



ImmunoSmol

Small molecule antibodies for research, diagnostics & therapy

ImmunoSmol SAS
PTIB - Hôpital Xavier Arnoz
Avenue Haut Lévêque
33400 Talence - France
+33 547 30 27 72
contact@immuSmol.com
www.immuSmol.com

Instructions for use **Glutamate ELISA**

REF

BA E-2400



96

RUO

For research
use only –
Not for use
in diagnostic
procedures

1. Introduction**1.1 Intended use and principle of the test**

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of L-Glutamate in urine and various biological samples.

After extraction and derivatisation Glutamate is quantitatively determined by ELISA.

The competitive ELISA uses the microtiter plate format. The antigen is bound to the solid phase of the microtiter plate. The derivatized analyte concentrations in the standards, controls and samples and the solid phase bound analyte compete for a fixed number of antibody binding sites. When the system is in equilibrium, free antigen and free antigen-antibody complexes are removed by washing. The antibody bound to the solid phase is detected by an anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate using TMB as a substrate. The reaction is monitored at 450 nm.

Quantification of unknown samples is achieved by comparing their absorbance with a standard curve prepared with known standards.

2. Procedural cautions, guidelines, warnings and limitations**2.1 Procedural cautions, guidelines and warnings**

- (1) This kit is intended for professional use only. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Only the test instruction provided with the kit is valid and has to be used to run the assay. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
- (2) This assay was validated for a certain type of sample as indicated in *Intended Use* (please refer to Chapter 1). Any off-label use of this kit is in the responsibility of the user and the manufacturer cannot be held liable.
- (3) The principles of Good Laboratory Practice (GLP) have to be followed.
- (4) In order to reduce exposure to potentially harmful substances, wear lab coats, disposable protective gloves and protective glasses where necessary.
- (5) All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
- (6) For dilution or reconstitution purposes, use deionized, distilled, or ultra-pure water.
- (7) The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch with desiccant and used in the frame provided.
- (8) Duplicate determination of sample is highly recommended to be able to identify potential pipetting errors.
- (9) Once the test has been started, all steps should be completed without interruption. Make sure that the required reagents, materials and devices are prepared ready at the appropriate time.
- (10) Incubation times do influence the results. All wells should be handled in the same order and time intervals.
- (11) To avoid cross-contamination of reagents, use new disposable pipette tips for dispensing each reagent, sample, standard and control.
- (12) A standard curve must be established for each run.
- (13) The controls should be included in each run and fall within established confidence limits. The confidence limits are listed in the QC-Report provided with the kit.
- (14) Do not mix kit components with different lot numbers within a test and do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- (15) Avoid contact with Stop Solution containing 0.25 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns. In case of contact with eyes or skin, rinse off immediately with water.
- (16) TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them.
- (17) For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheet (SDS). The Safety Data Sheet for this product is made available directly on the website of the manufacturer or upon request.
- (18) Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.

2.2 Limitations

Any inappropriate handling of samples or modification of this test might influence the results.

2.2.1 Interfering substances

Serum/Plasma

Samples containing precipitates or fibrin strands or which are haemolytic or lipemic might cause inaccurate results.

24-hour urine

Please note the sample preparation! If the percentage of the final concentration of acid is too high, this will lead to incorrect results for the urine samples.

2.2.2 Drug interferences

There are no known substances (drugs) which ingestion interferes with the measurement of glutamate level in the sample.

2.2.3 High-Dose-Hook effect

No hook effect was observed in this test.

3. Storage and stability

Store the unopened reagents at 2 - 8 °C until expiration date. Do not use components beyond the expiry date indicated on the kit labels. Once opened the reagents are stable for 1 month when stored at 2 - 8 °C. Once the resealable pouch has been opened, care should be taken to close it tightly with desiccant again.

4. Materials

4.1 Contents of the kit

BA D-0090	FOILS	Adhesive Foil - Ready to use
Contents:	Adhesive Foils in a resealable pouch	
Volume:	1 x 4 foils	
BA D-0024	REAC-PLATE	Reaction Plate - Ready to use
Contents:	1 x 96 well plate, empty in a resealable pouch	
BA E-2442	EXTRACT-PLATE 48	Extraction Plate - Ready to use
Contents:	2 x 48 well plate, precoated with cation exchanger in a resealable pouch	
BA E-0030	WASH-CONC 50x	Wash Buffer Concentrate - Concentrated 50x
Contents:	Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH	
Volume:	1 x 20 ml/vial, light purple cap	
BA E-0040	CONJUGATE	Enzyme Conjugate - Ready to use
Contents:	Goat anti-rabbit immunoglobulins conjugated with peroxidase	
Volume:	1 x 12 ml/vial, red cap	
BA E-0055	SUBSTRATE	Substrate - Ready to use
Contents:	Chromogenic substrate containing tetramethylbenzidine, substrate buffer and hydrogen peroxide	
Volume:	1 x 12 ml/black vial, black cap	
BA E-0080	STOP-SOLN	Stop Solution - Ready to use
Contents:	0.25 M sulfuric acid	
Volume:	1 x 12 ml/vial, light grey cap	
Hazards identification:		H290 May be corrosive to metals. H314 Causes severe skin burns and eye damage.
BA E-2431	GLUT	Glutamate Microtiter Strips - Ready to use
Contents:	1 x 96 well (12x8) antigen precoated microwell plate in a resealable foil pouch with desiccant	

BA E-2410 **AS** **GLUT** **Glutamate Antiserum** - Ready to use

Contents: Rabbit anti- glutamate antibody, blue coloured

Volume: 1 x 6 ml/vial, blue cap

BA E-2413 **ASSAY-BUFF** **Assay Buffer** - Ready to use

Contents: Buffer with alkaline pH

Volume: 1 x 20 ml/vial, yellow cap

BA E-2428 **EQUA-REAG** **Equalizing Reagent** - Lyophilized

Contents: Lyophilized protein

Volume: 1 vial, brown cap

Standards and Controls - Ready to use

Cat. no.	Component	Colour/Cap	Concentration µg/ml	Concentration µmol/l	Volume/ Vial
BA E-2401	STANDARD A	white	0	0	4 ml
BA E-2402	STANDARD B	light yellow	0.6	4.08	4 ml
BA E-2403	STANDARD C	orange	2	13.6	4 ml
BA E-2404	STANDARD D	dark blue	6	40.8	4 ml
BA E-2405	STANDARD E	light grey	20	136	4 ml
BA E-2406	STANDARD F	black	60	408	4 ml
BA E-2451	CONTROL 1	light green	Refer to QC-Report for expected value and acceptable range!		4 ml
BA E-2452	CONTROL 2	dark red			4 ml

Conversion: Glutamate (µg/ml) x 6.8 = Glutamate (µmol/l)

Contents: Acidic buffer with non-mercury preservative, spiked with defined quantity of Glutamate

BA E-2446 **D-REAGENT** **D-Reagent** - Ready to use

Contents: Crosslinking agent in dimethylsulfoxide

Volume: 1 x 4 ml/vial, white cap

BA E-2458 **Q-BUFFER** **Q-Buffer** - Ready to use

Contents: TRIS buffer

Volume: 1 x 20 ml/vial, white cap

BA E-2460 **DILUENT** **Diluent** - Ready to use

Contents: Buffer with sodium acetate

Volume: 1 x 20 ml/vial, dark green cap

BA E-2787 **NAOH** **NaOH** - Ready to use

Contents: Sodium hydroxide solution

Volume: 1 x 2 ml/vial, purple cap

Hazards identification: 

H290 May be corrosive to metals.

H315 Causes skin irritation.

H319 Causes serious eye irritation.

4.2 Additional materials and equipment required but not provided in the kit

- Calibrated precision pipettes to dispense volumes between 10 – 100 µl; 12.5 ml
- Polystyrene tubes and suitable rack
- Microtiter plate shaker (shaking amplitude 3 mm; approx. 600 rpm)
- ELISA reader capable of reading absorbance at 450 nm and if possible 620 - 650 nm
- Shaker (shaking amplitude 3 mm; approx. 600 rpm)
- Absorbent material (paper towel)
- Vortex mixer
- Water (deionized, distilled, or ultra-pure)

5. Sample collection and storage

Plasma

Whole blood should be collected by venipuncture into centrifuge tubes containing EDTA as anti-coagulant (Monovette™ or Vacuette™ for plasma) and centrifuged according to manufacturer's instructions at room temperature immediately after collection.

Fasting specimens or pre-feed specimens for children (2 - 3 hours after last meal) are advised.

Haemolytic and especially lipemic samples should not be used for the assay.

Storage: up to 24 hours at 2 - 8 °C, for longer period (up to 6 month) at -20 °C.

Repeated freezing and thawing should be avoided.

Serum

Collect blood by venipuncture (Monovette™ or Vacuette™ for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation according to manufacturer's instructions at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

Fasting specimens or pre-feed specimens for children (2 - 3 hours after last meal) are advised.

Haemolytic and especially lipemic samples should not be used for the assay.

Storage: up to 24 hours at 2 - 8 °C, for longer period (up to 6 month) at -20 °C.

Repeated freezing and thawing should be avoided.

Urine

Spontaneous urine or 24-hour urine, collected in a bottle containing 10 - 15 ml of 6 M HCl, can be used.

If 24-hour urine is used please record the total volume of the collected urine.

Storage: for longer periods (up to 6 month) at -20 °C.

Repeated freezing and thawing should be avoided. Avoid exposure to direct sunlight.

6. Test procedure

Allow all reagents and samples to reach room temperature and mix thoroughly by gentle inversion before use. Duplicate determinations are recommended. It is recommended to number the strips of the microwell plate before usage to avoid any mix-up.

The binding of the antisera and of the enzyme conjugate and the activity of the enzyme are temperature dependent, and the absorbance values may vary if a thermostat is not used. The higher the temperature, the higher the extinction values will be. Corresponding variations also apply to the incubation times. The optimal temperature during the Enzyme Immunoassay is between 20 - 25 °C.

In case of overflow, read the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to 405 nm

6.1 Preparation of reagents

Wash Buffer

Dilute the 20 ml Wash Buffer Concentrate with water (deionized, distilled, or ultra-pure) to a final volume of 1000 ml.

Storage: 1 month at 2 - 8 °C

Equalizing Reagent

Reconstitute the Equalizing Reagent with **12.5 ml** of **Assay Buffer**.

Reconstituted Equalizing Reagent which is not used immediately has to be stored in aliquots for max 1 month at -20 °C and may be thawed only once.

D-Reagent

The D-Reagent has a freezing point of 18.5 °C. To ensure that the D-Reagent is liquid when being used, it must be ensured that the D-Reagent has reached room temperature and forms a homogeneous, crystal-free solution.

Glutamate Microtiter Strips

In rare cases residues of the blocking and stabilizing reagent can be seen in the wells as small, white dots or lines. These residues do not influence the quality of the product.

6.2 Preparation of samples

The Glutamate ELISA is a flexible test system for various biological sample types and volumes. It is not possible to give a general advice how to prepare the samples. However, the following basics should help the researcher to adapt the protocol to his specific needs:

- **Urine samples** with creatinine >200 mg/dl should be diluted 1:3 [e.g. 100 µl urine + 200 µl water (deionized, distilled, or ultra-pure)] before starting the Extraction step. **The results of the diluted urine samples have to be corrected for the dilution factor.**
- **Serum/plasma samples** should always be pre-diluted 1:5 [e.g. 100 µl serum/ plasma + 400 µl water (deionized, distilled, or ultra-pure)]. Serum values of Glutamate are higher than for urine. The pre-dilution step makes sure that the sample is measured in the linear range of the standard curve. **The results have to be corrected for the dilution factor.**
- Avoid excess of acid: excess of acid might exceed the buffer capacity of the dilution buffer. A **pH of 5.0** during the extraction is mandatory.
- It is advisable to perform a **Proof of Principle** to determine the recovery of glutamate from the samples. Prepare a stock solution of glutamate. Add small amounts (to change the native sample matrix as less as possible) of the stock solutions to the sample matrix and check the recovery.
- The sample volume determines the sensitivity of this test. Determine the sample volume needed to determine glutamate in your sample by testing different amounts of sample volumes.
- If a sample volume < **100 µl** is used, water (deionized, distilled, or ultra-pure) has to be added to a **final volume of 100 µl** and this **prediluted sample** has to be used for the extraction procedure (please refer to point 6.3 of this protocol). This sample predilution has to be considered in the calculation of results (please refer to point 7 of this protocol).

If you need any support in establishing a protocol for your specific purposes, do not hesitate to contact the manufacturer directly!

6.3 Extraction

1.	Pipette 100 µl of the standards, controls and samples (serum 1:5 diluted) into the appropriate wells of the Extraction Plate .
2.	Add 100 µl of the Diluent to all wells. Cover plate with Adhesive Foil and shake for 10 min at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
3.	Use 25 µl for the subsequent derivatization!

6.4 Derivatization

1.	Pipette 25 µl of the extracted standards, controls and samples into the appropriate wells of the Reaction Plate .
2.	Pipette 10 µl of NaOH into all wells.
3.	Pipette 50 µl of the Equalizing Reagent into all wells.
4.	Pipette 10 µl of the D-Reagent into all wells.
5.	Cover plate with Adhesive Foil and shake for 2 h at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
6.	Pipette 75 µl of the Q-Buffer into all wells.
7.	Shake for 10 min at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
8.	Use 25 µl for the ELISA!

6.5 Glutamate ELISA

1.	Pipette 25 µl of the prepared standards, controls and samples into the appropriate wells of the Glutamate Microtiter Strips .
2.	Pipette 50 µl of the Glutamate Antiserum into all wells and mix shortly.
3.	Cover plate with Adhesive Foil and incubate for 15 - 20 h (overnight) at 2 - 8 °C . Alternatively incubate 2 h at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
4.	Remove the foil. Discard or aspirate the content of the wells. Wash the plate 3 x by adding 300 µl of Wash Buffer, discarding the content and blotting dry each time by tapping the inverted plate on absorbent material.
5.	Pipette 100 µl of the Enzyme Conjugate into all wells.
6.	Incubate for 30 min at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
7.	Discard or aspirate the contents of the wells and wash the plate 3 x by adding 300 µl of Wash Buffer, discarding the content and blotting dry each time by tapping the inverted plate on absorbent material.
8.	Pipette 100 µl of the Substrate into all wells and incubate for 20 - 30 min at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm). Avoid exposure to direct sunlight!
9.	Add 100 µl of the Stop Solution to each well and shake the microtiter plate to ensure a homogeneous distribution of the solution.
10.	Read the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to 450 nm (if available a reference wavelength between 620 nm and 650 nm is recommended).

7. Calculation of results

Measuring range	Glutamate	
	Urine (undiluted)	0.3 - 60 µg/ml

The standard curve is obtained by plotting the absorbance readings (calculate the mean absorbance) of the standards (linear, y-axis) against the corresponding standard concentrations (logarithmic, x-axis). Use non-linear regression for curve fitting (e.g. spline, 4- parameter, akima).

This assay is a competitive assay. This means: the OD-values are decreasing with increasing concentrations of the analyte. OD-values found below the standard curve correspond to high concentrations of the analyte in the sample and have to be reported as being positive.

Serum/plasma

The read concentrations of **plasma samples** have to be **multiplied by 5**.

Urine samples and controls

The concentrations of the samples and controls can be read directly from the standard curve.

Diluted urine samples (refer to 6.2) have to be **multiplied by 3**.

The total amount of Glutamate excreted in urine during 24 h is calculated as following:

$$\mu\text{g}/24\text{h} = \mu\text{g}/\text{ml} \times \text{ml}/24\text{h}$$

Conversion

$$\text{Glutamate } (\mu\text{g}/\text{ml}) \times 6.8 = \text{Glutamate } (\mu\text{mol}/\text{l})$$

Expected reference values

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own reference values.

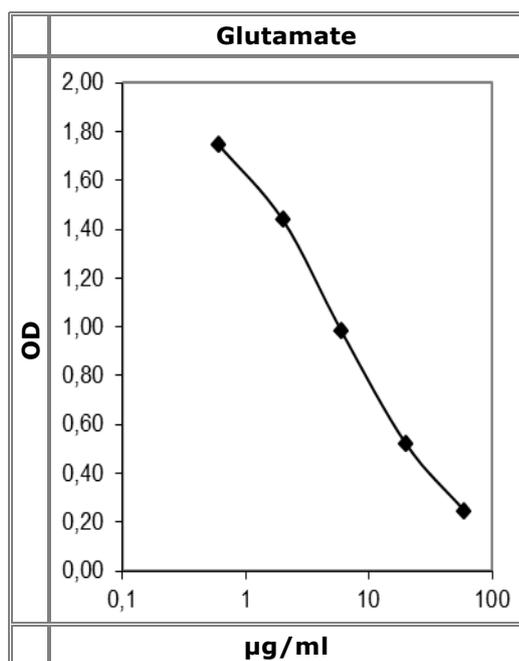
Spontaneous urine
5 - 100 µmol/g creatinine

7.1 Quality control

The confidence limits of the kit controls are indicated on the QC-Report.

7.2 Typical standard curve

▲ Example, do not use for calculation!



8. Assay characteristics

Analytical Sensitivity (Limit of Detection)	Glutamate
	0.3 µg/ml

Analytical Specificity (Cross Reactivity)	Substance	Cross Reactivity (%)
		Glutamate
	Glutamine	< 0.01
	Aspartate	0.09
	Glycine	< 0.01
	Alanine	< 0.01
	5-aminovaleric acid	< 0.01

Precision					
Intra-Assay			Inter-Assay		
Sample	Range	CV (%)	Sample	Range (µg/ml)	CV (%)
1 (n = 25)	6.9 ± 0.5	7.3	1 (n = 19)	0.8 ± 0.18	19
2 (n = 25)	16.0 ± 1.0	6.3	2 (n = 19)	9 ± 1.2	13

Linearity	Range	Serial dilution up to	Range (%)
	Glutamate (urine)	0.61 - 47 µg/ml	1:64

Recovery	Mean (%)	Range (%)	% Recovery after spiking
	Glutamate (urine)	98	

9. References/Literature

- (1) Pérez-Mato et al. Human recombinant glutamate oxaloacetate transaminase 1 (GOT1) supplemented with oxaloacetate induces a protective effect after cerebral ischemia. *Cell Death and Disease*, 5:e992 (2014)
- (2) Campos et al. Glutamate oxaloacetate transaminase: A new key in the dysregulation of glutamate in migraine patients. *Cephalalgia*, 33(14):1148–1154 (2013)
- (3) Yuan et al. Subsecond Absolute Quantitation of Amine Metabolites Using Isobaric Tags for Discovery of Pathway Activation in Mammalian Cells. *Analytical Chemistry*, 84(6): 2892-2899 (2012)

■ **For updated literature or any other information please contact your local supplier.**

■ **The liability of the manufacturer shall be limited to the replacement of defective products. The manufacturer takes no liability for any damages or expenses arising directly or indirectly from the use of this product.**

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Expiry date		Batch code		
	Consult instructions for use		Content		
	Caution		Catalogue number		For research use only!

1. Einleitung

1.1 Verwendungszweck und Testprinzip

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von L-Glutamat in Urin und verschiedenen biologischen Proben.

Im ersten Teil der Durchführung wird Glutamat extrahiert und derivatisiert und anschließend quantitativ im ELISA bestimmt.

Der sich anschließende kompetitive ELISA basiert auf dem Mikrotiterplattenformat. Das Antigen ist an eine feste Phase gebunden. Die Analytkonzentrationen der Standards, Kontrollen und Proben und die an der festen Phase gebundenen Analytkonzentrationen, konkurrieren um die vorhandenen Bindungsstellen der Antikörper. Wenn das System im Gleichgewicht ist, werden die freien Antigene und die freien Antigen-Antikörper-Komplexe durch Waschen entfernt. Der an der festen Phase gebundene Antigen-Antikörper-Komplex wird mit einem enzymmarkierten Antikörper bestimmt und mit einem Substrat durch eine Farbreaktion nachgewiesen. Die Reaktion wird bei 450 nm gemessen.

Die Konzentrationen in den Proben werden mit Hilfe einer Standardkurve ermittelt.

2. Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen

2.1 Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen

- (1) Dieses Kit ist nur für den gewerblichen Gebrauch bestimmt. Für eine erfolgreiche Anwendung dieses Kits benötigen die Anwender ein umfassendes Verständnis dieses Protokolls. Einzig die im Kit enthaltene Testanleitung ist gültig und bei der Durchführung des Assays zu verwenden. Für eine zuverlässige Leistung müssen die mitgelieferten Anweisungen genau und sorgfältig befolgt werden.
- (2) Dieser Assay wurde für die unter *Verwendungszweck* (siehe Kapitel 1) angegebene Probenart validiert. Jede nicht zugelassene Anwendung dieses Kits obliegt der Verantwortung des Anwenders und entbindet den Hersteller von jeglicher Haftung.
- (3) Die Grundsätze der Guten Laborpraxis (GLP) sind zu befolgen.
- (4) Bei Bedarf Laborkittel, geeignete Einweghandschuhe und Schutzbrille tragen, um die Exposition gegenüber potenziell gesundheitsgefährdenden Stoffen zu reduzieren.
- (5) Alle Reagenzien des Kits sowie die Proben sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig gemischt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben vermeiden.
- (6) Wenn die Verdünnung oder Rekonstitution mit Wasser erfolgen soll, hierfür deionisiertes, destilliertes oder hochreines Wasser verwenden.
- (7) Die Mikrotiterplatte verfügt über abbrechbare Streifen. Ungenutzte Kavitäten müssen bei 2 °C bis 8 °C mit Trockenmittelbeutel im verschlossenen Folienbeutel gelagert und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
- (8) Es ist sehr empfehlenswert, eine Doppelbestimmung der Proben durchzuführen, um mögliche Pipettierfehler erkennen zu können.
- (9) Sobald der Test begonnen wurde, sollten alle Schritte ohne Unterbrechung ausgeführt werden. Es muss dafür gesorgt werden, dass die erforderlichen Reagenzien, Materialien und Geräte zur vorgesehenen Zeit einsatzbereit sind.
- (10) Die Inkubationszeiten haben Einfluss auf die Ergebnisse. Alle Kavitäten sollten in der gleichen Reihenfolge und zeitlichen Abfolge behandelt werden.
- (11) Zur Vermeidung einer Kontamination der Reagenzien ist bei jeder Abgabe eines Reagenzes, einer Probe, eines Standards und einer Kontrolle eine neue Einwegpipettenspitze zu verwenden.
- (12) Bei jeder Testanwendung muss eine Standardkurve erstellt werden.
- (13) Bei jeder Testanwendung sollten Kontrollen mitgetestet werden, deren Werte innerhalb der bekannten Vertrauensgrenzen liegen müssen. Die gültigen Vertrauensgrenzen für die Kitkontrollen können dem QC-Report entnommen werden, der dem Kit beiliegt.
- (14) Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Chargenbezeichnungen nicht im selben Test verwenden. Reagenzien nach dem auf dem Kitetikett angegebenen Verfalldatum nicht mehr benutzen.
- (15) Kontakt mit der Stopplösung vermeiden, da sie 0,25 M H₂SO₄ enthält. Die Lösung kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen. Bei Berührung mit den Augen oder der Haut sofort mit Wasser aus- bzw. abspülen.
- (16) Das TMB-Substrat reizt die Haut und Schleimhäute. Bei möglichem Kontakt Augen mit reichlich Wasser und Haut mit Seife und reichlich Wasser aus- bzw. abspülen. Kontaminierte Gegenstände vor der erneuten Verwendung abspülen.
- (17) Für Informationen zu den im Kit enthaltenen gesundheitsgefährdenden Stoffen siehe Sicherheitsdatenblatt (SDS). Das Sicherheitsdatenblatt dieses Produkts ist direkt auf der Webseite des Herstellers abrufbar oder auf Anfrage erhältlich.
- (18) Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.

2.2 Grenzen des Tests

Jede unsachgemäße Behandlung der Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

2.2.1 Interferenzen

Serum/Plasma

Proben, welche ein Präzipitat oder Fibrinfäden enthalten oder die hämolytisch oder lipämisch sind, können zu ungenauen Ergebnissen führen.

Sammelurin

Probenvorbereitung beachten! Ist der Säuregehalt des 24 Stunden-Sammelurins zu hoch, führt dies zu falschen Ergebnissen der Urinproben.

2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente

Bislang sind uns keine Stoffe (Medikamente) bekannt, deren Einnahme die Bestimmung des Glutamat-Gehaltes in der Probe beeinflusst.

2.2.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

3. Lagerung und Haltbarkeit

Die ungeöffneten Reagenzien sind bei 2 - 8 °C bis zum Verfallsdatum aufzubewahren. Die Reagenzien dürfen nach Überschreiten des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden. Einmal geöffnet sind die Reagenzien 1 Monat stabil, wenn sie bei 2 - 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets mit Trockenmittelbeutel sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

4. Materialien

4.1 Reagenzien im Kit

BA D-0090	FOILS	Adhesive Foil - Gebrauchsfertig
Inhalt:	4 Klebefolien in einem wiederverschließbaren Beutel	
Volumen:	1 x 4 Folien	
BA D-0024	REAC-PLATE	Reaction Plate - Gebrauchsfertig
Inhalt:	1 x 96 Well Platte, leer in einem wiederverschließbaren Beutel	
BA E-2442	EXTRACT-PLATE 48	Extraction Plate - Gebrauchsfertig
Inhalt:	2 x 48 Well Platte, beschichtet mit Kationenaustauscher in einem wiederverschließbaren Beutel	
BA E-0030	WASH-CONC 50x	Wash Buffer Concentrate - 50x konzentriert
Inhalt:	Puffer mit einem nicht-ionischen Detergenz und physiologischem pH	
Volumen:	1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel helllila	
BA E-0040	CONJUGATE	Enzyme Conjugate - Gebrauchsfertig
Inhalt:	Ziege Anti-Kaninchen Immunglobulin konjugiert mit Peroxidase	
Volumen:	1 x 12 ml/ Fläschchen, Deckel rot	
BA E-0055	SUBSTRATE	Substrate - Gebrauchsfertig
Inhalt:	Chromogenes Substrat mit Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid	
Volumen:	1 x 12 ml/ Fläschchen schwarz, Deckel schwarz	
BA E-0080	STOP-SOLN	Stop Solution - Gebrauchsfertig
Inhalt:	0,25 M Schwefelsäure	
Volumen:	1 x 12 ml/ Fläschchen, Deckel hellgrau	
Mögliche Gefahren:		

H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

BA E-2431 **GLUT** **Glutamate Microtiter Strips** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: 1 x 96 Well (12x8) Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem widerverschließbaren Folienbeutel

BA E-2410 **AS GLUT** **Glutamate Antiserum** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: Kaninchen Anti- Glutamat Antikörper, blau gefärbt
 Volumen: 1 x 6 ml/Fläschchen, Deckel blau

BA E-2413 **ASSAY-BUFF** **Assay Buffer** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: Puffer mit alkalischem pH
 Volumen: 1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel gelb

BA E-2428 **EQUA-REAG** **Equalizing Reagent** - Lyophilisiert
 Inhalt: Lyophilisiertes Protein
 Volumen: 1 Fläschchen, Deckel braun

Standards und Controls - Gebrauchsfertig

Artikelnr.	Komponente	Deckelfarbe	Konzentration µg/ml	Konzentration µmol/l	Volumen/ Fläschchen
BA E-2401	STANDARD A	weiß	0	0	4 ml
BA E-2402	STANDARD B	hellgelb	0,6	4,08	4 ml
BA E-2403	STANDARD C	orange	2	13,6	4 ml
BA E-2404	STANDARD D	dunkelblau	6	40,8	4 ml
BA E-2405	STANDARD E	hellgrau	20	136	4 ml
BA E-2406	STANDARD F	schwarz	60	408	4 ml
BA E-2451	CONTROL 1	hellgrün	Die zu erwartenden Konzentrationen und		4 ml
BA E-2452	CONTROL 2	dunkelrot	Akzeptanzbereiche sind auf dem QC- Report angegeben		4 ml

Umrechnung: Glutamat (µg/ml) x 6,8 = Glutamat (µmol/l)

Inhalt: Saurer Puffer aufgestockt mit einer definierten Menge Glutamat

BA E-2446 **D-REAGENT** **D-Reagent** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: Crosslinker in Dimethylsulfoxid
 Volumen: 1 x 4 ml/Fläschchen, Deckel weiß

BA E-2458 **Q-BUFFER** **Q-Buffer** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: TRIS Puffer
 Volumen: 1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel weiß

BA E-2460 **DILUENT** **Diluent** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: Natriumacetat Puffer
 Volumen: 1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel dunkelgrün

BA E-2787 **NAOH** **NaOH** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: Verdünnte Natronlauge
 Volumen: 1 x 2 ml/Fläschchen, Deckel lila

Mögliche Gefahren:



H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
 H315 Verursacht Hautreizungen.
 H319 Verursacht schwere Augenreizung.

4.2 Nicht im Kit enthaltene aber zur Durchführung erforderliche Geräte und Reagenzien

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 10 – 100 µl; 12,5 ml
- Polystyrol-Röhrchen mit passendem Ständer
- Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten (manuell, halbautomatisch oder automatisch)
- Photometer zur Auswertung von Mikrotiterplatten mit 450 nm- und, wenn möglich, 620 - 650 nm-Filter
- Mikrotiterplattenschüttler (ca. 600 rpm mit Amplitude 3 mm)
- Vortex-Mischer
- Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)
- saugfähige Unterlage

5. Probenmaterial und Lagerung

Plasma

Das durch Venenpunktion entnommene Vollblut in einem für EDTA-Plasma vorgesehenen Blutentnahmeröhrchen (Plasma Monovette™ oder Vacuette®) sammeln und das Plasma direkt durch Zentrifugation (nach Angaben des Herstellers) von den übrigen Blutbestandteilen trennen.

Es wird dazu geraten, Blutproben im nüchternen Zustand - bei Kindern 2 -3 Stunden nach der letzten Mahlzeit - zu verwenden. Hämolytische und insbesondere lipämische Proben sollten nicht eingesetzt werden. Lagerung: bis zu 24 Stunden bei 2 - 8 °C, für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Serum

Blut durch Venenpunktion entnehmen (Serum Monovette™ oder Vacuette®), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation (nach Angabe des Herstellers) abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

Es wird dazu geraten, Blutproben im nüchternen Zustand - bei Kindern 2 -3 Stunden nach der letzten Mahlzeit - zu verwenden. Hämolytische und insbesondere lipämische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

Lagerung: bis zu 24 Stunden bei 2 - 8 °C, für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Urin

Es kann Spontanurin oder 24 Stunden-Sammelurin verwendet werden (im Sammelbehälter werden zur Stabilisierung des Sammelurins 10 - 15 ml 6 M HCl vorgelegt). Wird 24 Stunden-Sammelurin verwendet, ist es notwendig, das Volumen zu bestimmen und für die spätere Auswertung der Ergebnisse zu notieren.

Lagerung: für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden. Direktes Sonnenlicht sollte vermieden werden!

6. Testdurchführung

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig durchmischt werden. Die Durchführung von Doppelbestimmungen wird empfohlen. Um eventuelle Verwechslungen der Mikrotiterstreifen zu vermeiden, wird empfohlen, diese vor Verwendung zu nummerieren.

Die Reaktion des Antikörpers, Enzymkonjugats und die Aktivität des Enzyms sind temperaturabhängig und sollten durch ein Thermostat sichergestellt sein. Je höher die Temperatur ist, desto größer werden die Absorptionswerte. Entsprechende Abweichungen ergeben sich ebenfalls durch die Inkubationszeiten. Die optimale Temperatur während des Enzymimmunoassay ist zwischen 20 – 25°C.

Liegt die gemessene Absorption außerhalb des Messbereichs, so muss diese innerhalb von 10 Minuten nochmals bei 405 nm gemessen werden.

6.1 Vorbereitung der Reagenzien

Waschpuffer

20 ml **WASH-CONC 50X** mit Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) auf ein Endvolumen von 1000 ml verdünnen.

Lagerung: 1 Monat bei 2 – 8 °C

Ausgleichsreagenz

Den Inhalt eines Fläschchen **EQUA-REAG** (BA E-2428) mit 12,5 ml **ASSAY-BUFF** (BA E-2413) lösen. Rekonstituiertes Ausgleichsreagenz, welches nicht benötigt wird, sollte umgehend aliquotiert und max. 1 Monat bei -20 °C gelagert werden (nur einmal auftauen).

D-Reagent **D-REAGENT**

Das **D-REAGENT** hat einen Gefrierpunkt von 18,5 °C. Es muss sichergestellt sein, dass es vor der Verwendung Raumtemperatur angenommen hat und eine homogene, kristallfreie Lösung bildet.

Glutamate Microtiter Strips

Vereinzelte Rückstände der Blockier- und Stabilisierungslösung in den Wells zu sehen sein (kleine weiße Punkte oder Linien). Diese stellen keine Beeinträchtigung der Qualität des Produktes dar.

6.2 Probenvorbereitung

Der Glutamat ELISA ist ein flexibles Testsystem für verschiedene biologische Probentypen und Volumina. Es ist nicht möglich, eine pauschale Empfehlung zur Probenvorbereitung zu geben. Allerdings können die folgenden Grundlagen dazu beitragen, das Protokoll an die spezifischen Anforderungen anzupassen:

- **Urinproben** mit einem Kreatiningehalt >200 mg/dl sollten vor der Extraktion 1:3 verdünnt werden [z.B. 100 µl Urin + 200 µl Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-rein)]. **Die Ergebnisse der verdünnten Urinproben müssen um den Faktor der Verdünnung korrigiert werden.**
- **Serum-/ Plasmaproben** sollten immer 1:5 vorverdünnt werden [z.B. 100 µl Serum/ Plasma + 400 µl Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-rein)]. Die Serumwerte von Glutamat sind höher, als für Urine. Der Vorverdünnungsschritt stellt sicher, dass die Probe im linearen Bereich der Standardkurve gemessen wird. **Die Ergebnisse müssen um den Faktor der Verdünnung korrigiert werden.**
- Säureüberschuss vermeiden: Ein Säureüberschuss könnte die Pufferleistung des Verdünnungspuffers überschreiten. Ein **pH 5,0** während der Extraktion ist zwingend notwendig.
- Es ist ratsam, ein **Proof of Principle** zu erstellen, um die Wiederfindung von Glutamat in den Proben bestimmen zu können. Dazu eine Glutamat-Stocklösung herstellen. Von der hergestellten Stocklösung kleine Mengen (um die native Probenmatrix so wenig wie möglich zu verändern) zur Probenmatrix hinzugeben und die Wiederfindung prüfen.
- Die Probenvolumina bestimmen die Sensitivität des Tests. Zur Bestimmung von Glutamat in der Probe, muss vorher das Probenvolumen durch Austestung verschiedener Mengen an Probenvolumina bestimmt werden.
- Wird ein Probenvolumen < **100 µl** verwendet, muss diese Probe mit Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) bis zu einem **Endvolumen von 100 µl** verdünnt werden. Diese **vorverdünnte Probe** wird in der Extraktion (siehe Punkt 6.3) verwendet. Diese Vorverdünnung der Probe muss bei der Berechnung der Ergebnisse berücksichtigt werden (siehe Punkt 7).

Falls Sie Unterstützung bei der Erstellung eines Protokolls für Ihre spezifischen Zwecke benötigen, wenden Sie sich vertrauensvoll direkt an den Hersteller!

6.3 Extraktion

1. Jeweils 100 µl der Standards, Kontrollen und Proben (Serum 1:5 verdünnt) in die entsprechenden Kavitäten der EXTRACT-PLATE 48 pipettieren.
2. Jeweils 100 µl DILUENT in alle Kavitäten pipettieren. Platte mit FOIL abdecken und 10 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
3. Jeweils 25 µl für die Derivatisierung verwenden!

6.4 Derivatisierung

1. Jeweils 25 µl der extrahierten Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Kavitäten der REAC-PLATE pipettieren.
2. Jeweils 10 µl NAOH in alle Kavitäten pipettieren.
3. Jeweils 50 µl Ausgleichsreagenz (siehe 6.1) in alle Kavitäten pipettieren.
4. Jeweils 10 µl D-REAGENT in alle Kavitäten pipettieren.
5. Platte mit FOIL abdecken und 2 Stunden bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
6. Jeweils 75 µl Q-BUFFER in alle Kavitäten pipettieren.
7. Für 10 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
8. Jeweils 25 µl für den ELISA verwenden!

6.5 Glutamat ELISA

1.	25 µl der derivatisierten Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Kavitäten der GLUT pipettieren.
2.	50 µl AS GLUT in alle Kavitäten hinzugeben und kurz schütteln.
3.	Platte mit FOIL abdecken und für 15 - 20 Stunden (über Nacht) bei 2 - 8 °C inkubieren. Alternativ für 2 Stunden bei RT (20 - 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
4.	FOIL entfernen und den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten 3 mal gründlich mit 300 µl Waschpuffer waschen, ausleeren und die Restflüssigkeit jedes Mal durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
5.	100 µl CONJUGATE in alle Kavitäten pipettieren.
6.	Für 30 Min bei RT (20 - 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
7.	Den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten 3 mal gründlich mit 300 µl Waschpuffer waschen, ausleeren und die Restflüssigkeit jedes Mal durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
8.	100 µl SUBSTRATE in alle Kavitäten pipettieren und für 20 - 30 Min bei RT (20 - 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren. Direktes Sonnenlicht vermeiden!
9.	100 µl STOP-SOLN in alle Kavitäten pipettieren und die Mikrotiterplatte kurz schütteln.
10.	Absorption mit einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 450 nm (falls vorhanden gegen eine Referenzwellenlänge von 620 - 650 nm) innerhalb von 10 Minuten messen .

7. Berechnung der Ergebnisse

Messbereich	Glutamat	
	Urin (unverdünnt)	0,3 - 60 µg/ml

Eine Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekanntnen Proben ermittelt werden kann, wird durch Auftragen der gemessenen Standard-Extinktionen (linearer Maßstab auf der y-Achse) gegen die entsprechenden Standardkonzentrationen (logarithmischer Maßstab auf der x-Achse) erstellt.

Für die Auswertung wird eine nicht-lineare Regression (z.B.: spline, 4- parameter, akima) verwendet.

Dieser Assay ist ein kompetitiver Assay. Das bedeutet, dass die OD-Werte mit zunehmender Konzentration des Analyten sinken. OD Signale, die unterhalb der Standardkurve liegen, entsprechen einer sehr hohen Konzentration des Analyten in der gemessenen Probe und müssen als positiv gewertet werden.

Serum/ Plasmaproben

Die Konzentrationen der **Plasmaproben** müssen mit dem **Faktor 5 multipliziert** werden.

Urinproben und Kontrollen:

Die Konzentrationen der Proben und Kontrollen können direkt von der Standardkurve abgelesen werden.

Verdünnte Urinproben (siehe 6.2) müssen mit dem **Faktor 3 multipliziert** werden.

Die Tagesmenge Glutamat, die innerhalb von 24 Stunden im Urin ausgeschieden wird, errechnet sich wie folgt:

$$\mu\text{g}/24 \text{ Stunden} = \mu\text{g}/\text{ml} \times \text{ml}/24 \text{ Stunden}$$

Umrechnung

$$\text{Glutamat } (\mu\text{g}/\text{ml}) \times 6,8 = \text{Glutamat } (\mu\text{mol}/\text{l})$$

Erwartete Referenzbereiche

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwerte ermittelt.

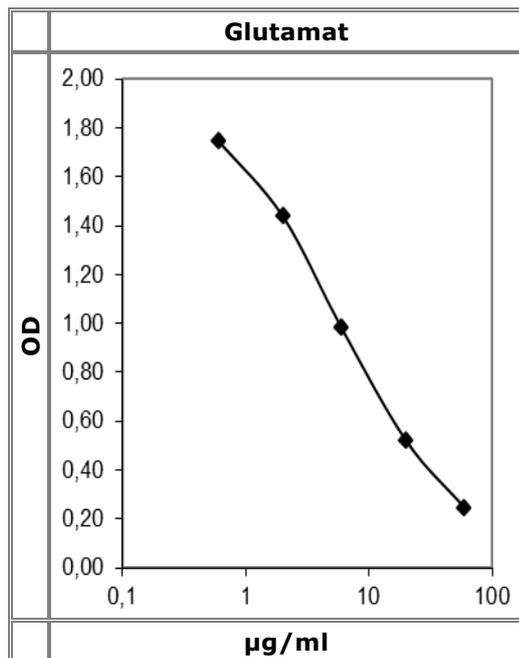
Spontanurin
5 - 100 µmol/g Kreatinin

7.1 Qualitätskontrolle

Die Vertrauensbereiche der Kitkontrollen sind im QC-Report aufgeführt.

7.2 Typische Standardkurve

Beispiel: bitte nicht für die Auswertung verwenden!



8. Testcharakteristika

Analytische Sensitivität (Limit of Detection)	Glutamat
	0,3 µg/ml

Analytische Spezifität (Kreuzreaktion)	Substanz	Kreuzreaktion (%)
		Glutamat
	Glutamat	100
	Glutamin	< 0,01
	Aspartat	0,09
	Glycin	< 0,01
	Alanin	< 0,01
	5-Amino-Pentansäure	< 0,01

Präzision					
Intra-Assay			Inter-Assay		
Probe	Bereich (µg/ml)	CV (%)	Probe	Bereich (µg/ml)	CV (%)
1 (n = 25)	6,9 ± 0,5	7,3	1 (n = 19)	0,8 ± 0,18	19
2 (n = 25)	16,0 ± 1,0	6,3	2 (n = 19)	9 ± 1,2	13

Linearität		Bereich	Serielle Verdünnung bis:	Bereich (%)
		Glutamat (Urin)	0,61 – 47 µg/ml	1:64

Wiederfindung		Mittelwert (%)	Bereich (%)	% Wiederfindung nach Aufstockung
		Glutamat (Urin)	98	83 - 105

9. Referenzen/Literatur

- (1) Pérez-Mato et al. Human recombinant glutamate oxaloacetate transaminase 1 (GOT1) supplemented with oxaloacetate induces a protective effect after cerebral ischemia. *Cell Death and Disease*, 5:e992 (2014)
- (2) Campos et al. Glutamate oxaloacetate transaminase: A new key in the dysregulation of glutamate in migraine patients. *Cephalalgia*, 33(14):1148–1154 (2013)
- (3) Yuan et al. Subsecond Absolute Quantitation of Amine Metabolites Using Isobaric Tags for Discovery of Pathway Activation in Mammalian Cells. *Analytical Chemistry*, 84(6): 2892-2899 (2012)

■ **Aktuelle Literatur oder weitere Informationen zum Test werden Ihnen auf Anforderung von Ihrem Anbieter gerne zu Verfügung gestellt.**

■ **Die Haftung des Herstellers ist auf den Ersatz defekter Produkte begrenzt. Der Hersteller übernimmt keine Haftung für Schäden, die direkt oder indirekt aus der Nutzung des Produktes entstehen.**

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis	LOT	Chargennummer		
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen	CONT	Inhalt		
	Achtung	REF	Katalog-Nummer	RUO	Nur für Forschungszwecke