

Arbeitsanleitung / Manual

ADMA ELISA

***Zur In-vitro-Bestimmung von ADMA in EDTA-Plasma und Serum
von Nagern sowie in Zellkulturmedien***

***For the in vitro determination of ADMA in EDTA plasma and serum
of rodents and in cell culture media***

Nur zu Forschungszwecken / For research use only

Gültig ab / Valid from 2019-01-03

REF KR3001



RUO



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

| | |
|-------------------------------------------------------|-----------|
| 1. VERWENDUNGSZWECK | 2 |
| 2. EINLEITUNG | 2 |
| 3. INHALT DER TESTPACKUNG | 3 |
| 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL | 4 |
| 5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN | 4 |
| 6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG | 5 |
| 7. TESTDURCHFÜHRUNG | 5 |
| <i>Testprinzip</i> | 5 |
| <i>Pipettierschema Probenvorbereitung</i> | 6 |
| <i>Pipettierschema Testdurchführung</i> | 6 |
| 8. 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> | 12 |
| <i>Spezifität</i> | 12 |
| 11. VORSICHTSMASSNAHMEN | 12 |
| 12. TECHNISCHE MERKMALE | 12 |
| 13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST | 12 |
| 14. LITERATUR | 13 |
| <i>Allgemeine Literatur</i> | 13 |
| <i>Literatur mit Immundiagnostik ADMA ELISA K3001</i> | 14 |

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die quantitative Bestimmung von asymmetrischem Dimethyl-L-Arginin (ADMA) in EDTA-Plasma und Serum von Nagern und in Zellkulturmedien geeignet. Nur zu Forschungszwecken. Nicht für diagnostische Zwecke.

2. EINLEITUNG

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 |
|--------------|-------------|---------------------------------------------------------------------|------------------------|
| KR3001 | PLATE | Mikrotitermodul, vorbeschichtet | 12 x 8 Vertiefungen |
| KR3001 | STD | Standards, gebrauchsfertig (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 µM) | 6 x 1 ml |
| KR3001 | CTRL 1 | Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen) | 1 x 1 ml |
| KR3001 | CTRL 2 | Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen) | 1 x 1 ml |
| KR0006.C.100 | WASHBUF A | Waschpufferkonzentrat, 10x | 2 x 100 ml |
| KR3001 | AB | ADMA-Antikörper, lyophilisiert | 1 vial |
| KR3001 | CONJ | Konjugat, gebrauchsfertig | 1 x 12 ml |
| KR0012.15 | DERBUF | Reaktionspuffer, gebrauchsfertig | 1 x 15 ml |
| KR3001 | DER | Derivatisierungsreagenz, lyophilisiert | 1 x 50 mg |
| KR0008.04 | DMSO | Dimethylsulfoxid (DMSO) | 1 x 4 ml |
| KR0013.28 | CODIL | Verdünnungspuffer nach Derivatisierung, gebrauchsfertig | 1 x 28 ml |
| KR0002.15 | SUB | Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig | 1 x 15 ml |
| KR0003.15 | STOP | Stopplösung, gebrauchsfertig | 1 x 15 ml |

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

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 (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).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert werden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF A)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF A + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehaltes im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF A** kann bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF A) ist **1 Monat bei 2-8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **DMSO** kristallisiert bei 2-8 °C aus. Vor Gebrauch das DMSO auf Raumtemperatur bringen, um die Kristalle zu lösen.
- Das **lyophilisierte Derivatisierungsreagenz (DER)** ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor dem Öffnen auf Raumtemperatur bringen. Das DER (50 mg) wird mit **3 ml DMSO** rekonstituiert, zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. **Das Derivatisierungsreagenz (gelöstes DER) kann 2 Monate bei 2-8 °C gelagert werden.** Das Derivatisierungsreagenz vor dem erneuten Gebrauch wieder auf Raumtemperatur bringen. Bitte beachten: DMSO greift

Plastik an, DMSO reagiert nicht mit Polypropylen-Produkten und Glasgefäßen.

- Der **lyophilisierte ADMA-Antikörper (AB)** ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Der AB wird mit **6 ml Waschpuffer** rekonstituiert. **ADMA-Antikörper** (rekonstituierter AB) **kann 2 Monate bei 2-8 °C gelagert werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2-8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

EDTA-Plasma und Serum von Nagern sowie Zellkulturmedien

- Blutproben sind bei 2-8 °C eine Woche haltbar. Zur längeren Lagerung müssen die Proben bei -20 °C aufbewahrt werden.
- Lipämische und hämolytische Proben beeinflussen das Testergebnis und sollten nicht verwendet werden.
- Plasma, Serum oder Zellkulturmedium werden **unverdünnt** verwendet.
- Zur weiteren Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen ADMA versetzt (siehe Pipettierschema Probenvorbereitung).

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von ADMA. Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays.

Zur Vorbereitung wird die zu untersuchende Probe mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen ADMA versetzt. Anschließend wird die derivatisierte Probe zusammen 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.

Beim zweiten Inkubationsschritt wird ein peroxidasemarkierter Sekundärantikörper zugegeben, der an die ADMA-Antikörper bindet. Nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Komponenten wird das Peroxidase-substrat Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb

erfolgt. 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 ADMA-Konzentration in der Probe reduziert sich die Konzentration der an den Tracer gebundenen Antikörper und das Signal nimmt ab. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema Probenvorbereitung

Vor Gebrauch alle **Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (15-30 °C) bringen, gut mischen.

Die Derivatisierung der Standards, der Kontrollen und der Proben wird in Mikroreaktionsgefäßen (z.B. 1,5-ml-Reaktionsgefäßen) durchgeführt.

Wir empfehlen, pro Standard, Kontrolle und Probe je eine Derivatisierung durchzuführen und diese jeweils als Doppelbestimmung in die Wells der Mikrotiterplatte aufzutragen.

| | |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. | 100 µl Standard (STD) bzw. 100 µl Kontrolle (CTRL) bzw. 25 µl Probe in die jeweiligen Mikroreaktionsgefäße pipettieren. |
| 2. | 75 µl Reaktionspuffer (DERBUF) nur zu den Proben in den Reaktionsgefäßen pipettieren. |
| 3. | 25 µl Derivatisierungsreagenz in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, Probe) pipettieren und gründlich mischen , z.B. durch mehrmaliges Umdrehen, oder mehrere Sekunden vortexen. Anschließend auf einem Horizontalschüttler 45 min bei Raumtemperatur (15-30 °C) inkubieren. |
| 4. | 125 µl Verdünnungspuffer (CODIL) in alle Reaktionsgefäße pipettieren, gut mischen und auf einem Horizontalschüttler 45 min bei Raumtemperatur (15-30 °C) inkubieren. |

2 x 50 µl der derivatisierten Standards, Kontrollen und Proben werden im ELISA als Doppelbestimmung eingesetzt.

Pipettierschema Testdurchführung

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben in Doppelbestimmung in einem Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden.

| | |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5. | 2 x 50 µl der derivatisierten Standards/Kontrollen/Proben als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren. |
| 6. | 50 µl ADMA-Antikörper in jede Vertiefung pipettieren. |
| 7. | Streifen luftdicht abdecken und über Nacht bei 2-8 °C inkubieren. |
| 8. | Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. |
| 9. | 100 µl Konjugat (CONJ) in jede Vertiefung pipettieren. |
| 10. | Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30 °C) unter Schütteln inkubieren. |
| 11. | Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. |
| 12. | 100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren. |
| 13. | 10-14 min* bei Raumtemperatur (15-30 °C) im Dunkeln inkubieren. |
| 14. | 100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen. |
| 15. | 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.

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

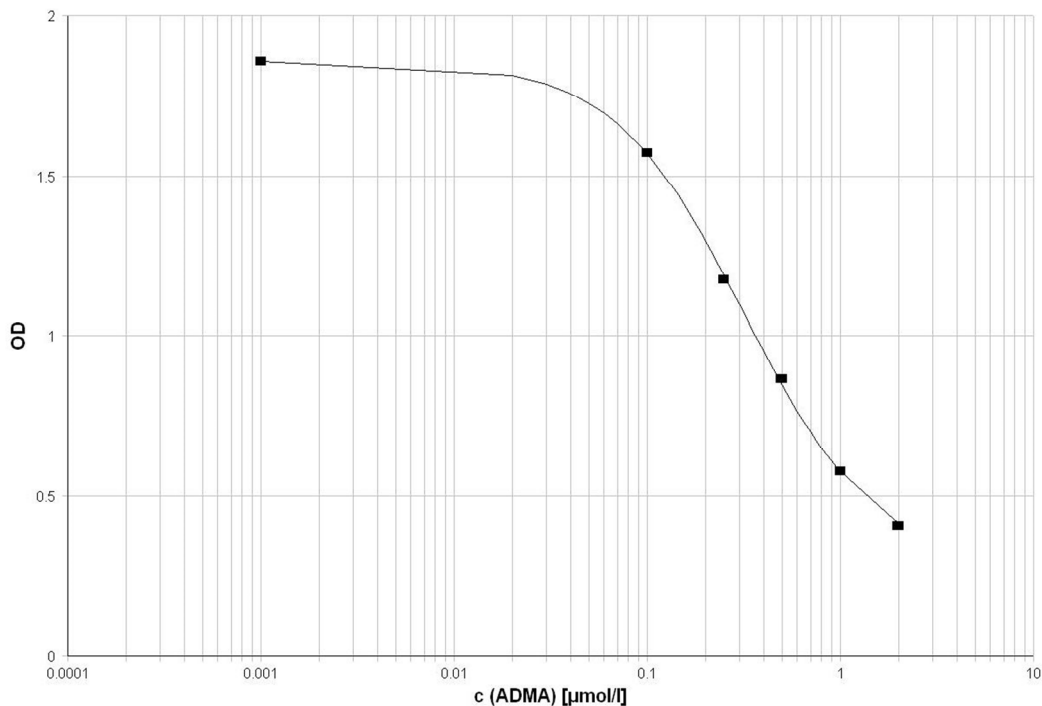
Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

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.

Serum und EDTA-Plasma, Zellkulturüberstand

Die Konzentrationen der Proben können direkt aus der Standardkurve in $\mu\text{mol/l}$ abgelesen werden. Es wird **kein Faktor** benötigt.

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



8. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können mit Reaktionspuffer (DERBUF) verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Standardkurve × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

LoB × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor

LoB siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

9. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG 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 AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

10. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Serum

Intra-Assay (n = 4)

| Probe | ADMA [$\mu\text{mol/l}$] | VK [%] |
|-------|----------------------------|--------|
| 1 | 0,33 | 7,0 |
| 2 | 0,67 | 6,5 |

Inter-Assay (n = 4)

| Probe | ADMA [$\mu\text{mol/l}$] | VK [%] |
|-------|----------------------------|--------|
| 1 | 0,34 | 7,0 |
| 2 | 0,67 | 6,5 |

Zellkulturmedium

Intra-Assay (n = 4)

| Probe | ADMA [$\mu\text{mol/l}$] | VK [%] |
|-------|----------------------------|--------|
| 1 | 0,54 | 6,6 |
| 2 | 1,02 | 4,8 |

Inter-Assay (n = 4)

| Probe | ADMA [$\mu\text{mol/l}$] | VK [%] |
|-------|----------------------------|--------|
| 1 | 0,54 | 7,7 |
| 2 | 0,99 | 5,5 |

Spike-Wiederfindung

Unterschiedliche Mengen an ADMA wurden zu einer Nagerserum-Probe bzw. zu Zellkulturmedium gegeben und anschließend im ELISA gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug bei Serum 92 %, bei Zellkulturmedium 104 % (n = 4).

Serum

| Spike [$\mu\text{mol/l}$] | ADMA erwartet [$\mu\text{mol/l}$] | ADMA gemessen [$\mu\text{mol/l}$] | Wiederfindung [%] |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------|
| | | 0,55 | |
| 0,5 | 1,05 | 0,98 | 93 |
| 1,0 | 1,55 | 1,41 | 91 |

Zellkulturmedium

| Spike [$\mu\text{mol/l}$] | ADMA erwartet [$\mu\text{mol/l}$] | ADMA gemessen [$\mu\text{mol/l}$] | Wiederfindung [%] |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------|
| | | 0,0 | |
| 0,5 | 0,5 | 0,55 | 110 |
| 1,0 | 1,0 | 0,98 | 98 |

Wiederfindung in der Verdünnung

Mit ADMA gespike Proben wurden mit REABUF verdünnt und im Test gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug für Serum 95 %, für Zellkulturmedium 88 %.

Serum

| Verdünnung | ADMA erwartet [$\mu\text{mol/l}$] | ADMA gemessen [$\mu\text{mol/l}$] | Wiederfindung [%] |
|-------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------|
| | | 1,51 | |
| 1:2 | 0,76 | 0,71 | 94 |
| 1:4 | 0,38 | 0,36 | 95 |

Zellkulturmedium

| Verdünnung | ADMA erwartet [$\mu\text{mol/l}$] | ADMA gemessen [$\mu\text{mol/l}$] | Wiederfindung [%] |
|-------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------|
| | | 0,98 | |
| 1:2 | 0,49 | 0,44 | 90 |
| 1:4 | 0,25 | 0,21 | 86 |

Analytische Sensitivität

| | |
|---------------------------------------------------------|-------------|
| Leerwert (<i>limit of blank</i> , LoB) | 0,12 µmol/l |
| Nachweisgrenze (<i>limit of detection</i> , LoD) | 0,15 µmol/l |
| Bestimmungsgrenze (<i>limit of quantitation</i> , LoQ) | 0,16 µmol/l |

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP-17-A2 durchgeführt. Das festgelegte Präzisionsziel für die Bestimmungsgrenze lag bei 20 % VK.

Spezifität

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

| | |
|-----------|----------|
| L-Arginin | < 0,01 % |
| SDMA | < 0,2 % |

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 zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. 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 (H₂SO₄). H₂SO₄ ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H₂SO₄ 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.

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 auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums 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 dem 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

1. 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
2. Böger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res*. 2003; **59**: 824-833












3. 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
4. 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.
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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

Literatur mit Immundiagnostik ADMA ELISA K3001

10. Kwiecien S, Ptak-Belowska A, Krzysiek-Maczka G, Targosz A, Jasnos K, Magierowski M, Szczyrk U, Brzozowski B, Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, interacts with gastric oxidative metabolism and enhances stress-induced gastric lesions. *J Physiol Pharmacol.* 2012, **63** (5): 515-524

11. Piecha G, Koleganova N, Ritz E, Müller A, Fedorova OV, Bagrov AY, Lutz D, Schirmacher P, Gross-Weissmann ML. High Salt Intake Causes Adverse Fetal Programming--Vascular Effects beyond Blood Pressure. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2012, **27** (9): 3464–76

Verwendete Symbole:

| | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
|  | Temperaturbegrenzung |  | Bestellnummer |
|  | Nur für Forschungszwecke |  | Zu verwenden mit |
|  | Hersteller |  | Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen |
|  | Chargenbezeichnung |  | Verwendbar bis |
|  | Achtung |  | Gebrauchsanweisung beachten |
|  | Spezifikationsdatenblatt beachten | | |

Manual

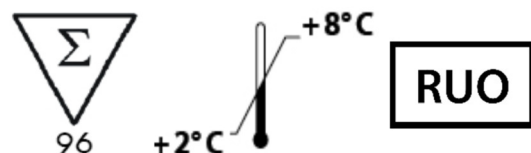
ADMA ELISA

For the in vitro determination of ADMA in EDTA plasma and serum of rodents and in cell culture media

For research use only

Valid from 2019-01-03

REF KR3001



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.Immundiagnostik.com

Table of Contents

| | |
|----------------------------------------------------------|-----------|
| 1. INTENDED USE | 18 |
| 2. INTRODUCTION | 18 |
| 3. MATERIAL SUPPLIED | 19 |
| 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED | 19 |
| 5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS | 20 |
| 6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES | 21 |
| 7. ASSAY PROCEDURE | 21 |
| <i>Principle of the test</i> | 21 |
| <i>Sample preparation procedure</i> | 21 |
| <i>Test procedure</i> | 22 |
| 8. RESULTS | 23 |
| 9. LIMITATIONS | 24 |
| 10. QUALITY CONTROL | 25 |
| 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS | 25 |
| <i>Precision and reproducibility</i> | 25 |
| <i>Spiking recovery</i> | 26 |
| <i>Dilution recovery</i> | 26 |
| <i>Analytical sensitivity</i> | 27 |
| <i>Specificity</i> | 27 |
| 12. PRECAUTIONS | 27 |
| 13. TECHNICAL HINTS | 28 |
| 14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE | 28 |
| 15. REFERENCES | 28 |
| <i>General literature</i> | 28 |
| <i>Literature using Immundiagnostik ADMA ELISA K3001</i> | 29 |

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is intended for the quantitative determination of asymmetric dimethyl-L-arginine (ADMA) in rodent EDTA plasma or serum and in cell culture media. It is for research use only. Not for use in diagnostic procedures.

2. INTRODUCTION

Asymmetric dimethylarginine (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 dimethylarginine dimethylaminohydrolase (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 |
|--------------|-----------|------------------------------------------------------------------|--------------|
| KR3001 | PLATE | Microtiter plate, pre-coated | 12 x 8 wells |
| KR3001 | STD | Standards, ready-to-use (0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 μ M) | 6 x 1 ml |
| KR3001 | CTRL 1 | Control, ready-to-use (see specification for range) | 1 x 1 ml |
| KR3001 | CTRL 2 | Control, ready-to-use (see specification for range) | 1 x 1 ml |
| KR0006.C.100 | WASHBUF A | Wash buffer concentrate, 10x | 2 x 100 ml |
| KR3001 | AB | ADMA antibody, lyophilised | 1 vial |
| KR3001 | CONJ | Conjugate, ready-to-use | 1 x 12 ml |
| KR0012.15 | DERBUF | Reaction buffer, ready-to-use | 1 x 15 ml |
| KR3001 | DER | Derivatisation reagent, lyophilised | 1 x 50 mg |
| KR0008.04 | DMSO | Dimethylsulfoxide (DMSO) | 1 x 4 ml |
| KR0013.28 | CODIL | Dilution buffer after derivatisation, ready-to-use | 1 x 28 ml |
| KR0002.15 | SUB | Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use | 1 x 15 ml |
| KR0003.15 | STOP | Stop solution, ready-to-use | 1 x 15 ml |

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Calibrated precision pipets and 10-1000 μ l 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 7)

* 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. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF A)** has to be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF A + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF A** is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF A) can be stored in a closed flask at **2-8 °C for 1 month**.
- **DMSO** crystallises at 2-8 °C. Before use, bring to room temperature to dissolve the crystals.
- The **lyophilised derivatisation reagent (DER)** is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. Bring to room temperature before opening. Reconstitute the DER (50 mg) with **3 ml DMSO**. Allow to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly with a vortex-mixer. **The derivatisation reagent** (reconstituted DER) **can be stored at 2-8 °C for 2 months**. Bring to room temperature before reuse. Please note: DMSO attacks all plastics but not polypropylene products and laboratory glass.
- The **lyophilised ADMA antibody (AB)** is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. Reconstitute the AB with **6 ml of wash buffer**. **ADMA antibody** (reconstituted AB) **can be stored at 2-8 °C for 2 months**.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2-8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

EDTA plasma and serum from rodents and cell culture media

- Blood samples are stable for one week at 2-8°C. For longer storage keep samples frozen at -20 °C.
- Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results and should not be used for analysis.
- Plasma, serum and cell culture medium samples are analysed **undiluted**.
- For sample preparation a derivatisation reagent for derivatisation of ADMA is added (see sample preparation procedure).

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of ADMA. The assay is based on the method of competitive enzyme linked immunoassays.

The sample preparation includes the addition of a derivatisation-reagent for ADMA derivatisation. Afterwards, the treated samples and the polyclonal ADMA-antiserum are incubated in the 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.

During the second incubation step a peroxidase-conjugated antibody is added 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 colour changes from blue to yellow, and the absorbance is measured in the photometer at 450 nm. The intensity of the yellow colour 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 the 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

Bring **all reagents and samples to room temperature** (15-30 °C) and mix well.

Derivatisation of standards, controls and samples is carried out in single analysis in vials (e.g. 1.5 ml vials).

We recommend preparing one derivatisation per standard, control and sample and transferring it in duplicate determinations into the wells of the microtiter plate.

| | |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. | Add 100 µl standard (STD), 100 µl control (CTRL) and 25 µl sample in the corresponding vials. |
| 2. | Add 75 µl reaction buffer (DERBUF) only to the samples . |
| 3. | Add 25 µl derivatisation reagent into each vial (STD, CTRL, sample), mix thoroughly by repeated inversion or several seconds on a vortex mixer. Incubate for 45 min at room temperature (15-30 °C) on a horizontal shaker . |
| 4. | Add 125 µl dilution buffer (CODIL) into each vial, mix well and incubate for 45 min at room temperature (15-30 °C) on a horizontal shaker . |

2 x 50 µl of the derivatised standards, controls and samples are used in the ELISA as duplicates.

Test procedure

Mark the positions of standards, controls and samples in duplicate on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips as needed from the kit. Store unused strips covered at 2-8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

| | |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5. | For the analysis in duplicate take 2 x 50 µl of the derivatised standards/ controls/ samples out of the vials and add into the respective wells of the microtiter plate. |
| 6. | Add 50 µl ADMA antibody into each well of the microtiter plate. |
| 7. | Cover the strips tightly with foil and incubate overnight at 2-8 °C . |
| 8. | Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper. |
| 9. | Add 100 µl conjugate (CONJ) into each well. |

| | |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10. | Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15-30 °C) on a horizontal shaker . |
| 11. | Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper. |
| 12. | Add 100 µl substrate (SUB) into each well. |
| 13. | Incubate for 10-14 min* at room temperature (15-30 °C) in the dark . |
| 14. | Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix well. |
| 15. | 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 colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour change and stopping 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

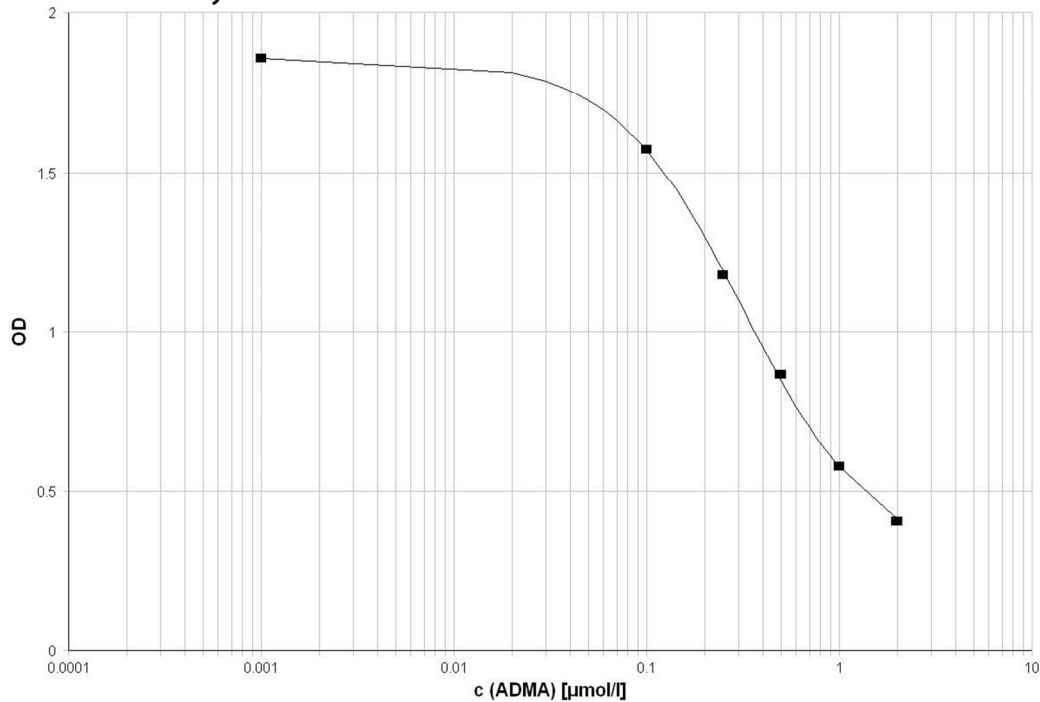
We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for concentration.

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

Serum and EDTA plasma, cell culture supernatant

The concentrations can be determined directly from the standard curve in $\mu\text{mol/l}$. **No factor** is required.

In the following, an example of a standard curve is given. Do not use it for the calculation of your results.



9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) can be diluted with reaction buffer (DERBUF) and re-assayed. Please consider this dilution factor when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range (see definition below) cannot be clearly quantified.

The upper limit of the measurement range can be calculated as:

highest concentration of the standard curve × sample dilution factor to be used

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

LoB × sample dilution factor to be used

LoB see chapter "Performance Characteristics".

10. QUALITY CONTROL

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

Control samples should be analysed 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.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Serum

Intra-Assay (n = 4)

| sample | ADMA [$\mu\text{mol/l}$] | CV [%] |
|--------|----------------------------|--------|
| 1 | 0.33 | 7.0 |
| 2 | 0.67 | 6.5 |

Inter-Assay (n = 4)

| sample | ADMA [$\mu\text{mol/l}$] | CV [%] |
|--------|----------------------------|--------|
| 1 | 0.34 | 7.0 |
| 2 | 0.67 | 6.5 |

Cell culture media

Intra-Assay (n = 4)

| sample | ADMA [$\mu\text{mol/l}$] | CV [%] |
|--------|----------------------------|--------|
| 1 | 0.54 | 6.6 |
| 2 | 1.02 | 4.8 |

Inter-Assay (n = 4)

| sample | ADMA [$\mu\text{mol/l}$] | CV [%] |
|--------|----------------------------|--------|
| 1 | 0.54 | 7.7 |
| 2 | 0.99 | 5.5 |

Spiking recovery

Different ADMA concentrations were spiked to rodent serum and to cell culture medium and measured in this assay. The mean recovery rate was 92 % for serum and 104 % for cell culture medium (n = 4).

Serum

| spike [$\mu\text{mol/l}$] | ADMA expected [$\mu\text{mol/l}$] | ADMA measured [$\mu\text{mol/l}$] | recovery [%] |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------|
| | | 0.55 | |
| 0.5 | 1.05 | 0.98 | 93 |
| 1.0 | 1.55 | 1.41 | 91 |

Cell culture media

| spike [$\mu\text{mol/l}$] | ADMA expected [$\mu\text{mol/l}$] | ADMA measured [$\mu\text{mol/l}$] | recovery [%] |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------|
| | | 0.0 | |
| 0.5 | 0.5 | 0.55 | 110 |
| 1.0 | 1.0 | 0.98 | 98 |

Dilution recovery

One spiked sample, respectively, was diluted with DERBUF. The mean recovery rate was 95 % for serum and 88 % for cell culture medium.

Serum

| spike [$\mu\text{mol/l}$] | ADMA expected [$\mu\text{mol/l}$] | ADMA measured [$\mu\text{mol/l}$] | recovery [%] |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------|
| | | 1.51 | |
| 1:2 | 0.76 | 0.71 | 94 |
| 1:4 | 0.38 | 0.36 | 95 |

Cell culture media

| spike [$\mu\text{mol/l}$] | ADMA expected [$\mu\text{mol/l}$] | ADMA measured [$\mu\text{mol/l}$] | recovery [%] |
|--------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------|
| | | 0.98 | |
| 1:2 | 0.49 | 0.44 | 90 |
| 1:4 | 0.25 | 0.21 | 86 |

Analytical sensitivity

| | |
|----------------------------|------------------------|
| Limit of blank, LoB | 0.12 $\mu\text{mol/l}$ |
| Limit of detection, LoD | 0.15 $\mu\text{mol/l}$ |
| Limit of quantitation, LoQ | 0.16 $\mu\text{mol/l}$ |

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP-17-A2. The specified accuracy goal for the LoQ was 20 % CV.

Specificity

The specificity of the antibody 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 | < 0.01 % |
| SDMA | < 0.2 % |

12. 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 colour 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.

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.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the 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

- 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.

15. REFERENCES

General literature

1. 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












2. Böger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res.* 2003; **59**: 824-833
3. 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
4. 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.
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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

Literature using Immundiagnostik ADMA ELISA K3001

10. Kwiecien S, Ptak-Belowska A, Krzysiek-Maczka G, Targosz A, Jasnos K, Magierowski M, Szczyrk U, Brzozowski B, Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, interacts with gastric oxidative metabolism and enhances stress-induced gastric lesions. *J Physiol Pharmacol.* 2012, **63** (5): 515-524

11. Piecha G, Koleganova N, Ritz E, Müller A, Fedorova OV, Bagrov AY, Lutz D, Schirmacher P, Gross-Weissmann ML. High Salt Intake Causes Adverse Fetal Programming--Vascular Effects beyond Blood Pressure. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2012, **27** (9): 3464–76

Used symbols:

| | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
|  | Temperature limitation |  | Catalogue Number |
|  | For research use only |  | To be used with |
|  | Manufacturer |  | Contains sufficient for <n> tests |
|  | Lot number |  | Use by |
|  | Attention |  | Consult instructions for use |
|  | Consult specification data sheet | | |