



american diagnostica GmbH

Kaplaneigasse 35, 64319 Pfungstadt
Tel: +49 6151 990899, Fax: +49 6151 990899

MDA-LDL ELISA Produkt Nr. 447839

Lagerung: 2–10°C

Für Forschungszwecke!

VERWENDUNGSZWECK

Der MDA-LDL ELISA ist ein quantitativer enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Test für die Bestimmung von Malondialdehyde-modified low-density lipoprotein (MDA-LDL, oxidized LDL) in humanem Serum. Der Test ist nur für Forschungszwecke geeignet.

ERKLÄRUNG DES TESTVERFAHRENS

Die Bezeichnung "oxidiertes LDL" ist ein Sammelbegriff für oxidativ denaturierte Low-density Lipoproteine; er bezieht sich auf LDL-Moleküle deren Hauptkomponente, z. Bsp. Apo B durch ein Lipidperoxidationsprodukt von LDL modifiziert wurde. Malondialdehyde (MDA) wurde als repräsentatives Lipid-Peroxidationsprodukt von LDL identifiziert, das Produkt bei dem Apo B durch Malondialdehyd modifiziert wird, nennt sich Malondialdehyd-modifiziertes LDL (MDA-LDL). MDA-LDL ist eine der Hauptformen von oxidiertem LDL.

Bei Patienten mit Diabetes mellitus und perkutaner Koronararterien-Intervention (PCI) wurde die Korrelation zwischen MDA-LDL Werten vor PCI und dem Auftreten von Restenosen nach PCI untersucht. Die Studie zeigte, dass die MDA-LDL-Werte vor PCI bei Patienten die eine Restenose entwickelten höher waren als bei Patienten bei denen keine Restenose auftrat. Das Auftreten von Restenosen nach PCI war in Patienten mit einem pre-PCI MDA-LDL Wert ≥ 110 U/L höher (mit einem relativen Risiko von 5.3) im Vergleich zu Patienten mit einem Wert von < 110 U/L.

Bei Patienten mit Diabetes mellitus und koronarer Herzkrankheit, wurde die Korrelation zwischen MDA-LDL Werten und dem Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen in einer 4-jährigen Follow-up Studie untersucht. Das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen war signifikant höher in Patienten mit einem MDA-LDL Wert ≥ 110 U/L als in Patienten mit einem Wert von < 110 U/L.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass MDA-LDL ein nützlicher Prognosemarker bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit ist.

TESTPRINZIP

Serum wird mit Verdünnungspuffer verdünnt, dieser enthält ein oberflächen-aktivierendes Reagenz, welches die Struktur von MDA-LDL in der Probe verändert. Das MDA-LDL bindet dann an einen festphasen-gebundenen monoklonalen anti-MDA-LDL Antikörper (ML25) auf der Mikrotiterplatte. Anschließend wird ungebundenes Material durch waschen entfernt und ein monoklonaler β -galactosidase-markierter anti-apolipoprotein B Antikörper (AB16) zugegeben. Anschließend wird ungebundenes Material durch waschen entfernt und das Enzymsubstrat zugegeben. Durch die Umsetzung des Substrats kommt es zu einer Farbentwicklung, diese wird durch Zugabe des Stoppreagenz abgestoppt. Die Extinktion dieser Lösung wird bei 415 nm gemessen. Die Extinktion ist direkt proportional zur MDA-LDL-Konzentration in der Probe.

REAGENZILIEN

MTP	anti-MDA-LDL mAk beschichtete Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen), 1 Platte
STAB	Probenstabilisierungsreagenz, Saccharose, 50 ml, 1 Fläschchen
DIL	Verdünnungspuffer, HEPES, 100 ml, 2 Fläschchen
WASH	Waschpuffer (5x Konzentrat), 100 ml, 2 Fläschchen
CON	β -Galactosidase-markierter anti-apolipoprotein B mAk, 11 ml, 1 Fläschchen
SUB	Substrat, o-Nitrophenol- β -D-galactopyranosid, 11 ml, 1 Fläschchen
STOP	Natrium-Carbonat-Stopplösung, 11 ml, 1 Fläschchen
STD	Human Serum Standard (lyophilisiert), 0,5 ml, 1 Fläschchen

WARNUNG UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Ausgangsmaterial für den im Kit enthaltenen Standard ist humanen Ursprungs. Dieses wurde auf Hepatitis B Oberflächenantigene (HBsAg), Hepatitis C Virus Antigen (HCV) und HIV Antigen getestet und für nicht-reaktiv befunden. Da sich die Übertragung von HBsAg, HCV, HIV und anderen im Blut zirkulierenden Infektionserregern durch Humanblutprodukte derzeit mit keiner bekannten Testmethode mit völliger Sicherheit ausschließen lässt, müssen diese Reagenzien wie potenziell infektiöse Humanproben gehandhabt werden.

Die folgenden Reagenzien enthalten ProClin 300 als Konservierungsmittel: Probenstabilisierungsreagenz, Verdünnungspuffer, Waschpuffer Enzym-markierter Antikörper, Substrat und Standard. ProClin 300 kann zu Hautreizungen führen, bei Haut- oder Augenkontakt sofort gründlich mit Wasser abspülen und gegebenenfalls einen Arzt konsultieren.

Den Test wie angegeben bei 2-10 °C lagern, nicht einfrieren. Keine Komponenten des Testkits nach dem Verfallsdatum verwenden. Keine Reagenzien aus verschiedenen Testkits oder Chargen zusammen verwenden. Die Flaschenverschlüsse zwischen verschiedenen Reagenzien nicht vertauschen und nicht in Kontakt mit anderen Reagenzien bringen. Reagenzien vor direkter Sonneneinstrahlung schützen

HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG

Probenart und Probenabnahme

- 1) Als Probe kann **nur Serum** verwendet werden, **Plasma ist nicht geeignet**.
- 2) Serum nach vollständiger Blutgerinnung abtrennen; Serum innerhalb von 6 Stunden nach der Blutentnahme abtrennen.

Probenlagerung

- 1) Frische Proben
Frisch abgetrenntes Serum innerhalb von 8 Stunden testen, wenn es bei 15 – 25 °C gelagert wurde und innerhalb von 3 Tagen, wenn es bei 2–8°C gelagert wurde

- 2) Gelagerte Proben

Wenn die Proben nicht direkt getestet werden können, muss sicher gestellt sein, dass innerhalb von 8 Stunden nach der Blutabnahme eine der folgenden Vorgehensweisen durchgeführt wird.

[i] Probenlagerung nach Zugabe des Proben-Stabilisierungsreagenz: Die Probe vor dem Einfrieren mit dem Stabilisierungsreagenz im Verhältnis 3:1 mischen (z. Bsp. 300 μ L Probe und 100 μ L Stabilisierungsreagenz). Die Probe muss innerhalb von 5 Monaten getestet werden, wenn sie bei -80°C gelagert wurde und innerhalb von 1 Monat, wenn sie bei -20°C gelagert wurde.

[ii] Direkte Probenlagerung bei -20°C: Die Probe darf während der Lagerung auf keinen Fall auftauen. Wenn die Probe bei -20 °C gelagert wurde, innerhalb einer Woche wie folgt vorgehen: die Probe auftauen und vor der Messung mit dem Stabilisierungsreagenz im Verhältnis 3:1 mischen (z. Bsp. 300 μ L Probe und 100 μ L Stabilisierungsreagenz). Wenn die Probe wieder gelagert wird, muß sie innerhalb von 5 Monaten getestet werden, wenn sie bei -80°C gelagert wurde und innerhalb von 1 Monat, wenn sie bei -20°C gelagert wurde.

- 3) Die Proben vor der Verdünnung Raumtemperatur (15-30°C) erreichen lassen.

Interferierende Substanzen

Die Messung wird durch die folgenden Komponenten minimal beeinflusst: Billirubin (bis zu 20 mg/dL), konjugiertes Billirubin (ab 20 mg/dL), Hämoglobin (bis zu 500 mg/dL), Trübeinheit Formazin (ab 3000 Units) und parenterale Fettemulsionen (ab 5%).

Sonstiges

- 1) bei jedem Testdurchlauf eine Standardkurve mitführen.
- 2) Wenn mehrere Proben vermessen werden, gewährleisten, dass die Reaktionszeit für jede Vertiefung bei jedem Schritt einheitlich ist.
- 3) Während der Waschschriffe gewährleisten, dass die Waschlösung vollständig entfernt wird.
- 4) direkte Sonneneinstrahlung ist bei allen Reaktionsschritten zu vermeiden.
- 5) bei allen Pipettierschritten darauf achten, dass die Reagenzien in die Mitte der Vertiefung gegeben werden, so dass nichts an der Gefäßwand

haftet.

- 6) wenn die Konzentration einer Probe außerhalb des Messbereichs der Standardkurve liegt, muss diese nach weiterer Verdünnung mit dem Verdünnungspuffer erneut getestet werden.

Notwendige Materialien, die nicht mitgeliefert werden

0.22 µm gefiltertes deionisiertes H₂O

Achtkanal Multipipette für den Volumenbereich 50-300 µl

Einkanalpipetten für den Volumenbereich 0-200, 200-1000 µl

Spektralphotometer für Mikrotiterplatten mit einer Wellenlänge von 415 nm
Plattenwaschgerät (optional)

VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

MTP Die Antikörper-beschichteten Mikrotiterstreifen sind gebrauchsfertig. Nicht verwendete Streifen können bei 2-10 °C bis zu 2 Wochen gelagert werden, wenn diese in dem verschlossenen Folienbeutel zusammen mit dem Trocknungsmittel unter Ausschluss von jeglicher Feuchtigkeit gelagert werden.

STAB Proben-Stabilisierungsreagenz, gebrauchsfertig

DIL Verdünnungspuffer, gebrauchsfertig

WASH 100 ml Waschpuffer Konzentrat mit 400 ml destilliertem Wasser verdünnen. Der verdünnte Waschpuffer ist bei Lagerung bei 2-10 °C einen Monat stabil.

CON Enzym-markiertes Antikörper Konjugat, gebrauchsfertig

SUB Substrat, gebrauchsfertig

STOP Stopplösung, gebrauchsfertig

STD Standard mit 0.5 ml destilliertem Wasser rekonstituieren, vorsichtig mischen und 10 min bei Raumtemperatur (15-30 °C) stehen lassen, wenn sich der Inhalt gelöst hat, das Fläschchen nochmals vorsichtig mischen, nicht vortexen. Diese Lösung als Stock-Lösung verwenden. (= Stock-Lösung). Der rekonstituierte Standard ist bei Lagerung bei 2-10 °C eine Woche stabil.

TESTDURCHFÜHRUNG

Alle Reagenzien **müssen Raumtemperatur (15-30°C)** haben. Unlösliches Material, vor allem im Verdünnungspuffer, muss vor Gebrauch vollständig gelöst sein. Proben vorsichtig mischen, nicht vortexen.

Vorbereitung der Standards

Die folgenden seriellen Verdünnungen in Verdünnungspuffer herstellen. Die verdünnten Standardlösungen **müssen 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30°C) inkubiert werden**.

Die Konzentration a (U/l) des Standards ist auf dem Etikett angegeben.

Konzentration (U/L)	8a	4a	2a	a	1/2a	1/4a	1/8a	0
Verdünnungsfaktor	10	250	500	1000	2000	4000	8000	16000
Standard [µl]	100	40	300	300	300	300	300	300
Puffer [µl]	900	960	300	300	300	300	300	300

Vorbereitung der Proben

Frische Proben

Serum als Probe verwenden und mit Verdünnungspuffer wie im Folgenden beschrieben verdünnen. Die Endverdünnung dieser Probe beträgt 1:2000.

- (1) Die Probe 1:50 verdünnen: zu 20 µl Probe 980 µL Verdünnungspuffer geben.
- (2) Diese 1:50-verdünnte Probe weiter 1:40 verdünnen: zu 20 µl der 1:50-verdünnten Probe 780 µL Verdünnungspuffer geben.
- (3) Diese Probenverdünnung **muss 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30°C) inkubiert werden**.

	1:50 Verdünnung	1:40 Verdünnung	Endverdünnung: 1:2000
Probe	20 µl	20 µl	Die Probenverdünnung nach 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30°C) weiter verwenden
Verdünnungspuffer	980 µl	780 µl	

Gelagerte Proben

Wenn die Proben nach Zugabe von Proben-Stabilisierungsreagenz gelagert wurden, werden diese mit Verdünnungspuffer wie im Folgenden beschrieben verdünnt. Die Endverdünnung dieser Probe ist 1:2000.

- (1) Die Probe 1:50 verdünnen: zu 20 µl Probe 980 µL Verdünnungspuffer geben.
- (2) Diese 1:50-verdünnte Probe weiter 1:30 verdünnen: zu 20 µl der 1:50-verdünnten Probe 580 µL Verdünnungspuffer geben.
- (3) Diese Probenverdünnung **muss 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30°C) inkubiert werden**.

	1:50 Verdünnung	1:30 Verdünnung	Endverdünnung: 1:2000
Probe	20 µl	20 µl	Die Probenverdünnung nach 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30°C) weiter verwenden
Verdünnungspuffer	980 µl	580 µl	

Testdurchführung

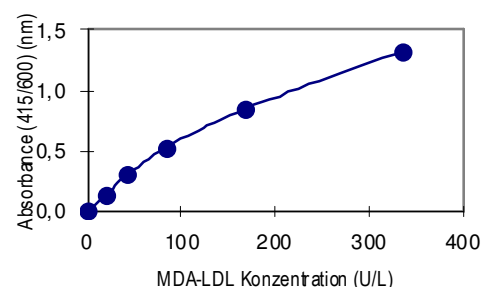
1. Die Vertiefungen 3mal mit je 300 µl Waschpuffer waschen. Tropfen entfernen indem die Platte 4-5mal umgekehrt auf einem Papiertuch ausgeklopft wird.
2. Je 100 µL verdünnter Standard oder verdünnte Probe in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren. Es wird empfohlen die Standards und Proben als Duplikate zu bestimmen. Mit der Azetat-Abdeckfolie bedecken und 2 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren.
3. Inhalt aus den Vertiefungen entfernen und 4mal mit 300 µl Waschpuffer waschen. Dieser Waschschritt kann entweder mit einem Plattenwaschgerät oder manuell durchgeführt werden. Zur manuellen Waschung den Waschpuffer mit einer Spülflasche oder Pipette in die Vertiefungen geben. Waschpuffer werfen und Tropfen entfernen indem die Platte 4-5mal umgekehrt auf einem Papiertuch ausgeklopft wird.
4. Je 100 µl Enzym-markierten anti-apolipoprotein B Antikörper in die Vertiefungen pipettieren, mit der Azetat-Abdeckfolie bedecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-30°C) inkubieren.
5. Vertiefungen wie unter Schritt 3 angegeben waschen.
6. Je 100 µl Substrat in die Vertiefungen pipettieren, mit der Azetat-Abdeckfolie bedecken und 2 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren.
7. Zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion je 100 µl Stopplösung in die Vertiefungen geben. Die Extinktion mit dem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 415 nm (optionale Referenz-Wellenlänge von 600 nm) messen.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Die Standardkurve wird erstellt, indem man die Mittelwerte der gemessenen Extinktionswerte (y-Achse) für die einzelnen Standards gegen die entsprechende Konzentration (x-Achse) aufträgt.
2. Die Konzentration der verdünnten Probe wird direkt aus der Standardkurve interpoliert.

Proben deren OD-Werte oberhalb des höchsten Standards liegen müssen nach Verdünnung erneut getestet werden, der entsprechende Verdünnungsfaktor ist bei der Konzentrationsbestimmung zu berücksichtigen.

Beispiel einer Standardkurve



ERWARTETE WERTE ⁹⁾

Männer (Alter unter 45 Jahre) und Frauen (Alter unter 55 Jahre):

64 ± 18 U/L (Mittelwert ± Stdabw.) (n=134)

Männer (Alter über 45 Jahre) und Frauen (Alter über 55 Jahre):

83 ± 22 U/L (Mittelwert ± Stdabw.) (n=122)

LEISTUNGSMERKMALE ⁹⁾

Sensitivität

- 1) Die Absorption der Pufferkontrolle (nur Verdünnungspuffer) liegt unter 0.15.
- 2) Die Absorption einer Probe mit bekannter MDA-LDL Konzentration liegt bei 0.4–1.8 pro 200 U MDA-LDL//L.

Präzision

Die Genauigkeit einer bekannten Konzentration liegt bei 80% bis 120%.

Die Interassay-Variation liegt unter 15%

Messbereich

Der Messbereich liegt bei 10–330 U/L

LITERATURHINWEISE

- 1) Kotani K., et al.: Biochim. Biophys. Acta 1215, 121 (1994).
- 2) Kotani K., et al.: Clinical Pathology (in Japanese) 45, 47 (1997).
- 3) Kotani K., et al.: Biological Sample Analysis (in Japanese) 20, 111 (1997).
- 4) Kondo A., et al.: Clin. Chem. 47, 893 (2001).
- 5) Sugano T., et al.: The Lipid (in Japanese) 9, 32 (1998).
- 6) Tanaga K., et al.: Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2, 662 (2002).
- 7) Kotani K.: Oxidative stress markers (in Japanese), p. 243, Japan Scientific Societies Press (2005).
- 8) Shigematsu S., et al.: Cir. J. 71, 1697 (2007).
- 9) In-house data of Sekisui Medical Co., Ltd.