



Instructions for use

Glutamate ELISA

1. Introduction

1.1 Intended use and principle of the test

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of L-glutamate in urine, to evaluate L-glutamate homeostasis.

The determination of L-glutamate in urine is helpful for the determination of neurostress.

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.

1.2 Clinical application

Glutamate, also known as glutamic acid, is one of the most important excitatory neurotransmitter in the central nervous system (CNS). It is released presynaptically and it binds postsynaptically to specific receptors for glutamate. The enzyme glutamic acid decarboxylase is able to convert L-glutamate in the CNS by decarboxylation to γ -aminobutyric acid (GABA), which acts as an inhibitory neurotransmitter.

Many publications postulate, that the determination of L-glutamate in urine is helpful for the determination of neurostress. The collective term „neurostress“ refers to many physical and psychological complaints caused due to our modern way of life, unfavourable environmental conditions, poor diet, medications, occupational and social stress, sleep deprivation, overstimulation or genetic predisposition. The resulting symptoms are burnout, depression, insomnia, chronic fatigue syndrome, fibromyalgia, multiple chemical sensitivity and other chronic pathologies. Furthermore, many publications describe an impaired or dysregulated glutamic acid balance in relation to previously listed symptoms. Based on this many laboratories offer the determination of specific neurostress profiles including, among others, the determination of glutamate. In this case, glutamate is detected primarily in the second morning urine by several methods. To generate a profound neurostress profile, also other analytes (serotonin, norepinephrine, dopamine, epinephrine, melatonin, DHEA and cortisol) should be determined.

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 0.25M 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.
- (19) The expected reference values reported in this test instruction are only indicative. It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals.
- (20) In case of any severe damage to the test kit or components, LDN has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations

2.2 Limitations

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

2.2.1 Interfering substances

Urine

Please note the sample preparation stabilization of the urine sample! It cannot be excluded that high acid concentrations lead to incorrect results. Up to 20 µl 6N HCl per 1 ml urine no influence on the results was observed.

2.2.2 Drug interferences

There are no known substances (drugs, food) 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.
- 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, brown cap

Hazards identification: 

H317 May cause an allergic skin reaction.

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
- 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

Urine

Spontaneous urine (second morning urine) stabilized with 10 µl 6N HCl per 1 ml of urine sample can be used.

Storage: up to 6 hours (18 – 25 °C); up to 14 days (2 – 8 °C); up to 6 months (<-15 °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.

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

Extraction

1.	Pipette 100 µl of the standards, controls and urine samples 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 !

Derivatization

1.	Pipette 25 µl of the extracted standards, controls and urine 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 !

6.3 Glutamate ELISA

1.	Pipette 25 µl of the prepared standards, controls and urine 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 .
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	0.26 – 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.*

Urine samples and controls

The concentrations of the samples and controls can be read directly from the standard curve. Samples found with concentrations higher than the highest standard (Standard F) should be diluted accordingly with water (deionized, distilled, or ultra-pure) and have to be re-assayed.

Conversion

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

Expected reference values

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

Spontaneous urine
1034 - 7726 $\mu\text{g/g}$ creatinine
7 - 52.5 $\mu\text{mol/g}$ creatinine
0.8 - 5.9 mmol/mol creatinine

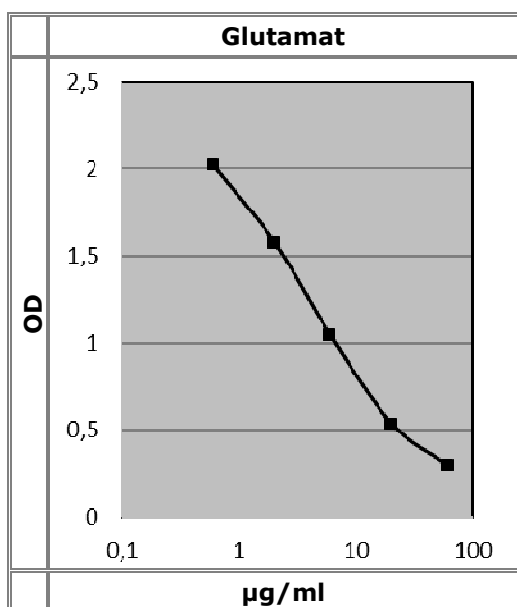
7.1 Quality control

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	Glutamate
Limit of Blank (LOB)	0.11 $\mu\text{g/ml}$
Limit of Detection (LOD)	0.17 $\mu\text{g/ml}$
Limit of Quantification (LOQ)	0.26 $\mu\text{g/ml}$

Analytical Specificity (Cross Reactivity)	Substance	Cross Reactivity (%)
		Glutamate
	L-Glutamine	< 0.4
	Glycine	< 0.4
	β-Alanine	< 0.4
	L-Alanine	< 0.4
	L-Aspartic Acid	< 0.4
	GABA	< 0.4
	5-Amino-n-valeric Acid	< 0.4

Precision							
Intra-Assay				Inter-Assay			
Sample	n	Mean ± SD (µg/ml)	CV (%)	Sample	n	Mean ± SD (µg/ml)	CV (%)
1	10	0.8 ± 0.1	10.8	1	13	1.7 ± 0.24	14.3
2	10	1.3 ± 0.1	8.7	2	14	5.0 ± 0.57	11.4
3	10	2.2 ± 0.1	6.3	3	14	10.6 ± 0.73	6.9
4	10	4.8 ± 0.2	4.0	4	13	3.0 ± 0.43	14.2
5	10	12.5 ± 0.6	4.6	5	14	5.6 ± 0.71	12.5
6	10	39.7 ± 2.2	5.6	6	14	10.0 ± 0.87	8.7

Linearity		Serial dilution up to	Range (%)	Mean (%)
	Urine	1:64	94 - 113	105

Recovery		Range (µg/ml)	Range (%)	Mean (%)
	Urine	1.25 - 41.0	97 - 108	102

9. References/Literature

- (1) Bieger, W.P., NeuroStress Guide. 2011.
- (2) Bustillo, J.R., Use of proton magnetic resonance spectroscopy in the treatment of psychiatric disorders: a critical update. Dialogues Clin Neurosci, 2013. 15(3): p. 329-37.
- (3) Duman, R.S., G. Sanacora, and J.H. Krystal, Altered Connectivity in Depression: GABA and Glutamate Neurotransmitter Deficits and Reversal by Novel Treatments. Neuron, 2019. 102(1): p. 75-90.
- (4) Femenia, T., et al., Dysfunctional hippocampal activity affects emotion and cognition in mood disorders. Brain Res, 2012. 1476: p. 58-70.
- (5) Flasnoecker, M., Reise aus dem Stress - Körper, Geist und Psyche stärken. 2015: W. Zuckschwerdt Verlag GmbH.
- (6) Frisardi, V., F. Panza, and A.A. Farooqui, Late-life depression and Alzheimer's disease: the glutamatergic system inside of this mirror relationship. Brain Res Rev, 2011. 67(1-2): p. 344-55.
- (7) Gao, S.F. and A.M. Bao, Corticotropin-releasing hormone, glutamate, and gamma-aminobutyric acid in depression. Neuroscientist, 2011. 17(1): p. 124-44.
- (8) Harris, R.E. and D.J. Clauw, Imaging central neurochemical alterations in chronic pain with proton magnetic resonance spectroscopy. Neurosci Lett, 2012. 520(2): p. 192-6.
- (9) Kendell, S.F., J.H. Krystal, and G. Sanacora, GABA and glutamate systems as therapeutic targets in depression and mood disorders. Expert Opin Ther Targets, 2005. 9(1): p. 153-68.
- (10) Krystal, J.H., et al., Glutamate and GABA systems as targets for novel antidepressant and mood-stabilizing treatments. Mol Psychiatry, 2002. 7 Suppl 1: p. S71-80.
- (11) Lener, M.S., et al., Glutamate and Gamma-Aminobutyric Acid Systems in the Pathophysiology of Major Depression and Antidepressant Response to Ketamine. Biol Psychiatry, 2017. 81(10): p. 886-897.
- (12) Sanacora, G., G. Treccani, and M. Popoli, Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. Neuropharmacology, 2012. 62(1): p. 63-77.
- (13) Strienz, J., Nebennierenunterfunktion - Stress stört die Hormonbalance. 3 ed. 2019: W. Zuckschwerdtverlag München.

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

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Expiry date		Batch code		For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use		Content		CE labelled
	Caution		Catalogue number		

1. Einleitung

1.1 Verwendungszweck und Testprinzip

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von L-Glutamat im Urin, um das Glutamat-Gleichgewicht zu beurteilen.

Die Bestimmung von L-Glutamat in Urin hilft u.a. bei der Beurteilung von Neurostress.

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.

1.2 Klinische Anwendung

Glutamat, auch Glutaminsäure genannt, ist einer der wichtigsten erregenden Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (ZNS). Er wird präsynaptisch freigesetzt und bindet postsynaptisch an spezifische Glutamat-Rezeptoren. Im ZNS kann L-Glutaminsäure durch das Enzym L-Glutaminsäuredecarboxylase zu γ -Aminobuttersäure (GABA) decarboxyliert werden, welches als Neurotransmitter an inhibitorischen Synapsen eingesetzt wird.

Viele Publikationen postulieren, dass die Bestimmung von Glutamat u.a. bei der Beurteilung von Neurostress hilft. Neurostress ist ein Sammelbegriff für eine Vielzahl körperlicher und psychischer Beschwerden, welche durch unsere moderne Lebensweise, ungünstige Umweltbedingungen, falsche Ernährung, Medikamente, beruflichen und sozialen Stress, Schlafmangel, Reizüberflutung oder auch genetische Veranlagung verursacht werden. Zu den ausgelösten Beschwerden zählen Burn-Out, Depressionen, Insomnie (Schlafstörungen), Chronic Fatigue Syndrome (CFS), Fibromyalgie (FM), MCS (Multiple Chemikaliensensitivität) und andere chronische Krankheitsbilder. Darüber hinaus berichten viele Veröffentlichungen von einem gestörten bzw. veränderten oder dysregulierten Glutamathaushalt bei unterschiedlichen Beschwerden. Aus diesem Grund bieten viele Labore die Bestimmung von Neurostress-Profilen an, in denen u.a. Glutamatlevel bestimmt werden. In speziell diesem Fall wird Glutamat hauptsächlich über den zweiten Morgenurin durch unterschiedliche Methoden nachgewiesen. Allerdings sollten neben der Bestimmung von Glutamat weitere Analyten (wie Serotonin, Noradrenalin, Dopamin und evtl. Adrenalin, Melatonin, DHEA und Cortisol) bestimmt werden, um ein fundiertes Neurostressprofil erstellen zu können.

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 0,25M 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 der Kits sind als gesundheitsgefährdende Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.
- (19) Die in dieser Testanleitung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwertintervalle erstellt.
- (20) Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss LDN in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

2.2 Grenzen des Tests

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

2.2.1 Interferenzen

Spontanurin

Probenvorbereitung Stabilisierung der Urin Probe genau beachten! Es ist nicht auszuschließen, dass ein zu hoher Säuregehalt zu falschen Ergebnissen führen kann. Bis zu 20 µl 6N HCl pro 1 ml Urin wurde kein Einfluss auf die Ergebnisse beobachtet.

2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente

Es gibt keine bekannten Substanzen (Medikamente, Nahrung), die bei Aufnahme die Messung der Glutamatlevel in der Probe beeinflussen.

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: 0,25M Schwefelsäure
 Volumen: 1 x 12 ml/ Fläschchen, Deckel hellgrau
 Mögliche Gefahren: 
 H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
- BA E-2431** GLUT **Glutamate Microtiter Strips** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: 1 x 96 Well (12x8) Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem wiederverschließbaren 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	<u>STANDARD</u> A	weiß	0	0	4 ml
BA E-2402	<u>STANDARD</u> B	hellgelb	0,6	4,08	4 ml
BA E-2403	<u>STANDARD</u> C	orange	2	13,6	4 ml
BA E-2404	<u>STANDARD</u> D	dunkelblau	6	40,8	4 ml
BA E-2405	<u>STANDARD</u> E	hellgrau	20	136	4 ml
BA E-2406	<u>STANDARD</u> F	schwarz	60	408	4 ml
BA E-2451	<u>CONTROL</u> 1	hellgrün	Die zu erwartenden Konzentrationen und Akzeptanzbereiche sind auf dem QC-Report angegeben		4 ml
BA E-2452	<u>CONTROL</u> 2	dunkelrot			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 braun

Mögliche
Gefahren:



H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

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
- 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

Urin

Es kann Spontanurin (2. Morgenurin) verwendet werden, stabilisiert mit 10 µl 6N HCl auf 1 ml Urin.

Lagerung: Bis zu 6 Stunden (18 – 25 °C); bis zu 14 Tagen (2 – 8 °C); bis zu 6 Monaten (<-15 °C)

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sowie 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.

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 können 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

Extraktion

1.	Jeweils 100 µl der Standards, Kontrollen und Urin Proben 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!

Derivatisierung

1.	Jeweils 25 µl der extrahierten Standards, Kontrollen und Urin 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!

6.3 Glutamat ELISA

1.	25 µl der derivatisierten Standards, Kontrollen und Urin 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.
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	0,26 – 60 µg/ml

Eine Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekannten 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.*

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

Proben, deren Konzentrationen oberhalb des höchsten Standards F gefunden werden, müssen entsprechend mit Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) verdünnt und nochmals bestimmt werden.

Umrechnung

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

Erwartete Referenzbereiche

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

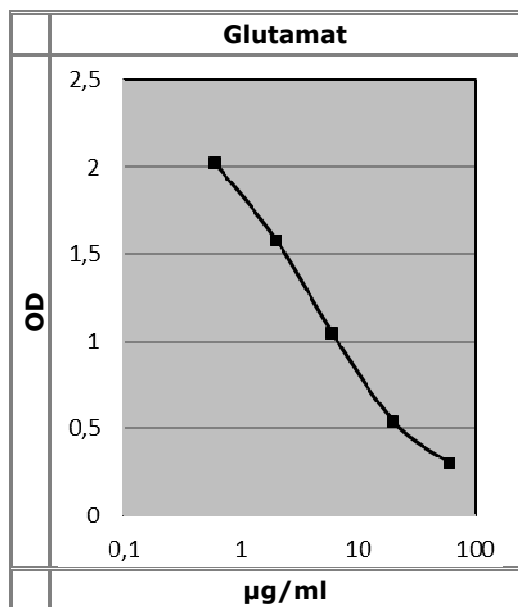
Spontanurin
1034 - 7726 µg/g Kreatinin
7 - 52,5 µmol/g Kreatinin
0,8 - 5,9 mmol/mol Kreatinin

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	Glutamat
Limit of Blank (LOB)	0,11 µg/ml
Limit of Detection (LOD)	0,17 µg/ml
Limit of Quantification (LOQ)	0,26 µg/ml

Analytische Spezifität (Kreuzreaktionen)	Substanz	Kreuzreaktion (%)
		Glutamat
	L-Glutamin	< 0,4
	Glycin	< 0,4
	β-Alanin	< 0,4
	L-Alanin	< 0,4
	L-Aspartic Acid	< 0,4
	GABA	< 0,4
	5-Amino-n-valeric Acid	< 0,4

Präzision							
Intra-Assay				Inter-Assay			
Probe	n	Mittelwert ± SD (µg/ml)	CV (%)	Probe	n	Mittelwert ± SD (µg/ml)	CV (%)
1	10	0,8 ± 0,1	10,8	1	13	1,7 ± 0,24	14,3
2	10	1,3 ± 0,1	8,7	2	14	5,0 ± 0,57	11,4
3	10	2,2 ± 0,1	6,3	3	14	10,6 ± 0,73	6,9
4	10	4,8 ± 0,2	4,0	4	13	3,0 ± 0,43	14,2
5	10	12,5 ± 0,6	4,6	5	14	5,6 ± 0,71	12,5
6	10	39,7 ± 2,2	5,6	6	14	10,0 ± 0,87	8,7

Linearität		Serielle Verdünnung	Bereich (%)	Mittelwert (%)
	Urin	1:64	94 - 113	105

Wiederfindung		Bereich (µg/ml)	Bereich (%)	Mittelwert (%)
	Urin	1,25 - 41,0	97 - 108	102

9. Referenzen/Literatur

- (1) Bieger, W.P., NeuroStress Guide. 2011.
- (2) Bustillo, J.R., Use of proton magnetic resonance spectroscopy in the treatment of psychiatric disorders: a critical update. Dialogues Clin Neurosci, 2013. 15(3): p. 329-37.
- (3) Duman, R.S., G. Sanacora, and J.H. Krystal, Altered Connectivity in Depression: GABA and Glutamate Neurotransmitter Deficits and Reversal by Novel Treatments. Neuron, 2019. 102(1): p. 75-90.
- (4) Femenia, T., et al., Dysfunctional hippocampal activity affects emotion and cognition in mood disorders. Brain Res, 2012. 1476: p. 58-70.
- (5) Flasnoecker, M., Reise aus dem Stress - Körper, Geist und Psyche stärken. 2015: W. Zuckschwerdt Verlag GmbH.
- (6) Frisardi, V., F. Panza, and A.A. Farooqui, Late-life depression and Alzheimer's disease: the glutamatergic system inside of this mirror relationship. Brain Res Rev, 2011. 67(1-2): p. 344-55.
- (7) Gao, S.F. and A.M. Bao, Corticotropin-releasing hormone, glutamate, and gamma-aminobutyric acid in depression. Neuroscientist, 2011. 17(1): p. 124-44.
- (8) Harris, R.E. and D.J. Clauw, Imaging central neurochemical alterations in chronic pain with proton magnetic resonance spectroscopy. Neurosci Lett, 2012. 520(2): p. 192-6.
- (9) Kendell, S.F., J.H. Krystal, and G. Sanacora, GABA and glutamate systems as therapeutic targets in depression and mood disorders. Expert Opin Ther Targets, 2005. 9(1): p. 153-68.
- (10) Krystal, J.H., et al., Glutamate and GABA systems as targets for novel antidepressant and mood-stabilizing treatments. Mol Psychiatry, 2002. 7 Suppl 1: p. S71-80.
- (11) Lener, M.S., et al., Glutamate and Gamma-Aminobutyric Acid Systems in the Pathophysiology of Major Depression and Antidepressant Response to Ketamine. Biol Psychiatry, 2017. 81(10): p. 886-897.
- (12) Sanacora, G., G. Treccani, and M. Popoli, Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. Neuropharmacology, 2012. 62(1): p. 63-77.
- (13) Strienz, J., Nebennierenunterfunktion - Stress stört die Hormonbalance. 3. ed. 2019: W. Zuckschwerdtverlag München.

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

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Tests
	Verwendbar bis		Chargennummer		In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen		Inhalt		CE gekennzeichnet
	Achtung		Katalog-Nummer		