

Arbeitsanleitung / Manual

IDK[®] Arginin ELISA

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

IDK[®] Arginine ELISA

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

Nur zu Forschungszwecken / For research use only

Gültig ab / Valid from 2019-01-28

REF

KR7733



+2°C

+8°C

-20°C

STD
CTRL 1
CTRL 2

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

1. VERWENDUNGSZWECK

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

2. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Bezeichnung	Kit Komponenten	Menge
KR7733	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
KR7733	STD	Standards, gebrauchsfertig (0; 12,5; 30; 60; 120; 300 µM)	6 x 500 µl
KR7733	CTRL 1	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 500 µl
KR7733	CTRL 2	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 500 µl
KR0006.C.100	WASHBUF A	Waschpufferkonzentrat, 10 x	2 x 100 ml
KR7733	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
KR0011.70	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	2 x 70 ml
KR7733	AB	L-Arginin-Antikörper, lyophilisiert	2 x 1 vial
KR7733	CONJ	Konjugat, gebrauchsfertig	1 x 12 ml
KR7733	DER	Derivatisierungsreagenz, lyophilisiert	1 x 50 mg
KR0008.04	DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 x 4 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.

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. 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.
- Die gebrauchsfertigen **Standards und Kontrollen (STD/CTRL)** werden bei **-20°C** gelagert. Sie sind so bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch die Standards und Kontrollen auftauen und kurz vortexen. Nach Gebrauch wieder einfrieren.
- **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 L-Arginin-Antikörper (AB)** ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Der Inhalt eines Fläschchens AB wird mit **9 ml Waschpuffer** rekonstituiert. Werden mehrere Fläschchen benötigt, deren Inhalt vereinen und vor Gebrauch mischen. **L-Arginin-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.

5. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

EDTA-Plasma

- Als Probe eignet sich EDTA-Plasma. Zur längeren Lagerung sollten die Proben bei -20 °C aufbewahrt werden.
- Die Plasmaproben werden vor dem Einsatz im Test verdünnt (siehe Pipettierschema Probenvorbereitung).
- Zur weiteren Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen L-Arginins versetzt (siehe Pipettierschema Probenvorbereitung).

6. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von L-Arginin. 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 zusammen 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.

Beim zweiten Inkubationsschritt wird ein peroxidase markierter Sekundärantikörper zugegeben, der an die L-Arginin-Antikörper bindet. Nach einem

Waschschritt 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 L-Arginin-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.

EDTA-Plasmaproben werden **1:41** mit Probenverdünnungspuffer wie folgt verdünnt:

25 µl Probe + **1 ml** Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF), gut mischen.

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

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

1.	Jeweils 100 µl Standard (STD)/ Kontrolle (CTRL)/ verdünnte Probe in Mikroreaktionsgefäße pipettieren.
2.	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.
3.	1250 µl Assaypuffer (ASYBUF) in alle Reaktionsgefäße pipettieren, gut mischen.

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

Pipettierschema Testdurchführung

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben 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.

4.	Die Vertiefungen vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	2 x 50 µl der derivatisierten Standards/Kontrollen/Proben als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren.
6.	150 µl L-Arginin-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.	8-12 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.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

7. 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.

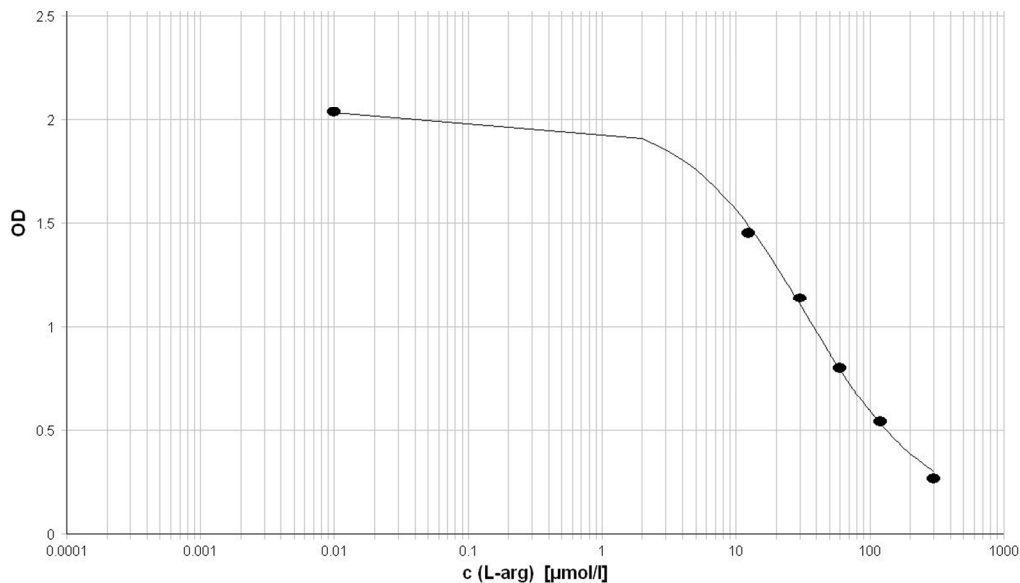
Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

EDTA-Plasma

Da die Probenverdünnung in der Standardkurve bereits berücksichtigt wurde, ist der Probenverdünnungsfaktor gleich 1.

Sollte ein zusätzlicher Verdünnungsfaktor verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit diesem zusätzlichen Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

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 Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) stärker 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:

Analytische Sensitivität × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor

Analytische Sensitivität 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

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 und gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug 103,3 % (n = 10).

Spike [$\mu\text{mol/l}$]	erwartet [$\mu\text{mol/l}$]	gemessen [$\mu\text{mol/l}$]	Wiederfindung [%]
		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 Probenpuffer verdünnt und im Test gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug 100,6 % (n = 6).

Verdünnung	erwartet [$\mu\text{mol/l}$]	gemessen [$\mu\text{mol/l}$]	Wiederfindung [%]
		97,0	
1:1,3	72,8	66,7	91,6
1:1,5	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-mal der Standard Null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von $3,0 \mu\text{mol/l}$.

Spezifität

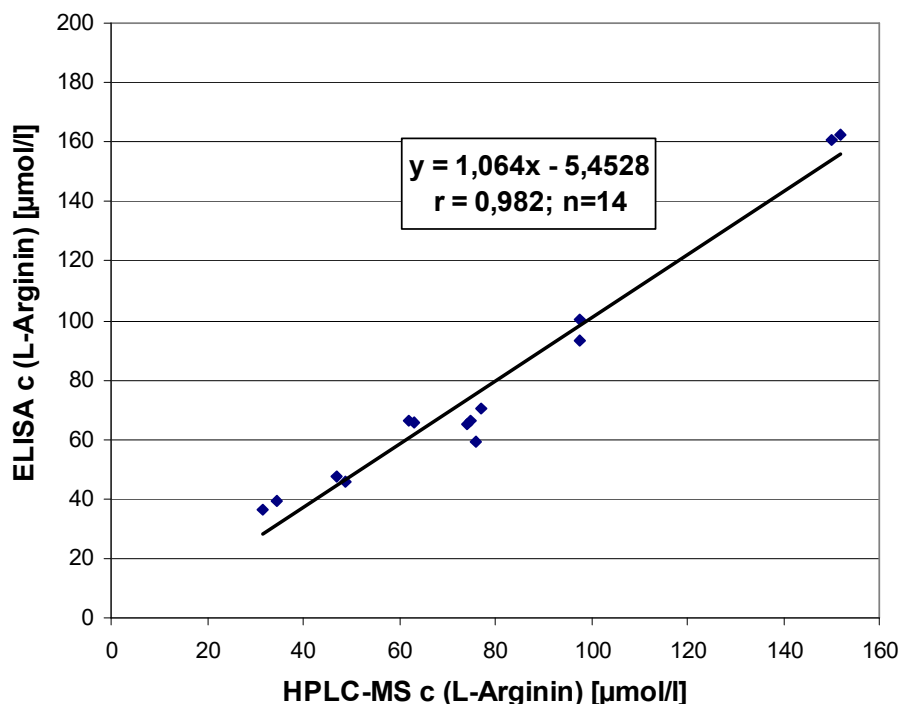
Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter Substanzen. Die Kreuzreaktivität wird angegeben in Prozent, bezogen auf die L-Arginin-Reaktivität:

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 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 (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.

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.
- IDK® ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- 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 Immun-

diagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

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

14. LITERATUR

Allgemeine Literatur












1. 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.
2. Carvalho DS, Diniz MM, Haidar AA, et al. L-Arginine supplementation improves insulin sensitivity and beta cell function in the offspring of diabetic rats through AKT and PDX-1 activation. *Eur J Pharmacol.* 2016;**791**:780-787. doi:10.1016/j.ejphar.2016.10.001.
3. Fayh APT, Krause M, Rodrigues-Krause J, et al. Effects of L-arginine supplementation on blood flow, oxidative stress status and exercise responses in young adults with uncomplicated type I diabetes. *Eur J Nutr.* 2013;**52**(3):975-983. doi:10.1007/s00394-012-0404-7.
4. Fazelian S, Hoseini M, Namazi N, et al. Effects of L- Arginine Supplementation on Antioxidant Status and Body Composition in Obese Patients with Pre-diabetes: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Adv Pharm Bull.* 2014;**4**(Suppl 1):449-454. doi:10.5681/apb.2014.066.
5. Giam B, Kuruppu S, Head G, Kaye D, Rajapakse N. Effects of Dietary L-Arginine on Nitric Oxide Bioavailability in Obese Normotensive and Obese Hypertensive Subjects. *Nutrients.* 2016;**8**(6):364. doi:10.3390/nu8060364
6. Hoang HH, Padgham S V, Meininger CJ. L-arginine, tetrahydrobiopterin, nitric oxide and diabetes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2013;**16**(1):76-82. doi:10.1097/MCO.0b013e32835ad1ef.
7. 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.
8. Piatti PM, Monti LD, Valsecchi G, et al. Long-term oral L-arginine administration improves peripheral and hepatic insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2001;**24**(5):875-880. doi:10.2337/diacare.24.5.875.

9. Rajapakse NW, Chong AL, Zhang W-Z, Kaye DM. Insulin-mediated activation of the L-arginine nitric oxide pathway in man, and its impairment in diabetes. *PLoS One*. 2013;**8**(5): e61840. doi:10.1371/journal.pone.0061840.
10. 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.
11. Schwedhelm E, Wallaschofski H, Atzler D, et al. Incidence of All-Cause and Cardiovascular Mortality Predicted by Symmetric Dimethylarginine in the Population-Based Study of Health in Pomerania. *PLoS One*. 2014;**9**(5):e96875. doi:10.1371/journal.pone.0096875.
12. 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.
13. 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.

Literatur mit Immundiagnostik IDK® Arginin ELISA

14. 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 Inflamm*. 2012;**2012**:210454. doi:10.1155/2012/210454.
15. 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 Inflamm*. 2013;**2013**:501430. doi:10.1155/2013/501430.

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

IDK® Arginine ELISA

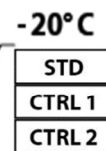
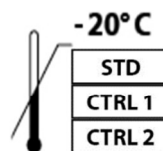
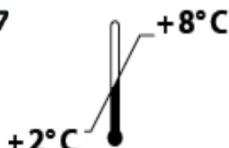
For the in vitro determination of of L-arginine in EDTA plasma

For research use only

Valid from 2019-01-28

REF

KR7733



STD
CTRL 1
CTRL 2

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

Table of Contents

1. INTENDED USE	17
2. MATERIAL SUPPLIED	17
3. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	17
4. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	18
5. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	19
6. ASSAY PROCEDURE	19
<i>Principle of the test</i>	19
<i>Sample preparation procedure</i>	20
<i>Test procedure</i>	20
7. RESULTS	21
8. LIMITATIONS	22
9. QUALITY CONTROL	22
10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	23
<i>Precision and reproducibility</i>	23
<i>Spiking recovery</i>	23
<i>Dilution recovery</i>	24
<i>Analytical sensitivity</i>	24
<i>Specificity</i>	24
<i>Correlation with HPLC-MS</i>	25
11. PRECAUTIONS	25
12. TECHNICAL HINTS	26
13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	26
14. REFERENCES	26
<i>General literature</i>	26
<i>Literature using Immundiagnostik IDK® Arginine ELISA</i>	28

1. INTENDED USE

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

2. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KR7733	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
KR7733	STD	Standards, ready-to-use (0, 12.5, 30, 60, 120, 300 µmol/l)	6 x 500 µl
KR7733	CTRL 1	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 500 µl
KR7733	CTRL 2	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 500 µl
KR0006.C.100	WASHBUF A	Wash buffer concentrate, 10 x	2 x 100 ml
KR7733	SAMPLEBUF	Sample buffer, ready-to-use	1 x 100 ml
KR0011.70	ASYBUF	Assay buffer, ready-to-use	2 x 70 ml
KR7733	AB	L-arginine antibody, lyophilised	2 x 1 vial
KR7733	CONJ	Conjugate, peroxidase-labelled, ready-to-use	1 x 12 ml
KR7733	DER	Derivatisation reagent, lyophilised	1 x 50 mg
KR0008.04	DMSO	Dimethylsulfoxide (DMSO)	1 x 4 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.

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. 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**.
- Store **standards and controls (STD/CTRL)** frozen at **-20 °C**. They are stable at **-20 °C** until the expiry date stated on the label. Thaw before use in the test and mix well. Re-freeze standards and controls after use.
- **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 L-arginine antibody (AB)** is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. Dissolve the content of one vial of AB in **9 ml of wash buffer**. When more than one vial is to be used, combine the contents

and mix prior to use. **L-arginine 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**.

5. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

EDTA plasma

- EDTA plasma is suited for this test system. For longer storage, keep samples frozen at -20 °C.
- The plasma samples are diluted before performing the assay (see sample preparation procedure).
- For sample preparation a derivatisation reagent for derivatisation of L-arginine is added (see sample preparation procedure).

6. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

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

The sample preparation includes the addition of a derivatisation reagent for L-arginine derivatisation. Afterwards, the treated samples and a 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, immobilised 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-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 colour changes from blue to yellow, and the absorbance is measured in a photometer at 450 nm. The intensity of the yellow colour 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 the 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

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

Dilute the EDTA plasma samples **1:41** with sample buffer as follows:

25 µl sample + **1 ml** sample buffer (SAMPLEBUF), mix well.

Derivatisation of standards, controls, and diluted samples is carried out 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)/ control (CTRL)/ diluted sample into the corresponding vials.
2.	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 .
3.	Add 1250 µl assay buffer (ASYBUF) into each vial and mix well.

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/samples 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 the expiry date stated on the label.

4.	Before use , wash the wells 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
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 150 µl L-arginine 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 8-12 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.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

7. 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.

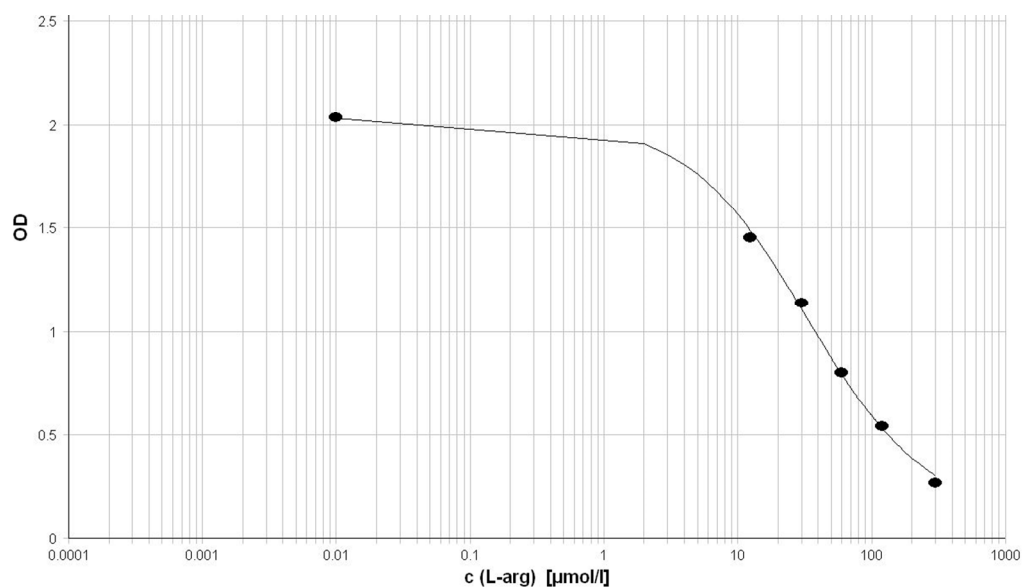
The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

EDTA plasma

Since the sample dilution is already considered in the standard curve, the dilution factor is 1.

In case an additional dilution factor is used, multiply the obtained result by the additionally used dilution factor.

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



8. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) can be further diluted with sample buffer (SAMPLEBUF) 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:

Analytical sensitivity × sample dilution factor to be used

Analytical sensitivity see chapter "Performance Characteristics".

9. 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.

10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-assay (n = 8)

Sample	L-arginine [µmol/l]	CV [%]
1	51.4	8.5
2	94.4	8.9

Inter-assay (n = 6)

Sample	L-arginine [µmol/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 using this assay. The mean recovery rate was 103.3 % (n = 10).

spike [$\mu\text{mol/l}$]	expected [$\mu\text{mol/l}$]	measured [$\mu\text{mol/l}$]	recovery [%]
		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	expected [$\mu\text{mol/l}$]	measured [$\mu\text{mol/l}$]	recovery [%]
		97.0	
1:1.3	72.8	66.7	91.6
1:1.5	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 $\mu\text{mol/l}$.

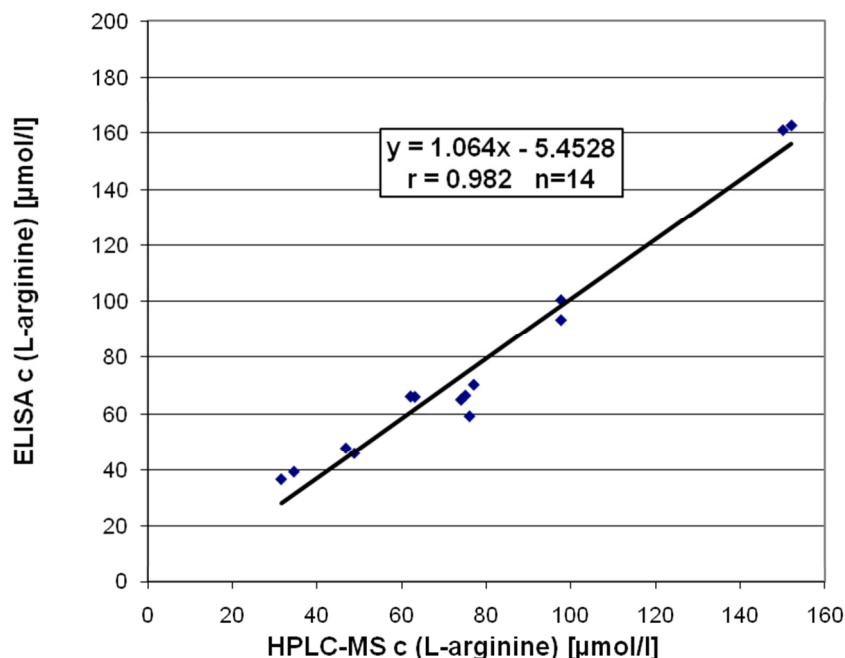
Specificity

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against a range of 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 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.

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 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.

13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- IDK® is a trademark of Immundiagnostik AG.
- 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

1. Bailey SJ, Winyard PG, Vanhatalo A, Blackwell JR, DiMenna FJ, Wilkerson DP, Jones AM. 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.
2. Carvalho DS, Diniz MM, Haidar AA, et al. L-Arginine supplementation improves insulin sensitivity and beta cell function in the offspring of diabetic












- rats through AKT and PDX-1 activation. *Eur J Pharmacol*. 2016;**791**:780-787. doi:10.1016/j.ejphar.2016.10.001.
3. Fayh APT, Krause M, Rodrigues-Krause J, et al. Effects of L-arginine supplementation on blood flow, oxidative stress status and exercise responses in young adults with uncomplicated type I diabetes. *Eur J Nutr*. 2013;**52**(3):975-983. doi:10.1007/s00394-012-0404-7.
 4. Fazelian S, Hoseini M, Namazi N, et al. Effects of L- Arginine Supplementation on Antioxidant Status and Body Composition in Obese Patients with Pre-diabetes: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Adv Pharm Bull*. 2014;**4**(Suppl 1):449-454. doi:10.5681/apb.2014.066.
 5. Giam B, Kuruppu S, Head G, Kaye D, Rajapakse N. Effects of Dietary L-Arginine on Nitric Oxide Bioavailability in Obese Normotensive and Obese Hypertensive Subjects. *Nutrients*. 2016;**8**(6):364. doi:10.3390/nu8060364
 6. Hoang HH, Padgham S V, Meininger CJ. L-arginine, tetrahydrobiopterin, nitric oxide and diabetes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2013;**16**(1):76-82. doi:10.1097/MCO.0b013e32835ad1ef.
 7. 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.
 8. Piatti PM, Monti LD, Valsecchi G, et al. Long-term oral L-arginine administration improves peripheral and hepatic insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2001;**24**(5):875-880. doi:10.2337/diacare.24.5.875.
 9. Rajapakse NW, Chong AL, Zhang W-Z, Kaye DM. Insulin-mediated activation of the L-arginine nitric oxide pathway in man, and its impairment in diabetes. *PLoS One*. 2013;**8**(5): e61840. doi:10.1371/journal.pone.0061840.
 10. 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.
 11. Schwedhelm E, Wallaschofski H, Atzler D, et al. Incidence of All-Cause and Cardiovascular Mortality Predicted by Symmetric Dimethylarginine in the Population-Based Study of Health in Pomerania. *PLoS One*. 2014;**9**(5):e96875. doi:10.1371/journal.pone.0096875.

12. 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.
13. 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.

Literature using Immundiagnostik IDK® Arginine ELISA

14. 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 Inflamm*. 2012;**2012**:210454. doi:10.1155/2012/210454.
15. 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 Inflamm*. 2013;**2013**:501430. doi:10.1155/2013/501430.

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		