

Carbonyl Proteine ELISA Kit

Zur Bestimmung von proteingebundenen Carbonylen in biologischen Proben

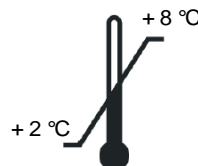
Carbonyl Protein ELISA Kit

For the determination of protein carbonyls in biological samples

Gültig ab / Valid from 18.07.2008



K 7822



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

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. VERWENDUNGSZWECK	3
2. EINLEITUNG	3
3. TESTPRINZIP	4
4. INHALT DER TESTPACKUNG	4
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	5
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	5
7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	6
8. PROBEN- UND TESTVORBEREITUNG	6
9. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>PROBENVORBEREITUNG UND TESTDURCHFÜHRUNG</i>	<i>7</i>
<i>PIPETTIERSCHEMA ELISA</i>	<i>8</i>
10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	10
<i>ERWARTETE ERGEBNISSE</i>	<i>10</i>
11. TESTCHARAKTERISTIKA	11
<i>PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT</i>	<i>11</i>
12. LITERATUR	11
13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	13

1. INTENDED USE	15
2. INTRODUCTION	15
3. PRINCIPLE OF THE TEST	16
4. MATERIAL SUPPLIED	16
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	17
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	17
7. PRECAUTIONS	18
8. SAMPLE AND TEST PREPARATION	18
9. ASSAY PROCEDURE	18
<i>SAMPLE PREPARATION AND TEST PROCEDURE</i>	<i>19</i>
<i>TEST PROCEDURE ELISA</i>	<i>20</i>
10. EVALUATION OF RESULTS	22
<i>EXPECTED VALUES</i>	<i>22</i>
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	23
<i>PRECISION AND REPRODUCIBILITY</i>	<i>23</i>
12. REFERENCES	23
13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	25

1. VERWENDUNGSZWECK

Dieser ELISA Test ist geeignet für die Bestimmung von proteingebundenen Carbonylen in biologischen Proben wie EDTA-Plasma, bronchoalveoläre Lavage und cerebrospinale Flüssigkeit, Zellextrakte und andere lösliche Proteinproben. Nur für Forschungszwecke.

2. EINLEITUNG

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können in der Zelle Proteine, Lipide und DNA oxidieren und sie dabei strukturell und funktionell schädigen. Die Proteine werden durch freie Radikale oxidiert, wobei ihre Aminosäuren auf verschiedene Weise modifiziert oder degradiert werden. Dabei erhalten die Proteine neue funktionelle Gruppen wie Carbonyl- oder Hydroxylgruppen, was in Proteinfragmentierung, Crosslinks-Bildung, Zerstörung der Tertiärstruktur und Funktionalitätsverlust resultieren kann. Zudem stehen ROS in direktem Zusammenhang mit Krankheiten wie z.B. Arteriosklerose, Alzheimer, Parkinson und rheumatoide Arthritis sowie mit Alterungsprozessen und Kanzerogenese.

Proteingebundene Carbonyle entstehen durch verschiedene Oxidationsmechanismen und stellen einen sensitiven Marker für oxidative Schädigung dar. Der Gehalt proteingebundener Carbonyle kann mittels Derivatisierung mit Dinitrophenylhydrazin (DNPH) und anschließender Bestimmung des gebundenen anti-DNPH-Antikörpers ermittelt werden. Die ELISA Methode ermöglicht eine quantitative Carbonyl-Bestimmung mit Proteinmengen im Mikrogramm-Bereich.

Indikation

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

3. TESTPRINZIP

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

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

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K7822MTP	PLATE	Mikrotiterplatte	12 x 8 Vertiefungen
K7822WP	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat (10-fach)	1 x 100 ml
K7822ST	STD	Standardstocklösung	1 x 50 µl
K7822KO	CTRL	Kontrolle, positiv	1 x 50 µl
K7822K	CONJ	Konjugat, Peroxidase-markiert	1 x 22 ml
K7822AK	AB	1.Antikörper	1 x 240 µl
K7822AVR	ABBUF	Antikörperverdünnungspuffer	1 x 30 ml
K7822DR	DER	Derivatisierungsreagenz	1 x 9 ml
K7822BU	ASYBUF	Assaypuffer	2 x 100 ml
K7822TMB	SUB	TMB-Substrat	2 x 15 ml
K7822AC	STOP	Stopplösung	1 x 15 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 0.5 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Multikanal- bzw. Multipipette zum Waschen
- Zentrifuge, 11000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche **Reaktionsgefäße (Cups, Einmalartikel) aus Polypropylen**
- Zentrifugenfiltrationsröhrchen können bei Immundiagnostik bestellt werden (Art. Nr. K 7822ZR)
- Proteinbestimmungstest (Art. Nr. K 7822BCA)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Mikrotiterplatte 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 4 x bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Der **WASHBUF** (Waschpuffer) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), 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.
- Das **DER** (Derivatisierungsreagenz) stellt eine gesättigte Lösung dar, weshalb es zu Kristallbildungen kommen kann. Das **DER** (Derivatisierungsreagenz) wird so verwendet.
- Der **AB** (1. Antikörper) wird **1:100 in ABBUF** (Antikörperverdünnungspuffer) verdünnt: z.B. Ansatz für eine Platte:
220 µl AB (1. Antikörper) + 22 ml ABBUF (Antikörperverdünnungspuffer)

Die **verdünnte AB-Lösung** ist bei **2-8°C 2 Tage** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

- Die Testreagenzien sind bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Die Stopp- und Derivatisierungslösung stellen verdünnte Säuren dar, die auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht verwendet werden müssen. Die Lösungen verursachen bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBEN- UND TESTVORBEREITUNG

- Als Probe eignen sich Plasma, bronchoalveoläre Lavage und cerebrospinale Flüssigkeit, Zellextrakte und andere lösliche Proteinproben.
- Die Probe sollte gekühlt versendet werden, ist aber bis 24 Stunden bei Raumtemperatur stabil.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Der Carbonylproteingehalt wird auf den Gesamtproteingehalt der Probe bezogen. **Es muss daher eine parallele Proteinbestimmung durchgeführt werden.**
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung von der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

Probenvorbereitung und Testdurchführung

Derivatisierung

1.	Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen
2.	Die Zentrifugenfiltrationsröhrchen für STD (Standard), CTRL (Kontrolle), ASYBUF (Blank), und SAMPLE (Proben) beschriften und in die Auffang-Gefäße stecken
3.	In jedes Zentrifugenfiltrationsröhrchen 80µl DER (Derivatisierungsreagenz) vorlegen
4.	je 4 µl STD (Standard), CTRL (Kontrolle), ASYBUF (Blank) und SAMPLE (Probe) in die entsprechenden Zentrifugenfiltrationsröhrchen mit dem vorgelegten Derivatisierungsreagenz pipettieren. Durch mehrmaliges Aufziehen mischen und verschließen
5.	Zur Derivatisierung 45 min bei Raumtemperatur stehen lassen
6.	Derivatisierungsansätze 15 min bei 11000 x g zentrifugieren
7.	60 µl ASYBUF (Assaypuffer) in alle Zentrifugenröhrchen pipettieren
8.	15 min bei 11000 x g zentrifugieren
9.	60 µl ASYBUF (Assaypuffer) in alle Zentrifugenfiltrationsröhrchen pipettieren.
10.	15 min bei 11000 x g zentrifugieren
11.	60 µl ASYBUF (Assaypuffer) in alle Zentrifugenfiltrationsröhrchen pipettieren

Verdünnung I

1:4 Verdünnung

- 180 µl ASYBUF (Assaypuffer) + 60 µl Überstand der **Probe** aus der Derivatisierung
- 180 µl ASYBUF (Assaypuffer) + 60 µl Überstand des **Blanks** aus Derivatisierung (S6)
- 180 µl ASYBUF (Assaypuffer) + 60 µl Überstand des **Standards** aus Derivatisierung (S1); Verdünnungsreihe anfertigen

Standardverdünnungsreihe

S2= 100 µL S1 + 100 µL ASYBUF (Assaypuffer)

S3= 100 µL S2 + 100 µL ASYBUF (Assaypuffer)

S4= 100 µL S3 + 100 µL ASYBUF (Assaypuffer)

S5= 100 µL S4 + 100 µL ASYBUF (Assaypuffer)

Verdünnung II

1:20 Verdünnung

- 40 µL Verdünnung I + 760 µl ASYBUF (Assaypuffer)

Diese Verdünnung wird für die Proteinbestimmung von Standard 1 (S1) und den jeweiligen Proben verwendet. Es wird empfohlen den Proteinbestimmungstest (BCA-Test) bei 37°C 3 Stunden zu inkubieren.

Verdünnung III

1:100 Verdünnung

- 10 µL Verdünnung II + 990 µl ASYBUF (Assaypuffer)

Diese Verdünnung wird im ELISA eingesetzt.

Pipettierschema ELISA

1. Die benötigten Streifen der PLATE (Mikrotiterplatte) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterplattenstreifen können in der verschlossenen Originalverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8°C gelagert werden
2. **2 x 200 µl STD** (Standard), **CTRL** (Kontrolle), **ASYBUF** (Blank) und **SAMPLE** (Probe) aus **Verdünnung III** in Doppelbestimmung in die Vertiefungen der Mikrotiterplattenstreifen pipettieren

3. Streifen luftdicht abdecken und 3 Stunden bei 37 °C oder über Nacht bei 2-8°C inkubieren
4. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
5. 200 µl des verdünnten AB (anti-DNPH-Antikörper) in alle Vertiefungen pipettieren
6. Streifen abdecken und 20 min bei Raumtemperatur inkubieren. Wichtig: Nicht schütteln!
7. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
8. 200 µl CONJ (Konjugat, Ziege-anti-Kaninchen-Peroxidase-markiert) in alle Vertiefungen pipettieren
9. Streifen abdecken und 20 min bei Raumtemperatur inkubieren. Wichtig: Nicht schütteln!
10. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
11. 200 µl SUB (TMB-Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren
12. 15-20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren*
13. 50 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren und im Mikrotiterplattenphotometer im Schüttelmodus mischen
14. Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden

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

10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Es wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – erstellt. Die Konzentrationen der Proben können direkt anhand der Standardkurve ausgewertet werden.

Es wird eine 4-Parameter-Auswertung empfohlen.

Der Carbonylgehalt wird mit Hilfe folgender Formel berechnet:

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

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

$\text{Proteine}_{\text{Standard}}$: Proteingehalt des höchsten Standards (S1), ermittelt mit dem BCA-Test in mg/ml aus Verdünnung II

$\text{Proteine}_{\text{Probe}}$: Proteingehalt der Probe, ermittelt mit dem BCA-Test in mg/ml aus Verdünnung II

Erwartete Ergebnisse

Normbereich

EDTA-Plasma

75 – 200 pmol/mg

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

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

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

12. LITERATUR

Beal MF (2002) Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radical Biology and Medicine* **32(9)**: 797-803

Berlett BS and Stadtman ER (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol. Chem.* **272**: 33-20316

Buss H, Chan TP, Sluis KB, Domigan NM and Winterbourn CC (1997) Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radic Biol Med* **23**: 361-366

Cao G and Cutler RG (1995) Protein oxidation and aging. I. Difficulties in measuring reactive protein carbonyls in tissues using 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Arch. Biochem. Biophys.* **320**: 106–114

- Davies KJA and Delsignore ME (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J. Biol. Chem.* **262**: 9908–9913
- Dean RT, Fu S, Stocker R and Davies MJ (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* May 15; **324**: 1-18
- Descamps-Latscha B, Druke T, Witko-Sarsat V (2001) Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy. *Semin Dial.* May-Jun; **14(3)**: 193-9
- Galli F (2007) Protein damage and inflammation in uraemia and dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* Jul; 22 Suppl 5: v20-v36. Review
- Gladstone IMJ and Levine RL (1994) Oxidation of proteins in neonatal lungs. *Pediatrics* **93**: 764–768
- Lenz A-G, Jorens PG, Meyer B, De Backer W, Van Overveld F, Bossaert L and Maier KL (1999) Oxidatively modified proteins in bronchoalveolar lavage fluid of patients with ARDS and patients at-risk for ARDS. *Eur Respir J.* **13**: 169-174
- Levine RL (2002) Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med.* May 1; **32(9)**: 790-6. Review
- Levine RL and Stadtman ER (2001) Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol.* Sep; **36(9)**: 1495-502. Review
- Marnett LJ, Riggins JN, West JD (2003) Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J. Clin. Invest.* **111**: 583–593
- Matzi V, Lindenmann J, Muench A, Greilberger J, Juan H, Wintersteiger R, Maier A, Smolle-Juettner FM (2007) The impact of preoperative micronutrient supplementation in lung surgery. A prospective randomized trial of oral supplementation of combined a-ketoglutaric acid and 5-hydroxymethylfurfural. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* **32**: 776-782
- Reznick AZ, Cross CE, Hu ML, Suzuki YJ, Khwaja S, Safadi A, Motchnik PA, Packer L, Halliwell B (1992) Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. *Biochem. J.* **286**: 607–611
- Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA, Markesbery WR (1991) Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal, aging and in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 10540–10543

Stadtman ER and Oliver CN (1991) Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J. Biol. Chem.* **266**: 2005–2008

Starke-Reed PE and Oliver CN (1989) Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* **275**: 559–567

Wiseman H and Halliwell B (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* **313**: 17–29

13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.
- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich für Forschungszwecke eingesetzt werden.
- Die Reagenzien sollten nach Ablauf des angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden (Haltbarkeitsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen sollten nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die dafür erstellten Richtlinien für medizinische Laboratorien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten und der Aufbereitung der Proben wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für direkt daraus resultierende Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

18.07.2008

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung



Nur für Forschungszwecke

Manual

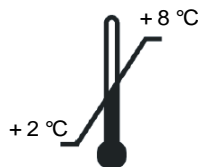
Carbonyl Protein ELISA Kit

For the determination of protein carbonyls in biological samples

Valid from 18.07.2008



K 7822



1. INTENDED USE

This ELISA Kit is intended for the determination of protein carbonyls in biological samples such as EDTA-plasma, bronchoalveolar lavage fluid and cerebrospinal fluid, cell extracts and other soluble protein samples. For research use only.

2. INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS) can oxidize proteins, lipids, and DNA, causing damage of their structure and function as well as cell injury. Proteins are oxidized by free radicals, whereby the constituent amino acids are variously modified or degraded. The modifications result in new functional groups such as carbonyl or hydroxyl groups, which may lead to protein fragmentation, formation of protein-protein cross-linkages, disruption of the tertiary structure and loss of functional activity. In addition, ROS are directly associated with diseases like atherosclerosis, rheumatoid arthritis, Alzheimer's and Parkinson's disease as well as ageing and cancerogenesis.

Protein carbonyls are formed by a variety of oxidative mechanisms and are sensitive indices of oxidative injury. The quantity of protein carbonyls in a protein sample can be determined by derivatizing with dinitrophenylhydrazine (DNPH) and measuring the bound anti-DNPH antibodies. The ELISA method enables carbonyls to be measured quantitatively with microgram quantities of protein.

Indication

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

3. PRINCIPLE OF THE TEST

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

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

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K7822MTP	PLATE	One holder with strips	12 x 8 wells
K7822WP	WASHBUF	Wash buffer concentrate (10 fold)	1 x 100 ml
K7822ST	STD	Standard stock solution	1 x 50 µl
K7822KO	CTRL	Control, positive	1 x 50 µl
K7822K	CONJ	Conjugate, peroxidase-labeled	1 x 22 ml
K7822AK	AB	1. Antibody	1 x 240 µl
K7822AVR	ABBUF	Antibody dilution buffer	1 x 30 ml
K7822DR	DER	Derivatization reagent	1 x 9 ml
K7822BU	ASYBUF	Assay buffer	2 x 100 ml
K7822TMB	SUB	TMB substrate	2 x 15 ml
K7822AC	STOP	Stop solution	1 x 15 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 0.5 - 1000 μ l
- Foil to cover the microtiter plate
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser for washing
- Centrifuge capable of 11000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory reaction vessels (cups) made of polypropylene
- Centrifugal filtration concentrators can be ordered from Immundiagnostik (Cat. No K 7822ZR)
- Protein quantification test (Cat. No K 7822BCA)
- Microtiter plate reader at 450 nm (reference wave length 620 or 690 nm)

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- The **WASHBUF** (Wash buffer concentrate) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or at 37°C using a water bath before dilution of the buffer solutions. The **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.**
- The **DER** (Derivatization reagent) is prepared as a saturated solution. Crystals can occur due to the high salt concentration. The **DER** (Derivatization reagent) is used as such, without removing the crystals.
- The **AB** (1. Antibody) must be diluted **1:100 in ABBUF** (Antibody dilution buffer): e.g. Preparation of reagents for 1 plate:

220 μ l AB (1. Antibody) + 22 ml ABBUF ((Antibody dilution buffer))

Diluted AB-solution can be stored for **2 days at 2-8°C** in a closed flask.

- All other test reagents can be stored at 2-8° C and are stable until the expiry date (see label of test package).

7. PRECAUTIONS

- Stop as well as derivatization solution is composed of strong acid. Even diluted, they still must be handled with care. They can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.

8. SAMPLE AND TEST PREPARATION

- Plasma, bronchoalveolar lavage fluid and cerebrospinal fluid, cell extracts and other soluble protein samples are suited for this test system.
- Samples should be sent cooled; they are stable for 24 h at room temperature.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- The carbonyl protein content is calculated from the estimated carbonyl concentration and the total protein content of the sample. **For this reason, a parallel determination of the protein content is required.**
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the test results. Immundiagnostik can therefore not be held reliable for any damage resulting from this.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

Sample preparation and test procedure

Derivatization

1. Bring all reagents and samples to room temperature (18-26°C)
2. Label the centrifugal filtration concentrators for STD (standard), CTRL (control), ASYBUF (blank) and SAMPLE (samples) and place them in the collecting vials
3. Add in each centrifugal filtration concentrator 80µl of DER (derivatization reagent)
4. Add 4 µl of each STD (standard), CTRL (control), ASYBUF (blank) and SAMPLE (sample) in the corresponding centrifugal filtration concentrator containing the derivatization reagent. Mix by repeated pipetting of the mixture up and down and close the centrifugal filtration concentrator
5. Allow the derivatization to proceed for 45 min at room temperature
6. Centrifuge all centrifugal filtration concentrators at 11000 x g for 15 min
7. Add 60 µl of ASYBUF (assay buffer) in all centrifugal filtration concentrators
8. Centrifuge at 11000 x g for 15 min
9. Add 60 µl of ASYBUF (assay buffer) in all centrifugal filtration concentrators.
10. Centrifuge at 11000 x g for 15 min
11. Add 60 µl of ASYBUF (assay buffer) in all centrifugal filtration concentrators

Dilution I

1:4 Dilution

- 180 µl ASYBUF (Assay buffer) + 60 µl **Sample** supernatant after derivatization
- 180 µl ASYBUF (Assay buffer) + 60 µl **Blank** supernatant after derivatization (S6)
- 180 µl ASYBUF (Assay buffer) + 60 µl **Standard** supernatant after derivatization (S1); prepare a dilution series

Standard dilution series

S2= 100 µL S1 + 100 µL ASYBUF (Assay buffer)

S3= 100 µL S2 + 100 µL ASYBUF (Assay buffer)

S4= 100 µL S3 + 100 µL ASYBUF (Assay buffer)

S5= 100 µL S4 + 100 µL ASYBUF (Assay buffer)

Dilution II

1:20 Dilution

- 40 µL Dilution I + 760 µl ASYBUF (Assay buffer)

This dilution is used for protein determination of standard 1 (S1) and the respective samples. We recommend incubating the protein determination test (BCA-Test) at 37°C for 3 hours.

Dilution III

1:100 Dilution

- 10 µL Dilution II + 990 µl ASYBUF (Assaypuffer)

This dilution is used for the ELISA test.

Test procedure ELISA

1. Take as many microtiter strips (PLATE) as needed from kit. Store unused strips in the closed original package bag at 2-8°C. Strips are stable until the expiry date stated on the label
2. For the analysis in duplicate, pipette **2 x 200 µl** of **STD** (standards), **CTRL** (control), **BLANK** (blank) and **SAMPLE** (samples) from **dilution III** into the respective well of the microtiter plate

3. Cover plate tightly and incubate for 3 hours at 37°C or over night at 2-8°C
4. Aspirate the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution
5. Add 200 µl of diluted AB (anti-DNPH-antibody) into each well
6. Cover the plate tightly and incubate for 20 min at room temperature (18-26°C). Important: Do not shake!
7. Aspirate the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution
8. Add 200 µl of CONJ (conjugate, goat-anti-rabbit-peroxidase-labeled) into each well
9. Cover the plate tightly and incubate for 20 min at room temperature (18-26°C). Important: Do not shake!
10. Aspirate the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution
11. Add 200 µl of SUB (TMB substrate) into each well
12. Incubate for 15-20 min at room temperature in the dark*
13. Add 50 µl of STOP (stop solution) into each well, mix thoroughly
14. 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 to observe the color change and to stop the reaction upon good differentiation.

10. EVALUATION OF RESULTS

A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from standard. The concentration of patient samples is determined directly from the linear standard curve.

A 4-parameter curve fitting equation is recommended for evaluation of the results.

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

$$CP_{\text{Sample}} [\text{pmol/mg}] \text{ standardized} = \frac{CP_{\text{Sample}} [\text{pmol/mg}] \times \text{Proteins}_{\text{Standard}} [\text{mg/ml}]}{\text{Proteins}_{\text{Sample}} [\text{mg/ml}]}$$

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

$\text{Proteins}_{\text{Standard}}$: Protein content of dilution II of the highest standard (S1), estimated with the BCA-Test in mg/ml

$\text{Proteins}_{\text{Sample}}$: Protein content of the sample dilution II, estimated with the BCA-Test in mg/ml

Expected values

Normal range

EDTA-plasma

75 – 200 pmol/mg

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n=4)		
Probe	Carbonyl proteins [pmol/mg]	Standard Deviation (SD) [%]
1	70	9.86
2	140	8.40
3	830	5.80
4	1140	8.40

Inter-Assay (n=4)		
Probe	Carbonyl proteins [pmol/mg]	Standard Deviation (SD) [%]
1	60	7.37
2	170	9.72
3	730	7.19
4	1130	6,36

12. REFERENCES

Beal MF (2002) Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radical Biology and Medicine* **32(9)**: 797-803

Berlett BS and Stadtman ER (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol. Chem.* **272**: 33-20316

Buss H, Chan TP, Sluis KB, Domigan NM and Winterbourn CC (1997) Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radic Biol Med* **23**: 361-366

- Cao G and Cutler RG (1995) Protein oxidation and aging. I. Difficulties in measuring reactive protein carbonyls in tissues using 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Arch. Biochem. Biophys.* **320**: 106–114
- Davies KJA and Delsignore ME (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J. Biol. Chem.* **262**: 9908–9913
- Dean RT, Fu S, Stocker R and Davies MJ (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* May 15; **324**: 1-18
- Descamps-Latscha B, Druke T, Witko-Sarsat V (2001) Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy. *Semin Dial.* May-Jun; **14(3)**: 193-9
- Galli F (2007) Protein damage and inflammation in uraemia and dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* Jul; 22 Suppl 5: v20-v36. Review
- Gladstone IMJ and Levine RL (1994) Oxidation of proteins in neonatal lungs. *Pediatrics* **93**: 764–768
- Lenz A-G, Jorens PG, Meyer B, De Backer W, Van Overveld F, Bossaert L and Maier KL (1999) Oxidatively modified proteins in bronchoalveolar lavage fluid of patients with ARDS and patients at-risk for ARDS. *Eur Respir J.* **13**: 169-174
- Levine RL (2002) Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med.* May 1; **32(9)**: 790-6. Review
- Levine RL and Stadtman ER (2001) Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol.* Sep; **36(9)**: 1495-502. Review
- Marnett LJ, Riggins JN, West JD (2003) Endogenous generation of reactive oxidants and elektrophiles and their reactions with DNA and protein. *J. Clin. Invest.* **111**: 583–593
- Matzi V, Lindenmann J, Muench A, Greilberger J, Juan H, Wintersteiger R, Maier A, Smolle-Juettner FM (2007) The impact of preoperative micronutrient supplementation in lung surgery. A prospective randomized trial of oral supplementation of combined a-ketoglutaric acid and 5-hydroxymethylfurfural. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* **32**: 776-782

Reznick AZ, Cross CE, Hu ML, Suzuki YJ, Khwaja S, Safadi A, Motchnik PA, Packer L, Halliwell B (1992) Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. *Biochem. J.* **286**: 607–611

Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA, Markesbery WR (1991) Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal, aging and in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 10540–10543

Stadtman ER and Oliver CN (1991) Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J. Biol. Chem.* **266**: 2005–2008

Starke-Reed PE and Oliver CN (1989) Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* **275**: 559–567

Wiseman H and Halliwell B (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* **313**: 17–29

13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- Test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.
- All reagents in the test package are for research use only.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.
- 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 wrong use.

18.07.2008

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number



For research use only