

Arbeitsanleitung/Manual

Urotensin II ELISA Kit

Zur in vitro Bestimmung von Urotensin II in Serum/Plasma und Zellkulturüberstand

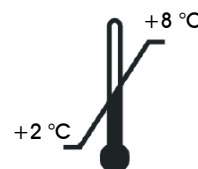
Urotensin II ELISA Kit

For the in vitro determination of Urotensin II in serum/plasma and cell culture supernatant

Gültig ab / Valid from 22.07.2008



K 1013



Inhaltsverzeichnis	Seite/Page
Table of contents	2
1. VERWENDUNGSZWECK	4
2. EINLEITUNG	4
3. TESTPRINZIP	4
4. INHALT DER TESTPACKUNG	5
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	5
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	6
7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	7
8. VORBEREITUNG DES PROBENMATERIALS	7
9. TESTDURCHFÜHRUNG	7
HINWEISE	7
PIPETTIERSHEMA	7
10. ERGEBNISSE	10
MUSTEREICHKURVE	10
12. QUALITÄTSKONTROLLE	11
13. LITERATUR	11
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11

Table of contents	Page
1. INTENDED USE	14
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	14
3. PRINCIPLE OF THE TEST	14
4. MATERIAL SUPPLIED	15
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	15
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	15
7. PRECAUTIONS	17
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	17
9. ASSAY PROCEDURE	17
PROCEDURAL NOTES	17
TEST PROCEDURE	17
10. RESULTS	20
TYPICAL CALIBRATION CURVE	20
11. LIMITATIONS	21
12. QUALITY CONTROL	21
13. LITERATURE	21
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	21

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von **Urotensin-II** aus Serum/Plasma und Zellkulturüberstand. Nur zu wissenschaftlichen Zwecken.

2. EINLEITUNG

Urotensin-II wurde ursprünglich im Rückenmark verschiedener Spezies (Fische, Vertebraten, Primaten) entdeckt. Es handelt sich um ein Peptid bestehend aus 11 Aminosäuren mit einer zyklische Region (CFWKYC), die für die biologische Aktivität verantwortlich ist.

1999 wurde Urotensin-II erstmals als Ligand für den GPR 14-Rezeptor definiert, welcher zu der Somatostatin/Opioid Rezeptorfamilie gehört und unter anderem von Endothelzellen des Blutgefäßsystems exprimiert wird. Wie in *in-vitro* Versuchen an isolierten Blutgefäßen gezeigt, fungiert Urotensin-II hier als vasoaktives „Somatostatin-ähnliches“ Peptid, dessen vasokonstriktorische Kapazität die bereits beschriebener vasoaktiver Substanzen wie z.B. Endothelin-1, Serotonin, Noradrenalin oder Angiotensin II um ein Vielfaches übersteigt. Urotensin-II zeigt in seiner Wirkung allerdings funktionelle und regionale Unterschiede in Abhängigkeit von der Spezies. Daher kann momentan noch keine generelle Aussage über die physiologische Rolle von Urotensin-II im Herz-Kreislaufsystem getroffen werden.

3. TESTPRINZIP

Dieser Testkit arbeitet nach dem Prinzip eines kompetitiven Enzym-Immunoassay. Das Urotensin-II der Probe konkurriert mit dem beschichteten Urotensin-II Peptid um die Bindung an den spezifischen Antikörper.

Im ersten Schritt wird Probe bzw. Standard mit dem spezifischen Antikörper (Kaninchen anti Urotensin-II) vorinkubiert. Nach Zugabe des Gemisches auf die Platte kompetitiert das Urotensin-II der Probe und des Standards mit dem Urotensin-II Peptid auf der MTP um die spezifische Bindung an den Antikörper. Mit steigender Analytkonzentration in der Probe bzw. Standard wird weniger Antikörper an das immobilisierte Peptid gebunden. Die Detektion und Quantifizierung erfolgt über einen Peroxidase-markierten Sekundärantikörper und der entsprechenden Substratumsetzung. Die gebundene Peroxidasemenge ist dabei dem Analytgehalt umgekehrt proportional. Als Substrat wird TMB eingesetzt. Die entstandene chromogene Verbindung kann photometrisch bei 450 nm gemessen werden.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 1013MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	96
K 13013WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	1 x 100 ml
K 1013AP	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
K 1013A2	AB	Antikörper, gebrauchsfertig	1 x 8 ml
K 1013K	CONJ	Konjugat (Ziege anti Kaninchen, HRPeroxidase-markiert), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 1013ST	STD	Standards, lyophilisiert (0; 32; 160; 800; 4000; 20000 pgl/ml)	6 vials
K 1013TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 1013AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Auf Wunsch erhalten Sie bei Bedarf 3 weitere Standardsets kostenlos. Jedes weitere Standardset wird berechnet.

5. Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

- Bidestilliertes (aqua bidest.) oder deionisiertes Wasser
- Tiefkühlschrank -20 °C
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Wasserbad bzw. Heizblock
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
Mikrotiterplattenreader mit Filter 450 nm
(Referenzfilter 620 oder 690 nm)

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden.**
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** (Pufferkonzentrat) kann **bei 2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. **Die verdünnte Pufferlösung ist bei 2-8 °C einen Monat in einem geschlossenen Gefäß haltbar.**
- Die lyophilisierten **STD** (Standards) werden mit **500 µl** aqua bidest. rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. Rekonstituierte Standards und Kontrolle können nicht gelagert werden.
- Der **AB** (Antikörper) ist nach Erhalt aus dem Kit zu entnehmen und bei -20 °C zu lagern. Er ist so bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Alle anderen Reagenzien sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar (siehe Etikett).

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur für wissenschaftliche Zwecke.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten Natriumazid oder Thimerosal zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. VORBEREITUNG DES PROBENMATERIALS

Serum/Plasma

Serum- und Plasmaproben sollte bis zur Verwendung bei $-20^{\circ}C$ gelagert werden. Die Proben werden vor der Bestimmung **1:10** in **ASYBUF** (Assaypuffer) verdünnt.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung abzuarbeiten.

Vorinkubation

1. **150 µl AB** (Antikörper) zu **150 µl STD** (Standard) und vorverdünnte Probe in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) pipettieren
2. **1 Stunde** bei 37 °C unter Schütteln inkubieren.

Pipettierschema

1.	Vor Gebrauch Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (18-26°C) bringen, gut mischen
2.	Positionen für STD (Standard) und Probe in Doppelbestimmung im Protokollblatt markieren
3.	Benötigte Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden
4.	Mikrotiterstreifen 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
5.	100 µl vorinkubierte STD (Standards) und Proben in die jeweiligen Vertiefungen in Doppelwerten pipettieren
6.	Streifen abdecken und 2 Stunden bei 37 °C unter Schütteln inkubieren**
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen

8.	100 µl CONJ (Peroxidase-markierter Antikörper) in jede Vertiefung pipettieren
9.	Streifen abdecken und 45 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren
10.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
11.	100 µl SUB (Substrat) in jede Vertiefung pipettieren
12.	5 - 15 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren*
13.	50 µl STOP (Stopplösung) in jede Vertiefung pipettieren und kurz mischen
14.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Sollte die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigen, sofort bei 405 nm gegen 620 nm (oder 690 nm) messen.

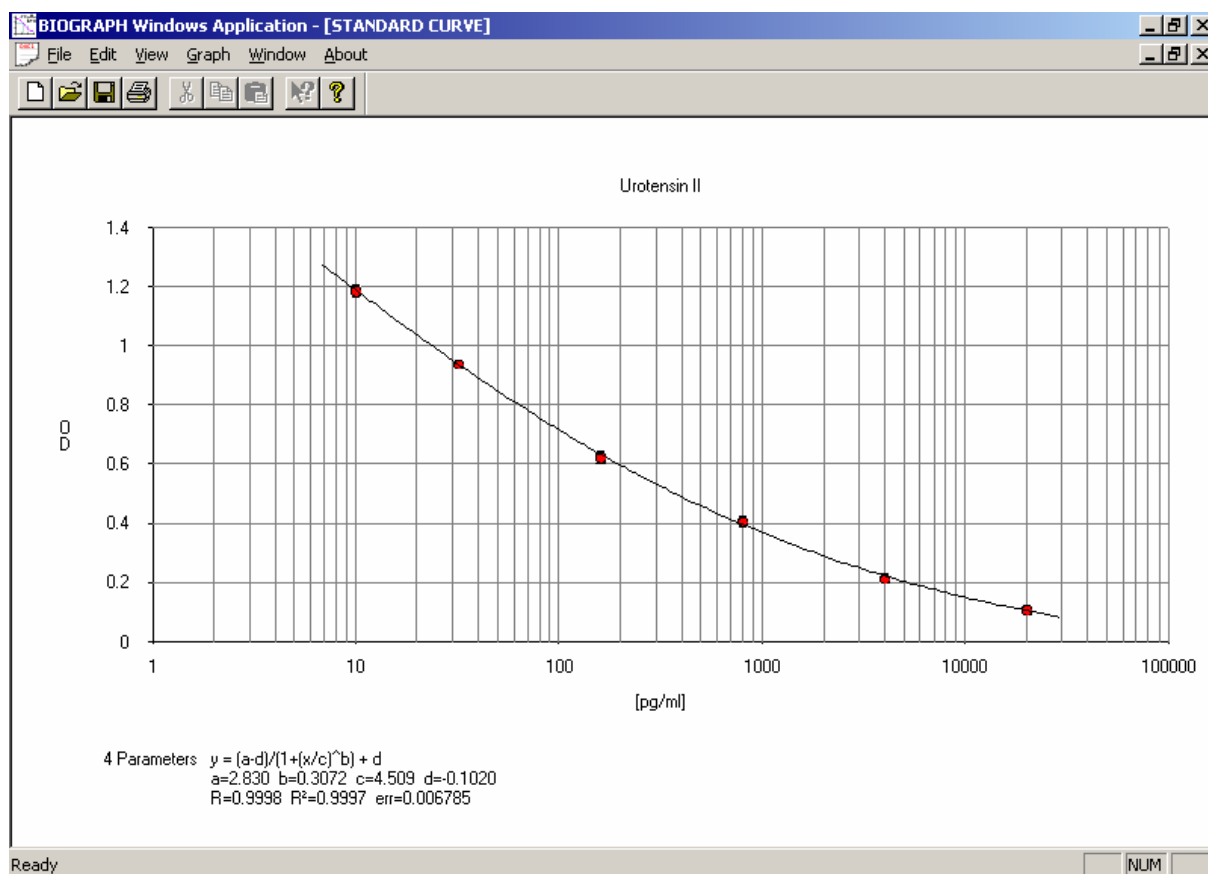
*Die Intensität der Farbentwicklung ist Temperaturabhängig. Es wird empfohlen den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

**Die oben genannten Inkubationsschritte unter Schütteln bei 37 °C sind vom Hersteller empfohlen. Besteht keine Möglichkeit bei 37 °C zu schütteln, empfehlen wir die Inkubation bei 37 °C ohne schütteln.

10. ERGEBNISSE

Zur Auswertung des Testes empfehlen wir die 4-Parameter-Funktion. Alternativ kann auch eine Punkt-zu-Punkt-Auswertung oder eine gewichtete Spline-Funktion gewählt werden. Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte diese der Operator durchführen.

Mustereichkurve



Standards	OD Mittelwert	Konzentration [pg/ml]
1	1.186	0
2	0.939	32
3	0.625	160
4	0.406	800
5	0.214	4000
6	0.107	20.000

Die hier aufgeführten Ergebnisse sind ein Beispiel für eine Standardkurve. Sie dürfen nicht für die Auswertung des Assays verwendet werden.

Serum/Plasma

Die Proben werden mit dem gewählten Verdünnungsfaktor multipliziert.

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer Urotensin-II Konzentration größer dem größten Standard sollten mit Assaypuffer weiter verdünnt werden und nochmals im Assay eingesetzt werden.

12. QUALITÄTSKONTROLLE

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

13. LITERATUR

1. Ames et al. (1999). Nature 40: 282-286
2. Coulouarn et al. (1998). PNAS 22;95 (26):15803-8

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten Natriumazid oder Thimerosal zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht

verwendet werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

- Bestandteile verschiedener Packungen nicht untereinander austauschen.
- Reagenzien nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden.
- Bestimmung immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchführen.
- 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 Immundiagnostik 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, zurück zu senden.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



Nur für Forschungszwecke



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Manual

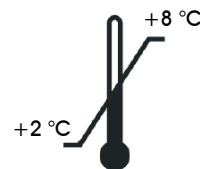
Urotensin II ELISA Kit

*For the in vitro determination of Urotensin II in serum/plasma
and cell culture supernatant*

Valid from 22.07.2008

REF

K 1013

**RUO**

1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is intended for the quantitative determination of **Urotensin II** in serum/plasma and cell culture supernatant. For research use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Urotensin II can be found in the spinal cord tissue from many different species (fish, vertebrae, primaten) and probably plays a role there as a hormone in the neuro-secretory-system. It acts like a peptide, consisting of 11 amino acids and the cyclic region (CFWKYC), which is responsible for biological activity.

In 1999, Urotensin II was first defined as a ligand for the GPR14 receptor, which belongs to the Somatostatin/Opioid receptor family and among other things, is expressed in the endothelial cells of the blood vessels.

Just as In-Vitro diagnostics can show isolated blood vessels, Urotensin II acts here as a vaso-constrictive "Somatostatin-similar" peptide, nevertheless, the vaso-constrictive capacity far exceeds that of the aforementioned vaso-active substances eg. Endotheline-1, Serotonin, Noradrenalin or Angiotensin II. Urotensin II shows overall functional and regional differences in its effects depending on the species. At the moment, there is still no generally agreed statement about the physiological role of Urotensin II on the heart-circulatory system.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This test kit works on the basis of a competitive enzyme immuno-assay. The Urotensin II in the sample competes with the Urotensin-II peptide coated to the plate.

In the first step the sample or calibrator will be incubated with the specific antibody (rabbit anti-Urotensin II). After adding the mixture to the plate, the Urotensin-II in calibrator or sample competes with the Urotensin-II coated to the plate. The more analytic concentration in the sample, or calibrator, the less antibody will be bound to the immobilized peptide.

The detection and quantifying follows a peroxidase-defining secondary antibody and the appropriate reactant conversion. The formed chromogen complex quantity is inversely proportional to the analytic content. TMB is used as substrate. The resulting chromogen compound can be photographically measured at 450nm.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K 1013MTP	PLATE	One holder with precoated strips	96
K 1013WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	1 x 100 ml
K 1013AP	ASYBUF	Assay buffer, ready-to-use	1 x 100 ml
K 1013A2	AB	Antibody, ready to use	1x 8 ml
K 1013K	CONJ	Conjugate (goat anti rabbit, HRP-labeled), ready to use	1 x 15 ml
K 1013ST	STD	Standards, lyophilized (0; 32; 160; 800; 4000; 20000 pgl/ml)	6 vials
K 1013TMB	SUB	TMB Substrate (Tetramethylbenzidin), ready-to-use	1 x 15 ml
K 1013AC	STOP	ELISA stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

On request we will send you 3 calibrator sets free of charge. Any further calibrator set will be charged.

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Distilled water
- Bidistilled (aqua bidest.) or deionized water
- Deep freezer -20 °C
- Precision pipettors calibrated to deliver 10-1000 µl
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Vortex-Mixer
- Water bath or heating block
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc. (one time products)
- Microtiter plate reader 450 nm
(reference wave length 620 or 690 nm)
- Seal cover for microtiter plates

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.**
- Reagents with a **volume less than 100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at 37°C in a water bath before dilution. The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) is stable **at 2-8°C** until the expiry date stated on the label. **Diluted buffer solution can be stored in a closed flask at 2-8°C for one month.**
- The lyophilized **STD** (standards) must be reconstituted with **500 µl** aqua bidest. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. Reconstituted standards and control are not stable.
- The **AB** (antibody) is to remove from the kit and is to be stored at -20 °C. The **AB** is stable until the expiry date stated on the label of kit.
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label of kit.

7. PRECAUTIONS

- 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 thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum/Plasma

Samples have to be stored at -20°C . Dilute the samples **1:10** in **ASYBUF** (assay buffer) before use.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not mix different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the test results. Immundiagnostik can therefore not be held responsible for any damage.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Pre-incubation

1. Add **150 µl AB** (Antibody) and **150 µl STD** (Standard) and prediluted sample into a 1.5 ml test tube (Eppendorf).
2. Incubate for **1 hour** at 37 °C while shaking.

Test procedure

1.	Bring all reagents and samples to room temperature (18-26 °C) and mix well
2.	Mark the positions of STD (Standards) and samples in duplicate on a protocol sheet
3.	Take as many microtiter strips as needed from kit. Store unused strips covered at 2-8° C. Strips are stable until expiry date stated on the label
4.	Wash each well 5x with 250 µl diluted wash buffer. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper
5.	Add 100 µl pre-incubated STD (Standard) and sample in duplicates into the respective wells
6.	Cover and incubate for 2 hours shaking on a horizontal mixer at 37 °C **
7.	Aspirate the contents of each well. Wash each well 5x with 250 µl diluted wash buffer. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper

8.	Add 100 µl CONJ (Peroxidase-labeled antibody)
9.	Cover and incubate for 45 min shaking on a horizontal mixer at room temperature (18-26°C)
10.	Aspirate the contents of each well. Wash each well 5x with 250 µl diluted wash buffer. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper
11.	Add 100 µl SUB (TMB substrate)
12.	Incubate for 5 - 15 min shaking on a horizontal mixer in the dark at room temperature (18-26°C) *
13.	Add 50 µl STOP (stop solution) and mix shortly
14.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the measurement range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm (or 690 nm) as reference.

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

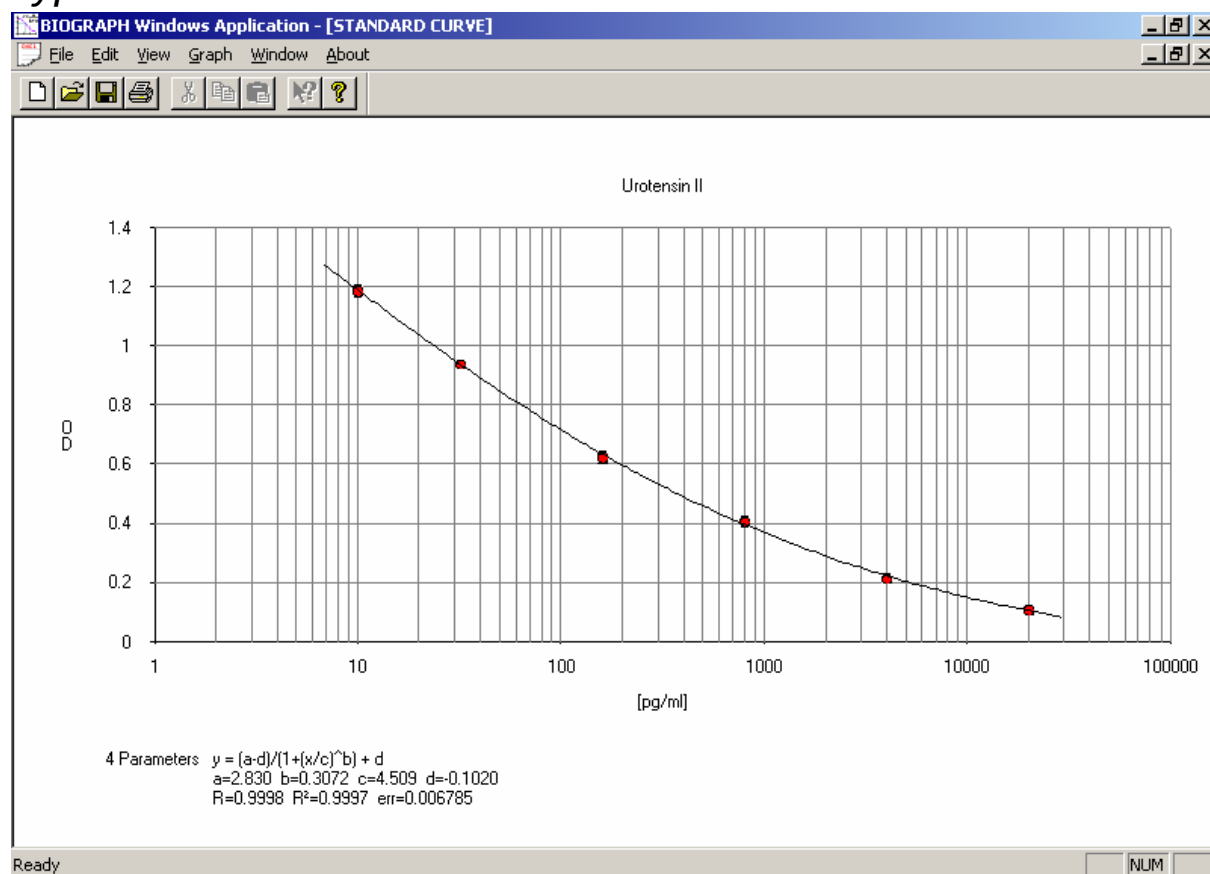
**The above incubation steps at 37 °C on a horizontal mixer are recommended by the producer. If there is no possibility to incubate at 37 °C, while shaking, we recommend to incubate at 37 °C without any shaking.

10. RESULTS

A calibration curve is constructed from the standards. Commercially available software can be used as well as graph paper. Results of the samples are read from this calibration curve.

THE CALIBRATION CURVE IS NOT LINEAR, therefore a spline- or 4PL algorithm is recommended.

Typical calibration curve



Calibrator	OD mean	Concentration [pg/ml]
1	1.186	0
2	0.939	32
3	0.625	160
4	0.406	800
5	0.214	4.000
6	0.107	20.000

The data is for demonstration only and cannot be used in place of data generations at the time of the assay.

Serum/Plasma

For the calculation of the sample values, the results must be multiplied by the dilution factor.

11. LIMITATIONS

Samples with Urotensin II levels greater than the highest calibrator should be diluted and re-assayed.

12. QUALITY CONTROL

Control samples or serum pools should be analyzed with each run of calibrators and patient samples. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. In assays in which one or more of the quality control sample values lie outside the acceptable limits, the results for the patient sample may not be valid.

13. LITERATURE

1. Ames et al. (1999). Nature 40: 282-286
2. Coulouarn et al. (1998). PNAS 22;95 (26):15803-8

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- For reserch use only.
- Quality control guidelines should be followed.
- 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 thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate

protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.
- 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 wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



For research use only



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number