

# Thiol-Status

(Sulphydryl-Status-Test)

Photometrisches Testsystem zur Bestimmung des gesamten Sulphydryl-Status in Serum, Plasma, Urin und Synovia

# Thiol status

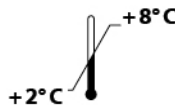
(Sulphydryl status assay)

Photometric assay for the determination of sulphydryl status in serum, plasma, urine and synovia

Gültig ab / Valid from 20.09.2006



K 1800



**Immundiagnostik AG**  
Stubenwald-Allee 8a  
64625 Bensheim, Germany  
[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)



# Inhalt

<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b> .....	<b>2</b>
<b>2. EINLEITUNG</b> .....	<b>2</b>
<b>3. TESTPRINZIP</b> .....	<b>3</b>
<b>4. INHALT DER TESTPACKUNG</b> .....	<b>3</b>
<b>5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b> .....	<b>3</b>
<b>6. LAGERUNG UND HERSTELLUNG DER REAGENZIEN</b> .....	<b>3</b>
<b>7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN</b> .....	<b>4</b>
<b>8. PROBENVORBEREITUNG</b> .....	<b>4</b>
<b>9. TESTDURCHFÜHRUNG</b> .....	<b>4</b>
Hinweise .....	4
Testansatz .....	4
Pipettierschema .....	5
<b>10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE</b> .....	<b>5</b>
Berechnung: .....	5
Mustereichgerade .....	6
<b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b> .....	<b>6</b>
Normbereich .....	6
Kontrollen .....	6
<b>12. LITERATUR</b> .....	<b>7</b>
<b>13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b> .....	<b>7</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Dieser photometrische Test ist für die Bestimmung des gesamten Sulphydryl-Status (GSH, proteingebundene und freie SH-Gruppen) in Plasma, Serum, Urin und Synovia geeignet. Für die Auswertung ist ein ELISA-Reader notwendig. Nur zur In-vitro-Diagnostik.

## 2. EINLEITUNG

Oxidativer Stress liegt vielen pathophysiologischen Reaktionen zugrunde, z.B. Entzündungsreaktionen, Alterungsprozessen, der diabetischen Angiopathie, postischämischen Gewebeschädigungen sowie der Karzinogenese und Teratogenese. Oxidativer Stress liegt vor, wenn vermehrt Sauerstoffradikale im Körper vorliegen und diese nicht mehr in ausreichender Menge abgebaut werden, weil z.B. die körpereigenen antioxidativen Schutzsysteme überlastet sind. Sauerstoffradikale wirken toxisch, daher ist ihre schnellstmögliche Beseitigung eine wichtige Aufgabe.

Thiole (Sulphydryle) stellen ein körpereigenes Schutzsystem zur Beseitigung freier Radikale dar. Thiole bzw. Alkanthiole sind organische Verbindungen, die eine oder mehrere funktionelle Thiolgruppen (SH-Gruppen) tragen. Diese reagieren mit freien Radikalen und können daher als „Radikalfänger“ gesehen werden. Ihre Konzentration in der Zirkulation ist ein Maß für den antioxidativen Status eines Organismus. Serum-Thiol-Spiegel charakterisieren außerdem die Fähigkeit DNA-Schäden zu reparieren, da die enzymatische Aktivität des DNA-Reparatur-Schlüsselenzyms Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) durch das Mengenverhältnis Thiole/Di-sulfide reguliert wird.

Hohe Thiol-Spiegel werden als Schutz gegenüber freien Radikalen gesehen. Niedrige Thiol-Spiegel gelten als Risikofaktor für DNA-Schädigungen und begünstigen die Entwicklung von Arteriosklerose und Tumorerkrankungen. Chronisch Kranke wiesen in klinischen Studien niedrigere Thiol-Spiegel als gesunde Vergleichspersonen auf. Die Thiol-Spiegel korrelierten außerdem mit dem Grad der Erkrankung (Banne et al. 2003).

### Indikationen

- Pankreatitis
- Rheumatische und reaktive Arthritis
- Systematischer Lupus erythematoses
- Sklerodermie, Mischkollagenosen
- Karzinomerkrankungen
- AIDS
- Herzinsuffizienz
- Lungenerkrankungen
- Diabetische Neuropathie

### 3. TESTPRINZIP

Freie und gebundene SH-Gruppen reagieren in Reaktionspuffer A mit Reaktionspuffer B zu einem gelblichen Farbprodukt mit einem Absorptionsmaximum bei 412 nm.

Die Quantifizierung erfolgt über einen mitgeführten Kalibrator.

### 4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Abkürzung	Kit Komponenten	Menge
K 1800KA	CAL	Kalibrator (lyoph. 1 ml; 1000 $\mu\text{mol/L}$ )	4 Fläschchen
K 1800RA	REABUF A	Reaktionspuffer A	1 x 24 ml
K 1800RB	REABUF B	Reaktionspuffer B	1 x 2,4 ml
K 1800MTP	PLATE	Mikrotiterplatte	1 Stück

### 5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Diverse Pipetten
- ELISA-Reader
- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Temperiereinheit für 37 °C

### 6. LAGERUNG UND HERSTELLUNG DER REAGENZIEN

Die Testreagenzien sind bei 2-8 °C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum verwendbar.

Herstellung der Reagenzien:

- Der REABUF A (Reaktionspuffer A) wird unverdünnt im Test eingesetzt.
- Der REABUF B (Reaktionspuffer B) wird unverdünnt im Test eingesetzt.
- Der CAL (Kalibrator) wird mit 1000  $\mu\text{l}$  bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) rekonstituiert. Der rekonstituierte CAL (Kalibrator) ist bei 2-8 °C oder bei -20°C 1 Woche haltbar.

## 7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Bestandteile verschiedener Packungen nicht untereinander austauschen.
- Reagenzien nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden.
- Mikrotiterstreifen während den Inkubationen mit Folie abdecken.
- Bestimmung immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchführen.

## 8. PROBENVORBEREITUNG

Plasma, Serum, Urin und Synovialflüssigkeit

- Lipämische und hämolytische Proben beeinflussen das Testergebnis und sollten nicht verwendet werden.
- Vollblut ist nicht für die Messung geeignet.
- Proben, welche sichtbare Mengen an Feststoff (meist Kryoproteine) enthalten, sollten vor Einsatz im Test zentrifugiert werden (mind. 5 min bei 10000 g) und der resultierende Überstand im Test eingesetzt werden.

## 9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.
- Der Assay ist immer nach der, im Kit beigefügten, Arbeitsanleitung abzuarbeiten.

Testansatz

Die Mikrotiterplatte ist gebrauchsfertig.

Wichtig: Die angegebene Temperatur und Inkubationsdauer ist exakt einzuhalten, um die Reproduzierbarkeit der Messwerte gewährleisten zu können.

## Pipettierschema

1. 20 µl Probe, CAL (Kalibrator) und Leerwert (H<sub>2</sub>O, welches zum rekonstituieren des CAL (Kalibrator) verwendet wurde) in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren.
2. 200 µl REABUF A (Reaktionspuffer A) hinzugeben.
3. Messung 1: Messung der Eigenabsorption der Proben im ELISA Reader bei 405 nm.
4. 20 µl REABUF B (Reaktionspuffer B) hinzugeben.
5. 30 min bei 37° C inkubieren (mit Folie abdecken).
6. Messung 2: erfolgt sofort nach der Inkubation bei 405 nm im ELISA Reader.

## 10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

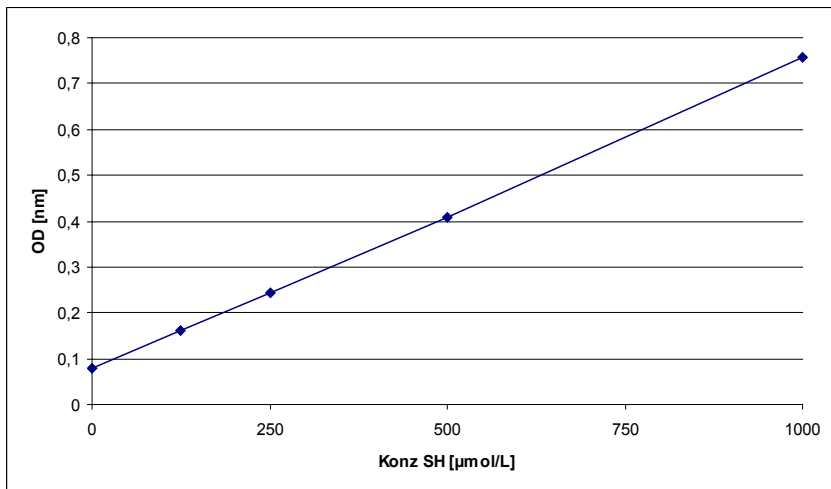
Die Differenz aus Messung 1 und 2 ist proportional dem Sulfhydryl-Status der Probe. Zur Auswertung werden von den gemessenen Proben und CAL (Kalibrator) die erhaltenen OD-Werte der 1. Messung von den OD-Werten der 2. Messung subtrahiert. Proben werden dann am CAL (Kalibrator) kalibriert.

Berechnung:

$$\text{Konzentration der Probe } [\mu\text{mol/l}] = \frac{\Delta \text{OD} \times \text{Konzentration Kalibrator } [\mu\text{mol/l}]}{\Delta \text{OD Kalibrator}}$$

Hinweis: Die unten dargestellte Mustereichgerade dient lediglich der Anschauung. Da die Reaktion in dem gewählten Konzentrationsbereich linear verläuft, kann eine Einpunktkalibrierung mittels des beigegefügt Kalibrators als ausreichend erachtet werden.

## Mustereichgerade



## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### Normbereich

Serum, Plasma: 430 - 660  $\mu\text{mol/l}$  (2 SD)

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

### Kontrollen

Zur Überwachung der Qualität der Analyse sollten bei jedem Lauf externe Kontrollen mitgeführt werden. Wenn eine oder mehrere Kontrollen eines Laufs außerhalb ihres Bereichs liegen ist es möglich, dass auch die Patientenproben falsch ermittelt wurden.

## 12. LITERATUR

- Banne AF et al. (2003) *Anti Aging Med* 6: 327-34
- Belch JJ et al. (1991) *Br Heart J* May; 65(5):245-248
- Dabrowski A, Gabryelewicz A (1992) *Int J Pancreatol* Dec; 12(3): 193-199
- Collier A et al. (1979) *Diabet Med* 7(1): 27-30
- Ellmann G, Lysko H (1979) *Anal Biochem*; Feb; 93(1): 98-102
- Hu-ML: *Methods-Enzymol.* 1994; 233: 380-385
- Jocelyn PC (1987) *Methods Enzymol* ; 143: 44-67
- Langley SC et al. (1993) *Pediatr Res*; Mar; 33(3): 247-250
- Miesel R, Zuber M (1993) *Inflammation.* Oct; 17(5): 551-561
- Nguyen TT et al. (1993) *J Burn Care Rehabil*; Nov-Dec; 14(6): 602-609
- Riddles PW et al. (1983) *Methods Enzymol* 91: 49-60
- Sitton NG (1986) *Wright-V: Rheumatol Int* 6(6): 251-254

## 13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.
- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zur in vitro Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien sollten nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden (Verfallsdatum 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 Pipettiervolumina 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.

**Verwendete Symbole:**

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>  
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

# Thiol status

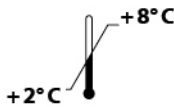
(Sulphydryl status assay)

Photometric assay for the determination of sulphydryl status in serum,  
plasma, urine and synovia

Valid from 20.09.2006



K 1800



**Immundiagnostik AG**

Stubenwald-Allee 8a  
64625 Bensheim, Germany  
[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Content

<b>1. INTENDED USE .....</b>	<b>11</b>
<b>2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST .....</b>	<b>11</b>
<b>3. PRINCIPLE OF THE TEST .....</b>	<b>11</b>
<b>4. MATERIAL SUPPLIED .....</b>	<b>12</b>
<b>5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED .....</b>	<b>12</b>
<b>6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS .....</b>	<b>12</b>
<b>7. PRECAUTIONS .....</b>	<b>13</b>
<b>8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION .....</b>	<b>13</b>
<b>9. ASSAY PROCEDURE .....</b>	<b>13</b>
Procedural notes .....	13
Testpreparations .....	13
Test initiation.....	14
<b>10. EVALUATION OF RESULTS .....</b>	<b>14</b>
Calculation .....	14
Standard curve (for demonstration purposes) .....	15
<b>11. TESTPERFORMANCE .....</b>	<b>15</b>
Reference values .....	15
Controls .....	15
<b>12. LITERATURE .....</b>	<b>16</b>
<b>13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE .....</b>	<b>16</b>

## 1. INTENDED USE

This photometric assay is suitable for the determination of the thiol (sulfhydryl) status (GSH, protein bound and free SH groups) in plasma, serum, urine and synovia. For in vitro diagnostic use only.

## 2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Oxidative stress, or the production of oxygen-centered free radicals, has been hypothesized as the major source of DNA damage that in turn can lead to altered genetic expression, disease, and aging of humans.

Serum protein thiol levels in blood are a direct measure of the in vivo reduction/oxidation (redox) status in humans, because thiols react readily with oxygen-containing free radicals to form disulfides. Moreover, serum thiols also reflect DNA repair capacity and the possible eventual accumulation of genetic damage, since a key DNA repair enzyme, poly ADP-ribose polymerase (PARP), is thiol/disulfide redox regulated.

Serum protein thiols can possibly be used to estimate individual aging status. Data from Banne et al. (2003) strongly confirm an important role of oxidative stress in human disease development, and identify serum thiol status as a potential biochemical endpoint useful in the assessment of aging.

## 3. PRINCIPLE OF THE TEST

When the sample is added to the reaction buffer A together with the reaction buffer B, free and bound SH groups from the sample undergo a reaction, that results in a yellow colored product with an absorption maximum at 412 nm. The quantitation is performed by the delivered calibrator.

#### 4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit Components	Quantity
K 1800KA	CAL	Calibrator (lyoph. 1 ml; 1000 $\mu\text{mol/L}$ )	4 vials
K 1800RA	REABUF A	Reaction buffer A	1 x 24 ml
K 1800RB	REABUF B	Reaction buffer B	1 x 2,4 ml
K 1800MTP	PLATE	Microtiter plate	1 plate

#### 5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water
- Precision pipettes calibrated to deliver 10-1000  $\mu\text{l}$
- ELISA-reader
- Incubation chamber for 37 °C

#### 6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

All reagents are stable at 2-8 °C up to the expiry date stated on of the label.

##### Preparation of the reagents

The REABUF A (reaction buffer A) has to be used undiluted

The REABUF B (reaction buffer B) has to be used undiluted

##### Reconstitution of the calibrator

The CAL (calibrator) must be reconstituted in 1000  $\mu\text{l}$  bidistilled water. The reconstituted calibrator is stable at 2-8°C or at -20°C for one week.

## 7. PRECAUTIONS

- For in vitro diagnostic use only.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.
- Do not mix reagents of different lots.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.
- Seal the cavities with plastic foil during incubation.

## 8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Plasma, serum, urine, sonovia

- Whole blood is not suited for this test.
- Lipaemia and haemolysis interfere with the test system. Such samples should not be measured.
- Samples with visible amounts of precipitates should be centrifuged (5 min at 10000 g) prior to measurement and the resulting supernatant is used in the test.

## 9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- The quality control guidelines should be observed.
- 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 the enclosed manual.

Testpreparations

- The microtiter plate is ready to use.
- To ensure the reproducibility of the measurement, the given incubation time and temperature should be followed strictly.

### Test initiation

1. Pipet 20 µl of sample, calibrator (CAL) and blank value (bidistilled water) in duplicates in appropriate wells.
2. Add 200 µl of REABUF A (reaction buffer A).
3. Measurement 1: Read the absorption of the samples in the ELISA reader at 405 nm.
4. Add 20 µl of REABUF B (reaction buffer B).
5. Incubate for 30 min at 37° C (seal the cavities with plastic foil).
6. Measurement 2: is performed immediately after the incubation at 405 nm in the ELISA reader.

## 10. EVALUATION OF RESULTS

### Calculation

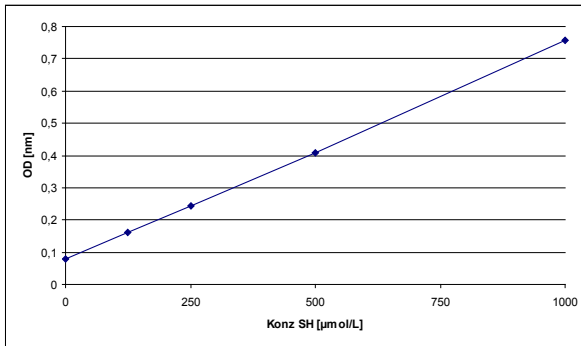
The difference between measurement 1 and 2 is directly proportional to the thiol- (sulfhydryl) status of the sample. For evaluation of the measured samples and the calibrator, the optical densities of measurement 1 are subtracted from the optical densities of measurement 2.

Samples and controls are then calibrated by the use of the calibrator (concentration is given on the label).

$$\text{Concentration of the sample } [\mu\text{mol/l}] = \frac{\Delta \text{OD} \times \text{Concentration Calibrator } [\mu\text{mol/l}]}{\Delta \text{OD Calibrator}}$$

Note: This linear standard curve is only for demonstration purposes. A standard curve should be generated for each set of samples assayed. Because of the linearity, only one-point calibration using the purchased calibrator is sufficient.

## Standard curve (for demonstration purposes)



## 11. TESTPERFORMANCE

### Reference values

Serum, plasma: 430 – 660 µmol / L (2SD)

We recommend each laboratory to establish its own normal range. The values mentioned above are only for orientation and can deviate from other published data.

### Controls

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 sample are outside the acceptable limits.

## 12. LITERATURE

- Banne AF et al. (2003) *Anti Aging Med* 6: 327-34
- Belch JJ et al. (1991) *Br Heart J* May; 65(5):245-248
- Dabrowski A, Gabryelewicz A (1992) *Int J Pancreatol* Dec; 12(3): 193-199
- Collier A et al. (1979) *Diabet Med* 7(1): 27-30
- Ellmann G, Lysko H (1979) *Anal Biochem*; Feb; 93(1): 98-102
- Hu-ML: *Methods-Enzymol.* 1994; 233: 380-385
- Jocelyn PC (1987) *Methods Enzymol* ; 143: 44-67
- Langley SC et al. (1993) *Pediatr Res*; Mar; 33(3): 247-250
- Miesel R, Zuber M (1993) *Inflammation.* Oct; 17(5): 551-561
- Nguyen TT et al. (1993) *J Burn Care Rehabil*; Nov-Dec; 14(6): 602-609
- Riddles PW et al. (1983) *Methods Enzymol* 91: 49-60
- Sitton NG (1986) *Wright-V: Rheumatol Int* 6(6): 251-254

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

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes has to be avoided.
- All reagents in the test package are to be used for research only.
- The reagents should not be used after the date of expiry stated on the label.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The guidelines for medical laboratories should be observed.
- 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.

**Used Symbols:**

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for &lt;n&gt; tests



Manufacturer



Use by



Lot number







**Immundiagnostik AG**

Stubenwald-Allee 8a  
D-64625 Bensheim

Tel.: +49(0) 62 51/70 19 00

Fax: +49(0) 62 51/84 94 30

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

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