

Tryptophan ELISA Kit

*Zur Bestimmung von Tryptophan in humanem EDTA-Plasma,
Serum und Urin*

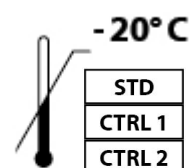
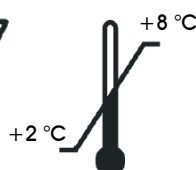
*For the determination of Tryptophan in human EDTA plasma,
serum and urine*

Nur zu Forschungszwecken / For research use only

Gültig ab / Valid from 05.12.2012



K 7730



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

Inhaltsverzeichnis / table of contents	Seite / page
1. VERWENDUNGSZWECK	4
2. EINLEITUNG	4
3. TESTPRINZIP	5
4. INHALT DER TESTPACKUNG	6
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	7
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	7
7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	9
8. PROBENVORBEREITUNG	9
9. TESTDURCHFÜHRUNG	10
<i>PIPETTIERSCHEMA PROBENVORBEREITUNG</i>	<i>10</i>
<i>PIPETTIERSCHEMA TESTDURCHFÜHRUNG</i>	<i>11</i>
10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	13
<i>ERWARTETE ERGEBNISSE</i>	<i>15</i>
11. TESTCHARAKTERISTIKA	15
<i>KREUZREAKTION</i>	<i>15</i>
<i>PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT</i>	<i>15</i>
<i>SENSITIVITÄT</i>	<i>16</i>
<i>WIEDERFINDUNG</i>	<i>17</i>
<i>LINEARITÄT</i>	<i>17</i>
<i>KORRELATION MIT HPLC-MS</i>	<i>18</i>
12. EINSCHRÄNKUNGEN	18
13. LITERATUR	18
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	19

1. INTENDED USE	22
2. INTRODUCTION	22
3. PRINCIPLE OF THE TEST	23
4. MATERIAL SUPPLIED	24
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	25
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	25
7. PRECAUTIONS	26
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	27
9. ASSAY PROCEDURE	27
<i>SAMPLE PREPARATION PROCEDURE</i>	27
<i>TEST PROCEDURE</i>	28
10. EVALUATION OF RESULTS	30
<i>EXPECTED VALUES</i>	31
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	32
<i>CROSS REACTIVITY</i>	32
<i>PRECISION AND REPRODUCIBILITY</i>	32
<i>SENSITIVITY</i>	32
<i>RECOVERY</i>	33
<i>LINEARITY</i>	33
<i>CORRELATION WITH HPLC-MS</i>	34
12. LIMITATIONS	34
13. REFERENCES	34
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	35

1. VERWENDUNGSZWECK

Dieser ELISA Test ist für die Bestimmung von Tryptophan in EDTA-Plasma, Serum und Urin geeignet. Nur zu Forschungszwecken.

2. EINLEITUNG

Tryptophan ist eine essentielle Aminosäure. Sie wird vom menschlichen Körper nicht gebildet und muss mit der Nahrung zugeführt werden. Eine wesentliche Rolle spielt das Tryptophan bei der Serotoninsynthese. Es ist die einzige Substanz aus der Serotonin synthetisiert werden kann. (siehe Abbildung 1).

Serotonin selbst wird an den Fortsätzen eines weit ausgebreiteten Transmittersystems freigesetzt, das global-modulatorische Wirkungen besitzt und dessen Aktivität sich deshalb in unterschiedlichen Lebensbereichen auswirkt. Diese Aktivität ist nicht zuletzt auch auf den aktuellen Spiegel von Tryptophan zurückzuführen. Bei manchen Krankheitsbildern wird ein Tryptophanmangel ermittelt, der in einigen Fällen die Aktivierung des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) als Ursache hat. Die IDO Aktivierung bewirkt, dass Tryptophan in den Kynureninweg eingeschleust und abgebaut wird (siehe Abbildung 1).

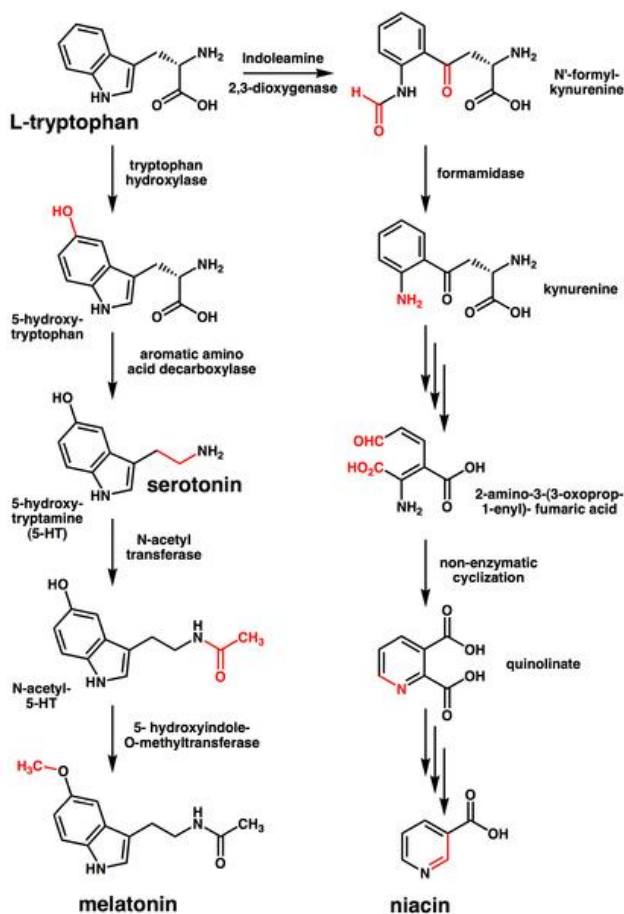


Abbildung 1: Synthese von Serotonin und Melatonin aus Tryptophan (links) und Einschleusung des Tryptophans in den Kynurenin-Weg über das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (rechts)

Kommt es hierdurch zu einer Absenkung des Tryptophans im Plasma, so steht dieses nicht mehr der Serotonin- und im Folgenden auch nicht der Melatoninsynthese zur Verfügung. Die Resultate sind Stimmungsschwankungen oder affektive Störungen, Aggressivität, Schlafstörungen, Essstörungen oder Depressionen.

In den letzten Jahren wurden zunehmend Krankheitsbilder bekannt, bei denen aufgrund der Aktivierung der IDO oder aus anderen Gründen der Tryptophanspiegel signifikant absinkt oder ein ungünstiges Tryptophan Kynurenin-Verhältnis besteht. Im ersten Fall geht der Mangel an Tryptophan mit der Erhöhung von Entzündungsmarkern einher. Einige Indikationen sollen nachfolgend genannt sein:

- Bei **Reizdarm** aktiviert Interferon-Gamma das Enzym IDO, wodurch es zu Tryptophanmangel kommt
- Bei **adipösen Menschen** sind ebenfalls inflammatorische Marker erhöht, die eine chronische Immunaktivierung anzeigen. Auch hier ist IDO aktiviert, es sind niedrige Tryptophan-Plasmawerte zu verzeichnen
- Bei **Stress** wird die IDO ebenfalls aktiviert und begünstigt so den Tryptophanabbau über den Kynurenin-Weg

Darüber hinaus wird bei gastrointestinalen Störungen wie **Fructose-unverträglichkeit**, als Folge der Resorptionsstörungen in Dick- und Dünndarm, Tryptophan nur mangelhaft aufgenommen.

Bei diesen Krankheitsbildern sind Stimmungsschwankungen, Essstörungen, Schlafstörungen oder Depressionen bekannt.

Durch die Gabe von Tryptophan könnten diese Krankheitssymptome gemildert werden. Eine Tryptophangabe macht jedoch nur bei Kenntnis des Spiegels Sinn. Mit dem vorliegenden Test lässt sich dieser elegant bestimmen.

3. TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays. Zur Vorbereitung wird die zu untersuchende Probe mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen Tryptophan versetzt. Anschließend wird die derivatisierte Probe zusammen mit einem polyklonalen Tryptophan-Antiserum in einer mit Tryptophan-Derivat (Tracer) beschichteten ELISA-Platte inkubiert. Während der Inkubation kompetitiert das Zielantigen in der Probe mit dem an die Platte gebundenen Tracer um die Bindung der polyklonalen Antikörper. Hierbei verdrängt das Zielantigen in der Probe den Antikörper aus der Bindung an den Tracer. Daher ist die Konzentration des an den Tracer

gebundenen Antikörpers umgekehrt proportional zu der Konzentration des Zielantigens in der Probe.

Beim zweiten Inkubationsschritt wird ein Peroxidase-markierter Sekundärantikörper zugegeben, der an die polyklonalen Anti-Tryptophan-Antikörper bindet. Nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Komponenten wird das Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration des gemessenen Analyten, d.h. mit steigender Tryptophan-Konzentration in der Probe reduziert sich die Konzentration der an den Tracer gebundenen Antikörper und das Signal nimmt ab. Parallel dazu wird eine Standardkurve - optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K7730MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K7730ST	STD	Standards (0, 3, 10, 30, 100, 600 µM)	6 x 200 µl
K7730KO1 K7730KO2	CTRL 1 CTRL 2	Kontrollen	2 x 200 µl
K7730WP	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat (10-fach)	2 x 100 ml
K7730AK	AB	Anti-Tryptophan-Antikörper (Iyo.)	2 x 1 Fläschchen
K7730K	2.AB	POD-Antikörper (Konzentrat 200-fach)	65 µl
K7730CSP	2.ABDIL	Konjugatstabilisierungspuffer	12 ml
K7730RP	REABUF	Reaktionspuffer	2x 100 ml
K7730DR	DER	Derivatisierungsreagenz	2 x 13,3 mg
K7730LM	DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO)	2 ml
K7730AP	ASYBUF	Assaypufferkonzentrat (10-fach)	2 x 3 ml

K7730TMB	SUB	TMB-Substrat	15 ml
K7730AC	STOP	Stopplösung	15 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit < 0,055 µS/cm bei 25°C (≥18,2 MΩ cm).

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 je nach Probenaufkommen bis zu 2x bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (**100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser**), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Das Pufferkonzentrat kann

bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die verdünnte Pufferlösung ist bei **2-8°C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

- Die **Standards (STD)** und die **Kontrollen (CTRL1, CTRL2)** werden eingefroren bei **-20°C** gelagert. Für den Test die Standards und Kontrollen auftauen und kurz vortexen. Standards und Kontrollen können bis zu 3x wieder eingefroren werden, das Wiedereinfrieren sollte sofort nach Entnahme erfolgen.
- **DMSO** kristallisiert bei 4°C aus. Zum Lösen das DMSO bei Raumtemperatur stehen lassen oder im Wasserbad erwärmen.
- Der Inhalt eines Fläschchens **Derivatisierungsreagenz (DER) (13,3 mg)** wird in **0,8 ml DMSO** gelöst und das Fläschchen für 5 min auf einen Horizontalschüttler gelegt. Das DER sollte **unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt** werden. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen. Durch die Aufteilung des DER in 2 Gefäße ist der ELISA in zwei Ansätze teilbar. **Bitte beachten:** DMSO greift Plastik an, DMSO reagiert nicht mit Polypropylen-Produkten und Glasgefäßen.
- Das **Assaypufferkonzentrat (ASYBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** mit Reaktionspuffer (REABUF) verdünnt werden: **27 ml REABUF** zu den **3 ml ASYBUF Konzentrat** in der Flasche geben, gut mischen. Durch die Aufteilung des ASYBUF in 2 Gefäße ist der ELISA in zwei Ansätze teilbar. Verdünnter Assaypuffer ist stabil und kann **4 Wochen bei 2-8°C** aufbewahrt werden.
- Der Inhalt eines Fläschchens **anti-Tryptophan-Antikörper (AB)** wird in **5,5 ml verdünntem Waschpuffer** gelöst. Durch die Aufteilung des AB in 2 Gefäße ist der ELISA in zwei Ansätze teilbar. Verdünnter Tryptophan-Antikörper ist stabil und kann **4 Wochen bei 2-8°C** aufbewahrt werden.
- Der **POD-Antikörper (2.AB)** wird **1:200** in Konjugatstabilisierungspuffer (2.ABDIL) verdünnt (**z.B. 60 µl 2.AB + 12 ml 2.ABDIL; nur die benötigte Menge ansetzen**). Unverdünnter POD-Antikörper ist bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Verdünnter POD-Antikörper kann **5 Tage bei 2-8°C** aufbewahrt werden.

- Alle anderen Testreagenzien sind bei 2-8°C zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zu Forschungszwecken.
- Die Kitkomponenten enthalten Natriumazid oder Thimerosal zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter H_2SO_4 . H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht verwendet werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

EDTA-Plasma, Serum und Urin

- Als Probe eignet sich Serum, EDTA-Plasma und Urin. Die Haltbarkeit der Proben beträgt bei 2-8°C bis zu 6 Stunden. Zur längeren Lagerung müssen die Plasma-, Serum- und Urin-Proben bei -20°C aufbewahrt werden. Wir empfehlen ein Ansäuern der Urinproben.
- Lipämische und hämolytische Proben beeinflussen das Testergebnis und sollten nicht verwendet werden.
- Proben mit sichtbaren Mengen an Feststoff sollten zentrifugiert werden.
- EDTA-Plasma-, Serum- und Urinproben werden für die Derivatisierung vorverdünnt (siehe Pipettierschema Probenvorbereitung).
- Zur weiteren Vorbereitung muss die Probe mit einem Derivatisierungsreagenz (DER) zur Derivatisierung des enthaltenen Tryptophan versetzt werden (Details siehe Pipettierschema Probenvorbereitung).

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettierolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik AG übernimmt keine Haftung.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

Pipettierschema Probenvorbereitung

Standards (STD), Kontrollen (CTRL) und Proben (SAMPLE) werden im Faktor **1:41** wie folgt verdünnt:

25 µl STD/ CTRL/ Probe + 1000 µl REABUF (Reaktionspuffer)

Bitte beachten: Proben von Patienten, die Tryptophan-Supplementierung erhalten (z.B. im Rahmen von Depletionsstudien), müssen sehr wahrscheinlich höher verdünnt werden. Wir empfehlen, diese Proben zusätzlich 1:2 mit REABUF vorzuverdünnen.

Die Derivatisierung der Standards (STD), der Kontrollen (CTRL) und der Proben (SAMPLE) wird als Einzelbestimmung in Mikroreaktionsgefäßen (z.B. 1,5-ml-Reaktionsgefäße) wie folgt durchgeführt:

1. Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche **Raumtemperatur (18-26°C)** aufweisen.
2. Jeweils **100 µl der verdünnten Standards (STD), Kontrollen (CTRL) bzw. Proben (SAMPLE)** in Mikroreaktionsgefäße pipettieren.
3. **25 µl** frisch angesetztes **Derivatisierungsreagenz (DER)** in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, SAMPLE) pipettieren, **gut mischen** und auf einem Horizontalschüttler (180-240 rpm) **45 min bei Raumtemperatur (18-26°C)** inkubieren.
4. Anschließend in alle verwendeten Mikroreaktionsgefäße **1000 µl verdünnten Assaypuffer (ASYBUF)** zugeben, gut mischen und auf einem Horizontalschüttler (180-240 rpm) **45 min bei Raumtemperatur (18-26°C)** inkubieren.

2 x 50 µl der so vorbereiteten Proben (STD, CTRL, SAMPLE) werden im ELISA als Doppelbestimmung eingesetzt.

Pipettierschema Testdurchführung

5. Positionen für Standards/Kontrollen/Proben (STD/CTRL/SAMPLE) in Doppelbestimmung am Protokollblatt markieren.
6. Die benötigten Streifen der Mikrotiterplatte (PLATE) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterplattenstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8°C gelagert werden.
7. **Mikrotiterplattenstreifen 5 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer (WASHBUF) waschen.** Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.

8.	2 x 50 µl der vorbereiteten derivatisierten Proben (STD, CTRL, SAMPLE) aus den Mikroreaktionsgefäßen in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren.
9.	50 µl verdünnten anti-Tryptophan-Antikörper (AB) in jede Vertiefung pipettieren. Platte luftdicht abdecken.
10.	Über Nacht (15-20 Stunden) bei 2-8°C inkubieren.
11.	Inhalt der Platte verwerfen und 5 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
12.	100 µl verdünnten POD-AK (2. AB) in alle Vertiefungen pipettieren.
13.	Platte abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln (180-240 rpm) inkubieren.
14.	Inhalt der Platte verwerfen und 5 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
15.	100 µl TMB-Substrat (SUB) in alle Vertiefungen pipettieren.
16.	8-12 min bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren*.
17.	100 µl Stopplösung (STOP) in alle Vertiefungen pipettieren und im Mikrotiterplattenphotometer im Schüttelmodus mischen.
18.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer mit einer Messwellenlänge von 450 nm messen. Sofern die höchste Extinktion der Standards (STD) den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte die Messung sofort bei einer Messwellenlänge von 405 nm wiederholt und diese Ergebnisse für eine Auswertung herangezogen werden. Wenn möglich, sollten bei jeder Messung die Extinktionen der Messwellenlänge mit den Extinktionen einer Referenzwellenlänge verglichen werden. Zulässige Referenzwellenlängen sind z.B.: 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm und 690 nm.

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

10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Bei einer Durchführung des Tests unter strikter Einhaltung der Volumenangaben für Standards, Kontrollen und Probenbehandlung sind Standards, Kontrollen sowie Proben gleich verdünnt, deshalb wird bei der Auswertung der Ergebnisse **kein Verdünnungsfaktor mitberechnet**.

Ausnahme: Bei Proben, die zusätzlich vorverdünnt wurden, müssen die Ergebnisse mit diesem Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

Auswertungsfunktionen

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion.

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden, z.B. 0,01).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0,01).

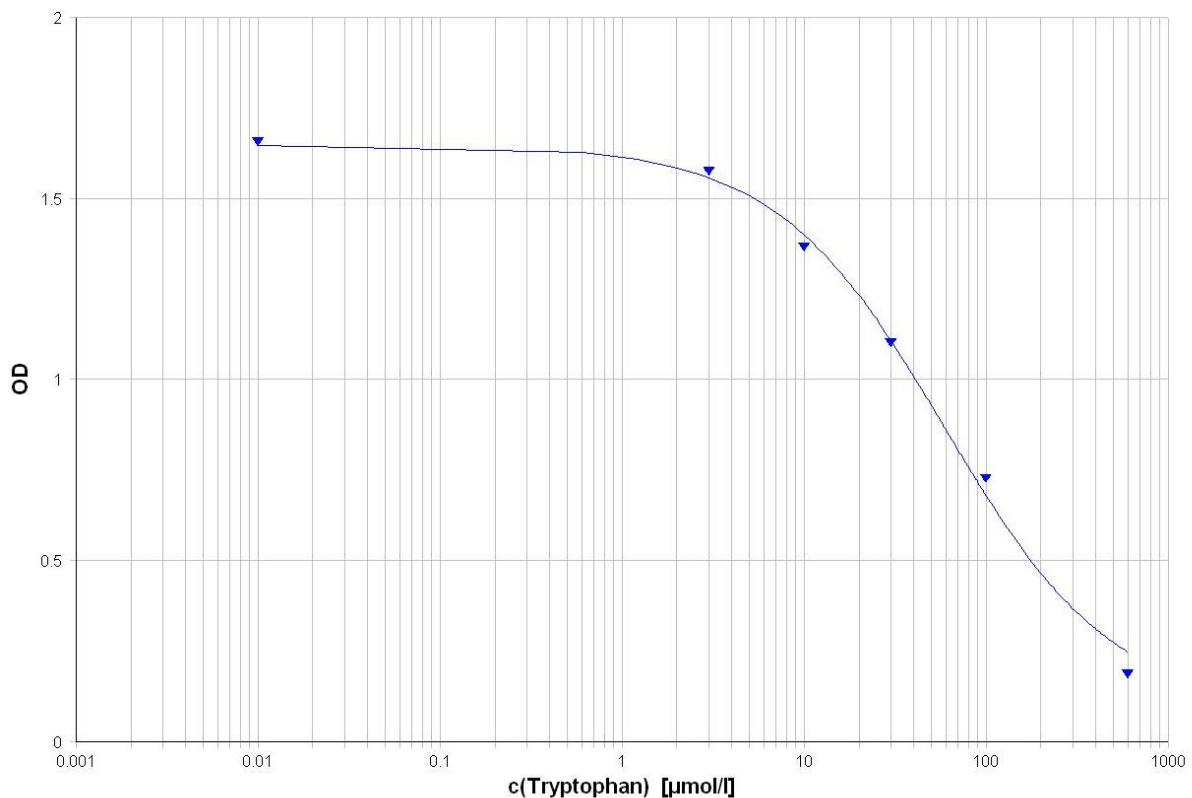
Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Kontrollen

Zur Überwachung der Qualität der Analyse sollten bei jedem Testansatz Kontrollen mitgeführt werden. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen ein oder mehrere Werte außerhalb des angegebenen Bereiches, ist es möglich, dass auch die Patientenproben falsch ermittelt wurden.

Die Konzentrationen der Kontrollen und Patientenproben können direkt aus der Kalibrierkurve in $\mu\text{mol/l}$ abgelesen werden. Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve. Sie darf nicht zur Auswertung der Messwerte benutzt werden.

Musterkalibrierkurve



Erwartete Ergebnisse

Anhand einer laborinternen Studie mit Proben von augenscheinlich Gesunden (n=40) wurde ein Mittelwert von 54 µmol/l ermittelt, bei einer Standardabweichung von 12 µmol/l.

EDTA-Plasma Mittelwert ± 2 Standardabweichungen: 54 ± 24 µmol/l

Normalbereich 30 – 78 µmol/l

Wir empfehlen jedem Labor seinen eigenen Normalwerte-Bereich zu erstellen, weil Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Normalbereichs dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Kreuzreaktion

5-HTP (5-Hydroxy-Tryptophan)	< 0,5 %
L-Phenylalanin	< 0,1 %
L-Tyrosin	< 0,1 %

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n=12)		
Probe	Tryptophan [µmol/l]	Variationskoeffizient (CV) [%]
1	17,7	11,4
2	56,7	4,1

Inter-Assay (n=5)		
Probe	Tryptophan [µmol/l]	Variationskoeffizient (CV) [%]
1	19,4	6,9
2	59,1	4,0

Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde als $B_0 + 2 \text{ SD}$ festgelegt. Gemessen wurde 20 x der Standard Null.

Probe	Tryptophan Mittelwert [OD]	2 Standard- abweichungen (2 x SD)	Nachweis- grenze [$\mu\text{mol/l}$]
Standard Null	2,3	0,05	7

Wiederfindung

Unterschiedliche Mengen an Tryptophan wurden zu einer Serumprobe gegeben (Spike) und anschließend im ELISA gemessen. Die analytische Wiederfindung von Tryptophan wurde bei zwei verschiedenen Konzentrationen aus den theoretisch erwarteten und den praktisch gemessenen Werten ermittelt. Die mittlere Wiederfindung für alle Konzentrationen der Serumprobe betrug 100,8 % (n=5).

Spike [µmol/l]	Tryptophan erwartet [µmol/l]	Tryptophan gemessen [µmol/l]	Wiederfindung [%]
0		44,8	
25	69,8	74,7	107,1
50	94,8	89,5	94,4

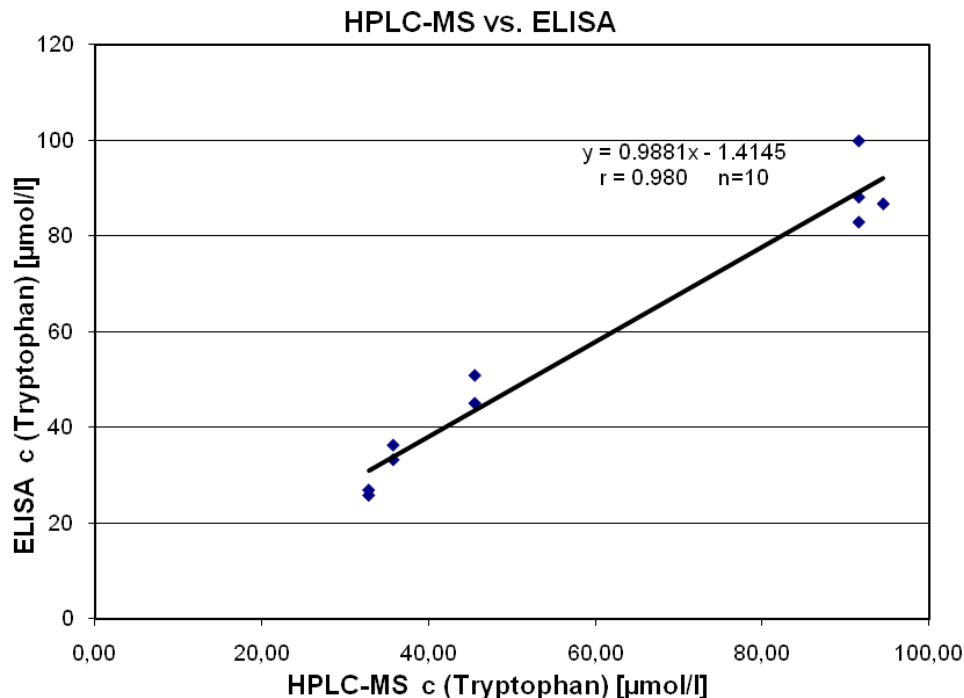
Linearität

Die Linearität des ELISAs wurde durch Verdünnen einer aufgestockten Serumprobe bestimmt. Die mittlere Linearität betrug 99,8 % (n=5).

Verdünnung	Erwartet [µmol/l]	Messwert [µmol/l]	Wiederfindung [%]
Original		44,8	
1+1	22,4	22,5	100,4
1+3	11,2	11,1	99,1

Korrelation mit HPLC-MS

Die Korrelation mit HPLC-MS wurde anhand von 10 Proben ermittelt, sie betrug $r = 0,98$.



12. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Tryptophan-Konzentrationen über 600 µmol/l müssen stärker verdünnt und gegebenenfalls nochmals im Assay gemessen werden.

Stark hämolysierte oder lipämische Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Wir empfehlen, solche Proben nicht zu analysieren.

13. LITERATUR

Wilson ST, Stanley B, Brent DA, Oquendo MA, Huang YY, Mann JJ: The tryptophan hydroxylase-1 A218C polymorphism is associated with diagnosis, but not suicidal behavior, in borderline personality disorder. *AM J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2009 Mar 5; 150B (2): 202-8.

Richard DM, Dawes MA, Mathias CW, Acheson A, Hill-Kapturczak N, Dougherty DM: L-Tryptophan: Basic metabolic functions, behavioural research and therapeutic indications. *International Journal of Tryptophan Research* 2009: 2 45-60.

Demisch K, Bauer J, Georgi K, Demisch L. Treatment of severe chronic insomnia with L-tryptophan: Results of a double blind cross-over study. *Pharmacopsychiatry*. 1987 Nov; 20 (6): 242-4.

Komer E, Bertha G, Flooh E, et al. Sleep inducing effect of L-tryptophane. *Er Neurol*. 1986 ; 25 (Suppl 2): 107-13.

Gendall KA, Joyce PR. Meal induced changes in tryptophan:LNAAs ratio: effects on craving and binge eating. *Eat Beh* 2000; 1 (1): 53-62.

Brandacher G, Hoeller E, Fuchs D, Weiss HG. Chronic immune activation underlies morbid obesity: is IDO a key player. *Curr Drug Metab*. 2007; 8 (3): 289-95.

Breum L, Rasmussen MH, Hilsted J, Femstrom JD. Twenty-four-hour plasma tryptophan concentrations and ratio are below normal in obese subjects and are not normalised by substantial weight reduction. *Am J Clin Nutr*. 2003; 77 (5): 1112-8.

Porter RJ, Mulder RT, Joyce PR, Miller AL, Kennedy M. Tryptophan hydrolase gene (TPH1) and peripheral tryptophan level in depression. *J Affect Disord*. 1;109(1-2):209-12.

Almeida-Montes LG, Valles-Sanches V, Moreno-Aguilar J et al. Relation of serum cholesterol, lipid, serotonin and tryptophan levels to severity of depression and suicide attempts. *J Psychiatry Neurosci*. 2000 Sep; 25 (4): 371-7.

Fitzgerald P et al: tryptophan catabolism in females with irritable bowel syndrome: relationship to interferon gamma, severity of symptoms and psychiatric co-morbidity; *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 1291-7

Hideki Miura et al: A link between stress and depression: Shifts in the balance between the kynurenine and serotonin pathways of tryptophan metabolism and the etiology and pathophysiology of depression; *Stress*, Volume 11, Issue 3 2008, 198-209.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zu Forschungszwecken eingesetzt werden.
- Die Reagenzien sollten nach Ablauf des angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden (Haltbarkeitsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen sollten nicht gemischt oder ausgetauscht werden.

- Für die Qualitätskontrolle sind die dafür erstellten Richtlinien für medizinische Laboratorien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten und der Aufbereitung der Proben wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immunodiagnostik AG übernimmt für direkt daraus resultierende Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



Nur für Forschungszwecke

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Manual

Tryptophan ELISA Kit

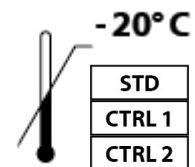
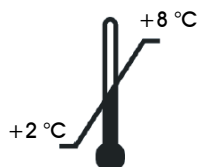
*For the determination of Tryptophan in human
EDTA plasma, serum and urine*

For research use only

Valid from 05.12.2012



K 7730



1. INTENDED USE

The Tryptophan ELISA Kit is intended for the quantitative determination of Tryptophan in EDTA plasma, serum and urine. It is for research use only.

2. INTRODUCTION

Tryptophan is an essential amino acid, which can not be synthesized by humans and, therefore, must be obtained from diet. Tryptophan plays an important role in the synthesis of serotonin, as it is the only source for synthesizing serotonin (see figure 1).

Serotonin itself is released from the appendices of a widespread transmitter system with global modulating effects on different areas of life. The activity of this system depends not least on the actual tryptophan level. In some disease patterns a tryptophan deficiency is found, which is induced by an activation of the enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). The activation of IDO causes shifting the metabolism of tryptophan to the kynurenine pathway and its degradation (see figure 1).

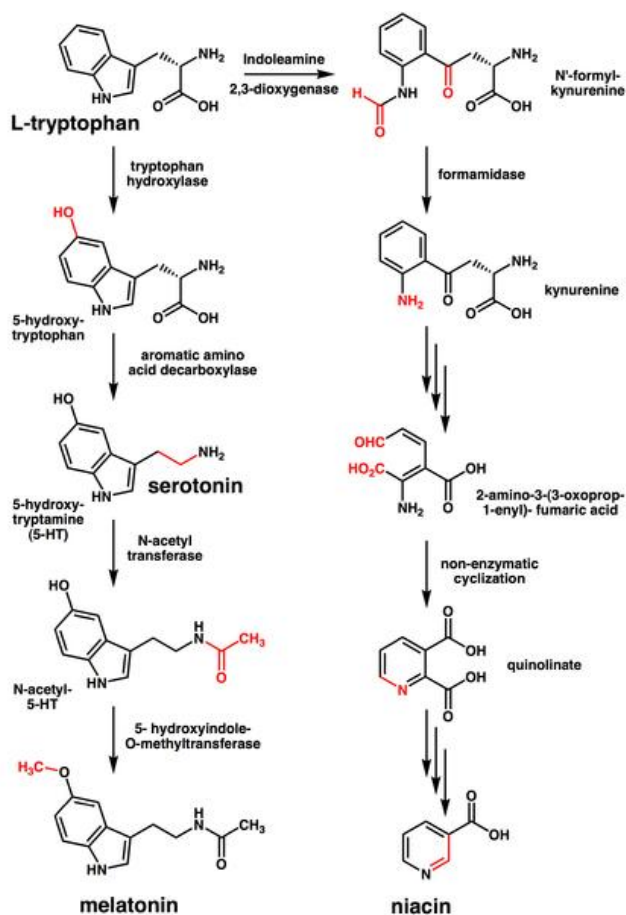


Figure 1: Synthesis of serotonin and melatonin via tryptophan (left) and shifting the metabolism of tryptophan to the kynurenine-pathway via the enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (right)

As a consequence of that, the tryptophan level in plasma is reduced; it is not available for serotonin synthesis and in the following, for the melatonin production. As a result, fluctuations of mood, aggression, sleep and eating disorder or depression can occur.

In recent years, an increasing number of disease patterns has been detected, in which either the tryptophan level is significantly lowered due to the activation of IDO or for other reasons, or which show an adverse ratio of tryptophan-to-kynurenine levels. In the former case, the tryptophan deficiency is associated with an increase in inflammation markers. Some indications are mentioned in the following:

- In case of **irritable bowel syndrome** (IBS) interferone-gamma activates the enzyme IDO, causing a tryptophan deficiency,
- In **obese patients**, inflammation markers, which show a chronic activation of the immune system, are increased as well. IDO is also activated here, and the plasma tryptophan levels are low,
- **Stress** activates IDO likewise and facilitates the degradation of tryptophan *via* the kynurenine pathway.

In addition, gastrointestinal dysfunctions like **fructose intolerance** are associated with difficulties in absorbing tryptophan from the gut.

In all these disease patterns fluctuation of mood, sleep and eating disorder or depression are known.

The symptoms of these diseases can be eased by administration of tryptophan. However, such a treatment requires the knowledge of the tryptophan level, which can be determined appropriately with the now available test.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This assay is based on the method of competitive enzyme linked immunoassays. The sample preparation includes the addition of a derivatization reagent for tryptophan derivatization. Afterwards, the treated samples and a polyclonal tryptophan-antiserum are incubated in the wells of a microtiter plate coated with tryptophan-derivative (tracer). During the incubation period, the target tryptophan in the sample competes with the tracer immobilized on the wall of the microtiter wells for the binding of the polyclonal antibodies. The tryptophan in the sample displaces the antibodies out of the binding to the tracer. Therefore the concentration of the tracer-bound antibody is inverse proportional to the tryptophan concentration in the sample.

During the second incubation step, a peroxidase-conjugated antibody is added to each microtiter well to detect the anti-tryptophan antibodies. After washing away the unbound components, tetramethylbenzidine (TMB) is added as a peroxidase substrate. Finally, the enzymatic reaction is terminated by an acidic stop solution. The color changes from blue to yellow and the absorbance is measured in the photometer at 450 nm. The intensity of the yellow color is inverse proportional to the tryptophan concentration in the sample; this means, high tryptophan concentration in the sample reduces the concentration of tracer-bound antibodies and lowers the photometric signal. A dose response curve of absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from the standard. Tryptophan present in the patient samples is determined directly from this curve.

4. MATERIAL SUPPLIED

Catalog No	Content	Kit Components	Quantity
K7730MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K7730ST	STD	Standards (0, 3, 10, 30, 100, 600 μ M)	6 x 200 μ l
K7730KO1 K7730KO2	CTRL 1 CTRL 2	Controls	2 x 200 μ l
K7730WP	WASHBUF	Wash buffer concentrate (10-fold)	2 x 100 ml
K7730AK	AB	Anti-tryptophan antibody (Iyo.)	2 x 1 vial
K7730K	2.AB	POD antibody (concentrate 200-fold)	65 μ l
K7730CSP	2.ABDIL	Conjugate stabilizing buffer	12 ml
K7730RP	REABUF	Reaction buffer	2 x 100 ml
K7730DR	DER	Derivatization reagent	2 x 13.3 mg
K7730LM	DMSO	Dimethylsulfoxide (DMSO)	2 ml
K7730AP	ASYBUF	Assay buffer concentrate (10-fold)	2 x 3 ml
K7730TMB	SUB	TMB substrate	15 ml
K7730AC	STOP	Stop solution	15 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000 μ l
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 nm (reference wave length 620 or 690 nm)

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 μ m) with an electrical conductivity of 0.055 μ S/cm at 25°C (\leq 18.2 M Ω cm).

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 2 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 μ l** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- Dilute the **wash buffer concentrate (WASHBUF)** with ultra pure water **1:10** before use (**100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water**), mix well. Crystals may occur due to high salt concentration in the stock solution. The crystals must be redissolved at room temperature or at 37°C using a water bath before dilution. The wash buffer concentrate is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted buffer solution can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month.**
- Store **Standards (STD) and controls (CTRL1, CTRL2)** frozen at **-20°C**, thaw before use in the test and mix well. Re-freeze standards and controls immediately after use. They can be re-frozen up to 3 times.

- **DMSO** could crystallize at 4°C. Dissolve the crystals at room temperature or in a water bath.
- Dissolve the content of one vial of **derivatization reagent (DER) (13.3 mg) in 0.8 ml DMSO**. Put the vial on a horizontal shaker for 5 min. DER must be **prepared immediately before use**. Discard any rest of the reagent after use. The ELISA kit can be separated into two performances by providing two DER vials. **Please note:** DMSO attacks all plastics but not polypropylene products and laboratory glass.
- Dilute the **assay buffer concentrate (ASYBUF)** with reaction buffer (REABUF) **1:10** before use: Add **27 ml REABUF** to the **3 ml ASYBUF concentrate** in the bottle, mix well. The ELISA kit can be separated into two performances by providing 2 x 3 ml assay buffer concentrate. Diluted assay buffer can be stored at **2-8°C for 4 weeks**.
- Dissolve the content of one vial of **anti-tryptophan antibody (AB)** in **5.5 ml of diluted wash buffer**. The ELISA kit can be separated into two performances by providing two AB vials. Diluted anti-tryptophan antibody can be stored at **2-8°C for 4 weeks**.
- Dilute the **POD antibody (2.AB) 1:200** with conjugate stabilizing buffer (2.ABDIL) (e.g. **60 µl 2.AB + 12 ml 2.ABDIL, prepare only the required amount**). The undiluted POD antibody (2.AB) is stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label. Diluted POD antibody can be stored at **2-8°C for 5 days**.
- 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

- For research use only.
- 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 kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

EDTA plasma, serum and urine

- Serum, EDTA-Plasma and urine are suited for this test system. The samples are stable for up to 6 hours at 2-8°C. For longer storage, blood- and urine samples must be frozen at -20°C. We recommend acidifying the urine samples.
- Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results and should not be used for analysis.
- Samples with visible amounts of precipitates should be centrifuged.
- The EDTA plasma, serum and urine samples are diluted for derivatization (see sample preparation procedure).
- For sample preparation, a derivatization reagent (DER) for derivatization of tryptophan is added (details are given in the sample preparation procedure).

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the test results. Immundiagnostik AG can therefore not be held reliable for any damage resulting from this.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

Sample preparation procedure

Dilute standars (STD), controls (CTRL) and samples (SAMPLE) by factor **1:41** as follows:

25 µl STD/CTRL/SAMPLE + 1000 µl REABUF (reaction buffer)

Please note: Samples from patients with tryptophan supplementation (e.g. in depletion studies) probably require further dilution, we recommend diluting these samples additionally 1:2 with REABUF.

Derivatization of standards (STD), controls (CTRL) and samples (SAMPLE) is carried out in single analysis in vials (e.g. 1.5 ml vials) as follows:

1.	Bring all reagents and samples to room temperature (18-26°C) .
2.	Add 100 µl of diluted standards/ controls/ samples (STD/ CTRL/ SAMPLE) in the corresponding vial.
3.	Add 25 µl of freshly prepared derivatization reagent (DER) into each vial (STD, CTRL, SAMPLE), mix well and incubate for 45 min at room temperature (18-26°C) on a shaker (180-240 rpm).
4.	Afterwards add 1000 µl of assay buffer (ASYBUF) into each vial, mix well and incubate for 45 min at room temperature (18-26°C) on a shaker (180-240 rpm).

2 x 50 µl of each treated sample (STD, CTRL, SAMPLE) are used in the ELISA as duplicates.

Test procedure

5.	Mark the positions of standards/ controls/ samples (STD/ CTRL/ SAMPLE) in duplicate on a protocol sheet.
6.	Take as many microtiter plate strips (PLATE) as needed from kit. Store unused strips covered at 2-8°C. Strips are stable until the expiry date stated on the label.
7.	Wash the microtiter plate strips 5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer (WASHBUF) into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution.
8.	For the analysis in duplicate, take 2 x 50 µl of derivatized standards (STD)/ controls (CTRL)/ samples (SAMPLE) out of the vials and add into the respective wells of the microtiter plate.
9.	Add 50 µl of diluted anti-tryptophan antibody (AB) into each well. Cover the plate tightly.

10.	Incubate overnight (15-20 hours) at 2-8°C .
11.	Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution.
12.	Add 100 µl of diluted POD antibody (2. AB) into each well.
13.	Cover plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) on a horizontal shaker (180-240 rpm).
14.	Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution.
15.	Add 100 µl of TMB substrate (SUB) into each well.
16.	Incubate for 8-12 min at room temperature (18-26°C) in the dark*.
17.	Add 100 µl of stop solution (STOP) into each well, mix thoroughly.
18.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm . If the highest extinction of the standards (STD) is above the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm and the obtained results used for evaluation. If possible, the extinctions from each measurement should be compared with extinctions obtained at a reference wavelength, e. g. 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm and 690 nm can be used

* The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend to observe the color change and to stop the reaction upon good differentiation.

10. EVALUATION OF RESULTS

If the test is performed in strict compliance with the manufacturer's instructions (i.e. with the exact volumes for standards, controls, samples, and with correct sample treatment), standards, controls, and samples are equally diluted. Therefore, **no dilution factor is required for the calculation of results.**

Exception: The results from additionally diluted samples must be multiplied by this dilution factor.

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the "4-parameter-algorithm".

1. *4-parameter-algorithm*

It is recommended to use a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.01).

2. *Point-to-point-calculation*

We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for concentration.

3. *Spline-algorithm*

We recommend a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.01).

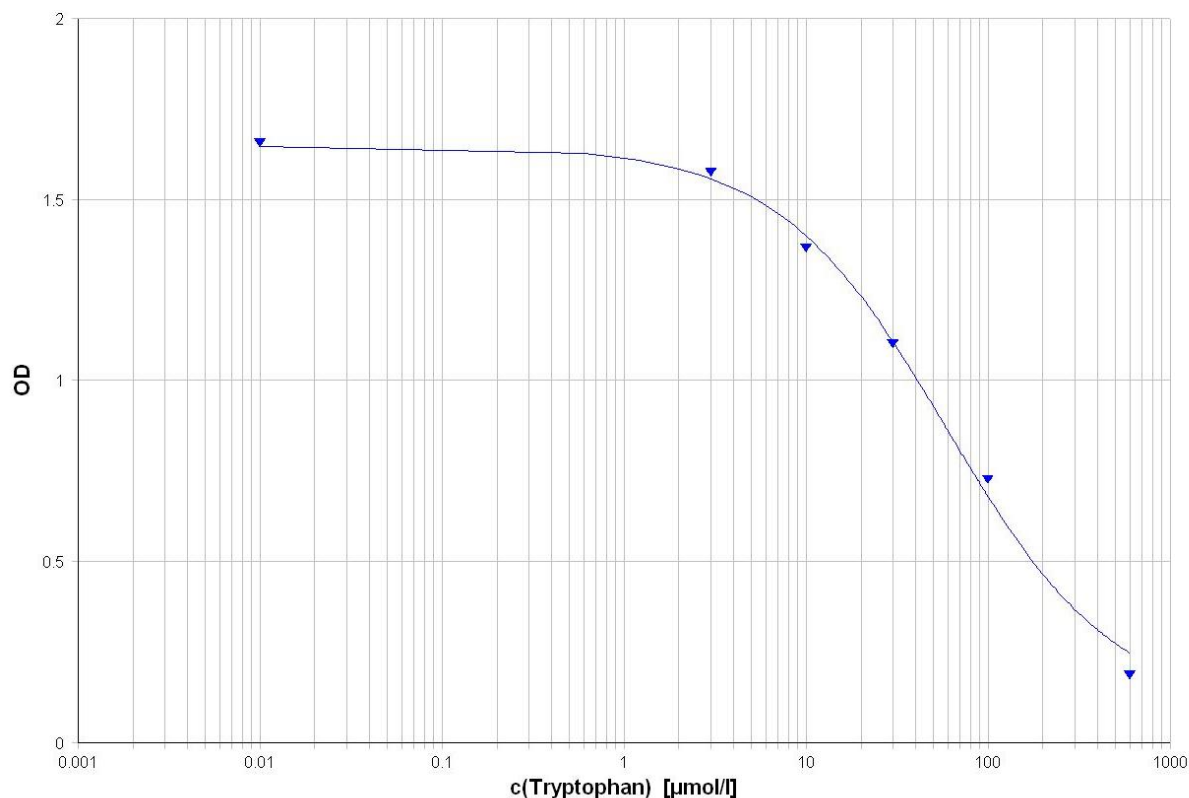
Plausibility of the measured pairs of values should be examined before automatically evaluating the results. If this option is not available in the used program, the pairs of values should be controlled manually.

Controls

Control samples should be analyzed with each run. Results generated from the analysis of control samples should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

The concentration of controls and patient samples can be determined directly from the calibration curve in $\mu\text{mol/l}$. In the following an example of a calibration curve is given, do not use it for the calculation of your results.

Example of calibration curve



Expected values

Based on internal studies with plasma samples of evidently healthy persons ($n=40$) a mean value of $54 \mu\text{mol/l}$ was estimated. The standard deviation was $12 \mu\text{mol/l}$.

EDTA plasma mean value $\pm 2x$ standard deviation: **$54 \pm 24 \mu\text{mol/l}$**

Normal range: **$30 - 78 \mu\text{mol/l}$**

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

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Cross reactivity

5-HTP (5-Hydroxy-Tryptophan)	< 0.5 %
L-Phenylalanine	< 0.1 %
L-Tyrosine	< 0.1 %

Precision and reproducibility

Intra-assay (n=12)		
Sample	Tryptophan [$\mu\text{mol/l}$]	coefficient of variation (CV) [%]
1	17.7	11.4
2	56.7	4.1

Inter-assay (n=5)		
Sample	Tryptophan [$\mu\text{mol/l}$]	coefficient of variation (CV) [%]
1	19.4	6.9
2	59.1	4.0

Sensitivity

The sensitivity was set as $B_0 + 2SD$. The zero-standard was measured 20 times.

Sample	Tryptophan mean value [OD]	2 x standard deviation (SD)	Detection limit [$\mu\text{mol/l}$]
Zero-standard	2.3	0.05	7

Recovery

One serum sample was spiked with different tryptophan concentrations and measured in this assay. The analytical recovery rate was determined by the expected and measured tryptophan levels. The mean recovery rate for all concentrations was 100.8 % (n=5).

Spike [μmol/l]	Tryptophan expected [μmol/l]	Tryptophan measured [μmol/l]	Recovery [%]
0		44.8	
25	69.8	74.7	107.1
50	94.8	89.5	94.4

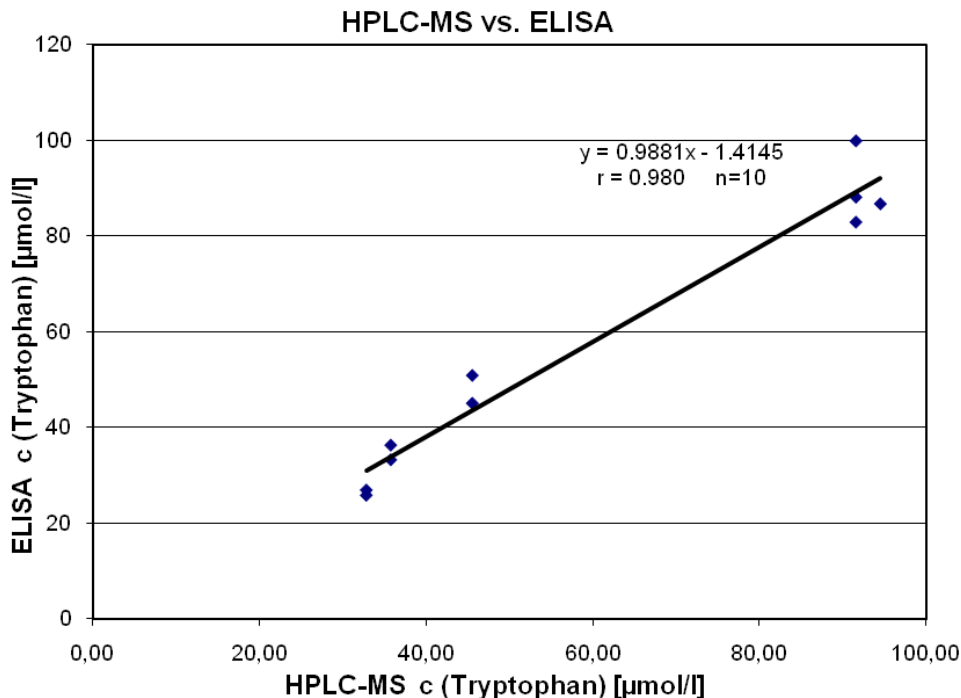
Linearity

The linearity of the ELISA was determined by the dilution of a spiked serum sample. The mean linearity was 99.8 % (n=5).

Dilution	Expected [μmol/l]	Measured [μmol/l]	Recovery [%]
original		44.8	
1+1	22.4	22.5	100.4
1+3	11.2	11.1	99.1

Correlation with HPLC-MS

10 samples were measured with this ELISA and HPLC-MS. The correlation was $r = 0.98$.



12. LIMITATIONS

Samples with phenylalanine concentrations above 600 µmol/l should be further diluted and re-assayed.

Strong hemolytic and lipemic samples often show wrong concentrations. Do not measure hemolytic and lipemic samples.

13. REFERENCES

Wilson ST, Stanley B, Brent DA, Oquendo MA, Huang YY, Mann JJ: The tryptophan hydrolase-1 A218C polymorphysmus is assoziated with diagnosis, but not suicidal behavior, in borderline personality disorder. AM J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2009 Mar 5; 150B (2): 202-8.

Richard DM, Dawes MA, Mathias CW, Acheson A, Hill-Kapturczak N, Dougherty DM: L-Tryptophan: Basic metabolic functions, behavioural research and therapeutic indications. International Journal of Tryptophan Research 2009: 2 45-60.

Demisch K, Bauer J, Georgi K, Demisch L. Treatment of severe chronic insomnia with L-tryptophan: Results of a double blind cross-over study. *Pharmacopsychiatry*. 1987 Nov; 20 (6): 242-4.

Komer E, Bertha G, Flooh E, et al. Sleep inducing effect of L-tryptophane. *Er Neurol*. 1986 ; 25 (Suppl 2): 107-13.

Gendall KA, Joyce PR. Meal induced changes in tryptophan:LNAAs ratio: effects on craving and binge eating. *Eat Beh* 2000; 1 (1): 53-62.

Brandacher G, Hoeller E, Fuchs D, Weiss HG. Chronic immune activation underlies morbid obesity: is IDO a key player. *Curr Drug Metab*. 2007; 8 (3): 289-95.

Breum L, Rasmussen MH, Hilsted J, Femstrom JD. Twenty-four-hour plasma tryptophan concentrations and ratio are below normal in obese subjects and are not normalised by substantial weight reduction. *Am J Clin Nutr*. 2003; 77 (5): 1112-8.

Porter RJ, Mulder RT, Joyce PR, Miller AL, Kennedy M. Tryptophan hydrolase gene (TPH1) and peripheral tryptophan level in depression. *J Affect Disord*. 1;109(1-2):209-12.

Almeida-Montes LG, Valles-Sanches V, Moreno-Aguilar J et al. Relation of serum cholesterol, lipid, serotonin and tryptophan levels to severity of depression and suicide attempts. *J Psychiatry Neurosci*. 2000 Sep; 25 (4): 371-7.

Fitzgerald P et al: tryptophan catabolism in females with irritable bowel syndrome: relationship to interferon gamma, severity of symptoms and psychiatric co-morbidity; *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 1291-7

Hideki Miura et al: A link between stress and depression: Shifts in the balance between the kynurenine and serotonin pathways of tryptophan metabolism and the etiology and pathophysiology of depression; *Stress*, Volume 11, Issue 3 2008, 198-209.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- All reagents in the test package are for research use only.
- Reagents should not be used after the date of expiry stated on the label.
- Single components with different lot numbers should not be mixed or exchanged.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.

- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.

Used symbols:

Temperature limitation



Catalogue Number



For research use only



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number