



## Gebrauchsanweisung


# Homoarginine ELISA


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

**RUO**

Nur für Forschungszwecke

**REF** EA205/96

 12 x 8










 2 – 8 °C



## Inhaltsverzeichnis

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

## Verwendete Symbole

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

Die Symbole der Komponenten des Kits sind in Kapitel 4 *Inhalt des Testkits* beschrieben.

## 1 Warnhinweis

### **ACHTUNG: WICHTIGER PATENTRECHTLICHER HINWEIS (Deutscher Teil des Europäischen Patents EP 2 533 653 B1)**

Der von uns angebotene/gelieferte Homoarginin ELISA Kit ist dazu geeignet, in einem Verfahren zum Bestimmen des Mortalitätsrisikos eines Patienten verwendet zu werden, bei dem die Menge an Homoarginin oder seinen metabolischen Vorläufern in einer Probe des Patienten bestimmt wird und die bestimmte Menge mit einer Referenzmenge verglichen wird.

Wir weisen ausdrücklich darauf hin, dass das

VERGLEICHEN DER MIT DIESEM HOMOARGININ ELISA KIT BESTIMMTEN MENGE AN HOMOARGININ ODER EINES METABOLISCHEN VORLÄUFERS DAVON MIT EINER REFERENZMENGE, WOBEI DAS MORTALITÄTSRISIKO IN DEM PATIENTEN BESTIMMT WIRD

im Geltungsbereich des deutschen Teils des Europäischen Patents EP 2 533 653 B1 liegt und für die Patentinhaberin, die Immundiagnostik AG, patentrechtlich geschützt ist und **daher der separaten Zustimmung der Patentinhaberin bedarf.**

**Die Verwendung dieses Homoarginin ELISA Kits für das beschriebene Mortalitätsrisikobestimmungsverfahren ohne Zustimmung der Patentinhaberin stellt eine Patentverletzung dar.**

## 2 Einleitung und Testprinzip

Der Homoarginin ELISA Kit enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von derivatisiertem Homoarginin in EDTA-Plasma,- Serum- und Zellkulturproben. Die Derivatisierung erfolgt während der Probenvorbereitung. Dabei wird Homoarginin durch das Acylierungsreagenz quantitativ in N-Acylhomoarginin umgewandelt.

Der 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 Anti-Kaninchen-IgG-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.

## 3 Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für Forschungszwecke. Nicht für in-vitro diagnostische Zwecke verwenden. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal.
- Wichtigen patentrechtlichen Warnhinweis beachten.
- Vor der Testdurchführung sollte die Gebrauchsanweisung vollständig gelesen und deren Inhalt verstanden worden sein. Die gültige Version aus dem Kit verwenden.
- Alle Reagenzien dieses Kits, die tierischen Ursprungs sind, stammen von gesunden Tieren. Die Reagenzien sollten trotzdem wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Kits 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 Kits enthalten Gefahrstoffe und sind kennzeichnungspflichtig. Diese Komponenten tragen das entsprechende Gefahrensymbol auf ihrem Etikett. Weitere Informationen befinden sich in 4. Inhalt des Kits und auf den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern.
- Vermeiden Sie alle Handlungen, die zu einem Verschlucken, Einatmen oder Injizieren der Reagenzien führen könnten. Niemals mit dem Mund pipettieren.
- Kontakt mit einzelnen Reagenzien vermeiden, diese können Reizungen und Verätzungen verursachen.
- Abfälle sollten nach den staatlichen und örtlichen Umweltschutzregularien entsorgt werden.
- Zerbrochenes Glas kann zu Verletzungen führen. Vorsicht bei Glasgefäßen.

#### **4 Änderungen**

Version \_10: Ergänzungen/Änderungen sind in grau unterlegt.

Version \_9: Warnhinweis bzgl. Patent eingefügt.

Version \_8: Ergänzungen/Änderungen sind in grau unterlegt.





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.


## 5 Lagerung und Haltbarkeit

Der Kit wird bei Umgebungstemperatur geliefert und ist anschließend bei Lagerung zwischen 2 – 8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach Anbruch ist der Kit bis zum Verfallsdatum haltbar. Die Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Reagenzien ist auf dem jeweiligen Flaschenetikett angegeben. 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.

## 6 Inhalt des Kits

<b>MT Streifen</b>	<b>STRIPS</b>		12 Stück
Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar, beschichtet mit Homoarginin			
<b>Standards (1 - 6)</b>	<b>CAL 1 - 6</b>		6 Flaschen
Je 4 ml, gebrauchsfertig			
<b>Kontrolle 1 &amp; 2</b>	<b>CON 1 &amp; 2</b>		2 Flaschen
Je 4 ml gebrauchsfertig, Konzentrationen: siehe QC-Zertifikat			
<b>Acylierungs-Reagenz</b>	<b>ACYL-REAG</b>		3 Flaschen
3ml, lyophilisiert, mit Solvent lösen			
<b>Acylierungs-Puffer</b>	<b>ACYL-BUFF</b>		1 Flasche
3,5 ml, gebrauchsfertig, blau gefärbt			
			Achtung
<b>Solvent</b>	<b>SOLVENT</b>		2 Flaschen
10 ml, gebrauchsfertig, enthält DMSO			
			Gefahr
			Achtung
<b>Antiserum</b>	<b>AS</b>		1 Flasche
7 ml, gebrauchsfertig, gelb gefärbt, Kaninchen-anti-N-Acyl-Homoarginin			
			Achtung

<b>Enzymkonjugat</b> 13 ml, gebrauchsfertig, Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase	<b>CONJ</b>		1 Flasche <b>Achtung</b>
<b>Waschpuffer</b> 20 ml, Konzentrat, (50 x)	<b>WASH</b>		1 Flasche
<b>Substrat</b> 13 ml TMB Lösung, gebrauchsfertig	<b>SUB</b>		1 Flasche
<b>Stopplösung</b> 13 ml, gebrauchsfertig, enthält 0,3M Schwefelsäure	<b>STOP</b>		1 Flasche
<b>Reaktionsplatte</b> für die Acylierung	<b>ACYL-PLATE</b>		1 Stück
<b>Ausgleichsreagenz</b> lyophilisiert, mit 21 ml dest. Wasser lösen	<b>EQUA-REAG</b>		1 Flasche
<b>Folie</b> gebrauchsfertig	<b>FOIL</b>		2 Stück

**Zusätzliches Material (nicht im Kit enthalten):**

- Pipetten für 20, 50, 100 und 200 µl
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- **Multipette**
- Destilliertes Wasser
- **Vortex-Mischer**
- **Rollenmischer**
- Photometer für die Auswertung von Mikrotiterplatten (450 nm)
- Horizontal-Schüttler
- **Papiertücher, Pipettenspitzen, Stoppuhr**

## 7 Probengewinnung und -lagerung

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

### 7.1 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.

### 7.2 Zellkultur

Zellkulturmedien wie DMEM und RPMI können im Test verwendet werden. Weitere Zellkulturmedien sind vom Anwender zu testen.

## 8 Vorbereitung der Reagenzien

Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.

### 8.1 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.

### 8.2 Waschpuffer

Inhalt (20 ml) des Waschpufferkonzentrates (50x) **WASH** mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 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.

Wird der Kit in mehreren Ansätzen verwendet, sollte nur die dafür benötigte Menge Waschpuffer angesetzt werden.

### 8.3 Ausgleichsreagenz

Inhalt des Fläschchens **EQUA-REAG** mit 21 ml destilliertem Wasser lösen, kurz vortexen und mindestens 20 Minuten auf dem 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.

#### 8.4 Acylierungsreagenz

Benötigte Fläschchen Acylierungs-Reagenz **ACYL-REAG** dem Folienbeutel entnehmen, die übrigen Fläschchen im Folienbeutel zusammen mit dem Trockenmittel belassen und sorgfältig verschließen. Zur Rekonstitution des lyophilisierten Acylierungs-Reagenzes den Inhalt des Fläschchens 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.

## 9 Testdurchführung

Es wird empfohlen, Doppelbestimmungen durchzuführen.

Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen und sorgfältig mischen, dabei Schaumbildung vermeiden.

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

### 9.1 Testdurchführung für EDTA-Plasma und Serum

#### 9.1.1 Probenvorbereitung (Acylierung) für EDTA-Plasma und Serum

1. Je 20 µl Standard 1 bis 6 **CAL 1 - 6**, je 20 µl Kontrolle 1 & 2 **CON 1& 2** und je 20 µl EDTA-Plasma bzw. Serum 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 **gelöstes** Ausgleichsreagenz **EQUA-REAG** (s. 8.3) in jede Vertiefung pipettieren. Platte 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler **bei mittlerer Schüttelfrequenz** schütteln.
4. Je 50 µl frisch angesetztes Acylierungsreagenz **ACYL-REAG** (s. 8.4) in jede Vertiefung pipettieren und **sofort** mit dem nächsten Punkt fortfahren. Farbe wechselt zu violett.

Achtung: Acylierungsreagenz reagiert mit vielen Plastikmaterialien, z.B. Plastikschälchen, aber 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 **(20 – 25 °C)** auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.

**Je 20 µl werden im ELISA eingesetzt.**

### 9.1.2 ELISA für EDTA-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** (s. 8.2) füllen und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (**Papiertuch**) 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 (**20 – 25 °C**) 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 und **mindestens 10 Sekunden** auf einem Horizontalschüttler mischen.
11. Platte im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) innerhalb von 15 Minuten messen.

## 9.2 Testdurchführung für Zellkulturproben

Die Probenvorbereitung und die Durchführung des ELISAs für Zellkulturproben muss in einem separaten Ansatz vorgenommen werden und kann nicht zusammen mit EDTA-Plasma- und Serumproben erfolgen.

### 9.2.1 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 [ACYL-PLATE] 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] (s. 8.3) in jede Vertiefung pipettieren. Platte 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz schütteln.
6. 50 µl gelöstes Acylierungsreagenz [ACYL-REAG] (s. 8.4) in alle Vertiefungen pipettieren und **sofort** mit dem nächsten Punkt fortfahren. Farbe wechselt zu violett.

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

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

7. 15 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.

**Je 20 µl werden im ELISA eingesetzt.**

## 9.2.2 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 **Haftklebefolie 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** (s. 8.2) füllen und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (**Papiertuch**) 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 (20 – 25 °C) 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 **und mindestens 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler** mischen.
11. Platte im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) innerhalb von 15 Minuten messen.

## 10 Auswertung und Beurteilung

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

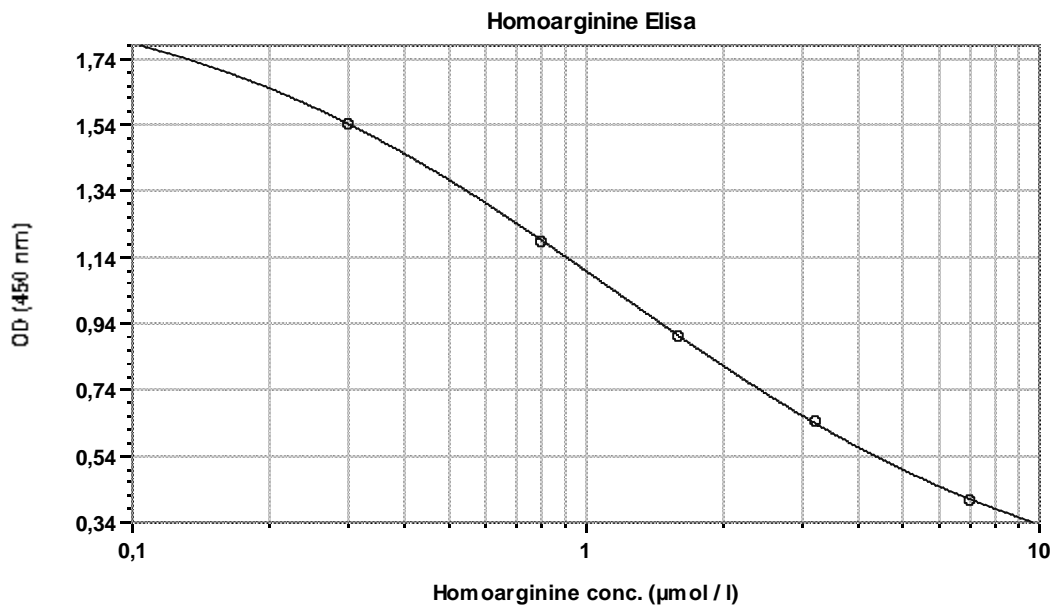
Umrechnung: Homoarginin: 1μmol/l = 188,23 ng/ml

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 μmol/l abgelesen werden.

Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve.



$y = ((A - D)/(1 + (x/C)^B)) + D$ :      **A**      **B**      **C**      **D**      **R<sup>2</sup>**  
 ○ 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.

## 11 Testcharakteristika

### 11.1 Sensitivität

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

### 11.2 Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

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

### 11.3 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

### 11.4 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

### 11.5 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 %

### 11.6 Methodenvergleich

Matrix	Vergleichsmethode oder Matrix	Korrelation
EDTA-Plasma	LC/MS	$Y = 0,98 \times \text{LC/MS} + 0,12$ ; $R = 0,998$ ; $N = 25$
Serum	EDTA-Plasma	$Y = 1,00 \times \text{Plasma} + 0,11$ ; $R = 0,965$ ; $N = 12$

### 11.7 Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgt durch Einwaage der Reinsubstanz.

## 11.8 Grenzen der Methode

Die Ergebnisse sind nur für Forschungszwecke geeignet.

Proben, die oberhalb des höchsten Standards gemessen wurden, müssen mit Wasser (s. 11.4 Linearität) verdünnt und erneut bestimmt werden.

Die Werte von verdünnten Proben müssen mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

## 11.9 Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

## 12 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. Nicolaidis  
**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
- Franczyk-Skóra, B., Gluba, A., Banach, M.; et al. (2012):  
**Prevention of sudden cardiac death in patients with chronic kidney disease**  
*BMC Nephrology* 13:162
- Davids, M., Ndika, J., Salomons, G.; et al. (2012):  
**Promiscuous activity of arginine:glycine amidinotransferase is responsible for the synthesis of the novel cardiovascular risk factor homoarginine**  
*FEBS Letters* 586 3653–3657
- Valtonen, P., Laitinen, T., Lyyra-Laitinen, T.; et al. (2008):  
**Serum L-Homoarginine Concentration is Elevated During Normal Pregnancy and is Related to Flow-Mediated Vasodilatation**  
*Circulation Journal Vol.72*, 1879– 1884
- Edzard Schwedhelm, Kathrin Cordts, Eileen Moritz, Reinhard Wesemann, Chi-un Choe, Rainer Böger, Till Ittermann, Marcus Dörr, Nele Friedrich, Martin Bahls  
**Edzard Schwedhelm, Kathrin Cordts, Eileen Moritz, Reinhard Wesemann, Chi-un Choe, Rainer Böger, Till Ittermann, Marcus Dörr, Nele Friedrich, Martin Bahls**  
*The Journal of Applied Laboratory Medicine*, Volume 7, Issue 6, November 2022, Pages 1272–1282
- Kathrin Cordts, Dorothee Atzler, Vazhma Qaderi, Karsten Sydow, Rainer H Böger, Chi-Un Choe, Edzard Schwedhelm  
**Measurement of homoarginine in human and mouse plasma by LC-MS/MS and ELISA: a comparison and a biological application**  
*Amino Acids*. 2015 Sep; 47(9): 2015-22.

**Pipettierschema - EDTA-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
------	----	-----	-----	-----

**Platte mindestens 10 Sekunden schütteln**

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
------	----	-----	-----	-----

Platte mindestens 10 Sekunden schütteln

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