

Arbeitsanleitung/Manual

# Zonulin ELISA Kit

*Zur in vitro Bestimmung von Zonulin in Serum und EDTA-Plasma*

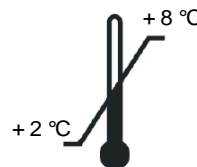
*For the in vitro determination of Zonulin in serum and EDTA-plasma*

*Nur für Forschungszwecke / For research use only*

Gültig ab / Valid from 06.11.2008



K 5600



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim  
Tel.: ++49 6251 70190-0  
Fax: ++ 49 6251 849430  
e.mail: [Info@immundiagnostik.com](mailto:Info@immundiagnostik.com)  
[www.Immundiagnostik.com](http://www.Immundiagnostik.com)

Inhaltsverzeichnis	Seite/Page
Table of content	2
<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>3</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>3. TESTPRINZIP</b>	<b>4</b>
<b>4. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>4</b>
<b>5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>5</b>
<b>6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>5</b>
<b>7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN</b>	<b>6</b>
<b>8. PROBENVORBEREITUNG</b>	<b>7</b>
<b>9. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>7</b>
HINWEISE	7
PIPETTIERSHEMA	8
<b>10. ERGEBNISSE</b>	<b>9</b>
MUSTEREICHKURVE	9
<b>11. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>10</b>
<b>12. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>10</b>
ERWARTETE ERGEBNISSE	10
<b>13. LITERATUR</b>	<b>10</b>
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>11</b>

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>14</b>
<b>2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST</b>	<b>14</b>
<b>3. PRINCIPLE OF THE TEST</b>	<b>14</b>
<b>4. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>15</b>
<b>5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>15</b>
<b>6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b>	<b>16</b>
<b>7. PRECAUTIONS</b>	<b>17</b>
<b>8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION</b>	<b>17</b>
<b>9. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>17</b>
PROCEDURAL NOTES	17
TEST PROCEDURE	18
<b>10. RESULTS</b>	<b>19</b>
TYPICAL CALIBRATION CURVE	19
<b>11. LIMITATIONS</b>	<b>20</b>
<b>12. QUALITY CONTROL</b>	<b>20</b>
EXPECTED VALUES	20
<b>12. REFERENCES</b>	<b>20</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>21</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von Zonulin in Serum und EDTA-Plasma geeignet. Nur für Forschungszwecke.

## 2. EINLEITUNG

Zonulin ist ein humanes Protein ähnlich dem Zonula-occludens-Toxin von *Vibrio cholerae*, das an der Regulation der interzellulären Kontakte (Tight junctions) in der Darmwand beteiligt ist. Zonulin bindet an einen spezifischen Rezeptor an der Oberfläche der Epithelzellen der Darmbarriere und aktiviert eine Kaskade biochemischer Ereignisse, welche die Öffnung der Tight junctions induzieren und als Folge die Durchlässigkeit der Darmepithelzellen erhöhen, so dass verschiedene Substanzen die Darmbarriere passieren und Autoimmunreaktionen auslösen können.

Die Arbeitsgruppe um Fasano hat festgestellt, dass bei Zöliakie- und Typ 1 Diabetes-mellitus-Patienten das Zonulin-Zonulinrezeptor-System stärker aktiviert ist. Patienten mit aktiver Zöliakie zeigen erhöhte Konzentrationen von Zonulin und Zonulin-Antikörpern im Vergleich zu nicht-Zöliakiepatienten und Patienten in Remission unter glutenfreier Diät.

Im Hinblick auf den autoimmunbedingten Typ 1 Diabetes konnte in Versuchen mit Ratten gezeigt werden, dass der Anstieg der Zonulin-Spiegel und die erhöhte Durchlässigkeit der Darmwand einer Typ 1 Diabetes-erkrankung zeitlich vorausgehen. Umgekehrt konnte im Tierexperiment ein Typ 1 Diabetes verhindert werden, wenn das Protein Zonulin blockiert wurde.

Darüber hinaus wurde berichtet, dass viele Zöliakiepatienten auch an anderen Autoimmunkrankheiten leiden. Es wird vermutet, dass bei der Entwicklung von Zöliakie und anderen Autoimmunerkrankungen wie insulinabhängiger Diabetes, Multiple Sklerose und Rheumatoide Arthritis, erhöhte Zonulin-Spiegel einen entscheidenden Faktor darstellen.

### 3. TESTPRINZIP

Dieser Zonulin Enzymimmunoassay dient zur quantitativen Erfassung von Zonulin aus humanem Serum oder EDTA-Plasma.

Das Testprinzip beruht auf einer Kompetitionsreaktion zwischen dem freien Antigen der Probe und dem immobilisierten Antigen auf der Mikrotiterplatte. Standards bzw. Proben werden mit dem Primärantikörper gegen Zonulin direkt auf die vorbeschichtete Mikrotiterplatte überführt.

Das Antigen aus den Proben konkurriert mit dem auf der Mikrotiterplatte immobilisierten Antigen um die freien Bindungsstellen der spezifischen anti-Zonulin Antikörper.

Die Detektion erfolgt über einen Peroxidase-markierten Sekundärantikörper und die entsprechende Substratumsetzung. Die Quantifizierung erfolgt durch Bestimmung der Absorption bei 450 nm.

### 4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art. Nr.	Abkürzung	Kit Komponenten	Menge
K 5600MTP	MTP	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 5600WP	WASHBUF	BM- Waschpufferkonzentrat 10x	100 ml
K 5600EP	EXBUF	Extraktionspuffer	25 ml
K 5600KV	CONJBUF	Konjugatverdünnungspuffer	15 ml
K 5600AK	AB	Zonulin-Antikörper	200 µl
K 5600VP	ABBUF	Zonulin-Antikörperverdünnungspuffer	15 ml
K 5600K	2. AB	Konjugat	200 µl
K 5600ST	STD	Standards (lyophilisiert)	2 x 7 vials
K 5600KO	CTRL	Kontrolle (lyophilisiert)	2 x 1 vial
K 5600TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml
K 5600AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	15 ml

## 5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 5 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Eppendorf-Gefäße 1,5 ml
- 15 ml Röhrchen (z.B. Falcon)
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 oder 405 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

## 6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Der **WASHBUF** (BM-Waschpufferkonzentrat) wird vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt (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 im Wasserbad bei 37 °C auf. Der **WASHBUF** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die lyophilisierten **STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrolle) werden mit **500 µl** bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Standards und Kontrolle können 1 Monat bei -20°C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.**

- Der **AB** (Zonulin-Antikörper) wird **1:100** in **ABBUF** (Zonulin-Antikörperverdünnungspuffer) verdünnt (50 µl AB + 4,95 ml ABBUF). Unverdünnter **AB** ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünnter AB ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Der **2.AB** (Konjugat) wird **1:100** in **CONJBUF** (Konjugatverdünnungspuffer) verdünnt (50 µl 2.AB + 4,95 ml CONJBUF). Unverdünnter **2.AB** (Konjugat) ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünnter 2.AB ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- 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 Thimerosal. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ ).  $H_2SO_4$  ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet werden.  $H_2SO_4$  verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

## 8. PROBENVORBEREITUNG

### EDTA-Plasma und Serum

Das Probenmaterial bis zur Verwendung bei  $-20\text{ °C}$  lagern.

**250  $\mu\text{l}$**  frische EDTA-Plasma- oder Serumproben in Eppendorf-Gefäße pipettieren, mit **250  $\mu\text{l}$  EXBUF** (Extraktionspuffer) versetzen, gut vortexen und für 20 Minuten bei 13000 rpm zentrifugieren. Danach wird der Überstand abgenommen, in ein Eppendorfröhrchen überführt und ein weiteres Mal für 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. **50  $\mu\text{l}$**  des Überstandes werden pro Vertiefung in den Test eingesetzt.

Verdünnungsfaktor 1:2

## 9. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Hinweise*

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen während den Inkubationen mit Folie abdecken.
- Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien vermeiden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

## Pipettierschema

Die vorbeschichtete Mikrotiterplatte vor Gebrauch **5x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.

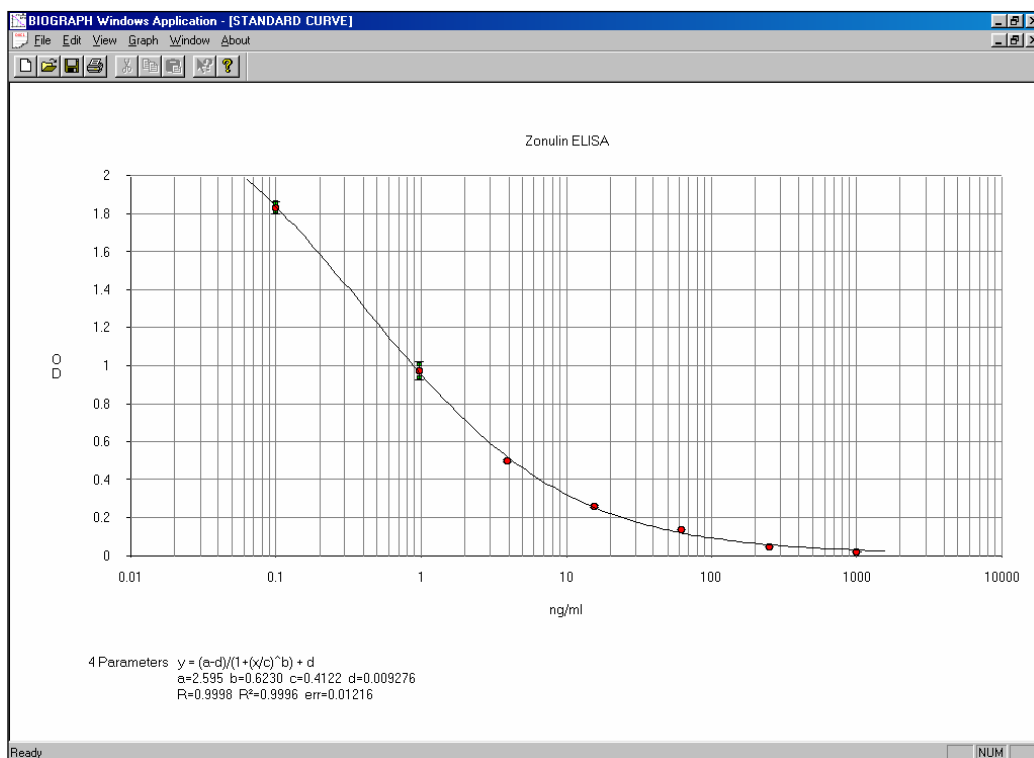
Die Bestimmungen in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchführen.

1. **50 µl STD** (Standards), **CTRL** (Kontrolle) oder **Proben** in Doppelbestimmungen in die Vertiefungen pipettieren
2. **50 µl AB** (anti-Zonulinantikörper) pro Vertiefung pipettieren
3. Streifen abdecken und **1,5 Stunden** bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln unter Schütteln inkubieren
4. Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen
5. **100 µl 2.AB** (Konjugat) pro Vertiefung pipettieren
6. Streifen abdecken und **1,5 Stunden** bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln unter Schütteln inkubieren
7. Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen
8. **100 µl SUB** (Substrat) pro Vertiefung pipettieren
9. **5-10 Minuten** bei Raumtemperatur (18-26°C) inkubieren
10. **50 µl STOP** (Stopplösung) pro Vertiefung zusetzen und im Mikrotiterplattenphotometer im Schüttelmodus kurz mischen
11. Extinktion **sofort** im Mikrotiterplattenphotometer bei **450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Sollte die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigen, sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) messen

## 10. ERGEBNISSE

Zur Auswertung des Testes empfehlen wir die 4-Parameter-Funktion. Alternativ kann auch eine Punkt-zu-Punkt-Auswertung oder eine gewichtete Spline-Funktion gewählt werden. Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte diese der Operator durchführen.

### Standardkurve



Die Abbildung ist ein Beispiel für eine Standardkurve. Die Daten dürfen nicht zur Auswertung von Kundenergebnissen verwendet werden.

## 11. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit hohen Zonulin Konzentrationen, die außerhalb des Messbereichs liegen, sollen mit EXBUF (Extraktionspuffer) verdünnt und nochmals bestimmt werden.

## 12. QUALITÄTSKONTROLLE

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

### *Erwartete Ergebnisse*

Die ermittelten Werte werden mit **Verdünnungsfaktor 2** multipliziert um die tatsächliche Zonulin-Konzentration der Proben zu bestimmen.

### **Normbereich**

Wir empfehlen jedem Labor eigenen Normwertbereich zu etablieren.

## 13. LITERATUR

1. Wang W, Uzzau S, Goldblum SE, Fasano A. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J Cell Sci* 2000;113 Pt 24: 4435-40.
2. Fasano A. Intestinal zonulin: open sesame! *Gut* 2001; 49: 159-62.
3. Fasano A, Not T, Wang W et al. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in celiac disease. *Lancet* 2000; 355(9214): 1518-19.
4. Thomas KE, Sapone A, Fasano A, Vogel SN. Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in Celiac disease. *J Immunol* 2006; 176: 2512-21.
5. Freemark M, Lynne LL. Screening for Celiac Disease in Children with Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 1932-39.
6. Lazzarotto F, Basso D, Plebani M et al. Celiac Disease and Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 248-49.

7. Watts T, Berti I, Sapone A et al. Role of the intestinal tight junction modulator zonulin in the pathogenesis of type 1 diabetes in BB diabetic-prone rats. *Proc Nat Acad Sci USA* 2005; 102(8): 2916-21.
8. Sapone A, de Magistris L, Pietzak M, Clemente MG, Tripathi A, Cucca F, Lampis R, Kryszak D, Carteni M, Generoso M, Iafusco D, Prisco F, Laghi F, Riegler G, Carratu R, Counts D, Fasano A. Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes* 2006; 55: 1443-9.
9. De Magistris MT. Zonula occludens toxin as a new promising adjuvant for mucosal vaccines. *Vaccine* 2006;24 Suppl 2: S2-60-1.

## 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich für Forschungszwecke verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern 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 zurück zu senden.

06.11.2008 Zonulin.doc

**Verwendete Symbole:**

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>  
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung



Nur für Forschungszwecke

# Zonulin ELISA Kit

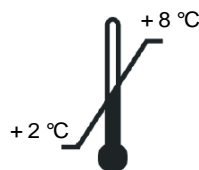
*For the in vitro determination of Zonulin in serum and EDTA-plasma*

*For research use only*

Valid from 06.11.2008



K 5600



## 1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is intended for the quantitative determination of zonulin in serum and EDTA-plasma. For research use only.

## 2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Zonulin is a novel human protein analogue to the *Vibrio cholerae* derived Zonula occludens toxin, which participates in tight junctions between cells of the wall of the digestive tract. Zonulin binds to a specific receptor on the surface of intestinal epithelia and triggers a cascade of biochemical events which induces tight junction disassembly and a subsequent permeability increase of the intestinal epithelia, allowing some substances to pass through and activate immune reactions.

Dr. Fasano and his co-workers found out that the zonulin-zonulin-receptor-system is more activated in celiac disease and type 1 diabetes mellitus patients. Patients with active celiac disease showed higher levels of zonulin and anti-zonulin antibodies compared to non-celiac patients and patients in remission, who were eating a gluten-free diet.

Concerning the autoimmune type 1 diabetes, in experiments with rats could be demonstrated, that elevated zonulin levels as well as increased intestinal permeability precede a type 1 diabetes disease. Conversely, type 1 diabetes could be prevented by inhibition of zonulin in animal experiments.

In addition, it was reported that many people who suffer from celiac disease also suffer from other autoimmune disorders. It is suggested that increased levels of zonulin are a contributing factor to the development of celiac disease and other autoimmune disorders such as insulin dependent diabetes, multiple sclerosis, and rheumatoid arthritis

## 3. PRINCIPLE OF THE TEST

This enzyme immuno assay can be used for the quantitative determination of Zonulin in serum and EDTA-plasma.

The test principle is based on a competition between the free antigen in the samples or standards and the antigen coated on the wells of the microplate. Standards, samples and the primary anti-zonulin antibody are transferred directly into the precoated microplate wells. The antigen in the samples competes with the antigen immobilized on the wells of the microplate for the binding sites of the specific anti-zonulin antibody. A peroxidase-conjugated antibody is used for detection, and tetramethylbenzidine (TMB) as a peroxidase substrate. The enzymatic reaction is terminated by acidic stop solution. The quantification is based on the optical density at 450 nm.

#### 4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Label	Kit Components	Quantity
K 5600MTP	MTP	Microtiter plate, precoated	12 x 8 wells
K 5600WP	WASHBUF	BM-wash buffer concentrate 10 x	100 ml
K 5600EP	EXBUF	Extraction buffer	25 ml
K 5600KV	CONJBUF	Conjugate dilution buffer	15 ml
K 5600AK	AB	Zonulin-antibody	200 µl
K 5600VP	ABBUF	Zonulin-antibody dilution buffer	15 ml
K 5600K	2. AB	Conjugate	200 µl
K 5600ST	STD	Standards (lyophilized)	2 x 7 vials
K 5600KO	CTRL	Control (lyophilized)	2 x 1 vial
K 5600TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine)	15 ml
K 5600AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	15 ml

#### 5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Precision pipettors calibrated and tips to deliver 5-1000 µl
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Eppendorf-cups, 1,5 ml
- 15 ml tubes (e. g. Falcon)
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 or 405 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.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **WASHBUF** (BM 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 37°C in a water bath before dilution of the buffer solutions. The **WASHBUF** 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 lyophilized **STD** (standards) and **CTRL** (control) must be reconstituted with **500 µl** aqua bidest. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. **Reconstituted standards and control can be stored at -20°C for one month. Avoid repeated freeze-thaw cycles.**
- The **AB** (Zonulin-antibody) must be diluted **1:100** in **ABBUF** (Zonulin-Zonulin-antibody dilution buffer) (50 µl AB + 4.95 ml ABBUF). The **AB** (Zonulin-antibody) is stable at **2 -8 °C** until expiry date given on the label. **Diluted AB is not stable and can not be stored.**
- The **2.AB** (Conjugate) must be diluted **1:100** in **CONJBUF** (Conjugate dilution buffer) (50 µl 2.AB + 4.95 ml CONJBUF). The **2.AB** (Conjugate) is stable at **2 -8 °C** until expiry date given on the label. **Diluted 2.AB is not stable and can not be stored.**
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8°C**.

## 7. PRECAUTIONS

- 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 thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.

## 8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

### EDTA-Plasma and Serum

Store samples until use at -20 °C.

Pipette **250 µl** freshly collected EDTA-plasma or serum samples in Eppendorf-cups, add **250 µl EXBUF** (extraction buffer), vortex well and centrifuge for 20 min at 13000 rpm. Transfer the supernatant into an Eppendorf tube and centrifuge for 10 minutes at 13000 rpm. For analysis, pipet **50 µl** of the obtained supernatant per well.

**Dilution factor 1:2**

## 9. ASSAY PROCEDURE

### *Procedural notes*

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Substrate solution should remain colorless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

### *Test procedure*

Wash the precoated microtiter plate **5 x with 250 µl** of diluted wash buffer. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution. Run the test in duplicate.

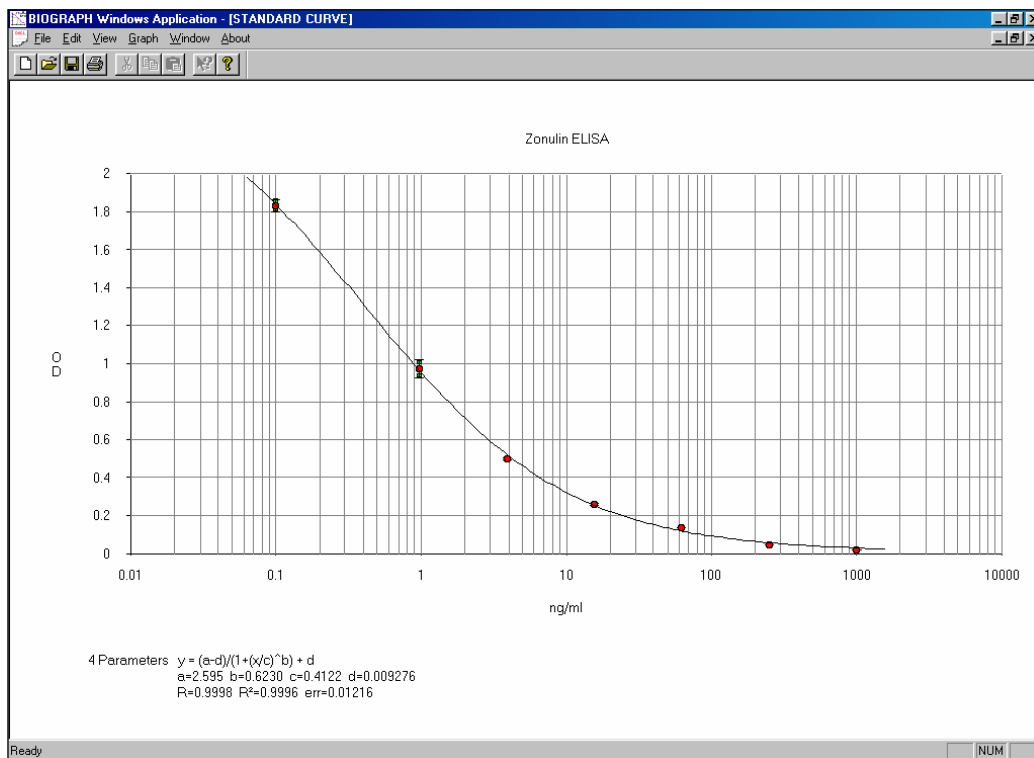
1. Add **50 µl** of **STD** (standards), **CTRL** (control) or **samples** into each well in duplicate
2. Add **50 µl** of **AB** (anti-zonulin antibody) into each well
3. Cover the strips and incubate for **1,5 hours** shaking on a horizontal mixer in the dark at room temperature (18-26°C)
4. Aspirate the contents of each well. Wash the microtiter plate **5 x with 250 µl** of diluted wash buffer. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution
5. Add **100 µl** of **2.AB** (conjugate) into each well
6. Cover the strips and incubate for **1,5 hours** shaking on a horizontal mixer in the dark at room temperature (18-26°C)
7. Aspirate the contents of each well. Wash the microtiter plate **5 x with 250 µl** of diluted wash buffer. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution
8. Add **100 µl** of **SUB** (substrate solution) into each well
9. Incubate for **5-10 minutes** at room temperature (18-26°C)
10. Add **50 µl** of **STOP** (stop solution) into each well and mix shortly in the ELISA reader using the shake option
11. Determine absorption **immediately** with an ELISA reader at **450 nm** against 620 nm (alternatively at 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

## 10. RESULTS

A calibration curve is constructed from the calibrators. Commercially available software can be used as well as graph paper. Results of the samples are read from this calibration curve.

THE CALIBRATION CURVE IS NOT LINEAR, therefore a spline- or 4PL algorithm is recommended.

### *Typical calibration curve*



The calibration curve is for demonstration only. The data cannot be used for the evaluation of test results.

## 11. LIMITATIONS

If the absorption of any sample is outside the measurement range, the sample should be diluted with EXBUF (extraction buffer) and re-assayed.

## 12. QUALITY CONTROL

**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.

### *Expected values*

A **dilution factor of 2** is used to obtain the Zonulin concentration of the samples.

### **Normal range**

We recommend each laboratory to establish its own baseline values.

## 12. REFERENCES

1. Wang W, Uzzau S, Goldblum SE, Fasano A. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J Cell Sci* 2000;113 Pt 24: 4435-40.
2. Fasano A. Intestinal zonulin: open sesame! *Gut* 2001; 49: 159-62.
3. Fasano A, Not T, Wang W et al. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in celiac disease. *Lancet* 2000; 355(9214): 1518-19.
4. Thomas KE, Sapone A, Fasano A, Vogel SN. Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in Celiac disease. *J Immunol* 2006; 176: 2512-21.
5. Freemark M, Lynne LL. Screening for Celiac Disease in Children with Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 1932-39.

6. Lazzarotto F, Basso D, Plebani M et al. Celiac Disease and Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 248-49.
7. Watts T, Berti I, Sapone A et al. Role of the intestinal tight junction modulator zonulin in the pathogenesis of type 1 diabetes in BB diabeticprone rats. *Proc Nat Acad Sci USA* 2005; 102(8): 2916-21.
8. Sapone A, de Magistris L, Pietzak M, Clemente MG, Tripathi A, Cucca F, Lampis R, Kryszak D, Carteni M, Generoso M, Iafusco D, Prisco F, Laghi F, Riegler G, Carratu R, Counts D, Fasano A. Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes* 2006; 55: 1443-9.
9. De Magistris MT. Zonula occludens toxin as a new promising adjuvant for mucosal vaccines. *Vaccine* 2006;24 Suppl 2: S2-60-1.

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

- All reagents in the kit package are for research use only.
- 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.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

**Used symbols:**

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for &lt;n&gt; tests



Manufacturer



Use by



Lot number



For research use only