

L-Arginin ELISA Kit

Zur In-vitro-Bestimmung von L-Arginin in humanem EDTA-Plasma

L-arginine ELISA Kit

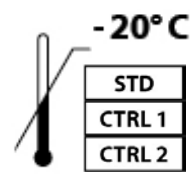
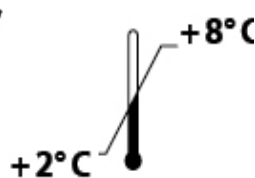
For the in vitro determination of L-arginine in human EDTA plasma

Nur zu Forschungszwecken / For research use only

Gültig ab / Valid from 20.11.2014



K 7733



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

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. INHALT DER TESTPACKUNG	2
3. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
4. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	3
5. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG	4
6. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema Probenvorbereitung</i>	6
<i>Pipettierschema Testdurchführung</i>	6
7. ERGEBNISSE	8
8. EINSCHRÄNKUNGEN	9
9. QUALITÄTSKONTROLLE	9
10. TESTCHARAKTERISTIKA	10
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	10
<i>Spike-Wiederfindung</i>	10
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	11
<i>Analytische Sensitivität</i>	11
<i>Spezifität</i>	11
<i>Korrelation mit HPLC-MS</i>	12
11. VORSICHTSMASSNAHMEN	12
12. TECHNISCHE MERKMALE	13
13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	13
14. LITERATUR	14
<i>Allgemeine Literatur</i>	14
<i>Literatur mit Immundiagnostik L-Arginin ELISA</i>	14

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von L-Arginin in humanem EDTA-Plasma geeignet. Für wissenschaftliche Forschung. Nicht für diagnostische Zwecke.

2. INHALT DER TESTPACKUNG

Art. Nr.	Bezeichnung	Kit Komponenten	Menge
K 7733MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 7733ST	STD	Standards vorverdünnt in Probenpuffer, gebrauchsfertig (0; 12,5; 30; 60; 120; 300 µM)	6 x 1 Fläschchen
K 7733KO1 K 7733KO2	CTRL 1 CTRL 2	Kontrollen vorverdünnt in Probenpuffer, gebrauchsfertig	2 x 1 Fläschchen
K 7733WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 7733PV	SAMPLEBUF	Probenpuffer, gebrauchsfertig	1 x 45 ml
K 7733AP	ASYBUF	Assaypufferkonzentrat, 10x	2 x 5 ml
K 7733AK	AB	L-Arginin-Antikörper, lyophilisiert	2 x 1 Fläschchen
K 7733VR	ABBUF	Antikörperverdünnungspuffer-Konzentrat, 10x	2 x 1 ml
K 7733K	CONJ	Konjugat, Peroxidase-markiert, Konzentrat	1 x 120 µl
K 7733CSP	CONJBUF	Konjugatstabilisierungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 24 ml
K 7733DR	DER	Derivatisierungsreagenz	2 x 12,5 mg
K 7733LM	DMF	Dimethylformamid (DMF)	1 x 2 ml
K 7733TMB	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 25 ml
K 7733AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

3. 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 (benötigte Filter siehe Kapitel 6)

* 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).

4. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits 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 kurz anzentrifugiert 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 Probenpuffer (SAMPLEBUF) 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.

- Der Inhalt eines Fläschchens **Derivatisierungsreagenz (DER) (12,5 mg)** wird in **750 µl DMF** gelöst und das Fläschchen für 5 min auf einen Horizontalschüttler gelegt. ACHTUNG: DMF ist giftig, bitte Vorsichtsmaßnahmen beachten (siehe Kapitel 11). 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 entsorgen. Durch die Aufteilung des DER in zwei Gefäße ist der ELISA in zwei Ansätze teilbar. **Bitte beachten:** DMF greift Plastik an, DMF reagiert nicht mit Polypropylen-Produkten und Glasgefäßen.
- Das **Assaypufferkonzentrat (ASYBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** mit Reinstwasser verdünnt werden: **45 ml Reinstwasser** zu den **5 ml Assaypufferkonzentrat** in der Flasche geben, gut mischen. Durch die Aufteilung des ASYBUF in 2 Gefäße ist der ELISA in zwei Ansätze teilbar. Verdünnter Assaypuffer kann **4 Wochen bei 2-8°C** aufbewahrt werden.
- Das **Antikörperverdünnungspuffer-Konzentrat (ABBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden: **9 ml Reinstwasser** zu **1 ml ABBUF Konzentrat** in der Flasche geben, gut mischen. Eventuell aufgetretene Kristalle vollständig auflösen. Durch die Aufteilung des ABBUF in 2 Gefäße ist der ELISA in zwei Ansätze teilbar. Verdünnter Antikörperpuffer kann **4 Wochen bei 2-8°C** aufbewahrt werden
- Der Inhalt eines Fläschchens **L-Arginin-Antikörper (AB)** wird in **9 ml verdünntem Antikörperverdünnungspuffer (ABBUF)** gelöst. Durch die Aufteilung des AB in 2 Gefäße ist der ELISA in zwei Ansätze teilbar. Verdünnter L-Arginin-Antikörper kann **4 Wochen bei 2-8°C** aufbewahrt werden.
- Das **Peroxidase-Konjugat (CONJ)** wird **1:201** in Konjugatstabilisierungspuffer (CONJBUF) verdünnt (z.B. **110 µl CONJ + 22 ml CONJBUF**; 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.

5. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

EDTA-Plasma

- Als Probe eignet sich EDTA-Plasma. Zur längeren Lagerung sollten die Proben bei -20°C aufbewahrt werden.

- Lipämische und hämolytische Proben beeinflussen das Testergebnis und sollten nicht verwendet werden.
- EDTA-Plasmaproben werden für die Derivatisierung vorverdünnt (siehe Pipettierschema Probenvorbereitung).
- Proben mit sichtbaren Mengen an Feststoff sollten zentrifugiert werden.
- Zur weiteren Vorbereitung muss die Probe mit einem Derivatisierungsreagenz (DER) zur Derivatisierung des enthaltenen L-Arginins versetzt werden (Details siehe Pipettierschema Probenvorbereitung).

6. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays. Zur Vorbereitung wird die zu untersuchende Probe mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen L-Arginin versetzt. Anschließend wird die derivatisierte Probe mit einem polyklonalen L-Arginin-Antiserum in einer mit L-Arginin-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-L-Arginin-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 L-Arginin 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

EDTA-Plasmaproben werden im **Faktor 1:40** vorverdünnt. Dafür werden jeweils **25 µl Probe** mit **975 µl Probenpuffer (SAMPLEBUF)** verdünnt.

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

Die Reagenzien dieses Kits reichen aus für 48 Derivatisierungen, welche jeweils als Doppelbestimmung in die Wells der Platte aufgetragen werden.

1. Vor Gebrauch alle **Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur** (15-30°C) bringen, gut mischen.
2. Je **100 µl gebrauchsfertiger Standard (STD)** bzw. **100 µl gebrauchsfertige Kontrollen (CTRL)** bzw. **100 µl vorverdünnte Probe (SAMPLE)** in Mikroreaktionsgefäße pipettieren.
3. **25 µl** frisch angesetztes **Derivatisierungsreagenz (DER)** in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, SAMPLE) pipettieren, **gründlich mischen** (z.B. durch mehrmaliges Umdrehen, oder mehrere Sekunden vortexen) und auf einem Horizontalschüttler (180-240 rpm) **45 min** bei **Raumtemperatur** (15-30°C) inkubieren.
4. Anschließend in alle verwendeten Mikroreaktionsgefäße **1250 µl verdünnten Assaypuffer (ASYBUF)** zugeben, gut mischen und auf einem Horizontalschüttler (180-240 rpm) **45 min** bei **Raumtemperatur** (15-30°C) inkubieren.

2 x 50 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 50 µl der vorbereiteten, derivatisierten Proben (STD, CTRL, SAMPLE) aus den Mikroreaktionsgefäßen als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
9. 150 µl verdünnten L-Arginin-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. 200 µl verdünntes Peroxidase-Konjugat (CONJ) in alle Vertiefungen pipettieren.
13. Platte abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30°C) unter Schütteln (180-240 rpm) inkubieren.
14. Inhalt der Platte verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
15. 200 µl TMB-Substrat (SUB) in alle Vertiefungen pipettieren.
16. 8-12 min bei Raumtemperatur (15-30°C) im Dunkeln inkubieren*
17. 100 µl Stopplösung (STOP) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen.
18. Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. 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.

7. ERGEBNISSE

Bei einer Durchführung des Tests unter strikter Einhaltung der Volumenangaben für Standards, Kontrollen und Probenbehandlung wird bei der Auswertung der Ergebnisse **kein Verdünnungsfaktor mitberechnet**.

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.

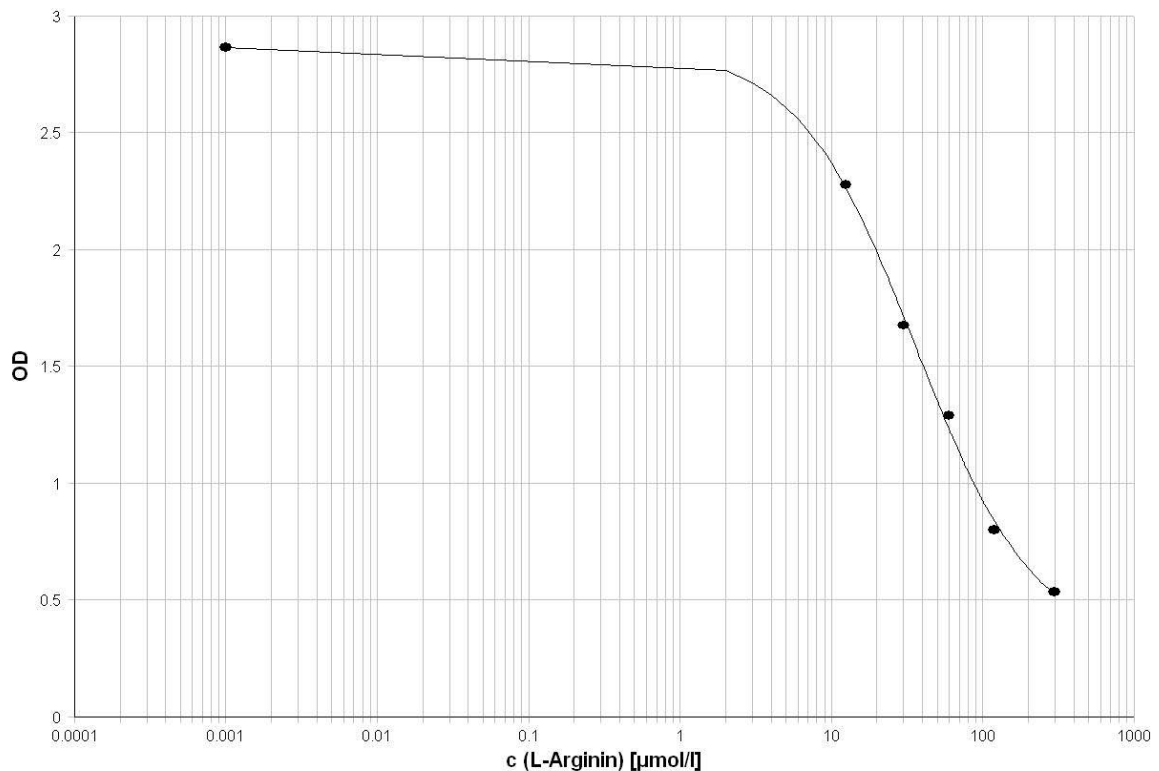
3. Gewichtete Spline-Funktion

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.

Die Konzentrationen der Kontrollen und Patientenproben können direkt aus der Kalibrierkurve in $\mu\text{mol/l}$ abgelesen werden. Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve. Sie darf nicht zur Auswertung der Messwerte benutzt werden.

Musterkalibrierkurve



8. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer L-Arginin-Konzentration größer dem größten Standard sollten mit Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) stärker verdünnt werden und nochmals im Assay eingesetzt werden. Bitte beachten Sie diesen Verdünnungsfaktor bei der Ergebnisberechnung.

9. 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.

10. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n=8)

Probe	L-Arginin [$\mu\text{mol/l}$]	VK [%]
1	51,4	8,5
2	94,4	8,9

Inter-Assay (n=6)

Probe	L-Arginin [$\mu\text{mol/l}$]	VK [%]
1	46,4	8,6
2	95,4	3,6

Spike-Wiederfindung

Eine Plasmaprobe wurde mit unterschiedlichen Mengen an L-Arginin versetzt (Spike) und anschließend im ELISA gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug 103,3 % (n=10).

Spike [$\mu\text{mol/l}$]	L-Arginin erwartet [$\mu\text{mol/l}$]	L-Arginin gemessen [$\mu\text{mol/l}$]	Wiederfindung [%]
0		49,5	
50	99,5	97,0	97,5
100	149,5	162,9	109,0

Wiederfindung in der Verdünnung

Eine mit L-Arginin gespikete Plasmaprobe wurde mit SAMPLBUF verdünnt und im Test gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug 100,6 % (n=6).

Verdünnung	L-Arginin erwartet [µmol/l]	L-Arginin gemessen [µmol/l]	Wiederfindung [%]
original		97,0	
3:4	72,8	66,7	91,6
2:3	64,7	64,6	99,8
1:2	48,5	49,5	102,1
1:3	32,3	35,2	108,8

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 - 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 32 x der Standard Null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 3,0 µmol/l.

Probe	L-Arginin Mittelwert [OD]	2 Standardabweichungen (2 x SD)	Nachweisgrenze [µmol/l]
Standard Null	1,7	0,1	3,0

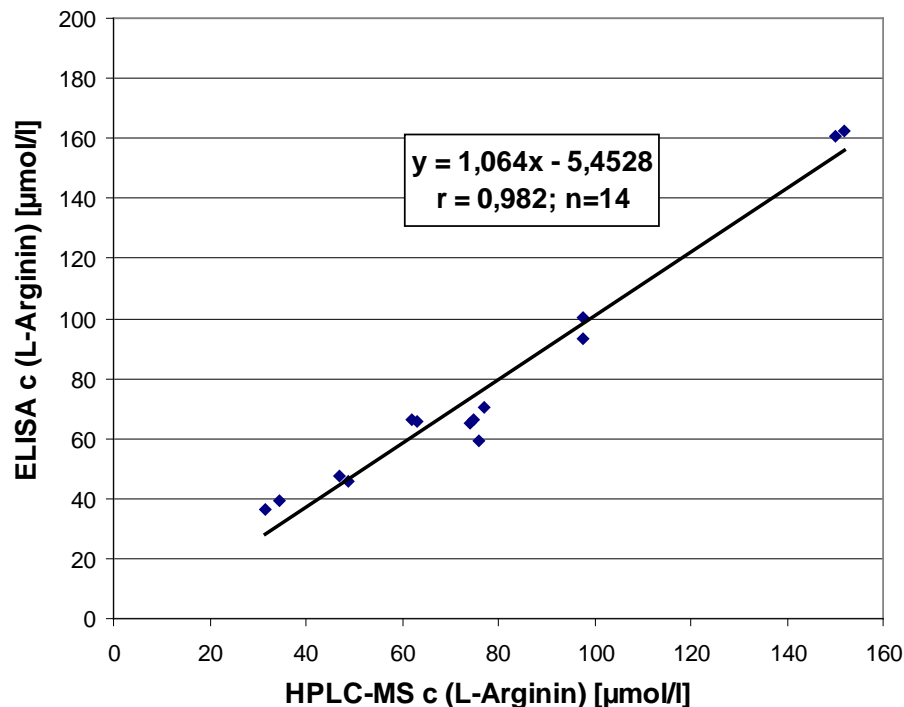
Spezifität

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

ADMA	< 0,06%
SDMA	< 0,006%

Korrelation mit HPLC-MS

Die Korrelation mit HPLC-MS wurde anhand von 14 Proben ermittelt, sie betrug $r = 0,982$.



11. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu Forschungszwecken verwendet 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 benutzt 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 Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

- DMF ist giftig. Es kann das Kind im Mutterleib schädigen und ist gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Hautkontakt. Arbeiten mit DMF sollten daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille unter dem Abzug vorgenommen werden. Bei Haut- oder Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und Arzt konsultieren.

12. 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.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- 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.

13. 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 Immunodiagnostik AG, zurückzusenden.

14. LITERATUR

Allgemeine Literatur

- Visser M, Paulus WJ, Vermeulen MA, Richir MC, Davids M, Wisselink W, de Mol BA, van Leeuwen PA. The role of asymmetric dimethylarginine and arginine in the failing heart and its vasculature. *Eur J Heart Fail.* 2010 Dec;**12**(12):1274-81. doi: 10.1093/eurjhf/hfq158.
- Neri I, Monari F, Sgarbi L, Berardi A, Masellis G, Facchinetti F. L-arginine supplementation in women with chronic hypertension: impact on blood pressure and maternal and neonatal complications. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2010 Dec;**23**(12):1456-60. doi: 10.3109/14767051003677962.
- Saleh AI, Abdel Maksoud SM, El-Maraghy SA, Gad MZ. Protective effect of L-arginine in experimentally induced myocardial ischemia: comparison with aspirin. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2011 Mar;**16**(1):53-62. doi: 10.1177/1074248410378506.
- Tripathi P, Chandra M, Misra MK. Oral administration of L-arginine in patients with angina or following myocardial infarction may be protective by increasing plasma superoxide dismutase and total thiols with reduction in serum cholesterol and xanthine oxidase. *Oxid Med Cell Longev.* 2009 Sep-Oct;**2**(4):231-7. doi: 10.4161/oxim.2.4.9233.
- Bailey SJ, Winyard PG, Vanhatalo A, Blackwell JR, DiMenna FJ, Wilkerson DP, Jones AM. Acute L-arginine supplementation reduces the O₂ cost of moderate-intensity exercise and enhances high-intensity exercise tolerance. *J Appl Physiol.* 2010 Nov;**109**(5):1394-403. doi: 10.1152/jappphysiol.00503.2010.

Literatur mit Immundiagnostik L-Arginin ELISA

- Brenner T, Fleming TH, Rosenhagen C, Krauser U, Mieth M, Bruckner T, Martin E, Nawroth PP, Weigand MA, Bierhaus A, Hofer S. L-arginine and asymmetric dimethylarginine are early predictors for survival in septic patients with acute liver failure. *Mediators of Inflammation.* **2012**: 210454 (2012). doi:10.1155/2012/210454.
- Brenner T, Fleming TH, Spranz D, Schemmer P, Bruckner T, Uhle F, Martin EO, Weigand MA, Hofer S. Reactive Metabolites and AGE-RAGE-Mediated Inflammation in Patients Following Liver Transplantation. *Mediators of Inflammation.* **2013**: 501430 (2013) doi:10.1155/2013/501430.

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



Nur für Forschungszwecke

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Manual

L-arginine ELISA Kit

For the in vitro determination of of L-arginine in human EDTA plasma

For research use only

Valid from 20.11.2014

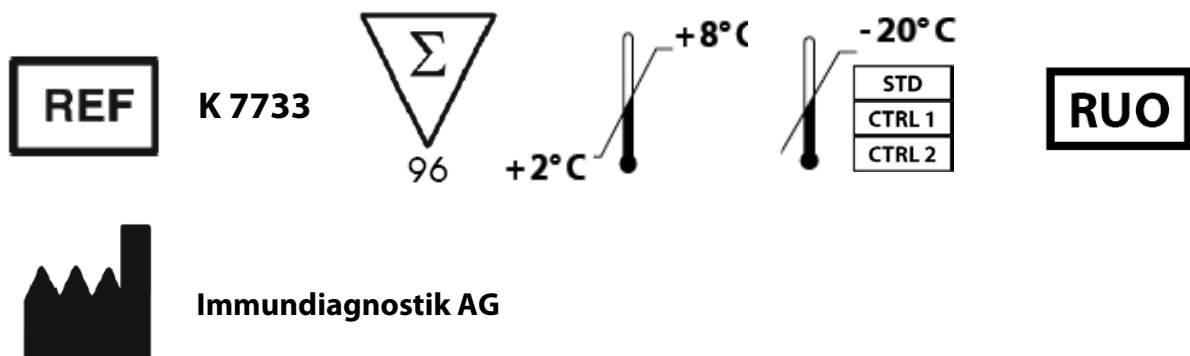


Table of Contents

1. INTENDED USE	18
2. MATERIAL SUPPLIED	18
3. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	19
4. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	19
5. PREPARATION AND STORAGE OF SAMPLES	20
6. ASSAY PROCEDURE	21
<i>Principle of the test</i>	21
<i>Sample preparation procedure</i>	21
<i>Test procedure</i>	22
7. RESULTS	23
8. LIMITATIONS	24
9. QUALITY CONTROL	25
10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	25
<i>Precision and reproducibility</i>	25
<i>Spiking recovery</i>	25
<i>Dilution recovery</i>	26
<i>Analytical sensitivity</i>	26
<i>Specificity</i>	26
<i>Correlation with HPLC-MS</i>	27
11. PRECAUTIONS	27
12. TECHNICAL HINTS	28
13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	28
14. REFERENCES	28
<i>General literature</i>	28
<i>Literature using Immundiagnostik L-arginine ELISA</i>	28

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is intended for the quantitative determination of L-arginine in human EDTA plasma. For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

2. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit Components	Quantity
K 7733MTP	PLATE	Holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 7733ST	STD	Standards diluted in sample buffer, ready to use (0, 12.5, 30, 60, 120, 300 µM)	6 x 1 vial
K 7733KO1 K 7733KO2	CTRL 1 CTRL 2	Controls diluted in sample buffer, ready to use	2 x 1 vial
K 7733WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 7733PV	SAMPLEBUF	Sample buffer, ready to use	1 x 45 ml
K 7733AP	ASYBUF	Assay buffer concentrate, 10x	2 x 5 ml
K 7733AK	AB	L-arginine antibody, lyophilized	2 x 1 vial
K 7733VR	ABBUF	Antibody dilution buffer concentrate, 10x	2 x 1 ml
K 7733K	CONJ	Conjugate (peroxidase-labeled), concentrate	1 x 120 µl
K 7733CSP	CONJBUF	Conjugate stabilizing buffer, ready to use	1 x 24 ml
K 7733DR	DER	Derivatization reagent	2 x 12,5 mg
K 7733LM	DMF	Dimethylformamide (DMF)	1 x 2 ml
K 7733TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 25 ml
K 7733AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

3. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Calibrated precision pipets and 10-1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Centrifuge, 3000 g
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 6)

* 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).

4. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than once ensure that reagents are stored at the 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 sample buffer (SAMPLEBUF). Store Standards and Controls frozen at **-20°C**, thaw before use in the test and mix well. Re-freeze standards and controls immediately after use. They can be re-frozen up to 3 times.
- Dissolve the content of one vial of **derivatization reagent (DER) (12.5 mg) in 750 µl DMF**. CAUTION! DMF is toxic (see chapter 11 - precautions). 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. Dispose of any rest of the reagent after use. The ELISA kit can be separated into two performances by providing two DER vials. **Please note:** DMF attacks all plastics but not polypropylene products and laboratory glass.

- Dilute the **assay buffer concentrate (ASYBUF)** with ultra pure water **1:10** before use: Add **45 ml ultra pure water** to the **5 ml concentrate** in the bottle, mix well. The ELISA kit can be separated into two performances by providing 2 x 5 ml assay buffer. Diluted assay buffer can be stored at **2-8°C for 4 weeks.**
- Dilute the **antibody dilution buffer concentrate (ABBUF)** with aqua bidest. **1:10** before use: Add **9 ml ultra pure water** to **1 ml concentrate** in the bottle, mix well and dissolve any occurring crystals. The ELISA kit can be separated into two performances by providing 2 x 1 ml antibody dilution buffer concentrate. The diluted buffer can be stored at **2-8°C for 4 weeks.**
- Dissolve the **L-arginine antibody (AB)** in **9 ml of diluted antibody dilution buffer (ABBUF)**. The ELISA kit can be separated into two performances by providing two AB vials. Diluted L-arginine antibody can be stored at **2-8°C for one month.**
- Dilute the **peroxidase conjugate (CONJ) 1:201** with conjugate stabilizing buffer (CONJBUF) (e.g. **110 µl CONJ + 22 ml CONJBUF**; 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 to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8°C.**

5. PREPARATION AND STORAGE OF SAMPLES

EDTA plasma

- EDTA plasma is suited for this test system. For longer storage, samples should be frozen at -20°C.
- Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results and should not be used for analysis.
- The EDTA plasma samples are diluted for derivatization (see sample preparation procedure).

- Samples with visible amounts of precipitates should be centrifuged.
- For sample preparation a derivatization reagent (DER) for derivatization of L-arginine is added (details are given in the sample preparation procedure).

6. 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 L-arginine derivatization. Afterwards, the treated samples and the polyclonal L-arginine antiserum are incubated in wells of a microtiter plate coated with L-arginine-derivative (tracer). During the incubation period the target L-arginine in the sample competes with the tracer immobilized on the wall of the microtiter wells for the binding of the polyclonal antibodies. The L-arginine 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 L-arginine concentration in the sample.

During the second incubation step a peroxidase-conjugated antibody is added to each microtiter well to detect the anti-L-arginine 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 a photometer at 450 nm. The intensity of the yellow color is inverse proportional to the L-arginine concentration in the sample; this means, high L-arginine 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 standards. L-arginine present in the patient samples is determined directly from this curve

Sample preparation procedure

Dilute the **EDTA plasma samples** with reaction buffer by **factor 1:40**, i.e. **25 µl sample + 975 µl sample buffer (SAMPLEBUF)**.

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

The reagents provided with this kit are sufficient for up to 48 derivatizations, which are transferred in duplicate determinations to the wells of the microtiter plate.

1. Bring **all reagents and samples to room temperature** (15-30°C) and mix well.
2. Add **100 µl of ready to use standards (STD)**, **100 µl of ready to use controls (CTRL)** and **100 µl of diluted samples (SAMPLE)** in the corresponding vial.
3. Add **25 µl** of freshly prepared **derivatization reagent (DER)** into each vial (STD, CTRL, SAMPLE), **mix thoroughly** by repeated inversion or several seconds on a vortex mixer and incubate for **45 min at room temperature** (15-30°C) on a horizontal **shaker** (180-240 rpm).
4. Afterwards add **1250 µl of diluted assay buffer (ASYBUF)** into each vial, mix well and incubate for **45 min at room temperature** (15-30°C) on a horizontal **shaker** (180-240 rpm).

2 x 50 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 **protocol sheet**.
6. Take as many **microtiter strips (PLATE)** 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 each well **5x** with **250 µl of diluted wash buffer** 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 **2 x 50 µl** of the **derivatized standards/ controls/ samples (STD/ CTRL/ SAMPLE)** out of the vials and add into the respective wells.
9. Add **150 µl** of diluted **L-arginine antibody (AB)** into each well. Cover the plate tightly.

10. Incubate overnight (15-20 hours) at 2-8°C .
11. Aspirate or decant the contents of each well. Wash each well 5 x with 250 µl of diluted wash buffer . After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
12. Add 200 µl of diluted peroxidase conjugate (CONJ) into each well.
13. Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (15-30°C) on a horizontal shaker (180-240 rpm).
14. Aspirate or decant the contents of each well. Wash each well 5 x with 250 µl of diluted wash buffer . After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
15. Add 200 µl of TMB substrate (SUB) into each well.
16. Incubate for 8-12 min at room temperature (15-30°C) in the dark*.
17. Add 100 µl of stop solution (STOP) 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.

7. RESULTS

If the test is performed in strict compliance with the manufacturer's instructions, **no dilution factor is required for the calculation of 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.

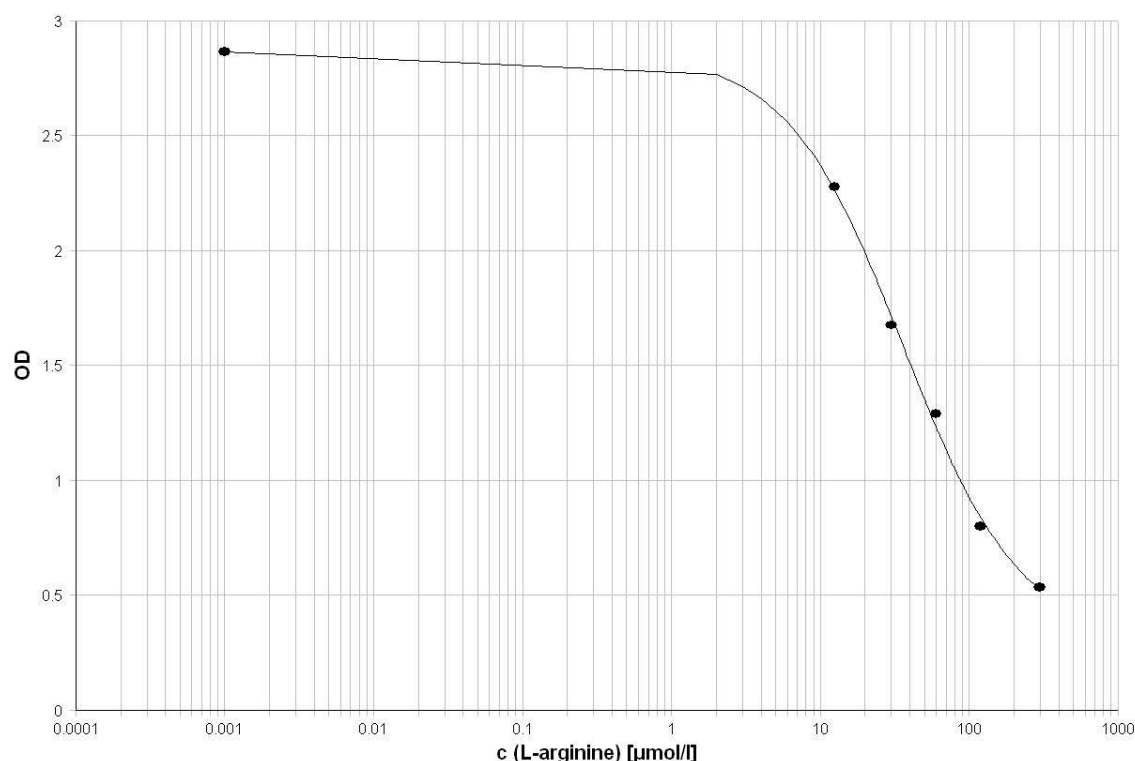
3. Spline algorithm

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.

The concentration of controls and patient samples can be determined directly from the calibration curve in $\mu\text{mol/l}$. 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



8. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range should be further diluted in sample buffer (SAMPLEBUF) and re-assayed. Please consider this dilution factor when calculating the results.

9. 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 of the acceptable limits.

10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-assay (n=8)

Sample	L-arginine [$\mu\text{mol/l}$]	CV [%]
1	51.4	8.5
2	94.4	8.9

Inter-assay (n=6)

Sample	L-arginine [$\mu\text{mol/l}$]	CV [%]
1	46.4	8.6
2	95.4	3.6

Spiking recovery

One plasma sample was spiked with different L-arginine concentrations and measured in this assay. The mean recovery rate was 103.3 % (n=10).

spike [$\mu\text{mol/l}$]	L-arginine expected [$\mu\text{mol/l}$]	L-arginine measured [$\mu\text{mol/l}$]	recovery [%]
0		49.5	
50	99.5	97.0	97.5
100	149.5	162.9	109.0

Dilution recovery

One spiked plasma sample was diluted with sample buffer. The mean recovery rate was 100.6 % (n=6).

dilution	L-arginine expected [$\mu\text{mol/l}$]	L-arginine measured [$\mu\text{mol/l}$]	recovery [%]
original		97.0	
3:4	72.8	66.7	91.6
2:3	64.7	64.6	99.8
1:2	48.5	49.5	102.1
1:3	32.3	35.2	108.8

Analytical sensitivity

The zero-standard was measured 32 times. The detection limit was set as $B_0 - 2 \text{ SD}$ and estimated to be $3.0 \mu\text{mol/l}$.

Sample	L-arginine mean value [OD]	2 x standard deviation (2 x SD)	Detection limit [$\mu\text{mol/l}$]
zero-standard	1.7	0.1	3.0

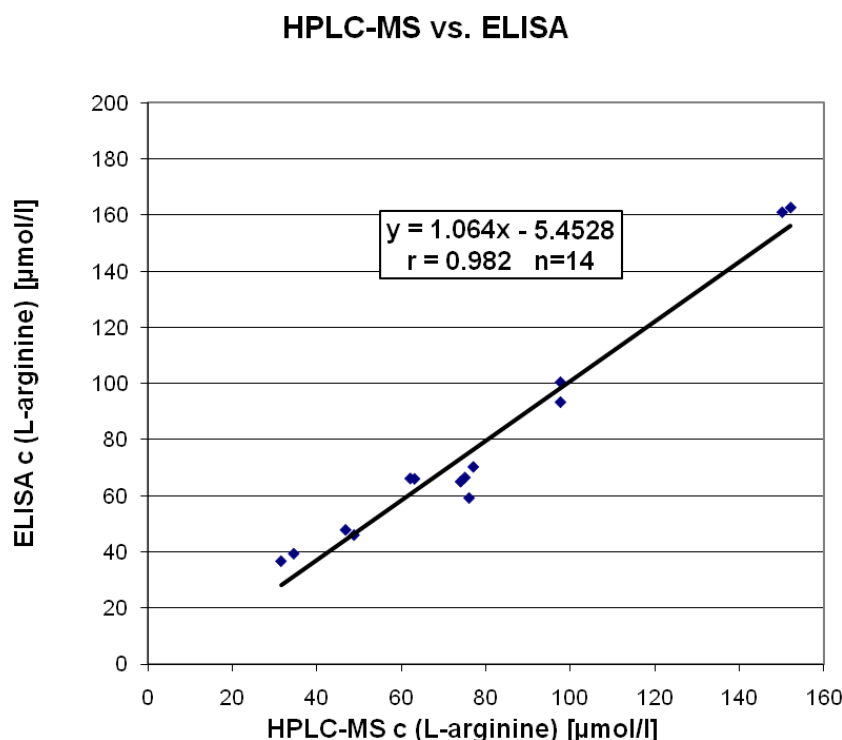
Specificity

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

ADMA	< 0.06 %
SDMA	< 0.006 %

Correlation with HPLC-MS

14 samples were measured with this ELISA and HPLC-MS. The correlation was $r = 0.982$.



11. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for research use only.
- 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 up immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapour and avoid inhalation.
- DMF is toxic. It may cause harm to the unborn child and is harmful by inhalation and in contact with skin. Work under hood and apply preventive skin protection. In case of skin or eye contact flush with plenty of water and get medical attention.

12. 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.
- Control samples should be analyzed with each run.
- 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.

13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- The 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.

14. REFERENCES

General literature

- Visser M, Paulus WJ, Vermeulen MA, Richir MC, Davids M, Wisselink W, de Mol BA, van Leeuwen PA. The role of asymmetric dimethylarginine and arginine in the failing heart and its vasculature. *Eur J Heart Fail.* 2010 Dec;**12**(12):1274-81. doi: 10.1093/eurjhf/hfq158.

- Neri I, Monari F, Sgarbi L, Berardi A, Masellis G, Facchinetti F. L-arginine supplementation in women with chronic hypertension: impact on blood pressure and maternal and neonatal complications. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2010 Dec;**23**(12):1456-60. doi: 10.3109/14767051003677962.
- Saleh AI, Abdel Maksoud SM, El-Maraghy SA, Gad MZ. Protective effect of L-arginine in experimentally induced myocardial ischemia: comparison with aspirin. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2011 Mar;**16**(1):53-62. doi: 10.1177/1074248410378506.
- Tripathi P, Chandra M, Misra MK. Oral administration of L-arginine in patients with angina or following myocardial infarction may be protective by increasing plasma superoxide dismutase and total thiols with reduction in serum cholesterol and xanthine oxidase. *Oxid Med Cell Longev.* 2009 Sep-Oct;**2**(4):231-7. doi: 10.4161/oxim.2.4.9233.
- Bailey SJ, Winyard PG, Vanhatalo A, Blackwell JR, DiMenna FJ, Wilkerson DP, Jones AM. Acute L-arginine supplementation reduces the O₂ cost of moderate-intensity exercise and enhances high-intensity exercise tolerance. *J Appl Physiol.* 2010 Nov;**109**(5):1394-403. doi: 10.1152/jappphysiol.00503.2010.

Literature using Immundiagnostik L-arginine ELISA

- Brenner T, Fleming TH, Rosenhagen C, Krauser U, Mieth M, Bruckner T, Martin E, Nawroth PP, Weigand MA, Bierhaus A, Hofer S. L-arginine and asymmetric dimethylarginine are early predictors for survival in septic patients with acute liver failure. *Mediators of Inflammation.* **2012**: 210454 (2012). doi:10.1155/2012/210454.
- Brenner T, Fleming TH, Spranz D, Schemmer P, Bruckner T, Uhle F, Martin EO, Weigand MA, Hofer S. Reactive Metabolites and AGE-RAGE-Mediated Inflammation in Patients Following Liver Transplantation. *Mediators of Inflammation.* **2013**: 501430 (2013) doi:10.1155/2013/501430.

Used symbols:

Temperature limitation



Catalogue Number



For research use only



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number