

# ADMA ELISA Kit

*Zur In-vitro-Bestimmung von ADMA in Urin*

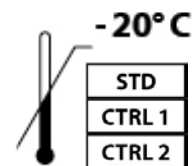
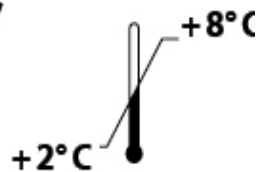
*For the in vitro determination of ADMA in urine*

*Nur zu Forschungszwecken / For research use only*

Gültig ab / Valid from 17.06.2014



K 7830



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim  
Tel.: ++49 6251 70190-0  
Fax: ++ 49 6251 849430  
e.mail:Info@immundiagnostik.com  
www.immundiagnostik.com

# Inhalt

<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>2</b>
<b>2. EINLEITUNG / KLINISCHE RELEVANZ</b>	<b>2</b>
<b>3. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>3</b>
<b>4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>4</b>
<b>5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>4</b>
<b>6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG</b>	<b>5</b>
<b>7. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>5</b>
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema Probenvorbereitung</i>	6
<i>Pipettierschema Testdurchführung</i>	7
<b>8. ERGEBNISSE</b>	<b>8</b>
<b>9. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>10</b>
<b>10. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>10</b>
<b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>10</b>
<i>Spezifität</i>	10
<b>12. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>10</b>
<b>13. TECHNISCHE MERKMALE</b>	<b>11</b>
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>11</b>
<b>15. LITERATUR</b>	<b>12</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von asymmetrischem Dimethyl-L-Arginin (ADMA) in Urin geeignet. Nur zu Forschungszwecken. Nicht für diagnostische Zwecke.

## 2. EINLEITUNG / KLINISCHE RELEVANZ

Asymmetrisches Dimethyl-L-Arginin (ADMA) ist ein endogener Inhibitor der Stickstoffmonoxid-Synthase. Es entsteht bei dem Abbau methylierter Proteine und wird entweder renal eliminiert oder durch das Enzym Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) metabolisiert. Verschiedene Zelltypen einschließlich humaner Endothel- und Tubuluszellen bilden und verstoffwechseln ADMA. Bei einer Reihe von Erkrankungen, die mit einer endothelialen Dysfunktion einhergehen, sind die ADMA-Konzentrationen im Blut erhöht. Bei Dialysepatienten beispielsweise korrelieren die erhöhten ADMA-Blutspiegel signifikant mit dem Ausmaß der Arteriosklerose und des kardiovaskulären Risikos. Erhöhte ADMA-Konzentrationen wurden u. a. bei Patienten mit Hypercholesterinämie, Hypertonie, Arteriosklerose, chronischer Niereninsuffizienz und chronischer Herzinsuffizienz nachgewiesen und mit einer eingeschränkten endothelabhängigen Vasodilatation in Zusammenhang gebracht.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die Regulation von Gefäßtonus und -struktur durch Stickstoffmonoxid (NO) eine große klinische Bedeutung besitzt. Ferner wurde berichtet, dass menschliche Endothelzellen neben Stickstoffmonoxid auch ADMA produzieren, was auf eine endogene NO-Regulation durch ADMA im Endothel hinweist. Es wurde daher angenommen, dass das vielfache Auftreten von Hypertonie, Arteriosklerose und immunologischer Dysfunktion bei Patienten mit Niereninsuffizienz in engem Zusammenhang mit dem beeinträchtigten L-Arginin/NO-Stoffwechsel und der Akkumulation von ADMA steht. Der Mechanismus, durch welchen es zu einer veränderten L-Arginin-NO-Stoffwechsellage kommt, konnte bisher nur zum Teil geklärt werden. Sicherlich handelt es sich um eine multifaktorielle Erscheinung, die u. a. den Anstieg freier Sauerstoffradikale, die Akkumulation von ADMA und eine verminderte NO-Synthase-Aktivität beinhaltet.

Prospektive Studien in den letzten Jahren lassen ADMA als neuen kardiovaskulären Risikomarker bzw. -faktor zunehmend an Bedeutung gewinnen.

### Indikationen

- Arteriosklerose
- Hypertonie
- Herzinsuffizienz
- Koronare Herzerkrankungen

- Hypercholesterinämie
- Niereninsuffizienz
- Diabetes mellitus
- Periphere arterielle Verschlusskrankheit

### 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art. Nr.	Bezeichnung	Kit Komponenten	Menge
K 7830MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 7830ST	STD	Standards vorverdünnt in Reaktionspuffer, gebrauchsfertig (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 3,5; 10 µM)	7 Fläschchen
K 7830KO1 K 7830KO2	CTRL 1 CTRL 2	Kontrollen vorverdünnt in Reaktionspuffer, gebrauchsfertig	2 Fläschchen
K 7830WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 7830AK	AB	ADMA-Antikörper, lyophilisiert	2 Fläschchen
K 7830K	2.AB	Konjugat, Peroxidase-markiert, Konzentrat	1 x 120 µl
K 7830CSP	2.ABDIL	Konjugatstabilisierungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 24 ml
K 7830RP	DERBUF	Reaktionspuffer, gebrauchsfertig	1 x 90 ml
K 7830DR	DER	Derivatisierungsreagenz	2 x 50 mg
K 7830LM	DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 x 7 ml
K 7830SL	CODIL	Verdünnungspuffer nach Derivatisierung, gebrauchsfertig	1 x 28 ml
K 7830TMB	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 25 ml
K 7830AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

## 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser\*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 oder 405nm

\* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥18,2 MΩ cm).

## 5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so je nach Probenaufkommen bis zu 2x bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (**100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser**), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Das Pufferkonzentrat kann bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die verdünnte Pufferlösung ist bei **2-8°C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die **Standards (STD)** und die **Kontrollen (CTRL1, CTRL2)** sind bereits in Reaktionspuffer (DERBUF) verdünnt und werden bei **-20°C** gelagert. Für den Test die Standards und Kontrollen auftauen und kurz vortexen. Die Standards und Kontrollen können bis zu 3x wieder eingefroren werden, das Wiedereinfrieren sollte sofort nach Entnahme erfolgen.

- **DMSO** kristallisiert bei 4°C aus. Zum Lösen das DMSO bei Raumtemperatur stehen lassen oder im Wasserbad erwärmen.
- Der Inhalt eines Fläschchens **Derivatisierungsreagenz (DER) (50 mg)** wird in **3 ml DMSO** gelöst und das Fläschchen für 5 min auf einen Horizontal-schüttler gelegt. Das DER sollte **unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt** werden. Falls mehrere Fläschchen benötigt werden, deren Inhalt vereinen und vor Gebrauch mischen. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen. Durch die Aufteilung des DER in zwei Gefäße ist der ELISA in zwei Ansätze teilbar. **Bitte beachten:** DMSO greift Plastik an, DMSO reagiert nicht mit Polypropylen-Produkten und Glasgefäßen.
- Der **ADMA-Antikörper (AB)** wird in **5,6 ml verdünntem Waschpuffer** gelöst. Hierzu wird der Inhalt eines AB-Gefäßes zunächst mit 0,6 ml verdünntem Waschpuffer 5 min gelöst. Diese Lösung wird anschließend vollständig in ein separates Gefäß überführt und mit 5 ml verdünntem Waschpuffer aufgefüllt. Durch die Aufteilung des AB in 2 Gefäße ist der ELISA in zwei Ansätze teilbar. Verdünnter ADMA-Antikörper (AB) ist stabil und kann **einen Monat bei 2-8°C** aufbewahrt werden.
- Das **Peroxidase-Konjugat (2.AB)** wird **1:201** in Konjugatstabilisierungspuffer (2.ABDIL) verdünnt (z.B. **110 µl 2.AB + 22 ml 2.ABDIL**; nur die benötigte Menge ansetzen). Unverdünntes Konjugat ist bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Verdünntes Konjugat kann **1 Woche bei 2-8°C** aufbewahrt werden.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8°C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

### Urin

- Urinproben sind bei 2-8°C vier Tage haltbar. Zur längeren Lagerung sollte die Probe bei -20°C aufbewahrt werden. Wir empfehlen, die Urinproben anzusäuern.
- Die Proben werden **1:100** in **Reaktionspuffer (DERBUF) verdünnt:**  
**20 µl Probe + 1980 µl DERBUF.**
- Zur weiteren Vorbereitung muss die Probe mit einem Derivatisierungsreagenz (DER) zur Derivatisierung des enthaltenen ADMA versetzt werden (Details siehe Pipettierschema Probenvorbereitung).

## 7. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Testprinzip*

Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays. Zur Vorbereitung wird die zu untersuchende Probe zusammen mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen ADMA versetzt. Anschließend wird die derivatisierte Probe mit einem polyklonalen ADMA-Antiserum in einer mit ADMA-Derivat (Tracer) beschichteten ELISA-Platte inkubiert. Während der Inkubation kompetitiert das Zielantigen in der Probe mit dem an die Platte gebundenen Tracer um die Bindung der polyklonalen Antikörper. Hierbei verdrängt das Zielantigen in der Probe den Antikörper aus der Bindung an den Tracer. Daher ist die Konzentration des an den Tracer gebundenen Antikörpers umgekehrt proportional zu der Konzentration des Zielantigens in der Probe.

Beim zweiten Inkubationsschritt wird ein Peroxidase-markierter Sekundärantikörper zugegeben, der an die polyklonalen Anti-ADMA-Antikörper bindet. Nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Komponenten wird das Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration des gemessenen Analyten, d.h. mit steigender Konzentration von ADMA in der Probe reduziert sich die Konzentration der an den Tracer gebundenen Antikörper und das Signal nimmt ab. Parallel dazu wird eine Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

### *Pipettierschema Probenvorbereitung*

Die Derivatisierung der Standards (STD), der Kontrollen (CTRL) und der verdünnten Proben (SAMPLE) wird als Einzelbestimmung in Mikroreaktionsgefäßen (z.B. 1,5-ml-Reaktionsgefäße) wie folgt durchgeführt:

1. Vor Gebrauch alle **Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur** (15-30°C) bringen, gut mischen.
2. Je **200 µl** gebrauchsfertiger **Standard (STD)** bzw. **200 µl** gebrauchsfertige **Kontrolle (CTRL)** bzw. **200 µl** verdünnte **Probe (SAMPLE)** in Mikroreaktionsgefäße pipettieren.

3. **50 µl** frisch angesetztes **Derivatisierungsreagenz (DER)** in **alle Reaktionsgefäße** (STD, CTRL, SAMPLE) pipettieren, **gründlich mischen** und auf einem Horizontalschüttler (180-240 rpm) **45 min** bei **Raumtemperatur** (15-30°C) inkubieren.
4. Anschließend in alle verwendeten Mikroreaktionsgefäße **250 µl Verdünnungspuffer (CODIL)** zugeben, gut mischen und auf einem Horizontalschüttler (180-240 rpm) **45 min** bei **Raumtemperatur** (15-30°C) inkubieren

**2 x 100 µl** der so vorbereiteten Proben (**STD, CTRL, SAMPLE**) werden im ELISA als Doppelbestimmung eingesetzt.

### *Pipettierschema Testdurchführung*

5. Positionen für Standards/ Kontrollen/ Proben (STD/ CTRL/ SAMPLE) in Doppelbestimmungen in einem **Protokollblatt** markieren.
6. Benötigte **Mikrotiterstreifen (PLATE)** aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterplattenstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8°C gelagert werden.
7. Mikrotiterstreifen **5 x mit je 250 µl** verdünntem **Waschpuffer** waschen und nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
8. **2 x 100 µl** der vorbereiteten, **derivatisierten Proben (STD, CTRL, SAMPLE)** aus den Mikroreaktionsgefäßen als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
9. **100 µl** verdünnter **ADMA-Antikörper (AB)** in jede Vertiefung pipettieren. Streifen luftdicht abdecken.
10. Über Nacht (**15-20 Stunden**) bei **2-8°C** inkubieren.
11. Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** verdünntem **Waschpuffer** waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.



12. <b>200 µl</b> verdünntes <b>Peroxidase-Konjugat (2.AB)</b> in alle Vertiefungen pipettieren.
13. Platte abdecken und <b>1 Stunde</b> bei <b>Raumtemperatur</b> (15-30°C) unter Schütteln (180-240 rpm) inkubieren.
14. Inhalt der Platte verwerfen und <b>5x mit je 250 µl</b> verdünntem <b>Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
15. <b>200 µl TMB-Substrat (SUB)</b> in alle Vertiefungen pipettieren.
16. <b>6-10 min</b> bei <b>Raumtemperatur</b> (15-30°C) im Dunkeln inkubieren*
17. <b>100 µl Stopplösung (STOP)</b> in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen.
18. <b>Extinktion sofort</b> im Mikrotiterplattenphotometer bei <b>450 nm</b> gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gelesen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

\* Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen, den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

## 8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion.

### 1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden, z.B. 0,001).

## 2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

## 3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

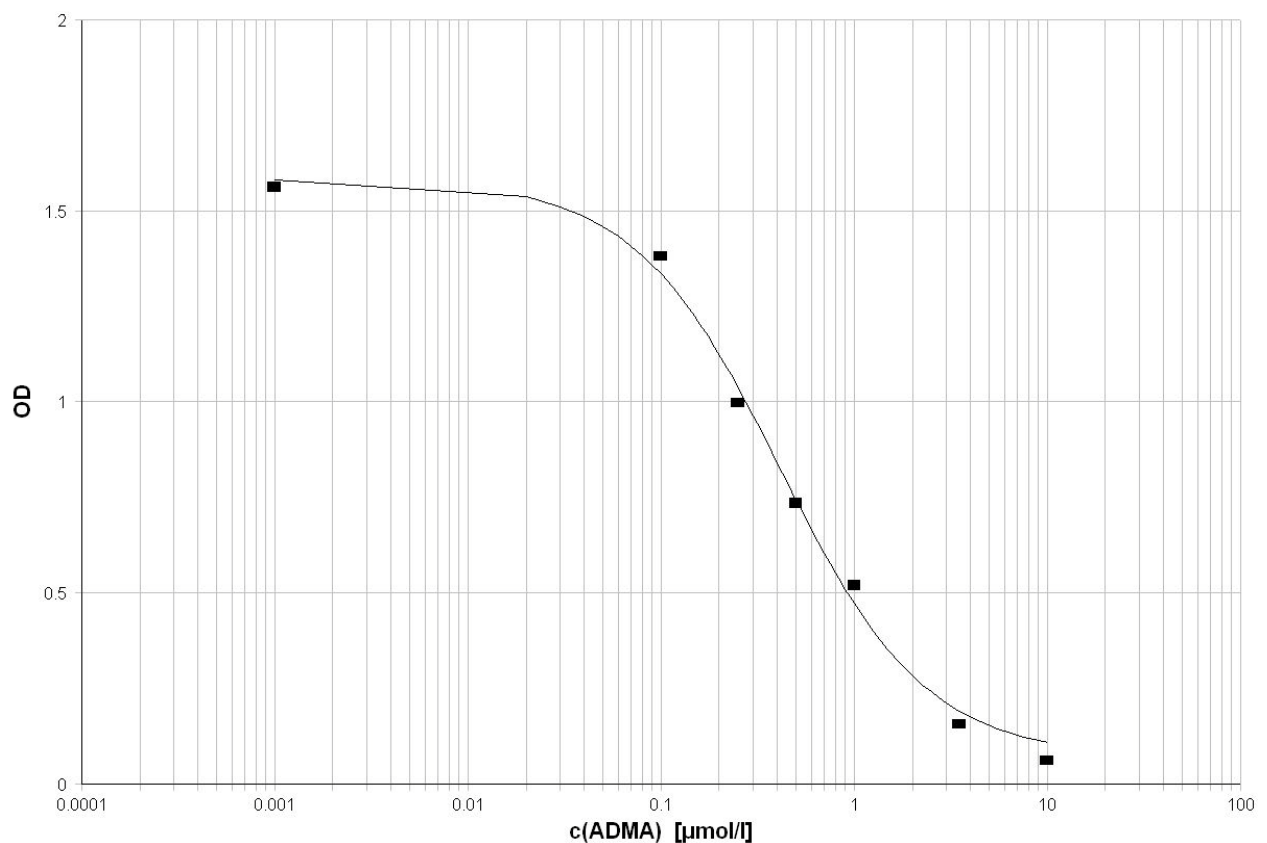
Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

## Urinproben

Die ermittelte ADMA-Konzentration (in  $\mu\text{mol/l}$ ) wird mit dem **Faktor 25** multipliziert.

Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve. Sie darf nicht zur Auswertung der Messwerte benutzt werden.

## Musterkalibrierkurve



## 9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer ADMA-Konzentration größer dem größten Standard sollten mit Reaktionspuffer (DERBUF) vorverdünnt werden und nochmals im Assay eingesetzt werden. Dieser zusätzliche Verdünnungsfaktor muss bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

## 10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### *Spezifität*

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter Substanzen. Die Kreuzreaktivität wird angegeben in Prozent, bezogen auf die ADMA-Reaktivität.

L-Arginin	< 0,02 %
SDMA	< 0,5 %
NMMA	< 0,5 %

## 12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu Forschungszwecken verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten Natriumazid oder ProClin zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch

Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ ).  $H_2SO_4$  ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet werden.  $H_2SO_4$  verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

### 13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden, da schon geöffnete Mikrotiterplatten anderen Bedingungen unterliegen als verschlossene.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

### 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immunodiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

## 15. LITERATUR

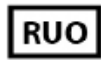
- Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of NO synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; **339**: 572 – 575
- Kielstein JT, Böger RH, Bode-Böger SM, et al. Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: Relationship to treatment method and atherosclerotic disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1999; **10**: 594 – 600
- Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tangphao O, Tsao PS, Chan JR, Blaschke TF, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine: a novel risk factor for endothelial dysfunction. Its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; **98**: 1842 – 1847
- 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, Nicolaidis 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.

**Verwendete Symbole:**

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



Nur für Forschungszwecke

Inhalt ausreichend für <n>  
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Manual

# ADMA ELISA Kit

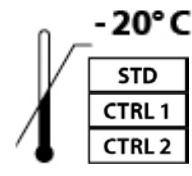
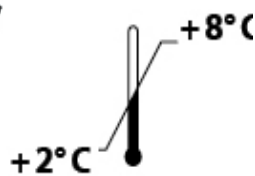
*For the in vitro determination of ADMA in urine*

*For research use only*

Valid from 17.06.2014



K 7830



Immundiagnostik AG

## Table of Contents

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>16</b>
<b>2. INTRODUCTION / CLINICAL RELEVANCE</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>17</b>
<b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>17</b>
<b>5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b>	<b>18</b>
<b>6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION</b>	<b>19</b>
<b>7. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>19</b>
<i>Principle of the test</i>	19
<i>Sample preparation procedure</i>	20
<i>Test procedure</i>	21
<b>8. RESULTS</b>	<b>22</b>
<b>9. LIMITATIONS</b>	<b>23</b>
<b>10. QUALITY CONTROL</b>	<b>23</b>
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>24</b>
<i>Specificity</i>	24
<b>12. PRECAUTIONS</b>	<b>24</b>
<b>13. TECHNICAL HINTS</b>	<b>24</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>25</b>
<b>15. REFERENCES</b>	<b>25</b>



## 1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is intended for the quantitative determination of asymmetric dimethyl arginine (ADMA) in urine. It is for research use only. Not for use in diagnostic procedures.

## 2. INTRODUCTION / CLINICAL RELEVANCE

Asymmetric dimethyl arginine (ADMA) is an endogenous inhibitor of NO-synthase. It is formed during proteolysis of methylated proteins and removed by renal excretion or metabolic degradation by the enzyme dimethylargininedimethylaminohydrolase (DDAH). Several cell types, including human endothelial and tubular cells are capable of synthesizing and metabolizing ADMA. Elevated ADMA concentrations in the blood are found in numerous diseases associated with endothelial dysfunction. For example, elevated ADMA levels in blood of dialysis patients correlate significantly with the degree of arteriosclerosis and cardiovascular risk. Furthermore, elevated ADMA levels are found in patients with hypercholesterolemia, hypertension, arteriosclerosis, chronic renal failure and chronic heart failure, and are associated with restrictions in endothelial vasodilatation.

During the last years, the important clinical relevance of the regulation of vascular tone and structure by nitric oxide (NO) has been shown. Moreover, there were reports that human endothelial cells produce ADMA as well as nitric oxide, which points to an endogenous endothelial NO-regulation by ADMA. Therefore it was assumed that hypertension, arteriosclerosis and immunological dysfunction in patients with chronic renal failure are connected to a dysfunction of the L-arginine/NO-metabolism and to ADMA accumulation. The reasons for the deregulation of the L-arginine/NO-metabolism could only partially be elucidated. Certainly, there are multiple factors involved in the L-arginine/NO-metabolism regulation as for example elevation of free superoxide radicals ( $O_2^-$ ), ADMA accumulation and reduced NO-synthase activity.

Prospective clinical studies of the last years demonstrate the increased importance of ADMA as a novel cardiovascular risk factor.

### Indication

- Arteriosclerosis
- Hypertension
- Chronic heart failure
- Coronary artery disease

- Hypercholesterolemia
- Chronic renal failure
- Diabetes mellitus
- Peripheral arterial occlusive disease

### 3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit Components	Quantity
K 7830MTP	PLATE	Holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 7830ST	STD	Standards diluted in reaction buffer, ready to use (0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 3.5; 10.0 $\mu$ M)	7 x 1 vial
K 7830KO1 K 7830KO2	CTRL 1 CTRL 2	Controls diluted in reaction buffer, ready to use	2 x 1 vial
K 7830WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 7830AK	AB	ADMA antibody, lyophilized	2 x 1 vial
K 7830K	2.AB	Conjugate (peroxidase-labeled), concentrate	1 x 120 $\mu$ l
K 7830CSP	2.ABDIL	Conjugate stabilizing buffer, ready to use	1 x 24 ml
K 7830RP	DERBUF	Reaction buffer, ready to use	1 x 90 ml
K 7830DR	DER	Derivatization reagent	2 x 50 mg
K 7830LM	DMSO	Dimethylsulfoxide (DMSO)	1 x 7 ml
K 7830SL	CODIL	Dilution buffer after derivatization, ready to use	1 x 28 ml
K 7830TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 25 ml
K 7830AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

### 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water\*
- Calibrated precision pipets and 10-1000  $\mu$ l tips
- Foil to cover the microtiter plate

- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge 3000 g
- Vortex
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 nm or 405 nm

\* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥18.2 MΩ cm).

## 5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 2 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- Dilute the **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) with ultra pure water **1:10** before use (**100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water**), mix well. Crystals may occur due to high salt concentration in the stock solution. The crystals must be redissolved at room temperature or at 37°C using a water bath before dilution. The buffer concentrate is stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label. Diluted buffer solution can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month**.
- **Standards (STD)** and **Controls (CTRL1, CTRL2)** are already diluted in reaction buffer (DERBUF). Store Standards and Controls frozen at **-20°C**, thaw before use in the test, and re-freeze immediately after use. They can be re-frozen up to 3 times
- **DMSO** could crystallize at 4°C. Dissolve the crystals at room temperature or in a water bath.
- Dissolve the content of one vial of **derivatization reagent (DER) (50 mg)** in **3 ml DMSO**. Put the vial on a horizontal shaker for 5 min. DER must be **prepared immediately before use**. When more than one vial is to be used, combine the contents and mix prior to use. Discard any rest of the reagent after use. The ELISA kit can be separated into two performances by providing

two DER vials. **Please note:** DMSO attacks all plastics but not polypropylene products and laboratory glass.

- Dissolve the content of one vial of **ADMA antibody (AB)** in **5.6 ml** of **diluted wash buffer**. For this, reconstitute the content of one AB vial with 0.6 ml of diluted wash buffer for 5 minutes. Then transfer quantitatively the obtained AB solution into a separate vial and add 5 ml of diluted wash buffer. The ELISA kit can be separated into two performances by providing two AB vials. Diluted ADMA antibody can be stored at **2-8°C for one month**.
- Dilute the **peroxidase conjugate (2.AB) 1:201** with conjugate stabilizing buffer (2.ABDIL) (e.g. **110 µl 2.AB + 22 ml 2.ABDIL**; prepare only the required amount). The undiluted POD conjugate is stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label. Diluted POD conjugate can be stored at **2-8°C for 1 week**.
- All other test reagents are ready for use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8°C**.

## 6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

### Urine

- Urine samples are stable for 4 days at 2-8°C. For longer storage samples should be frozen at -20°C. We recommend acidifying the urine samples.
- Dilute samples **1:100** with **reaction buffer (DERBUF):**  
**20 µl sample + 1980 µl DERBUF.**
- For sample preparation a derivatization reagent (DER) for derivatization of ADMA is added (see sample preparation procedure).

## 7. ASSAY PROCEDURE

### *Principle of the test*

This assay is based on the method of competitive enzyme linked immunoassays. The sample preparation includes the addition of a derivatization-reagent for ADMA derivatization. Afterwards, the treated samples and the polyclonal ADMA-antiserum are incubated in wells of a microtiter plate coated with ADMA-derivative (tracer). During the incubation period, the target ADMA in the sample competes with the tracer immobilized on the wall of the microtiter wells for the binding of the polyclonal antibodies. The ADMA in the sample displaces the antibodies out of the binding to the

tracer. Therefore, the concentration of the tracer-bound antibody is inverse proportional to the ADMA concentration in the sample. During the second incubation step a peroxidase-conjugated antibody is added to each microtiter well to detect the anti-ADMA antibodies. After washing away the unbound components tetramethylbenzidine (TMB) is added as a peroxidase substrate. Finally, the enzymatic reaction is terminated by an acidic stop solution. The color changes from blue to yellow and the absorbance is measured in the photometer at 450 nm. The intensity of the yellow color is inverse proportional to the ADMA concentration in the sample; this means, high ADMA concentration in the sample reduces the concentration of tracer-bound antibodies and lowers the photometric signal.

A dose response curve of absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from the standard. ADMA present in the patient samples is determined directly from this curve.

### *Sample preparation procedure*

Derivatization of standards (STD), controls (CTRL) and diluted samples (SAMPLE) is carried out in single analysis in vials (e.g. 1.5 ml vials) as follows:

1. Bring <b>all reagents and samples to room temperature</b> (15-30°C) and mix well.
2. Add <b>200 µl</b> of ready to use <b>standards (STD)</b> , <b>200 µl</b> of ready to use <b>controls (CTRL)</b> and <b>200 µl</b> of diluted <b>samples (SAMPLE)</b> in the corresponding vials.
3. Add <b>50 µl</b> of freshly prepared <b>derivatization reagent (DER)</b> into each vial (STD, CTRL, SAMPLE), <b>mix thoroughly</b> and incubate for <b>45 min</b> at <b>room temperature</b> (15-30°C) on a horizontal <b>shaker</b> (180-240 rpm).
4. Afterwards add <b>250 µl</b> of <b>dilution buffer (CODIL)</b> into each vial, mix well and incubate for <b>45 min</b> at <b>room temperature</b> (15-30°C) on a horizontal <b>shaker</b> (180-240 rpm).

**2 x 100 µl of each treated sample (STD, CTRL, SAMPLE)** are used in the ELISA as duplicates.

### Test procedure

5. Mark the positions of standards (STD)/ controls (CTRL)/samples (SAMPLE) in duplicate on a <b>protocol sheet</b> .
6. Take as many <b>microtiter strips (PLATE)</b> as needed from kit. Store unused strips covered at 2-8°C. Strips are stable until the expiry date stated on the label.
7. Wash the microtiter strips <b>5x</b> with <b>250 µl of diluted wash buffer</b> before use. After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
8. For the analysis in duplicate take <b>2 x 100 µl</b> of the <b>derivatized standards/ controls/ samples (STD/ CTRL/ SAMPLE)</b> out of the vials and add into the respective wells.
9. Add <b>100 µl</b> of diluted <b>ADMA antibody (AB)</b> into each well. Cover the plate tightly.
10. Incubate <b>overnight (15-20 hours) at 2-8°C</b> .
11. Aspirate the contents of each well. Wash each well <b>5 x</b> with <b>250 µl of diluted wash buffer</b> . After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
12. Add <b>200 µl</b> of diluted <b>peroxidase conjugate (2.AB)</b> into each well.
13. Cover the plate tightly and incubate for <b>1 hour at room temperature (15-30°C)</b> on a horizontal shaker (180-240 rpm).
14. Aspirate the contents of each well. Wash each well <b>5 x</b> with <b>250 µl of diluted wash buffer</b> . After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
15. Add <b>200 µl</b> of <b>TMB substrate (SUB)</b> into each well.
16. Incubate for <b>6-10 min</b> at <b>room temperature (15-30°C)</b> in the dark*.
17. Add <b>100 µl</b> of <b>stop solution (STOP)</b> into each well, mix thoroughly.

18. Determine **absorption immediately** with an ELISA reader at **450 nm** against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at **405 nm** against 620 nm (690 nm) as a reference.

\*The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend to observe the color change and to stop the reaction upon good differentiation.

## 8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the "4 parameter algorithm".

### 1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero standard must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

### 2. Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for concentration.

### 3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for concentration.

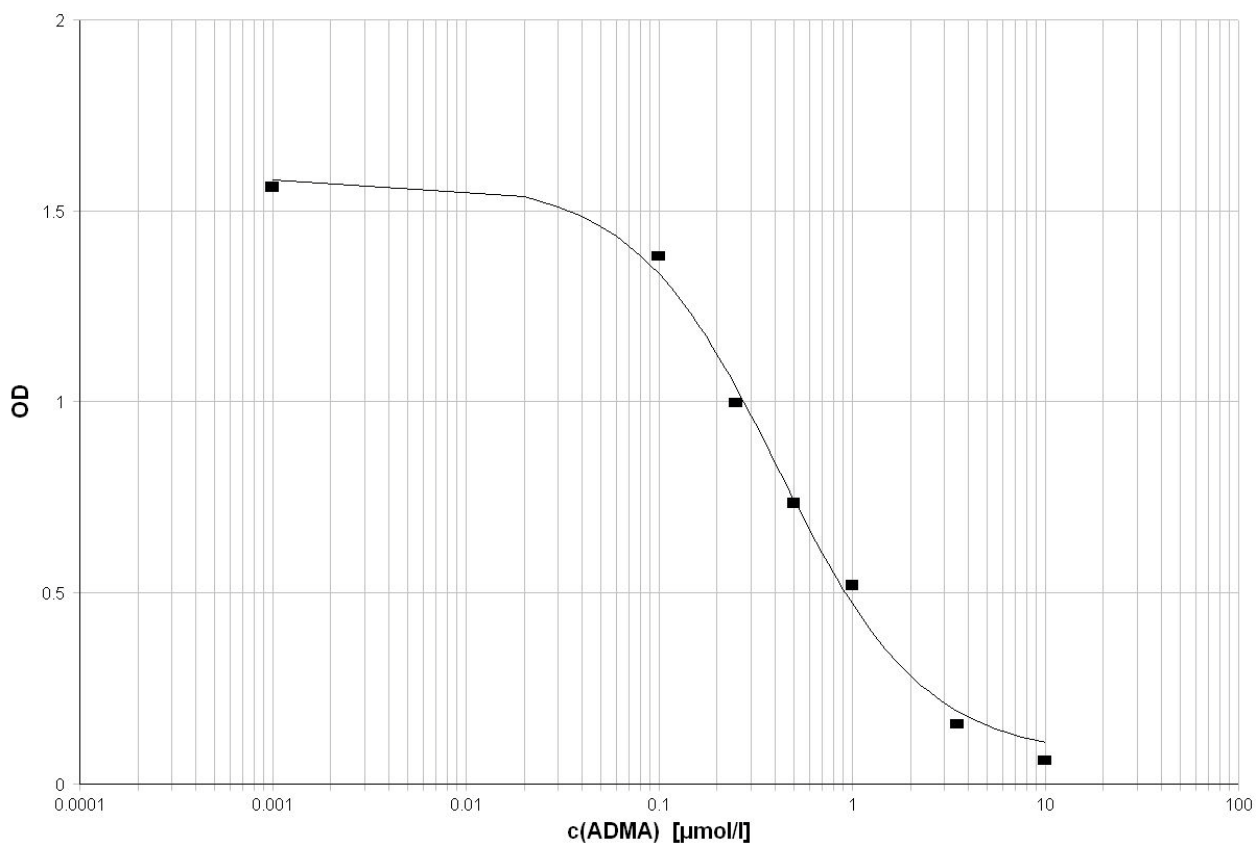
The plausibility of the duplicate values should be examined before automatically evaluating the results. If this option is not available within the used program, the duplicate values should be evaluated manually.

### Urine samples

The obtained ADMA levels ( $\mu\text{mol/l}$ ) have to be multiplied by **factor 25**.

In the following, an example of a calibration curve is given; do not use it for the calculation of your results.

## Example of calibration curve



## 9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range should be pre-diluted in reaction buffer (DERBUF) and re-assayed. Consider this additional dilution factor in data evaluation.

## 10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analyzed with each run. Results generated from the analysis of control samples should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control samples are outside the acceptable limits.



## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Specificity*

Specificity was tested by measuring the cross-reactivity against compounds with structural similarity to ADMA. The specificity is calculated in percent in relation to the ADMA binding activity.

L-Arginin	< 0.02 %
SDMA	< 0.5 %
NMMA	< 0.5 %

## 12. PRECAUTIONS

- All reagents in the package are for research use only.
- Control samples should be analyzed with each run.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulfuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped out immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapour and avoid inhalation.

## 13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore, we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch, as wells from already opened microtiter plates are exposed to different conditions than sealed ones.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.

- To ensure accurate results proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

## 14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- Guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature, and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure which is not coordinated with the producer may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

## 15. REFERENCES

- 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
- Kielstein JT, Böger RH, Bode-Böger SM, et al. Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: Relationship to treatment method and atherosclerotic disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1999; **10**: 594 – 600
- Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tangphao O, Tsao PS, Chan JR, Blaschke TF, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine: a novel risk factor for endothelial dysfunction. Its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; **98**: 1842 – 1847
- 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, Nicolaidis 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.

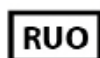
#### Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



For research use only



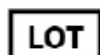
Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number