



Arbeitsanleitung

ADMA High Sensitive ELISA

Enzymimmunoassay
für die quantitative Bestimmung von
endogenem asymmetrischen Dimethyl-Arginin (ADMA)
in Serum oder Plasma
für Ratte, Maus und Zellkulturmedien

REF EA209/96

 12 x 8

 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	3
2. Vorsichtsmaßnahmen	Seite	4
3. Lagerung und Haltbarkeit	Seite	4
4. Inhalt des Testbestecks	Seite	5
5. Probengewinnung	Seite	6
6. Vorbereitung der Reagenzien und Proben	Seite	7
7. Testdurchführung Plasma und Serum	Seite	8
8. Testdurchführung Zellkultur	Seite	10
9. Auswertung und Beurteilung	Seite	12
10. Testcharakteristika	Seite	13
11. Literatur	Seite	21
Pipettierschema Probenvorbereitung	Seite	23
Pipettierschema ELISA	Seite	24

Verwendete Symbole

 CONT	Inhalt		Verwendbar bis
 LOT	Chargenbezeichnung		Temperaturbegrenzung
	Hersteller		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 mehreren klinischen und experimentellen Untersuchungen (s. Literaturübersicht) 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 -high sensitive - ELISA Kit enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von derivatisiertem ADMA (asymmetrisches Dimethyl-Arginin) in Serum, EDTA- und Heparin-Plasma für Ratte, Maus und Zellkulturmedien. Die Derivatisierung erfolgt während der Probenvorbereitung. Dabei wird ADMA durch das Acylierungsreagenz quantitativ in N-Acyl-ADMA umgewandelt.

Der neu entwickelte ADMA – high sensitive - 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. 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 1-7** **CAL 1 - 7** 7 Fläschchen
Je 4 ml, gebrauchsfertig
Konzentrationen:

Standard	1	2	3	4	5	6	7
μmol/l	0	0,1	0,3	0,6	1,0	2,0	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** 3 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, blau gefärbt, gebrauchsfertig
Kaninchen-anti-N-Acyl-ADMA

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

- 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  Gefahr

4.10	Stopplösung 12 ml, gebrauchsfertig Enthält 0,3 M Schwefelsäure	STOP	1 Fläschchen
4.11	Reaktionsplatte für die Acylierung	ACYL-PLATE	1 Stück
4.12	Ausgleichsreagenz lyophilisiert, mit 20,5 ml dest. Wasser lösen vorsichtig mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden	EQUA-REAG	1 Fläschchen
4.13	Solvent 2 x 6 ml Enthält Aceton und DMSO (bitte beachten: Solvent freift Plastik an; Solvent reagiert nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen)	SOLVENT	2 Fläschchen
		 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, EDTA-Plasma, Heparin-Plasma oder Zellkulturlösung eingesetzt werden.

Zellkulturmedien die besonders viel Arginin enthalten, können die Kurvensteilheit und die Sensitivität des Testes stark beeinflussen. Wir empfehlen Zellkulturlösungen mit wenig oder keinem Arginin zu verwenden.

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 verdünnte Waschpuffer muß für den späteren Gebrauch bei 2 - 8 °C gelagert werden und bleibt so für 4 Wochen stabil.

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 muß unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt werden. Durch die 2. und 3. Flasche im Kit ist der ELISA in zwei bis drei Ansätzen teilbar. Wenn der Kit in einem Ansatz verbraucht wird, den aufgelösten Inhalt zweier Fläschchen poolen. Bitte beachten, dass Solvent mit vielen Plastikmaterialien reagiert, z.B. Plastikschrälchen 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.

7. Testdurchführung Plasma und Serum

7.1. Probenvorbereitung Plasma und Serum (Acylierung)

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

1. Je 20 µl Standard 1 bis 7, 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 25 µl der so vorbereiteten Proben werden in den ELISA eingesetzt.

7.2. Durchführung Plasma und Serum ELISA

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

1. Proben-Inkubation

Jeweils 25 µl vorbereitete Standards 1 bis 7, 25 µl der vorbereiteten Kontrollen und 25 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.

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.

3. Konjugat-Inkubation

Jeweils 100 µl Enzymkonjugat in die Vertiefungen pipettieren.

60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubieren.

4. Waschen

Wie unter Punkt 2. beschrieben.

5. Substrat-Inkubation

Jeweils 100 µl Substrat in die Vertiefungen pipettieren und 25 bis 35 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (unter Schütteln).

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. Messung

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

8. Testdurchführung Zellkultur

8.1. Probenvorbereitung Zellkultur (Acylierung)

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

1. Je 20 µl Standard 1 bis 7, je 20 µl Kontrolle 1 & 2 und je 20 µl Zellkultur-Probe in die jeweiligen Vertiefungen der im Kit enthaltenen Reaktionsplatte pipettieren.
2. Je 20 µl Standard 1 nur in die jeweiligen Vertiefungen zu den Zellkultur-Proben pipettieren.
3. Je 20 µl Zellkulturlösung (zum Matrixausgleich) nur in die jeweiligen Vertiefungen zu den Standards 1 bis 7 und den Kontrollen 1 & 2 pipettieren.
4. Je 25 µl Acylierungspuffer in alle Vertiefungen pipettieren.
5. Je 200 µl Ausgleichsreagenz in alle Vertiefungen pipettieren.
6. Reaktionsplatte ca. 10 Sekunden mischen.
7. 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.

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

Je 25 µl der so vorbereiteten Proben werden in den ELISA eingesetzt.

8.2. Durchführung Zellkultur ELISA

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

1. Proben-Inkubation

Jeweils 25 µl vorbereitete Standards 1 bis 7, 25 µl der vorbereiteten Kontrollen und 25 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.

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.

3. Konjugat-Inkubation

Jeweils 100 µl Enzymkonjugat in die Vertiefungen pipettieren.

60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubieren.

4. Waschen

Wie unter Punkt 2. beschrieben.

5. Substrat-Inkubation

Jeweils 100 µl Substrat in die Vertiefungen pipettieren und 25 bis 35 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (unter Schütteln).

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. Messung

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

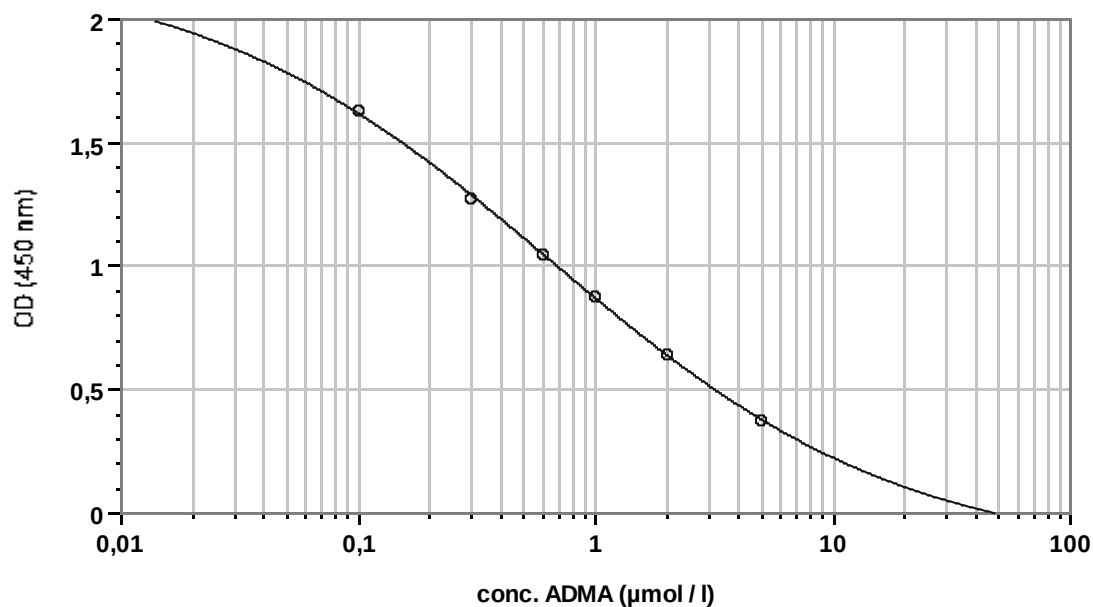
9. Auswertung und Beurteilung

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.



$y = ((A - D)/(1 + (x/C)^B)) + D$: A B C D R²
Std (Standards: Concentration vs MeanValue) 2,221 0,586 0,645 -0,178 1

10. Testcharakteristika

Sensitivität

Die untere Nachweisgrenze wurde bestimmt, indem die 2-fache Standardabweichung der optischen Dicht (OD) des Nullstandards gemessen und in die entsprechende Konzentration an der Standardkurve abgelesen wurde.

Sensitivität: 0,01 µmol/l

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 (µmol/l)	Kreuzreaktivität (%)
ADMA	0,745	100
Arginin	3.993	< 0,020
SDMA	2.990	0,025
NMMA	51	1,460

Wiederfindung

Unterschiedliche Mengen an ADMA wurden zu unterschiedlichen Proben gegeben und anschließend im ELISA gemessen. Die analytische Wiederfindung von ADMA wurde bei verschiedenen Konzentrationen aus den theoretisch erwarteten und den praktisch gemessenen Werten ermittelt.

Konzentrationsangaben in $\mu\text{mol/l}$

Heparin Plasma Ratte:

zugesezt	gemessen	erwartet	% Wiederfindung
0	0,58		
0,10	0,71	0,68	104
0,19	0,80	0,77	104
0,28	0,89	0,86	103
0,37	0,95	0,95	100
0,45	0,98	1,03	95
0,61	1,21	1,19	102
0,85	1,43	1,43	100
1,11	1,97	1,69	116
1,36	2,14	1,94	110
1,61	2,34	2,19	107
1,92	2,64	2,50	106

Mittelwert 104

EDTA Plasma Ratte:

zugesezt	gemessen	erwartet	% Wiederfindung
0	0,51		
0,10	0,59	0,61	97
0,19	0,75	0,70	107
0,28	0,82	0,79	104
0,37	0,98	0,88	111
0,45	0,86	0,96	90
0,61	1,07	1,12	96
0,85	1,34	1,36	99
1,11	1,68	1,62	104
1,36	1,94	1,87	104
1,61	2,04	2,12	96
1,92	2,36	2,43	97

Mittelwert**100****Serum Ratte:**

zugesezt	gemessen	erwartet	% Wiederfindung
0	1,05		
0,10	1,16	1,15	101
0,19	1,22	1,24	98
0,28	1,31	1,32	99
0,37	1,27	1,42	89
0,45	1,26	1,50	84
0,61	1,51	1,66	91
0,85	2,23	1,90	117
1,11	2,42	2,16	112
1,36	2,25	2,41	93
1,61	2,63	2,66	99
1,92	2,74	2,97	92

Mittelwert**98**

Serum Maus:

zugesezt	gemessen	erwartet	% Wiederfindung
0	0,23		
0,19	0,47	0,42	112
0,28	0,55	0,51	108
0,37	0,60	0,60	100
0,45	0,69	0,68	101
0,61	0,88	0,84	105
0,85	1,14	1,08	106
1,11	1,22	1,34	91
1,36	1,52	1,59	96
1,61	1,90	1,84	103
1,92	1,96	2,15	91

Mittelwert 101

RPMI Zellkulturmedium:

zugesezt	gemessen	erwartet	% Wiederfindung
0	0,25		
0,10	0,38	0,35	109
0,19	0,44	0,44	100
0,28	0,52	0,53	98
0,37	0,55	0,62	89
0,45	0,68	0,70	97
0,67	1,05	0,92	114
0,85	1,11	1,10	101
1,11	1,26	1,36	93
1,36	1,46	1,61	91
1,74	1,83	1,99	92
2,11	2,07	2,36	88
2,56	2,52	2,81	90

Mittelwert 97

DMEM Zellkulturmedium:

zugesezt	gemessen	erwartet	% Wiederfindung
0	0,23		
0,10	0,33	0,33	100
0,19	0,38	0,42	90
0,28	0,44	0,51	86
0,37	0,56	0,60	93
0,45	0,65	0,68	96
0,67	1,09	0,90	121
0,85	1,09	1,08	101
1,11	1,19	1,34	89
1,36	1,34	1,59	84
1,74	1,62	1,97	82
2,11	1,87	2,34	80
2,56	2,41	2,79	86

Mittelwert

92

Linearität

Die Linearität des ELISAs wurde durch Verdünnen einer aufgestockten Probe bestimmt.

Heparin Plasma Ratte:

Verdünnung	Messwert	extrapolierter Ausgangswert	Wiederfindung %
orig.	2,55		
3 + 1	1,86	2,48	97
2 + 1	1,61	2,42	95
1 + 1	1,26	2,52	99
1 + 2	0,82	2,46	96
1 + 3	0,60	2,40	94
1 + 5	0,41	2,46	96
1 + 9	0,27	2,70	106
1 + 15	0,18	2,88	113
1 + 20	0,11	2,31	91

mittlere Wiederfindung

99

EDTA Plasma Ratte:

Verdünnung	Messwert	extrapolierter Ausgangswert	Wiederfindung %
orig.	2,40		
3 + 1	1,96	2,61	109
2 + 1	1,61	2,42	101
1 + 1	1,40	2,80	117
1 + 2	0,78	2,34	98
1 + 3	0,62	2,48	103
1 + 5	0,41	2,46	103
1 + 9	0,24	2,40	100
1 + 15	0,15	2,40	100
1 + 20	0,11	2,31	96

mittlere Wiederfindung 103

Serum Ratte:

Verdünnung	Messwert	extrapolierter Ausgangswert	Wiederfindung %
orig.	2,72		
3 + 1	1,84	2,45	90
2 + 1	1,68	2,52	93
1 + 1	1,45	2,90	107
1 + 2	0,95	2,85	105
1 + 3	0,76	3,04	112
1 + 5	0,49	2,94	108
1 + 9	0,28	2,80	103
1 + 15	0,19	3,04	112
1 + 20	0,15	3,15	116

mittlere Wiederfindung 105

Serum Maus:

Verdünnung	Messwert	extrapolierter Ausgangswert	Wiederfindung %
orig.	3,31		
3 + 1	2,27	3,03	92
2 + 1	2,08	3,12	94
1 + 1	1,62	3,24	98
1 + 2	1,07	3,21	97
1 + 3	0,74	2,96	89
1 + 5	0,53	3,18	96
1 + 9	0,33	3,30	100
1 + 15	0,18	2,88	87
1 + 20	0,15	3,15	95

mittlere Wiederfindung**94****RPMI Zellkulturmedium:**

Verdünnung	Messwert	extrapolierter Ausgangswert	Wiederfindung %
orig.	2,25		
3 + 1	1,89	2,52	112
2 + 1	1,82	2,74	122
1 + 1	1,22	2,45	109
1 + 2	0,79	2,38	106
1 + 3	0,62	2,49	111
1 + 5	0,38	2,30	102
1 + 9	0,20	1,98	88

mittlere Wiederfindung**107**

DMEM Zellkulturmedium:

Verdünnung	Messwert	extrapolierter Ausgangswert	Wiederfindung %
orig.	1,97		
3 + 1	1,51	2,01	102
2 + 1	1,52	2,29	116
1 + 1	1,05	2,10	107
1 + 2	0,72	2,16	110
1 + 3	0,55	2,18	111
1 + 5	0,34	2,05	104
1 + 9	0,24	2,36	120

mittlere Wiederfindung 110

Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der ELISA-Methode wurde durch die Ermittlung der Intra- (Konzentrationsangaben in $\mu\text{mol/l}$):

Intra-Assay

Probe	Anzahl n	Mittelwert	SD	VK (%)
Plasma Ratte	40	0,40	0,033	8,3
Serum Ratte	40	0,99	0,075	7,6

11. 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

Krempf 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 DDH 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 flow-mediated 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 FABP2 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, Frölich 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 Plasma und Serum

		Standards	Kontrolle	Probe
Standard 1 - 7	µl	20		
Kontrolle 1 & 2	µl		20	
Probe	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 Probenvorbereitung Zellkultur

		Standards	Kontrolle	Probe
Standard 1 -7	µl	20		
Kontrolle 1 & 2	µl		20	
Probe	µl			20
Standard 1	µl			20
Zellkulturlösung	µl	20	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 Plasma, Serum und Zellkultur

	Standard	Kontrolle	Probe
Standard 1-7 μl	25		
Kontrolle 1 & 2 μl		25	
Probe μl			25
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
------------------------	-----	-----	-----

25 - 35 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

Stopplösung μl	100	100	100
---------------------------	-----	-----	-----

Messung der Extinktion bei 450 nm