DIAGNOSTIKA GMBH

Arbeitsanleitung

ADMA ELISA

Enzymimmunoassay
für die quantitative Bestimmung von
endogenem asymmetrischen Dimethyl-Arginin (ADMA)
in Serum oder EDTA-Plasma

CE

IVD

REF EA201/96

Σ 12 x 8

+2 +8 °C 2 – 8 °C

DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH
Adlerhorst 15 • 22459 Hamburg • Tel 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	Seite	5
2.	Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Seite	6
3.	Lagerung und Haltbarkeit	Seite	6
4.	Inhalt des Testbestecks	Seite	7
5.	Probengewinnung	Seite	8
6.	Vorbereitung der Reagenzien und Proben	Seite	9
7.	Testdurchführung ELISA	Seite	11
8.	Auswertung und Beurteilung	Seite	12
9.	Testcharakteristika	Seite	13
10.	Literatur	Seite	17
	Pipettierschema Probenvorbereitung	Seite	19
	Pipettierschema ELISA	Seite	20

Verwendete Symbole

I V D	In-Vitro-Diagnostikum	CE	CE markiert
CONT	Inhalt		Verwendbar bis
LOT	Chargenbezeichnung	+2 +8 °C	Temperaturbegrenzung
	Hersteller	Σ	Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
REF	Bestellnummer		Gebrauchsanweisung beachten

Gefahrensymbole

Gefahr

Achtung

1. Einleitung und Testprinzip

Die endogenen Methyl-Arginine ADMA und SDMA sind Derivate der Aminosäure L-Arginin. L-Arginin ist die Vorstufe zur Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) im menschlichen Körper. NO wiederum ist ein wichtiger physiologischer Mediator im Herz-Kreislaufsystem und in anderen Organsystemen, der an der Regulation von Blutdruck und Gefäßwiderstand, Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten, Adhäsion von Leukozyten und Monozyten und der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen beteiligt ist. NO spielt auch eine wichtige physiologische Rolle bei der Erektion. Bei Herz-Kreislauferkrankungen wie Arteriosklerose, Hypercholesterinämie, Hypertonie, chronischer Herzinsuffizienz, bei Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus, bei Präeklampsie, bei erektiler Dysfunktion und anderen Erkrankungen kommt es zur Abschwächung der biologischen Wirkungen von NO, wodurch das Fortschreiten dieser Erkrankungen und der begleitenden Gefäßläsionen beschleunigt wird. Durch die Gabe von L-Arginin kann diesem Geschehen entgegengewirkt werden.

In mehren klinischen und experimentellen Untersuchungen (s. Literatur-übersicht) konnte gezeigt werden, dass es bei den genannten Erkrankungen zu einem Ansteigen der Konzentration des endogenen L-Arginin-Analogons ADMA im Plasma oder Serum kommen kann. Erhöhte ADMA-Konzentrationen sind somit ein für das zukünftige Fortschreiten o.a. Erkrankungen prognostisch relevanter Faktor.

Die verfügbaren Messverfahren zur quantitativen Bestimmung von ADMA und SDMA in Plasma, Serum, Urin und anderen biologischen Flüssigkeiten basierten allesamt auf dem chemischen Nachweisverfahren der Hochdruck-Flüssigkeitschromatografie (HPLC). Diese Methode ist jedoch sehr zeit- und personalintensiv, teuer, und somit für die klinische Routinediagnostik nicht geeignet.

Der ADMA-ELISA Kit enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von derivatisiertem ADMA (asymmetrisches Dimethyl-Arginin) in Serum oder EDTA-Plasma. Die Derivatisierung erfolgt während der Probenvorbereitung. Dabei wird ADMA durch das Acylierungsreagenz quantitativ in N-Acyl-ADMA umgewandelt.

Der von der DLD Diagnostika GmbH neu entwickelte ADMA-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 Waschschritt 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

- Dieser Kit ist lediglich zum in vitro-Gebrauch bestimmt.
- Die angegebenen Verfallsdaten sind unbedingt zu beachten.
- Die Reagenzien bis zur Verwendung bei 2 - 8 °C lagern.
- Während der Testdurchführung Einmal-Handschuhe tragen.
- Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die tierischen Ursprungs sind, stammen von gesunden Tieren, die von einer zertifizierten Stelle untersucht wurden. Die Reagenzien sollten trotzdem wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Ein Teil der Komponenten dieses Testbestecks sind kennzeichnungspflichtig. Diese Komponenten tragen das entsprechende Gefahrensymbol auf ihrem Etikett.

3. Lagerung und Haltbarkeit

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.

4. Inhalt des Testbesteckes

4.1 **MT-Streifen** **STRIPS** 12 Stück
Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen,
einzeln abbrechbar, beschichtet mit ADMA

4.2 **Standards 1-6** **CAL 1 - 6** 6 Fläschchen
Je 4 ml, gebrauchsfertig
Konzentrationen:

Standard	1	2	3	4	5	6
µmol/l	0	0,1	0,3	0,6	1,0	5,0

4.3 **Kontrolle 1 & 2** **CON 1 & 2** 2 Fläschchen
Je 4 ml, gebrauchsfertig
Bereich: Siehe Q.C.-Zertifikat im Kit

4.4 **Acylierungspuffer** **ACYL-BUFF** 1 Fläschchen
3,5 ml, gebrauchsfertig

Achtung

4.5 **Acylierungsreagenz** **ACYL-REAG** 2 Fläschchen
lyophilisiert, Inhalt eines Fläschchens
mit 2,8 ml Solvent lösen und
gegebenenfalls vereinigen (s. auch 6.4)

4.6 **Antiserum** **AS** 1 Fläschchen
5,5 ml, gebrauchsfertig
Kaninchen-anti-N-Acyl-ADMA

4.7 **Enzymkonjugat** **CONJ** 1 Fläschchen
12 ml, gebrauchsfertig
Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase

4.8 **Waschpuffer** **WASH** 1 Flasche
20 ml, Konzentrat
Inhalt mit dest. Wasser auf 500 ml auffüllen.

4.9 **Substrat** **SUB** 1 Fläschchen
12 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig

4.10 **Stopplösung** **STOP** 1 Fläschchen
12 ml, gebrauchsfertig
Enthält 0,3 M Schwefelsäure

4.11 **Reaktionsplatte** **ACYL-PLATE** 1 Stück
für die Acylierung

4.12 **Ausgleichsreagenz** **EQUA-REAG** 1 Fläschchen
lyophilisiert, mit 20,5 ml dest. Wasser lösen
vorsichtig mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden

4.13 **Solvent** **SOLVENT** 1 Fläschchen
6 ml, enthält Aceton/DMSO
(bitte beachten: Solvent greift Plastik an; Solvent reagiert nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen)

Achtung

Gefahr

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten für 20, 25, 50, 100 und 200 µl
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Photometer für die Auswertung von Mikrotiterplatten (450 nm)
- Horizontal-Schüttler
- Vortex-Mischer
- Rollenmischer

5. Probengewinnung

Für den Test kann Serum oder EDTA-Plasma eingesetzt werden.

Hämolytische und insbesondere lipämische Proben sollten im Assay nicht eingesetzt werden.

Die Proben können bis zu 24 Stunden bei 2 - 8 °C gelagert werden. Proben, die nicht sofort in dem Test eingesetzt werden, können bei -20 °C mindestens 12 Monate gelagert werden.

Wiederholtes Einfrieren und Wiederauftauen sollte vermieden werden.

6. Vorbereitung der Reagenzien und Proben

6.1 MT-Streifen STRIPS

Mikrotiterstreifen 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.

6.2 Waschpuffer WASH

Inhalt des Fläschchens mit destilliertem Wasser auf 500 ml auffüllen.
Der fertige Waschpuffer muß bei 2 - 8 °C gelagert werden.

6.3 Ausgleichsreagenz EQUA-REAG

Inhalt des Fläschchens in 20,5 ml destilliertem Wasser lösen, kurz mischen (Vortex) und 30 min auf den Rollenmischer oder Schüttler legen.
Das gelöste Ausgleichsreagenz kann für den späteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren und mindestens für 1 Jahr gelagert werden.

6.4 Acylierungsreagenz ACYL-REAG

Inhalt des Fläschchens in je 2,8 ml Solvent lösen und für 5 min auf einen Horizontal-Schüttler legen. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen. Das Acylierungsreagenz sollte unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt werden. Durch die 2. Flasche im Kit ist der ELISA in zwei Ansätzen teilbar. Wenn der Kit in einem Ansatz verbraucht wird, den aufgelösten Inhalt beider Fläschchen poolen.
Bitte beachten, daß Solvent mit vielen Plastikmaterialien reagiert, z.B. Plastikschälchen für Mehrkanalpipetten. Solvent reagiert nicht mit normalen Pipettenspitzen und mit Glasgefäßen.

Achtung
Solvent ist leicht flüchtig und verdampft schnell. Daher bitte keine Gefäße zusammen mit Mehrkanalpipetten verwenden, da sie eine hohe Oberfläche haben. Bitte Multipetten o. ä. verwenden, das aufgelöste Acylierungsreagenz aus dem Fläschchen in die Spritze (über eine aufgesetzte Pipettenspitze) ziehen und Vertiefung für Vertiefung pipettieren.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

6.5. Probenvorbereitung (Acylierung)

Die für die Acylierung verwendeten Vertiefungen der Reaktionsplatte markieren (Edding) und nur einmal verwenden!

1. Je 20 µl Standard 1 bis 6, je 20 µl Kontrolle 1 & 2 und je 20 µl Probe in die jeweiligen Vertiefungen der im Kit enthaltenen Reaktionsplatte pipettieren.

2. Je 25 µl Acylierungspuffer in alle Vertiefungen pipettieren.

3. Je 200 µl Ausgleichsreagenz in alle Vertiefungen pipettieren.

4. Reaktionsplatte ca. 10 Sekunden mischen.

5. Acylierungsreagenz frisch ansetzen und je 50 µl Acylierungsreagenz in alle Vertiefungen pipettieren und sofort mischen.

   Achtung
   Solvent ist leicht flüchtig und verdampft schnell. Daher bitte keine Gefäße zusammen mit Mehrkanalpipetten verwenden, da sie eine hohe Oberfläche haben. Bitte Multipetten o. ä. verwenden, das aufgelöste Acylierungsreagenz aus dem Fläschchen in die Spritze (über eine aufgesetzte Pipettenspitze) ziehen und Vertiefung für Vertiefung pipettieren.

6. Reaktionsplatte 90 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubieren, Platte nicht abkleben oder abdecken, offen schütteln.

Je 50 µl der so vorbereiteten Proben werden in den ADMA-ELISA eingesetzt.

7. Testdurchführung ELISA

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

7.1 Proben-Inkubation

Jeweils 50 µl vorbereitete Standards 1 bis 6, 50 µl der vorbereiteten Kontrollen und 50 µl der vorbereiteten Proben (vorzugsweise als Doppelbestimmungen) in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
Je 50 µl Antiserum in alle Vertiefungen pipettieren und kurz auf dem Horizontal-Schüttler mischen. Platte mit Haftklebefolie abdecken und 15 bis 20 Stunden (über Nacht) bei 2 - 8 °C inkubieren.

7.2 Waschen

Vertiefungen entleeren, mit ca. 250 µl Waschpuffer füllen für einige Sekunden auf dem Horizontal-Schüttler mischen 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.

7.3 Konjugat-Inkubation

Jeweils 100 µl Enzymkonjugat in die Vertiefungen pipettieren.
60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubieren.

7.4 Waschen

Wie unter Punkt 7.2 beschrieben.

7.5 Substrat-Inkubation

Jeweils 100 µl Substrat in die Vertiefungen pipettieren und 20 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (unter Schütteln).

7.6 Stoppen der Substrat-Inkubation

Jeweils 100 µl Stopplösung in die Vertiefungen pipettieren; dabei die gleiche Reihenfolge und den gleichen Zeittakt einhalten wie bei Zugabe der Substratlösung.

7.7 Messung

Streifen im Mikrotiterplattenphotometer bei einer Meßwellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) gegen Luft messen.

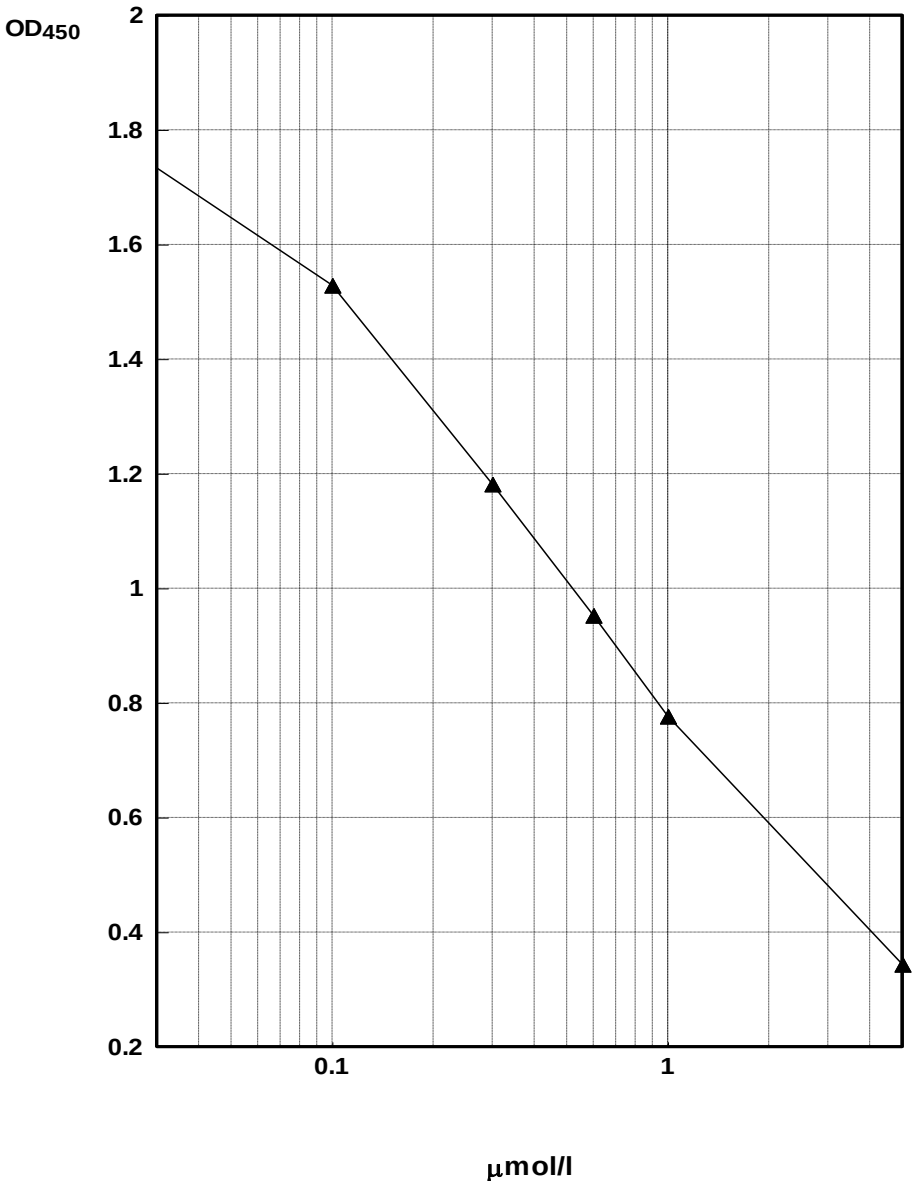
8. Auswertung und Beurteilung

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 Patientenproben können dann direkt aus der Eichkurve in µmol/l abgelesen werden.

Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve.



9. Testcharakteristika

Referenzbereiche

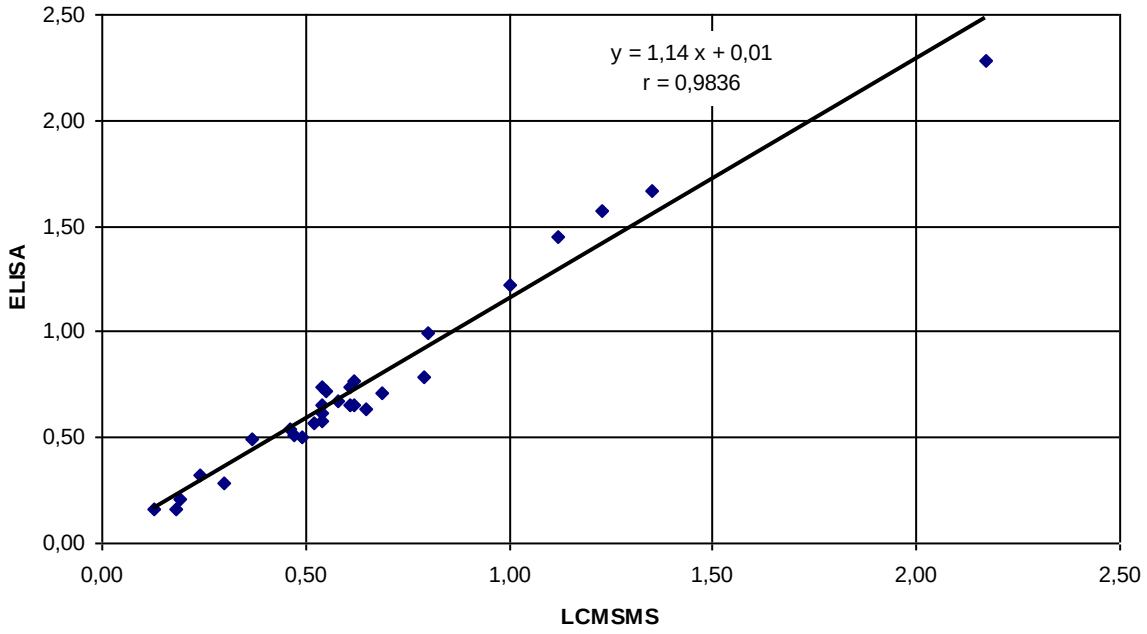
0,4 – 0,75 µmol/l (80 – 150 ng/ml)

Der angegebene Referenzbereich gilt lediglich als Richtlinie. Es wird empfohlen, daß jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche erstellt.

Sensitivität

0,05 µmol/l

Korrelation zur LC-MS-MS



Die Abbildung zeigt die Korrelation zur LC-MS-MS Methode. Diese Daten werden derzeit durch weitere Untersuchungen mit großen Patientenkollektiven ergänzt. Vergleichende Untersuchungen mit der HPLC ohne anschließende MS führte zu unplausiblen Ergebnissen.

Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

Der in dem Test verwendete Antikörper ist spezifisch für ADMA. Getestet wurden die Kreuzreaktivitäten zu Arginin, Monomethylarginin (NMMA) und SDMA.

Substanz	ED-50-Wert (ng/ml)	Kreuzreaktivität (%)
ADMA	126	100
Arginin	660.000	< 0,02
NMMA	12.200	1,0
SDMA	10.500	1,2

Wiederfindung

Unterschiedliche Mengen an ADMA wurden zu einer Serumprobe gegeben und anschließend im ELISA gemessen. Die analytische Wiederfindung von ADMA wurde bei 12 verschiedenen Konzentrationen aus den theoretisch erwarteten und den praktisch gemessenen Werten ermittelt. Die mittlere Wiederfindung für alle Konzentrationen der Serumprobe betrug 97%.

zugesetzt	gemessen	erwartet	% Wiederfindung
0	0,43		
0,10	0,55	0,53	104
0,19	0,61	0,62	98
0,28	0,67	0,71	94
0,37	0,79	0,80	99
0,45	0,83	0,88	97
0,73	1,08	1,16	93
0,97	1,33	1,40	95
1,20	1,60	1,63	98
1,42	1,67	1,85	90
1,92	2,24	2,35	95
2,33	2,76	2,76	100
2,80	3,32	3,23	103
		Mittelwert	**97**

Konzentrationsangaben in µmol/l

Linearität

Die Linearität des ELISAs wurde durch Verdünnen einer aufgestockten Serumprobe bestimmt. Die mittlere Linearität aller 9 Verdünnungen betrug in der Serumprobe 97%.

Verdünnung	Messwert	extrapolierter Ausgangswert	Wiederfindung %
orig.	2,819		
3 + 1	2,090	2,787	99
2 + 1	1,745	2,618	93
1 + 1	1,236	2,472	88
1 + 2	0,860	2,580	91
1 + 4	0,535	2,675	95
1 + 7	0,361	2,888	102
1 + 10	0,286	3,146	112
1 + 15	0,178	2,848	101
1 + 25	0,104	2,704	96
		mittlere Wiederfindung	**97**

Konzentrationsangaben in µmol/l

Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der ELISA-Methode wurde durch die Ermittlung der Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten gezeigt (Konzentrations-angaben in µmol/l):

Intra-Assay

Probe	Anzahl n	Mittelwert	SD	VK (%)
1	42	0,66	0,037	5,7
2	42	1,01	0,066	6,4

Inter-Assay

Probe	Anzahl n	Mittelwert	SD	VK (%)
1	28	0,63	0,07	10,3
2	28	1,01	0,10	9,8
3	28	1,38	0,13	9,4
4	28	2,26	0,19	8,3

10. Literatur

Literatur unter Einsatz des ADMA-ELISA der DLD Diagnostika

Schulze F, Wesemann R, Schwedhelm E, Sydow K, Albsmeier J, Cooke JP, Böger RH.
Determination of ADMA using a novel ELISA assay.
Clin. Chem. Lab. Med. 2004; 42: 1377-1383

Krempl TK, Kähler J, Maas R, Silberhorn L, Meinertz T, Böger RH.
Elevation of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in patients with unstable angina and recurrent cardiovascular events.
Eur. Heart J. 2005; 26: 1846-1851

Schulze F, Maas R, Freese R, Schwedhelm E, Silberhorn L, Böger RH.
Determination of a reference value for N,N-dimethyl-L-arginine in 500 subjects.
Eur. J. Clin. Invest. 2005; 35 : 622-626

Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, Jachmann N, Post F, Peetz D, Bickel C, Cambien F, Tiret L, Münzel T.
Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study.
Circ. Res. 2005; 97: e53-59

O`Dwyer MJ, Dempsey F, Crowley V, Kelleher D, McManus R, Ryan T.
Septic shock correlates with ADMA levels which may be influenced by a polymorphism in DDAH II: a prospective observational study.
Crit. Care 2006; 10: (5): R139

Antoniades C, Tousoulis D, Marinou K, Vasiliadou C, Tentolouris C, Bouras G, Pitsavos C, Stefanidis C.
Asymmetrical dimethylarginine regulates endothelial function in methionine-induced but not in chronic homocystinemia in humans: effect of oxidative stress and proinflammatory cytokines
Am. J. Clin. Nutr. 2006; 84: 781-788

Wang TZ., Chen WJ., Cheng WC., Lin JW., Chen MF., Lee YT.
Relation of improvement in endothelium-dependent flowmediated vasodilation after Rosiglitazone to changes in asymmetric dimethylarginine, endothelin-1, and C-reactive protein in nondiabetic patients with the metabolic syndrome
Am. J. Cardiol. 2006; 9: 1057-1062

Wanby P., Nilsson I., Brudin L., Nyhammar I., Gustafsson I., Carlsson M.
Increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in patients with carotid stenosis: no evidence for the role of the common FABBP2 A54T gene polymorphism
Acta Neurol. Scand. 2007; 115: 90-96

Konishi H, Sydow K, Cooke JP.
Dimethylarginine dimethylaminohydrolase promotes endothelial repair after vascular injury
J. Am. Coll. Cardiol. 2007; 49: 1099-1105

Iribarren C, Husson G, Sydow K, Wang BY, Sidney S, Cooke JP.
Asymmetric dimethyl-arginine and coronary artery calcification in young adults entering middle age: the CARDIA Study
Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil. 2007; 14:222-229

Melikian N, Wheatcroft SB, Ogah OS, Murphy C, Chowienczyk PJ, Wierzbicki AS, Sanders TA, Jiang B, Duncan ER, Shah AM, Kearney MT.
Asymmetric dimethylarginine and reduced nitric oxide bioavailability in young Black African men
Hypertension 2007; 49: 873-877

Horowitz JD, Heresztyn T.
An overview of plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in health and disease and in clinical studies: Methodological considerations.
J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2007; epub ahead of print

Korish AA, Arafah MM.
Catechin combined with vitamins C and E ameliorates insulin resistance (IR) and atherosclerotic changes in aged rats with chronic renal failure (CRF)
Arch. Gerontol. Geriatr. 2007; in press

Charitidou C, Farmakiotis D, Zournatzi V, Pidonia I, Pegiou T, Karamanis N, Hatzistilianou M, Katsikis I, Panidis D.
The administration of estrogens, combined with anti-androgens, has beneficial effects on the hormonal features and asymmetric dimethyl-arginine levels, in women with the polycystic ovary syndrome
Atherosclerosis 2007; in press

Allgemeine Literatur

Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S.
Accumulation of an endogenous inhibitor of NO synthesis in chronic renal failure
Lancet 1992; 339: 572 - 575

Stühlinger M, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, Reaven GM, Tsao PS.
Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor
J. Am. Med. Assoc. 2002; 287: 1420-1426

Zoccali C, Bode-Böger SM, Mallamaci F, Benedetto FA, Tripepi G, Malatino L, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Frölich JC, Böger RH.
Asymmetric dimethylarginine (ADMA): An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase predicts mortality in end-stage renal disease (ESRD)
Lancet 2001; 358: 2113-2117

Nijveldt RJ, Teerlink T, Van der Hoven B, Siroen MP, Kuik DJ, Rauwerda JA, van Leeuwen PA.
Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) in critically ill patients: high plasma ADMA concentration is an independent risk factor of ICU mortality
Clin. Nutr. 2003; 22: 23-30

Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frolich JC, Vallance P, Nicolaides KH.
Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia
Lancet 2003; 361: 1511-1517

Böger RH.
The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor
Cardiovasc. Res. 2003; 59: 824-833

Lu TM, Ding YA, Lin SJ, Lee WS, Tai HC.
Plasma levels of asymmetrical dimethylarginine and adverse cardiovascular events after percutaneous coronary intervention.
Eur Heart J. 2003; 24: 1912-1919

Pipettierschema Probenvorbereitung

		Standards	Kontrolle	Probe
Standard 1 - 6	µl	20		
Kontrolle 1 & 2	µl		20	
Patientenprobe	µl			20
Acylierungspuffer	µl	25	25	25
Ausgleichsreagenz	µl	200	200	200

10 Sekunden schütteln

frisch angesetztes Acylierungsreagenz	µl	50	50	50

Anschließend sofort für 90 Minuten auf einem Horizontal-Schüttler bei Raumtemperatur inkubieren, dabei die Platte **nicht** abkleben oder abdecken, offen schütteln.

Pipettierschema ELISA

	Standard	Kontrolle	Patienten -Proben
Standard 1-6 µl	50		
Kontrolle 1 & 2 µl		50	
Patientenprobe µl			50
Antiserum µl	50	50	50

Kurz auf dem Horizontal-Schüttler mischen und für
15 – 20 Stunden (über Nacht) bei 2 - 8 °C mit Folie abgedeckt inkubieren

4 x Waschen mit je 250 µl Waschpuffer

Enzymkonjugat µl	100	100	100

60 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen mit je 250 µl Waschpuffer

Substrat µl	100	100	100

20 - 30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

Stopplösung µl	100	100	100

Messung der Extinktion bei 450 nm