-Tyrosin-Antikörper</b> in jede Vertiefung pipettieren.
7.	Streifen luftdicht abdecken und <b>über Nacht bei 2-8 °C</b> inkubieren.

<b>8.</b>	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
<b>9.</b>	<b>100 µl Konjugat</b> in jede Vertiefung pipettieren.
<b>10.</b>	Streifen abdecken und <b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur (15-30 °C) unter <b>Schütteln</b> inkubieren.
<b>11.</b>	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
<b>12.</b>	<b>100 µl Substrat</b> (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
<b>13.</b>	<b>8-12 min*</b> bei Raumtemperatur (15-30 °C) im <b>Dunkeln</b> inkubieren.
<b>14.</b>	<b>100 µl Stopplösung</b> (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
<b>15.</b>	<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.

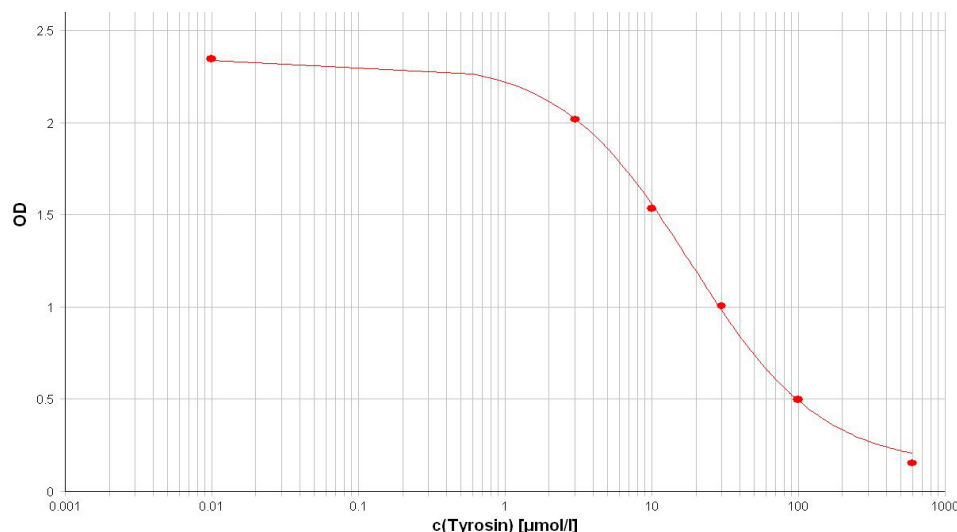
Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

### EDTA-Plasma und Serum

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

Bei Proben, die zusätzlich vorverdünnt wurden, müssen die Ergebnisse mit diesem Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

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



## 8. EINSCHRÄNKUNGEN

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

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

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

*höchste Konzentration der Standardkurve* × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

*Analytische Sensitivität* × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Analytische Sensitivität siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

## 9. QUALITÄTSKONTROLLE

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

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

### *Referenzwerte*

Anhand einer laborinternen Studie mit Proben von augenscheinlich gesunden Personen (n=146) wurde ein Mittelwert von 58 µmol/l ermittelt, bei einer Standardabweichung von 14,4 µmol/l. Aus Mittelwert ± 2 x SD ergibt sich ein Normbereich von 29 – 87 µmol/l.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

## 10. TESTCHARAKTERISTIKA

### *Präzision und Reproduzierbarkeit*

#### **Intra-Assay (n=10)**

<b>Probe</b>	<b>L-Tyrosin [<math>\mu\text{mol/l}</math>]</b>	<b>VK [%]</b>
1	31,4	7,6
2	125,3	7,4

#### **Inter-Assay (n=8)**

<b>Probe</b>	<b>L-Tyrosin [<math>\mu\text{mol/l}</math>]</b>	<b>VK [%]</b>
1	69,7	5,8
2	104,6	4,6

### *Spike-Wiederfindung*

Zwei Plasmaproben wurden mit unterschiedliche Mengen an L-Tyrosin versetzt und gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug 93,2 % (n=5).

<b>Probe [<math>\mu\text{mol/l}</math>]</b>	<b>Spike [<math>\mu\text{mol/l}</math>]</b>	<b>erwartet [<math>\mu\text{mol/l}</math>]</b>	<b>gemessen [<math>\mu\text{mol/l}</math>]</b>	<b>Wiederfindung [%]</b>
76,8	25	101,8	94,5	92,8
76,8	50	126,8	123,3	97,2
108,8	25	133,8	116,1	86,8
108,8	50	158,8	152,4	96,0

### *Wiederfindung in der Verdünnung*

Zwei mit L-Tyrosin gespikete Plasmaproben wurden verdünnt und im Test gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug 97,1 % (n=5).

Probe [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Verdünnung	erwartet [ $\mu\text{mol/l}$ ]	gemessen [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Wiederfindung [%]
76,8	1:2	38,4	34,0	88,4
76,8	1:4	19,2	20,0	103,9
108,8	1:2	54,4	50,6	93,0
108,8	1:4	27,2	28,0	102,9

### *Analytische Sensitivität*

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als  $B_0 - 2 \text{ SD}$ . Gemessen wurde 82-mal der Standard Null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von  $3,6 \mu\text{mol/l}$ .

### *Spezifität*

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

L-Phenylalanin	< 2 %
L-Tryptophan	< 0,5 %

## **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 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 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  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 auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums 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 dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

## 13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- 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.

## 14. LITERATUR












### Allgemeine Literatur

1. Badawy AA, Dougherty DM, Richard DM. Specificity of the acute tryptophan and tyrosine plus phenylalanine depletion and loading tests I. Review of biochemical aspects and poor specificity of current amino Acid formulations. *Int J Tryptophan Res.* 2010 Jan 1;2010(3):23-34.
2. Badawy AA, Dougherty DM, Richard DM. Specificity of the Acute Tryptophan and Tyrosine Plus Phenylalanine Depletion and Loading Tests Part II: Normalisation of the Tryptophan and the Tyrosine Plus Phenylalanine to Competing Amino Acid Ratios in a New Control Formulation. *Int J Tryptophan Res.* 2010;3:35-47.

### Literatur mit Immundiagnostik AG Tyrosin ELISA [KR7015]

3. Hildebrand P, Königshulte W, Gaber TJ, Bubenzer-Busch S, Helmbold K, Biskup CS, Langen KJ, Fink GR, Zepf FD: Effects of dietary tryptophan and phenylalanine-tyrosine depletion on phasic alertness in healthy adults - A pilot study. *Food & nutrition research.* 2015;**59**:26407. doi:10.3402/fnr.v59.26407.

#### Verwendete Symbole:

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

Manual

# Tyrosine ELISA

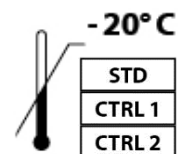
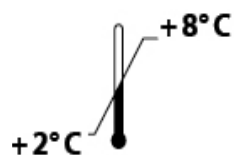
*For the in vitro determination of L-tyrosine in human EDTA plasma  
and serum*

*For research use only*

Valid from 2019-02-05

REF

KR7015



RUO



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

Tel.: + 49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

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>16</b>
<b>2. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>16</b>
<b>4. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS</b>	<b>17</b>
<b>5. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES</b>	<b>18</b>
<b>6. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>18</b>
<i>Principle of the test</i>	18
<i>Sample preparation procedure</i>	19
<i>Test procedure</i>	20
<b>7. RESULTS</b>	<b>21</b>
<b>8. LIMITATIONS</b>	<b>22</b>
<b>9. QUALITY CONTROL</b>	<b>22</b>
<i>Reference Range</i>	22
<b>10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>23</b>
<i>Precision and reproducibility</i>	23
<i>Spiking recovery</i>	23
<i>Dilution recovery</i>	24
<i>Analytical sensitivity</i>	24
<i>Specificity</i>	24
<b>11. PRECAUTIONS</b>	<b>24</b>
<b>12. TECHNICAL HINTS</b>	<b>25</b>
<b>13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>25</b>
<b>14. REFERENCES</b>	<b>25</b>
<i>General literature</i>	25
<i>Literature using Immundiagnostik AG Tyrosine ELISA [KR7015]</i>	26



## 1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is intended for the quantitative determination of L-tyrosine in human EDTA plasma and serum. For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

## 2. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Label	Kit Components	Quantity
KR7015	PLATE	Holder with precoated strips	12 x 8 wells
KR7015	STD	Standards, ready-to-use (0, 6, 20, 60, 200, 600 µmol/l)	6 x 200 µl
KR7015	CTRL 1	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 200 µl
KR7015	CTRL 2	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 200 µl
KR0006.C.100	WASHBUF A	Wash buffer concentrate, 10 x	2 x 100 ml
KR7015	AB	L-tyrosine antibody, lyophilised	2 x 1 vial
KR7015	CONJ	Conjugate concentrate, peroxidase-labelled	1 x 65 µl
KR0010.13	CONJBUF	Conjugate stabilizing buffer, ready-to-use	1 x 13 ml
KR7015	REABUF	Reaction buffer, ready-to-use	1 x 100 ml
KR7015	DER	Derivatisation reagent, lyophilised	2 x 13.3 mg
KR0008.04	DMSO	Dimethylsulfoxide (DMSO)	1 x 4 ml
KR0011.28	ASYBUF	Assay buffer, ready-to-use	2 x 28 ml
KR7015	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
KR7015	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

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

## 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 *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. 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 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.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF A)** has to be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF A + 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 A** is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF A) can be stored in a closed flask at **2-8 °C for 1 month**.
- Store **standards and controls (STD/CTRL)** frozen at **-20 °C**. They are stable at -20 °C until the expiry date stated on the label. Thaw before use in the test and mix well. Re-freeze standards and controls after use.
- **DMSO** crystallises at 2-8 °C. Before use, bring to room temperature to dissolve the crystals.
- Reconstitute the content of one vial of **derivatisation reagent (DER)** (13.3 mg) **with 0.8 ml DMSO**. Allow to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly with a vortex-mixer. The derivatisation reagent 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. Please note: DMSO attacks all plastics but not polypropylene products and laboratory glass.

- The **lyophilised L-tyrosine antibody (AB)** is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. Dissolve the content of one vial of AB in **5.5 ml of wash buffer**. When more than one vial is to be used, combine the contents and mix prior to use. **L-tyrosine antibody** (reconstituted AB) **can be stored at -20 °C for 1 month**.
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the conjugate concentrate has to be diluted **1:201** with **conjugate stabilizing buffer (CONJBUF)** (e.g. 60 µl CONJ + 12 ml CONJBUF). The CONJ is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. **Conjugate** (1:201 diluted CONJ) **can be stored at 2-8 °C for 1 month**.
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2-8°C**.

## 5. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

### Serum and EDTA plasma

- Serum and EDTA-Plasma samples are stable for up to 6 hours at 2-8°C. For longer storage, keep samples frozen at -20 °C.
- The EDTA plasma and serum samples are diluted for derivatisation (see sample preparation procedure).
- For sample preparation, a derivatisation reagent for derivatisation of L-tyrosine is added (see 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 derivatisation reagent for L-tyrosine derivatisation. Afterwards, the treated samples and a polyclonal L-tyrosine antiserum are incubated in wells of a microtiter plate coated with L-tyrosine-derivative (tracer). During the incubation period, the target L-tyrosine in the sample competes with the tracer, immobilised on the wall of the microtiter wells, for the binding of the polyclonal antibodies. The L-tyrosine in the sample displaces the antibodies out of the binding to the tracer

During the second incubation step, a peroxidase conjugate is added to each microtiter well to detect the anti-L-tyrosine antibodies. After washing away the unbound components tetramethylbenzidine is added as peroxidase substrate.

Finally, the enzymatic reaction is terminated by an acidic stop solution. The colour changes from blue to yellow, and the absorbance is measured in a photometer at 450 nm. The intensity of the yellow colour is inverse proportional to the L-tyrosine concentration in the sample; this means, high L-tyrosine 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 standards. L-tyrosine, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

### *Sample preparation procedure*

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

Dilute standards (STD), controls (CTRL) and samples **1:41** with reaction buffer as follows:

**25 µl STD / CTRL / sample + 1000 µl REABUF (reaction buffer)**

**Please note:** Samples from patients with L-tyrosine supplementation (e.g. in depletion studies) probably require further dilution, we recommend diluting these samples additionally 1:2 with REABUF.

Derivatisation of the diluted standards, controls and samples 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 derivatisations, which are transferred in duplicate determinations to the wells of the microtiter plate.

1.	Add <b>100 µl of diluted standards/controls/samples</b> into the corresponding vials.
2.	Add <b>25 µl</b> of freshly prepared <b>derivatisation reagent</b> into each vial (STD, CTRL, sample), <b>mix thoroughly</b> by repeated inversion or several seconds on a vortex mixer. Incubate for <b>45 min at room temperature</b> (15-30 °C) on a <b>horizontal shaker</b> .
3.	Add <b>1000 µl assay buffer</b> (ASYBUF) into each vial, mix well and incubate for <b>45 min at room temperature</b> (15-30°C) on a <b>horizontal shaker</b> .

2 x 25 µl of the derivatised standards, controls and samples are used in the ELISA as duplicates.

### Test procedure

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

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

4.	<b>Before use</b> , wash the wells <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
5.	For the analysis in duplicate, take <b>2 x 25 µl</b> of the <b>derivatised standards/controls/samples</b> out of the vials and add into the respective wells of the microtiter plate.
6.	Add <b>100 µl L-tyrosine antibody</b> into each well of the microtiter plate.
7.	Cover the strips tightly with foil and incubate <b>overnight at 2-8°C</b> .
8.	Discard the content of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
9.	Add <b>100 µl conjugate</b> into each well.
10.	Cover the strips and incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15-30 °C) on a <b>horizontal shaker</b> .
11.	Discard the content of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
12.	Add <b>100 µl substrate</b> (SUB) into each well.
13.	Incubate for <b>8-12 min*</b> at room temperature (15-30 °C) in the <b>dark</b> .
14.	Add <b>100 µl stop solution</b> (STOP) into each well and mix well.
15.	Determine <b>absorption immediately</b> with an ELISA reader at <b>450 nm</b> 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 <b>405 nm</b> against 620 nm (690 nm) as a reference.

\*The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour change and stopping the reaction upon good differentiation.

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 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 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.

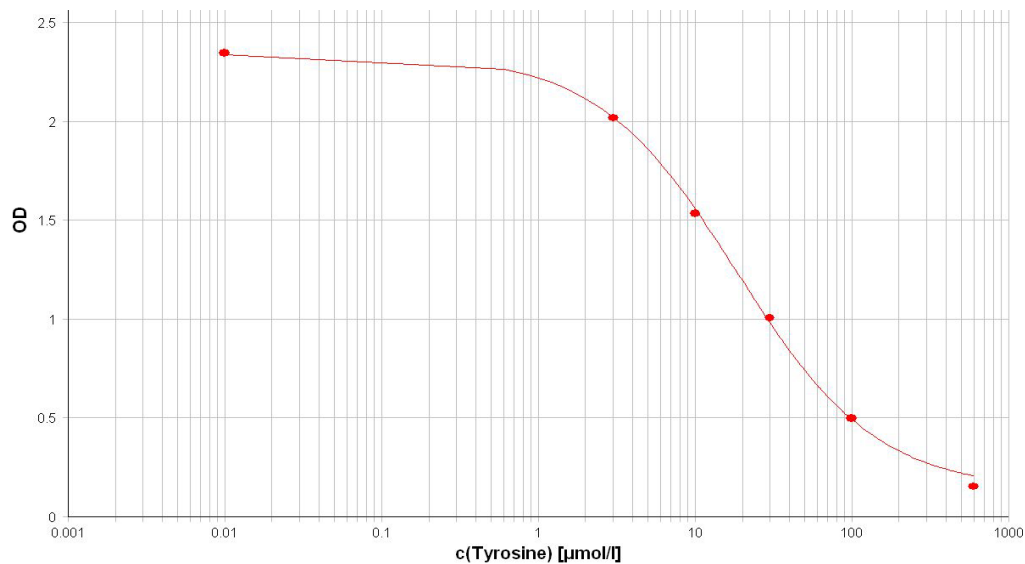
The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

### EDTA plasma and serum

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

The results from additionally diluted samples must be multiplied by this dilution factor.

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



## 8. LIMITATIONS

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

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

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

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

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

*Analytical sensitivity × sample dilution factor to be used*

Analytical sensitivity see chapter "Performance Characteristics".

## 9. QUALITY CONTROL

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

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control samples are outside of the acceptable limits.

### *Reference Range*

Based on internal studies with plasma samples of apparently healthy persons (n=146) a mean value of 58 μmol/l was calculated. The standard deviation was

14.4  $\mu\text{mol/l}$ . From mean value  $\pm 2 \times \text{SD}$  a normal range of 29 – 87  $\mu\text{mol/l}$  was estimated.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

## 10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Precision and reproducibility*

#### **Intra-assay (n=19)**

sample	L-tyrosine [ $\mu\text{mol/l}$ ]	CV [%]
1	31.4	7,6
2	125.3	7.4

#### **Inter-assay (n=8)**

sample	L-tyrosine [ $\mu\text{mol/l}$ ]	CV [%]
1	69.7	5.8
2	104.6	4.6

### *Spiking recovery*

Two plasma samples were spiked with different L-tyrosine concentrations and measured in this assay. The mean recovery rate for all concentrations was 93.2 % (n=5).

sample [ $\mu\text{mol/l}$ ]	spike [ $\mu\text{mol/l}$ ]	expected [ $\mu\text{mol/l}$ ]	measured [ $\mu\text{mol/l}$ ]	recovery [%]
76.8	25	101.8	94.5	92.8
76.8	50	126.8	123.3	97.2
108.8	25	133.8	116.1	86.8
108.8	50	158.8	152.4	96.0



### *Dilution recovery*

Two spiked plasma sample were diluted and measured in this assay. The mean recovery was 97.1 % (n=5).

sample [µmol/l]	dilution	expected [µmol/l]	measured [µmol/l]	recovery [%]
76.8	1:2	38.4	34.0	88.4
76.8	1:4	19.2	20.0	103.9
108.8	1:2	54.4	50.6	93.0
108.8	1:4	27.2	28.0	102.9

### *Analytical sensitivity*

The zero-standard was measured 82 times. The detection limit was set as  $B_0 - 2 \text{ SD}$  and estimated to be 3.6 µmol/l.

### *Specificity*

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

L-phenylalanine	< 2 %
L-tryptophan	< 0.5 %

## **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 colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulfuric 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 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 analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

## 13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- The Guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

## 14. REFERENCES

### *General literature*












- Badawy AA, Dougherty DM, Richard DM. Specificity of the acute tryptophan and tyrosine plus phenylalanine depletion and loading tests I. Review of biochemical aspects and poor specificity of current amino Acid formulations. *Int J Tryptophan Res.* 2010 Jan 1;2010(3):23-34.
- Badawy AA, Dougherty DM, Richard DM. Specificity of the Acute Tryptophan and Tyrosine Plus Phenylalanine Depletion and Loading Tests Part II: Normalisation of the Tryptophan and the Tyrosine Plus Phenylalanine to

Competing Amino Acid Ratios in a New Control Formulation. *Int J Tryptophan Res.* 2010;3:35-47.

### *Literature using Immundiagnostik AG Tyrosine ELISA [KR7015]*

- Hildebrand P, Königshulte W, Gaber TJ, Bubenzer-Busch S, Helmbold K, Biskup CS, Langen KJ, Fink GR, Zepf FD: Effects of dietary tryptophan and phenylalanine-tyrosine depletion on phasic alertness in healthy adults - A pilot study. *Food & nutrition research.* 2015;**59**:26407. doi:10.3402/fnr.v59.26407.

#### **Used symbols:**

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