




Gebrauchsanweisung


Homoarginine ELISA

Enzymimmunoassay für die
Quantitative Bestimmung von
Homoarginin in Plasma, Serum und Zellkulturproben

Nur für Forschungszwecke

REF EA205/96

 12 x 8

 2 – 8 °C











DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH
Adlerhorst 15 • 22459 Hamburg • Telefon: 040/ 555 87 10 • Fax: 040/ 555 87 111
Internet: <http://www.dld-diagnostika.de> • E-Mail: contact@dld-diagnostika.de

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Testprinzip.....	5
2	Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen.....	6
3	Änderungen	6
4	Lagerung und Stabilität der Reagenzien	7
5	Inhalt des Kits.....	7
6	Probengewinnung.....	9
7	Vorbereitung der Reagenzien.....	9
8	Testdurchführung.....	11
9	Auswertung und Beurteilung.....	15
10	Testcharakteristika.....	16
11	Literatur	17
	Pipettierschema - Plasma und Serum.....	19
	Pipettierschema – Zellkulturproben.....	20

Verwendete Symbole

	Inhalt		Verwendbar bis
	Chargenbezeichnung		Temperaturbegrenzung
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Bestellnummer		Gebrauchsanweisung beachten

Gefahrensymbole

	Gefahr		Achtung
---	--------	---	---------

1 Einleitung und Testprinzip

Homoarginin ist eine nicht-essentielle kationische Aminosäure, die aus Lysin gebildet wird und in vitro und in vivo ähnliche Eigenschaften wie Arginin zeigt.

Epidemiologische Untersuchungen in zwei großen unabhängigen Kohorten, nämlich Der Deutschen Diabetes Dialyse (4D) – Studie und der Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) - Studie haben Homoarginin als aussagekräftigen Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse und Sterblichkeit identifiziert. Niedrige Blutkonzentrationen von Homoarginin deuten auf eine erhöhte Mortalitätsrate hin. Sowohl die Gesamtmortalität als auch die kardiovaskuläre Mortalität verdoppeln sich bei sinkender Homoarginin-Konzentration.

Darüber hinaus ist die Homoarginin-Konzentration auch eng mit der Nierenfunktion verknüpft. Im Plasma mit Patienten mit dialysepflichtiger Niereninsuffizienz ist die Konzentration von Homoarginin um mehr als den Faktor 2 niedriger. Homoarginin könnte daher besonders für das Monitoring von Dialysepatienten nützlich sein.

Zitiert aus: J Lab Med, 2011; 35 (3): 153–159

Wir bieten ein Nachweisverfahren für Homoarginin in Plasma, Serum und Zellkulturproben an. Es ist ein kompetitiver ELISA im Mikrotiterplatten-Format. Der ELISA zeigt eine sehr gute Korrelation zur LC/MS und ist hervorragend geeignet zum Testen großer Serien von Proben. Der Assay ist nur für Forschungszwecke zu verwenden.

Homoarginin als Biomarker für das Mortalitätsrisiko ist zum Patent angemeldet: EP2533653A1.

Der neu entwickelte Homoarginin-ELISA ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay. An die Festphase gebundenes und freies, in Lösung befindliches Antigen, konkurrieren um eine definierte Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen. Wenn sich das System im Gleichgewicht befindet, wird der nicht-gebundene Antigen-Antikörper-Komplex in einem Waschschrift entfernt und der entsprechend gebundene Komplex mittels eines Peroxidase-Konjugats nachgewiesen und über den Umsatz von Tetramethylbenzidin (TMB) bestimmt. Die TMB/POD-Reaktion wird gestoppt und bei 450 nm gemessen. Die Konzentration des an die Festphase gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexes ist umgekehrt proportional zur Konzentration des Antigens in der Probe.

2 Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für Forschungszwecke. Nicht für in-vitro diagnostische Zwecke verwenden. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal.
- Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die tierischen Ursprungs sind, stammen von gesunden Tieren. Die Reagenzien sollten trotzdem wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Testbestecke sollten nicht ausgetauscht werden. Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten sind zu beachten.
- Beim Handhaben der Reagenzien, Kontrollen und Proben sind die gängigen Laborsicherheitsrichtlinien und die Gute Laborpraxis zu beachten.
- Während der Testdurchführung Kittel, Einmal-Handschuhe und Schutzbrille tragen.
- Ein Teil der Komponenten dieses Testbestecks enthalten Gefahrstoffe und sind kennzeichnungspflichtig. Diese Komponenten tragen das entsprechende Gefahrensymbol auf ihrem Etikett. Weitere Informationen befinden sich in 4. *Inhalt des Testbestecks* und auf den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern.
- Kontakt mit einzelnen Reagenzien vermeiden, diese können Reizungen und Verätzungen verursachen.
- Abfälle sollten nach den staatlichen und örtlichen Umweltschutzregularien entsorgt werden.

3 Änderungen

Version _7: Die Gebrauchsanweisung wurde neu formatiert. Abschnitt 2 wurde aktualisiert. Abschnitte 7, 8 und Pipettierschemata wurden um die Komponentenbezeichnung laut Etikett ergänzt, um die Zuordnung zu erleichtern. Es wurden keine Änderungen an den Komponenten oder an der Durchführung vorgenommen.

4 Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Der Kit ist bei Lagerung zwischen 2 – 8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach Anbruch ist der Kit bis zum Verfallsdatum haltbar. Zur Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Reagenzien siehe Vorbereitung der Reagenzien.

Alle Reagenzien müssen vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und sofort nach Gebrauch wieder kühl gestellt werden.

5 Inhalt des Kits

MT Streifen

STRIPS

12 Stück

Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar, beschichtet mit Homoarginin

Standards (1 - 6)

CAL 1 - 6

6 Flaschen

Je 4 ml, gebrauchsfertig, Konzentrationen:

Standard	1	2	3	4	5	6
µmol / l	0	0,3	0,8	1,6	3,2	7
ng / ml	0	56	151	301	602	1.318

Kontrolle 1 & 2

CON 1 & 2

2 Flaschen

Je 4 ml gebrauchsfertig, Konzentrationen: siehe QC-Zertifikat

Acylierungs-Reagenz

ACYL-REAG

3 Flaschen

lyophilisiert, Inhalt eines Fläschchens mit 3 ml Solvent lösen

Acylierungs-Puffer

ACYL-BUFF

1 Flasche

3,5 ml, gebrauchsfertig



Achtung

Solvent

SOLVENT

1 Flasche

10 ml, enthält DMSO



Gefahr

Antiserum 7 ml, gebrauchsfertig, gelb gefärbt, Kaninchen-anti-N-Acyl-Homoarginin	AS	1 Flasche
Enzymkonjugat 13 ml, gebrauchsfertig, Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase	CONJ	1 Flasche
Waschpuffer 20 ml, Konzentrat, (50 x)	WASH	1 Flasche
Substrat 13 ml TMB Lösung, gebrauchsfertig	SUB	1 Flasche
Stopplösung 13 ml, gebrauchsfertig, enthält 0,3M Schwefelsäure	STOP	1 Flasche
Reaktionsplatte für die Acylierung	ACYL-PLATE	1 Stück
Ausgleichsreagenz lyophilisiert, mit 21 ml dest. Wasser lösen vorsichtig mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden	EQUA-REAG	1 Flasche
Folie gebrauchsfertig	FOIL	2 Stück

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten für 20, 50, 100 und 200 µl
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Destilliertes Wasser
- Photometer für die Auswertung von Mikrotiterplatten (450 nm)
- Horizontal-Schüttler

6 Probengewinnung

Wiederholtes Einfrieren und Wiederauftauen sollte vermieden werden.

6.1 Plasma und Serum

Für den Test kann Serum oder EDTA-Plasma eingesetzt werden. Hämolytische, ikterische und insbesondere lipämische Proben sollten im Assay nicht eingesetzt werden.

Die Proben können bis zu 6 Stunden bei 2 – 8 °C gelagert werden. Proben, die nicht sofort in dem Test eingesetzt werden, können bei -20 °C mindestens 18 Monate gelagert werden.

6.2 Zellkultur

Zellkulturmedien wie DMEM und RPMI können im Test verwendet werden.

Weitere Zellkulturmedien sind vom Anwender zu testen.

7 Vorbereitung der Reagenzien

7.1 MT-Streifen

Mikrotiterstreifen **STRIPS** im geschlossenen Folienbeutel in etwa 10 Minuten auf Raumtemperatur bringen. Die nicht benötigten Mikrotiterstreifen dem Halterahmen entnehmen, wieder in den Beutel legen (das Trockenmittel im Beutel belassen) und diesen **sorgfältig** verschließen.

7.2 Waschpuffer

Inhalt des Fläschchens **WASH** mit destilliertem Wasser auf 1.000 ml auffüllen und kurz mischen.

Der verdünnte Waschpuffer muss für den späteren Gebrauch bei 2 – 8 °C gelagert werden und bleibt so für 4 Wochen verwendbar. Für eine Lagerung bis zum Verfallsdatum muss der verdünnte Waschpuffer bei -20 °C eingefroren werden.

7.3 Ausgleichsreagenz

Inhalt des Fläschchens **EQUA-REAG** mit 21 ml destilliertem Wasser lösen, kurz vortexen und mindestens 20 Minuten auf den Rollmischer oder ähnlichem Schüttler mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden.

Das gelöste Ausgleichsreagenz muss für den späteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren werden und bleibt so bis zum Verfallsdatum verwendbar.

7.4 Acylierungsreagenz

Inhalt des Fläschchens **ACYL-REAG** mit 3 ml Solvent **SOLVENT** lösen und mindestens 10 Minuten auf den Rollenmischer oder ähnlichem Schüttler mischen. Das Acylierungsreagenz sollte unmittelbar vor Testbeginn frisch angesetzt werden und ist dann mind. 3 Stunden stabil. Durch die 2. und 3. Flasche im Kit ist der ELISA in zwei oder drei Ansätzen teilbar. Wenn der Kit in einem Ansatz verbraucht wird, den aufgelösten Inhalt von zwei Fläschchen poolen. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

8 Testdurchführung

8.1 Testdurchführung für Plasma und Serum

Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen und sorgfältig mischen, dabei Schaumbildung vermeiden. Es wird empfohlen, Doppelbestimmungen durchzuführen.

8.1.1 Probenvorbereitung (Acylierung) für Plasma und Serum

Die für die Acylierung verwendeten Vertiefungen der Reaktionsplatte **ACYL-PLATE** markieren (Edding) und nicht noch einmal verwenden!

1. Je 20 µl Standard 1 bis 6 **CAL 1 - 6**, je 20 µl Kontrolle 1 & 2 **CON 1& 2** und je 20 µl Probe in die jeweiligen Vertiefungen der im Kit enthaltenen Reaktionsplatte **ACYL-PLATE** pipettieren.
2. Je 20 µl Acylierungspuffer **ACYL-BUFF** in jede Vertiefung pipettieren.
3. Je 200 µl Ausgleichsreagenz **EQUA-REAG** in jede Vertiefung pipettieren. Platte 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
4. Je 50 µl frisch angesetztes Acylierungsreagenz **ACYL-REAG** in jede Vertiefung pipettieren und sofort mit Punkt 5. fortfahren.
Farbe wechselt zu violett.

Achtung

Acylierungsreagenz reagiert mit vielen Plastikmaterialien, z.B. Plastikschälchen. Acylierungsreagenz reagiert nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen.

Bitte Multipetten oder Ähnliches verwenden, das Acylierungsreagenz direkt aus dem Fläschchen aufziehen und pipettieren

5. 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.

Je 20 µl der so vorbereiteten Proben werden in den Homoarginin-ELISA eingesetzt.

8.1.2 ELISA für Plasma und Serum

1. Je 20 µl acylierte Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen **STRIPS** pipettieren.
2. 50 µl Antiserum **AS** in jede Vertiefung pipettieren.
3. Platte mit Folie **FOIL** abkleben und 90 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen
4. Vertiefungen entleeren, mit ca. 300 µl verdünntem Waschpuffer **WASH** füllen und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Diesen Vorgang insgesamt 4 mal durchführen.
Alternativ kann auch ein Waschgerät verwendet werden.
5. 100 µl Enzymkonjugat **CONJ** in jede Vertiefung pipettieren.
6. 25 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
7. Waschen: Wie unter Punkt 4. beschrieben.
8. 100 µl Substrat **SUB** in jede Vertiefung pipettieren.
9. 25 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
10. 100 µl Stopplösung **STOP** in jede Vertiefung pipettieren, kurz mischen.
11. Platte im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) innerhalb von 15 Minuten messen.

8.2 Testdurchführung für Zellkulturproben

Die Probenvorbereitung und die Durchführung des ELISAs für Zellkulturproben muss in einem separaten Ansatz vorgenommen werden und kann nicht zusammen mit Plasma- und Serumproben erfolgen. Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen und sorgfältig mischen, dabei Schaumbildung vermeiden. Es wird empfohlen, Doppelbestimmungen durchzuführen.

8.2.1 Probenvorbereitung (Acylierung) für Zellkulturproben

1. Je 20 µl Standard 1 bis 6 **CAL 1 - 6**, Kontrolle 1 & 2 **CON 1 & 2** und Zellkulturprobe in die entsprechenden Vertiefungen der Reaktionsplatte pipettieren.
2. 20 µl Standard 1 **CAL 1** in jede Vertiefung mit Zellkulturproben pipettieren (Matrixausgleich).
3. 20 µl Zellkulturmedium in jede Vertiefung mit Standards und Kontrollen pipettieren (Matrixausgleich).
Nicht in Vertiefungen mit Zellkulturproben pipettieren.
4. 20 µl Acylierungspuffer **ACYL-BUFF** in jede Vertiefung pipettieren.
5. 200 µl gelöstes Ausgleichsreagenz **EQUA-REAG** in jede Vertiefung pipettieren.
Platte 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
6. Je 50 µl frisch angesetztes Acylierungsreagenz **ACYL-REAG** in jede Vertiefung pipettieren und sofort mit Punkt 7. fortfahren.
Farbe wechselt zu violett.

Achtung

Acylierungsreagenz reagiert mit vielen Plastikmaterialien, z.B. Plastikschrälchen. Acylierungsreagenz reagiert nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen.

Bitte Multipipette oder Ähnliches verwenden, das Acylierungsreagenz direkt aus dem Fläschchen aufziehen und pipettieren.

7. 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.

Je 20 µl der so vorbereiteten Proben werden in den Homoarginin ELISA eingesetzt.

8.2.2 ELISA für Zellkulturproben

1. Je 20 µl acylierte Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen **STRIPS** pipettieren.
2. 50 µl Antiserum **AS** in jede Vertiefung pipettieren.
3. Platte mit Folie **FOIL** abkleben und 90 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
4. Vertiefungen entleeren, mit ca. 300 µl verdünntem Waschpuffer **WASH** füllen und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Diesen Vorgang insgesamt 4 mal durchführen.
Alternativ kann auch ein Waschgerät verwendet werden.
5. 100 µl Enzymkonjugat **CONJ** in jede Vertiefung pipettieren.
6. 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
7. Waschen: Wie unter Punkt 4. beschrieben.
8. 100 µl Substrat **SUB** in jede Vertiefung pipettieren.
9. 30 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
10. 100 µl Stopplösung **STOP** in jede Vertiefung pipettieren, kurz mischen.
11. Platte im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) innerhalb von 15 Minuten messen.

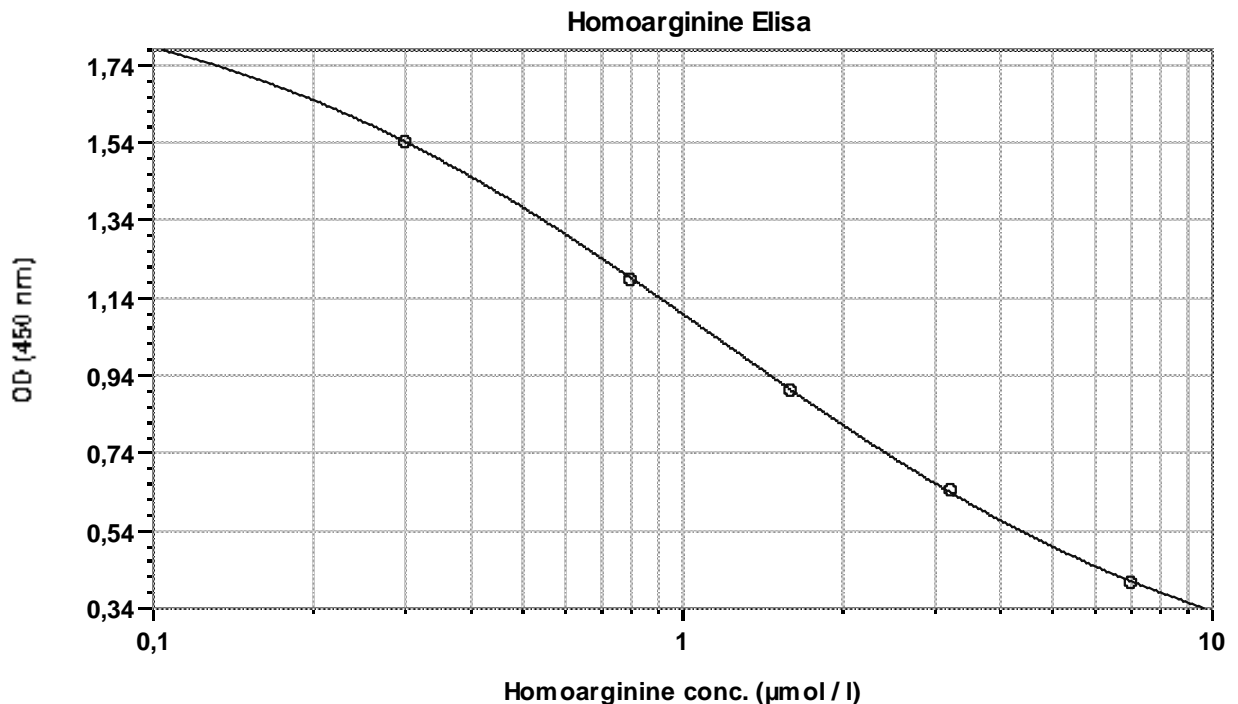
9 Auswertung und Beurteilung

Die OD-Werte der Standards (linear) werden gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen.

Bei Verwendung eines Computerprogramms wird die 4-Parameter-Analyse empfohlen. Alternativ kann auch die Cubic-Spline-Methode oder die Logit-Log-Berechnung verwendet werden.

Die Konzentrationen der Kontrollen und Proben können dann direkt aus der Eichkurve in $\mu\text{mol/l}$ abgelesen werden.

Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve.



	$y = ((A - D)/(1 + (x/C)^B)) + D:$	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>R²</u>
○ Std (Standards: Concentration vs MeanValue)		1,979	0,883	1,167	0,086	1

Qualitätskontrolle: Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn die Kitkontrollen innerhalb der Bereiche entsprechend des QC Zertifikates liegen. Ansonsten sollte der Test wiederholt werden.

10 Testcharakteristika

10.1 Referenzbereiche

Dieser Assay ist nur für Forschungszwecke bestimmt. Die nachstehenden Werte sind nicht für diagnostische Verfahren bestimmt. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche erstellt.

Matrix	Referenzbereich
EDTA-Plasma, Serum	2,0 ± 0,7 µmol / l

10.2 Sensitivität

Untere Nachweisgrenze	Berechnung
0,05 µmol / l	ODCal1 – 3 x SD

10.3 Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

Substanz	Kreuzreaktivität (%)
Homoarginin	100
Arginin	0,025
ADMA	< 0,025
SDMA	< 0,025
Monomethylarginin (NMMA)	< 0,025

10.4 Wiederfindung nach Spiken

Matrix	Bereich (µmol / l)	Mittelwert (%)	Bereich (%)
EDTA-Plasma	0,66 – 6,70	95	87 - 104
Serum	1,51 – 5,10	103	97 - 107
Zellkultur	0,52 – 4,12	96	87 - 100

10.5 Linearität

Matrix	Bereich (µmol / l)	Höchste Verd.	Mittelwert (%)	Bereich (%)
EDTA-Plasma	0,48 – 3,76	1 : 7 mit Wasser	99	89 - 105
Serum	0,39 – 2,68	1 : 7 mit Wasser	103	96 - 109
Zellkultur	0,30 – 3,30	1 : 10 mit Wasser	101	91 - 108

10.6 Reproduzierbarkeit

Matrix	Bereich (µmol / l)	Intra-Assay-Vk
EDTA-Plasma	0,83 – 2,23	6,1 – 3,3 %
Serum	1,30 – 2,73	4,6 – 5,6 %
Zellkultur	1,59 – 3,33	6,2 – 4,7 %

10.7 Methodenvergleich

Matrix	Vergleichsmethode oder Matrix	Korrelation
EDTA-Plasma	LC/MS	Y = 0,98 x LC/MS + 0,12; R = 0,998; N = 25
Serum	Plasma	Y = 1,00 x Plasma + 0,11; R = 0,965; N = 12

11 Literatur

- Meinitzer, Ch Drechsler, A. Tomaschitz, S. Pilz, V. Krane, Ch. Wanner, W. März
Homoarginin, ein neuer kardiovaskulärer Risikomarker bei Dialysepatienten
J. Lab. Med. 2011, 35 (3): 153 -159, copy 2011 by Walter de Gruyter, Berlin, Boston
- W. März, A. Meinitzer, Ch. Drechsler, S. Pilz, V. Krane, M.E. Kleber, J. Fischer, B.R. Winkelmann, B.O. Böhm, E. Ritz, Ch. Wanner.
Homoarginine, Cardiovascular Risk and Mortality
Circulation 2010, 122: 967-975
- Pietro Ravani, Renke Maas, Fabio Malberti, Paola Pecchini, Maren Mieth, Robert Quinn, Giovanni Tripepi, Francesca Mallamaci, Carmine Zoccali
Homoarginine and Mortality in Pre-Dialysis Chronic Kidney Disease (CKD) Patients
Plos One; September 2013, Volume 8, Issue 9: 1-6
- Ch. Drechsel, B. Kolleritz, A. Meinitzer, W. März, E. Ritz, P. König, U. Neyer, S. Pilz, Ch. Wanner, F. Kronenberg
Homoarginine and Progression of Chronic Kidney Disease: Results from the Mild to Moderate Kidney Disease Study
May 2013; Plos One, 10, 1371
- A.A. Khalil, D. Tsikas, R. Akolekar, J. Jordan, K.H. Nicolaides
Asymmetric dimethylarginine, arginine and homoarginine at 11-13 weeks' gestation and preeclampsia: a case control study.
J. of Human Hypertension January 2013 27; 38-43
- A. Jazwinska-Kozuba, J. Martens-Lobenhoffer, O. Kruszelnicka, J. Rycaj, B. Chyrchel, A. Surdacki, S. M. Bode-Böger
Opposite Associations of Plasma Homoarginine and Ornithine with Arginine in Healthy Children and Adolescents
Int. J. Mol. Sci. 2013, 14, 21819-21832
- Choe CU, Atzler D, Wild PS, Carter AM, Böger RH, Ojeda F, Simova O, Stockebrand M, Lackner K, Nabuurs C, Marescau B, Streichert T, Müller C, Lüneburg N, De Deyn PP, Benndorf RA, Baldus S, Gerloff C, Blankenberg S, Heerschap A, Grant PJ, Magnus T, Zeller T, Isbrandt D, Schwedhelm E

Homoarginine levels are regulated by L-arginine: glycine amidinotransferase and affect stroke outcome; results from human and murine studies

Circulation, 2013 Sep 24, 128 (13) 1451-1461

- van der Zwan, L., Davids, M., Scheffer, P.; et al.
L-Homoarginine and L-arginine are antagonistically related to blood pressure in an elderly population: the Hoorn study
Journal of Hypertension 2013: 31:1114–1123

Pipettierschema - Plasma und Serum**Probenvorbereitung**

		Standards	Kontrollen	Plasma	Serum
ACYL-PLATE:					
CAL 1 – 6	µl	20			
CON 1 & 2	µl		20		
Plasma	µl			20	
Serum	µl				20
ACYL-BUFF	µl	20	20	20	20
EQUA-REAG	µl	200	200	200	200

Platte 10 Sekunden schütteln

ACYL-REAG	µl	50	50	50	50
-----------	----	----	----	----	----

Sofort 15 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

ELISA

		Acyl. Standards	Acyl. Kontrollen	Acyl. Proben
STRIPS:				
Übertragung von ACYL-PLATE in STRIPS	µl	20	20	20
AS	µl	50	50	50

Platte mit FOIL abkleben.

90 Minuten bei Raumtemperatur schütteln, 4 x Waschen

CONJ	µl	100	100	100
------	----	-----	-----	-----

25 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

SUB	µl	100	100	100
-----	----	-----	-----	-----

25 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

STOP	µl	100	100	100
------	----	-----	-----	-----

Messung der Extinktion bei 450 nm (Ref 570 – 650 nm)

Pipettierschema – Zellkulturproben

Probenvorbereitung

		Standards	Kontrollen	Zellkulturproben
ACYL-PLATE:				
CAL 1 – 6	µl	20		
CON 1 & 2	µl		20	
Zellkulturprobe	µl			20
CAL 1	µl			20
Zellkultur Medium	µl	20	20	
ACYL-BUFF	µl	20	20	20
EQUA-REAG	µl	200	200	200

Platte 10 Sekunden schütteln

ACYL-REAG	µl	50	50	50
-----------	----	----	----	----

Sofort 15 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

ELISA

		Acyl. Standards	Acyl. Kontrollen	Acyl. Proben
STRIPS:				
Übertragung von ACYL-PLATE in STRIPS	µl	20	20	20
AS	µl	50	50	50

Platte mit FOIL abkleben.

90 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

CONJ	µl	100	100	100
------	----	-----	-----	-----

30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

SUB	µl	100	100	100
-----	----	-----	-----	-----

30 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

STOP	µl	100	100	100
------	----	-----	-----	-----

Messung der Extinktion bei 450 nm (Ref 570 – 650 nm)