



Arbeitsanleitung

Homoarginin ELISA

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

REF EA205/96

 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.	Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Seite	4
3.	Lagerung und Haltbarkeit	Seite	4
4.	Inhalt des Testbestecks	Seite	5
5.	Probengewinnung	Seite	6
6.	Vorbereitung der Reagenzien	Seite	7
7.	Testdurchführung	Seite	8
	Testdurchführung für Plasma und Serum	Seite	8
	Testdurchführung für Zellkulturproben	Seite	10
8.	Auswertung und Beurteilung	Seite	12
9.	Testcharakteristika	Seite	13
10.	Literatur	Seite	14
	Pipettierschema Plasma und Serum	Seite	15
	Pipettierschema Zellkulturproben	Seite	16

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 Patientenproben.

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 Waschschriff 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 zur in vitro Diagnostik. 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 Patientenproben 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.
- Die Richtlinien zur Qualitätskontrolle im medizinischen Laboratorium bezüglich des Mitführens von Kontrollproben und/oder Poolproben, sollten beachtet werden.

3. 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.

4. Inhalt des Testbestecks

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

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	0,3	0,8	1,6	3,2	7
ng / ml	0	56	151	301	602	1.318

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

4.5 **Acylierungsreagenz** **ACYL-REAG** 3 Fläschchen
lyophilisiert, Inhalt eines Fläschchens
mit 3 ml Solvent lösen

4.6 **Solvent** **SOLVENT** 2 Fläschchen
5,5 ml, enthält DMSO

4.7 **Antiserum** **AS** 1 Fläschchen
7 ml, gebrauchsfertig, gelb gefärbt
Kaninchen-anti-N-Acyl-Homoarginin

4.8 **Enzymkonjugat** **CONJ** 1 Fläschchen
13 ml, gebrauchsfertig
Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase

4.9 **Waschpuffer** **WASH** 1 Fläschchen
20 ml, Konzentrat (50x)

4.10 **Substrat** **SUB** 1 Fläschchen
13 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig

4.11	Stopplösung 13 ml, gebrauchsfertig Enthält 0,3 M Schwefelsäure	STOP	1 Fläschchen
4.12	Reaktionsplatte für die Acylierung	ACYL-PLATE	1 Stück
4.13	Ausgleichsreagenz lyophilisiert, mit 21 ml dest. Wasser lösen vorsichtig mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden	EQUA-REAG	1 Fläschchen
4.14	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

5. Probengewinnung

Wiederholtes Einfrieren und Wiederauftauen sollte vermieden werden.

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.

Zellkultur

Zellkulturmedien wie DMEM und RPMI können im Test verwendet werden.

Weitere Zellkulturmedien sind vom Anwender zu testen.

6. Vorbereitung der Reagenzien

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.

Waschpuffer **WASH**

Inhalt des Fläschchens 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.

Ausgleichsreagenz **EQUA-REAG**

Inhalt des Fläschchens 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.

Acylierungsreagenz **ACYL-REAG**

Inhalt des Fläschchens mit 3 ml 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.

7. Testdurchführung

Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen. Es wird empfohlen, Doppelbestimmungen durchzuführen.

7.1 Testdurchführung für Plasma und Serum

Probenvorbereitung (Acylierung)

Die für die Acylierung verwendeten Vertiefungen der Reaktionsplatte markieren (Edding) und nicht noch 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 20 µl Acylierungspuffer in alle Vertiefungen pipettieren.
3. Je 200 µl Ausgleichsreagenz in alle Vertiefungen pipettieren. Platte 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
4. Je 50 µl frisch angesetztes Acylierungsreagenz in alle Vertiefungen pipettieren und sofort mit Punkt 5. fortfahren. Farbe wechselt zu violett.

Achtung

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

Bitte Multipetten oder Ähnliches verwenden, das Acylierungsreagenz direkt aus dem Fläschrhen 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.

ELISA für Plasma und Serum

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

1. 20 μl acylierte Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
2. 50 μl Antiserum in alle Vertiefungen pipettieren.
3. Platte mit Folie 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 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 in alle Vertiefungen pipettieren.
6. 25 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
7. Waschen: Wie unter Punkt 4. beschrieben.
8. 100 μl Substrat in alle Vertiefungen pipettieren.
9. 25 \pm 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
10. 100 μl Stopplösung in alle Vertiefungen pipettieren, kurz mischen.
11. Platte im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) innerhalb von 15 Minuten messen.

7.2 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.

Probenvorbereitung (Acylierung)

1. 20 µl Standard 1 - 6, Kontrolle 1 & 2 und Zellkulturprobe in die entsprechenden Vertiefungen der Reaktionsplatte pipettieren.
2. 20 µl Standard 1 in alle Vertiefungen mit Zellkulturproben pipettieren (Matrixausgleich).
3. 20 µl Zellkulturmedium in alle Vertiefungen mit Standards und Kontrollen pipettieren (Matrixausgleich).
Nicht in Vertiefungen mit Zellkulturproben pipettieren.
4. 20 µl Acylierungspuffer in alle Vertiefungen pipettieren.
5. 200 µl gelöstes Ausgleichsreagenz in alle Vertiefungen pipettieren.
Platte 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
6. Je 50 µl frisch angesetztes Acylierungsreagenz in alle Vertiefungen pipettieren und sofort mit Punkt 7. 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.
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.

ELISA für Zellkulturproben

1. 20 μ l acylierte Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
2. 50 μ l Antiserum in alle Vertiefungen pipettieren.
3. Platte mit Folie abkleben und 90 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
4. Vertiefungen entleeren, mit ca. 300 μ l verdünntem Waschpuffer 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 μ l Enzymkonjugat in alle Vertiefungen pipettieren.
6. 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
7. Waschen: Wie unter Punkt 4. beschrieben.
8. 100 μ l Substrat in alle Vertiefungen pipettieren.
9. 30 \pm 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
10. 100 μ l Stopplösung in alle Vertiefungen pipettieren, kurz mischen.
11. Platte im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) innerhalb von 15 Minuten messen.

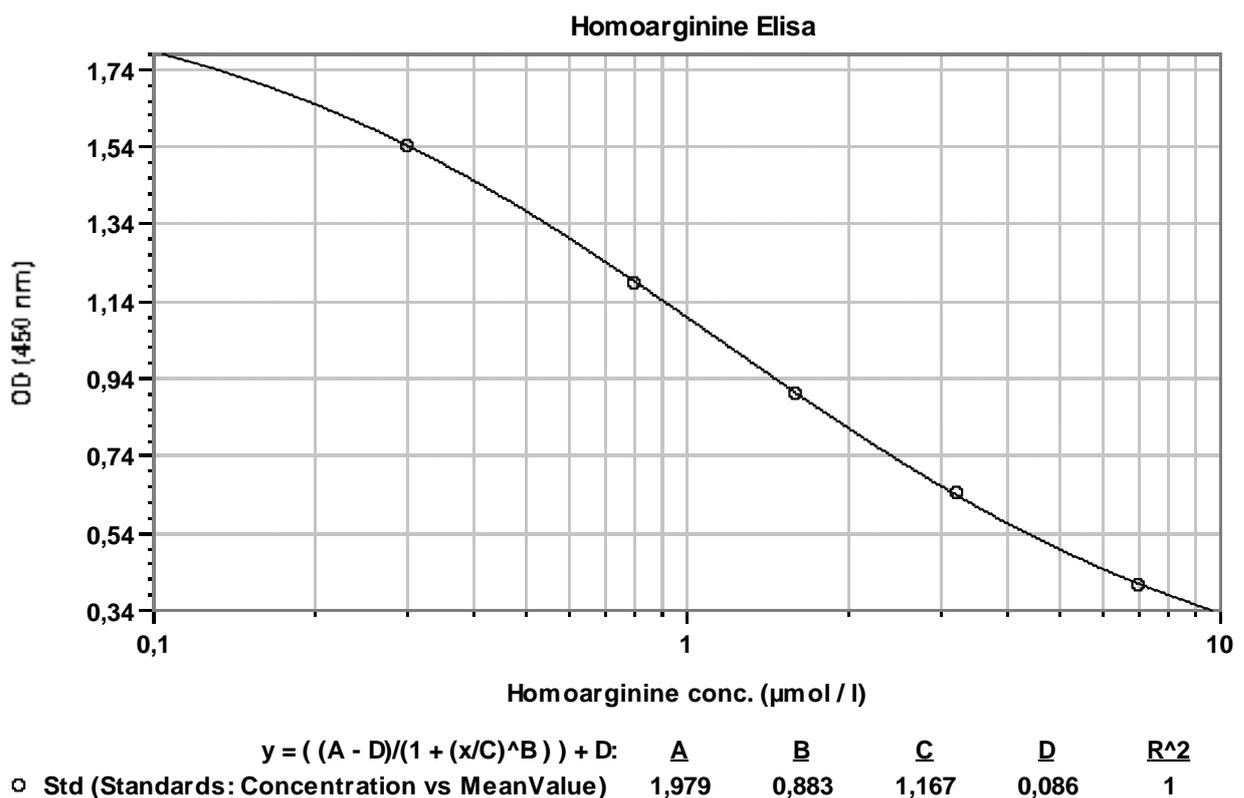
8. Auswertung und Beurteilung

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 $\mu\text{mol/l}$ abgelesen werden.

Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve.



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

9. Testcharakteristika

Referenzbereiche

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

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

Sensitivität

Untere Nachweisgrenze	Berechnung
0,05 µmol / l	OD _{Cal1} – 3 x SD

Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

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

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

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

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 %

Methodenvergleich

Matrix	Vergleichsmethode	Korrelation
EDTA-Plasma	LC/MS	Y = 0,98 x LC/MS + 0,12; R = 0,998; N = 25

Matrix	Vergleich	Korrelation
Serum	Plasma	Y = 1,00 x Plasma + 0,11; R = 0,965; N = 12

10. Literatur

A. 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

Pipettierschema Probenvorbereitung für Plasma und Serum

		Standard	Kontrolle	Plasma	Serum
Standard 1 - 6	µl	20			
Kontrolle 1 & 2	µl		20		
Plasma	µl			20	
Serum	µl				20
Acylierungspuffer	µl	20	20	20	20
Ausgleichsreagenz	µl	200	200	200	200

Platte 10 Sekunden schütteln

Acylierungsreagenz	µl	50	50	50	50
--------------------	----	----	----	----	----

Sofort 15 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

20 µl im ELISA einsetzen

Pipettierschema ELISA für Plasma und Serum

		Standard	Kontrolle	Probe
Acyl. Standard	µl	20		
Acyl. Kontrolle	µl		20	
Acyl. Probe	µl			20
Antiserum	µl	50	50	50

Platte mit Folie abkleben.
90 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

Enzymkonjugat	µl	100	100	100
---------------	----	-----	-----	-----

25 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

Substrat	µl	100	100	100
----------	----	-----	-----	-----

25 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

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

Messung der Extinktion bei 450 nm

Pipettierschema Probenvorbereitung für Zellkulturproben

		Standard	Kontrolle	Zellkulturprobe
Standard 1 - 6	µl	20		
Kontrolle 1 & 2	µl		20	
Zellkulturprobe	µl			20
Standard 1	µl			20
Zellkulturmedium	µl	20	20	
Acylierungspuffer	µl	20	20	20
Ausgleichsreagenz	µl	200	200	200

Platte 10 Sekunden schütteln

Acylierungsreagenz	µl	50	50	50
--------------------	----	----	----	----

Sofort 15 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

20 µl im ELISA einsetzen

Pipettierschema ELISA für Zellkulturproben

		Standard	Kontrolle	Probe
Acyl. Standard	µl	20		
Acyl. Kontrolle	µl		20	
Acyl. Probe	µl			20
Antiserum	µl	50	50	50

Platte mit Folie abkleben.
90 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

Enzymkonjugat	µl	100	100	100
---------------	----	-----	-----	-----

30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

Substrat	µl	100	100	100
----------	----	-----	-----	-----

30 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

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

Messung der Extinktion bei 450 nm