

IVD



Protocollo generale per

**KIT PER  
SAGGIO IMMUNOENZIMATICO**

(range: 0-1000 ng/ml)



PHOENIX PHARMACEUTICALS, INC.

<b>1. Contenuto del kit.....</b>	<b>2</b>
<b>2. Materiali aggiuntivi, non inclusi.....</b>	<b>2</b>
<b>3. Conservazione .....</b>	<b>3</b>
<b>4. Precauzioni di sicurezza .....</b>	<b>3</b>
<b>5. Smaltimento dei reagenti.....</b>	<b>3</b>
<b>6. Introduzione .....</b>	<b>4</b>
<b>7. Principio generale del saggio immunoenzimatico .....</b>	<b>4</b>
<b>8. Riassunto del protocollo di dosaggio .....</b>	<b>5</b>
<b>9. Protocollo di dosaggio.....</b>	<b>6</b>
A. Reidratazione del peptide e dell'anticorpo.....	6
B. Diluizioni del peptide standard .....	7
C. Caricamento dell'immunoplastra .....	8
D. Incubazione dell'immunoplastra.....	8
<b>10. Ulteriori raccomandazioni .....</b>	<b>10</b>
<b>11. Calcolo dei risultati .....</b>	<b>11</b>
<b>12. Metodo proposto per l'estrazione dei peptidi.....</b>	<b>12</b>
A. Prelievo del sangue e raccolta del plasma.....	12
B. Preparazione generale del tessuto .....	13
C. Estrazione dei peptidi dal campione.....	13
<b>13. Bibliografia .....</b>	<b>14</b>

**ATTENZIONE**

Dispositivo sperimentale. Limitato dalla legge allo scopo investigativo.  
 Esclusivamente per uso di ricerca. Non utilizzare in procedure  
 diagnostiche.

## CONTENUTO DEL KIT

1. Tampone di dosaggio EIA concentrato (50ml, 20x) ..... **n. catalogo EK-BUF**
2. Piastra EIA pre-rivestita (96 pozzetti, 1 piastra) ..... **n. catalogo EK-PLATE**
3. Sigillante acetico per le piastre (APS) (3 pezzi).... **n. catalogo EK-APS**
4. Anticorpo primario (IgG anti-peptide di coniglio)  
(1 flaconcino, liofilizzato)
5. Peptide standard (1 flaconcino, liofilizzato)
6. Peptide biotinilato (1 flaconcino, liofilizzato)
7. Perossidasi di rafano/streptavidina  
(SA-HRP) (30µl)..... **n. catalogo EK-SA-HRP**
8. Controllo positivo (2 flaconcini, liofilizzato)
9. Soluzione di substrato (TMB) (12ml, pronta all'uso) ..... **n. catalogo EK-SS**
10. HCl 2N (15ml, pronto all'uso) ..... **n. catalogo EK-HCL**
11. Protocollo generale (1 opuscolo)

## MATERIALI AGGIUNTIVI, NON INCLUSI

1. Lettore di piastre per microtitolazione (450nm) (necessario)
2. Micropipetta con puntali monouso (necessaria)
3. Materiale assorbente per blotting (necessario)
4. Agitatore a vortice (necessario)
5. Software di curve fitting per curva logistica a 4 parametri (consigliato)
6. Agitatore orbitale di piastre (300-400 rpm) (consigliato)
7. Lavatore per piastre per microtitolazione (consigliato)
8. Pipetta multicanale (50-100µl) (consigliata)
9. Serbatoio per soluzione (consigliato)
10. Centrifuga (opzionale)
11. Provette vacutainer EDTA tappo lilla per prelievi ematici (opzionale)  
..... **n. catalogo VT-6450**
12. Aprotinina (30 TIU) (opzionale)..... **n. catalogo RK-APRO**
13. SEP-COLUMN C18 (opzionale) ..... **n. catalogo RK-SEPCOL-1**
14. Tampone A (opzionale) ..... **n. catalogo RK-BA-1**
15. Tampone B (opzionale)..... **n. catalogo RK-BB-1**

## CONSERVAZIONE

1. Conservare il kit a 4°C dal momento della consegna. Non congelare. I kit non aperti restano stabili fino alla data di scadenza, purché vengano conservati come descritto.
2. Si consiglia fortemente di utilizzare tutte le soluzioni il prima possibile dopo la ricostituzione. Le soluzioni reidratate del peptide standard, biotinilato o dell'anticorpo primario dovrebbero essere utilizzate entro 5 giorni (4°C). Le diluizioni standard devono essere preparate subito prima di effettuare il test.
3. Tutte le strisce/colonne non utilizzate possono essere rimosse dall'immunoplastra pre-rivestita. Riporre le strisce, con un dissecante, nel sacchetto originale in alluminio con chiusura a zip, sigillare e conservare a 4° C. Evitare l'accumulo di umidità sui pozzetti.
4. Se necessario, conservare il tampone d'analisi 1x, le soluzioni ricostituite del peptide standard, del peptide biotinilato, dell'anticorpo e del SA-HRP a 4°C.

## PRECAUZIONI DI SICUREZZA

1. Il kit contiene HCl 2N e un conservante che può essere irritante. Indossare i guanti quando si lavora o si maneggiano i reagenti.
2. Per minimizzare i rischi di contaminazione microbica, indossare sempre occhiali di sicurezza e/o guanti.

## ENTSORGUNG DER REAGENZIEN

Smaltire i reagenti come previsto dalle disposizioni locali.

Phoenix Pharmaceuticals, Inc. garantisce che i prodotti sono conformi alle informazioni contenute in questa pubblicazione. L'acquirente deve verificare se il prodotto è adeguato ai suoi bisogni specifici e stabilire le concentrazioni ottimali di campione.

## INTRODUZIONE

Questo kit è sviluppato per misurare la concentrazione di un peptide specifico e dei peptidi ad esso correlati in base al principio del saggio immunoenzimatico competitivo. Il kit è utilizzato come ausilio per identificare svariati antigeni in campioni umani.

## PRINCIPIO GENERALE DEL SAGGIO IMMUNOENZIMATICO

L'immunoplastra di questo kit è pre-rivestita con un anticorpo secondario, i cui siti di legame non specifici sono bloccati. L'anticorpo secondario può legarsi al frammento Fc dell'anticorpo primario. Il peptide biotinilato sarà poi in competizione con il peptide target per il legame con il frammento Fab dell'anticorpo primario nella soluzione peptidica standard o nel campione sconosciuto. Il peptide biotinilato interagisce con la perossidasi di rafano/streptavidina (SA-HRP) che catalizza la soluzione del substrato. L'aggiunta della soluzione di arresto fa virare il colore di ogni pozzetto da blu a giallo. L'intensità del colore giallo risultante è direttamente proporzionale alla quantità di complesso peptide biotinilato/SA-HRP, ma inversamente proporzionale alla quantità di peptide target (nella soluzione peptidica standard o nel campione sconosciuto). Ciò è dovuto alla competizione tra il peptide biotinilato e il peptide target nel legame con l'anticorpo primario. Si può stabilire una curva standard tracciando il grafico delle O.D. misurate in funzione delle varie concentrazioni di peptide standard note. Si può determinare la concentrazione di peptide sconosciuto nei campioni tramite l'extrapolazione basata su questa curva standard.

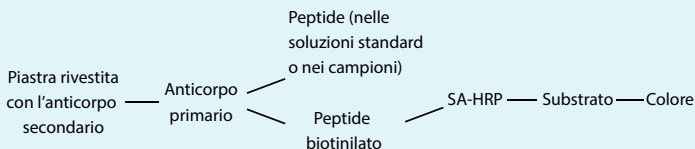


Figura 1. Diagramma delle interazioni molecolari utilizzate in questo kit

## RIASSUNTO DEL PROTOCOLLO DI DOSAGGIO

Distribuire 50  $\mu\text{l}$  di standard, campione o controllo positivo e 25  $\mu\text{l}$  di anticorpo primario e 25  $\mu\text{l}$  di peptide biotinilato in ogni pozzetto, **tranne quelli del bianco**

▼  
Incubare a temperatura ambiente (20-23°C) per 2 ore.

▼  
Lavare l'immunoplastra 4 volte con 350  $\mu\text{l}$  di tampone di dosaggio 1x per pozzetto

▼  
Distribuire 100  $\mu\text{l}$  di soluzione SA-HRP in ogni pozzetto

▼  
Incubare a temperatura ambiente (20-23°C) per 1 ora

▼  
Lavare l'immunoplastra 4 volte con 350  $\mu\text{l}$  di tampone di dosaggio 1x per pozzetto

▼  
Distribuire 100  $\mu\text{l}$  di soluzione di substrato TMB in ogni pozzetto

▼  
Incubare a temperatura ambiente (20-23°C) per 1 ora

▼  
Concludere la reazione con 100  $\mu\text{l}$  di HCl 2N

▼  
Leggere l'assorbanza O.D. a 450 nm e calcolare i risultati

Nota: leggere per intero il presente protocollo prima di iniziare il saggio. Ogni kit contiene reagenti sufficienti per 96 pozzetti e permette di saggiare 40 campioni in duplicato.

## PROTOCOLLO DI DOSAGGIO

Nota: il kit e tutti i suoi componenti devono essere portati a temperatura ambiente (20-23°C) prima dell'apertura dei flaconcini e dell'inizio del saggio. Prima di aprire le provette da microcentrifuga per la ricostituzione, centrifugare brevemente a ~3.000rpm per 5 secondi per far sì che tutto il materiale liofilizzato sia sul fondo della provetta.

1. Diluire il tampone di dosaggio EIA concentrato 20x con 950 ml di acqua distillata. Mescolare bene prima dell'utilizzo. Questa sarà la soluzione tampone 1x che sarà utilizzata per diluire o ricostituire tutti gli altri campioni e reagenti durante il saggio.

Nota: se compaiono cristalli nel tampone 20x, immergere il flacone in acqua calda per circa 30 minuti o fino a quando i cristalli non saranno più visibili.

2. Ricostituire il peptide standard in 1 ml di tampone 1x e agitare bene nell'agitatore a vortice. Lasciare riposare la soluzione per almeno 10 minuti a temperatura ambiente (20-23°C) per permettere lo scioglimento completo. Questa sarà la soluzione madre standard. Agitare nell'agitatore a vortice subito prima dell'utilizzo.
3. Ricostituire l'anticorpo primario in 5 ml di tampone di dosaggio 1x e agitare bene nell'agitatore a vortice. Lasciare riposare la soluzione per almeno 5 minuti a temperatura ambiente per consentire il completo scioglimento. Agitare nuovamente nell'agitatore a vortice prima dell'utilizzo.
4. Ricostituire il peptide biotinilato in 5ml di tampone di dosaggio 1x e agitare bene nell'agitatore a vortice. Lasciare riposare la soluzione per almeno 5 minuti a temperatura ambiente per consentire il completo scioglimento. Agitare nuovamente nell'agitatore a vortice prima dell'utilizzo.
5. Ricostituire il controllo positivo in 200 µl di tampone di dosaggio 1x e agitare bene nell'agitatore a vortice. Lasciare riposare la soluzione per almeno 5 minuti a temperatura ambiente per consentire il completo scioglimento. Agitare nuovamente nell'agitatore a vortice prima dell'utilizzo.

**Preparare le soluzioni standard del peptide come segue:**

ID / numero standard	Volume tampone di dosaggio 1x	Volume peptide standard	Concentrazione
Soluzione madre	1000 $\mu$ l	(polvere)	1000ng/ml
#2	900 $\mu$ l	100 $\mu$ l di soluzione madre	100ng/ml
#3	900 $\mu$ l	100 $\mu$ l of #2	10ng/ml
#4	900 $\mu$ l	100 $\mu$ l of #3	1ng/ml
#5	900 $\mu$ l	100 $\mu$ l of #4	0.1ng/ml

Figura 2. Tabella delle diluizioni standard

Bianco	(B)	(B)
Legame totale	(T)	(T)
0.1 ng/ml	(5)	(5)
1 ng/ml	(4)	(4)
10 ng/ml	(3)	(3)
100 ng/ml	(2)	(2)
Soluzione madre	(S)	(S)
Controllo positivo	(PC)	(PC)

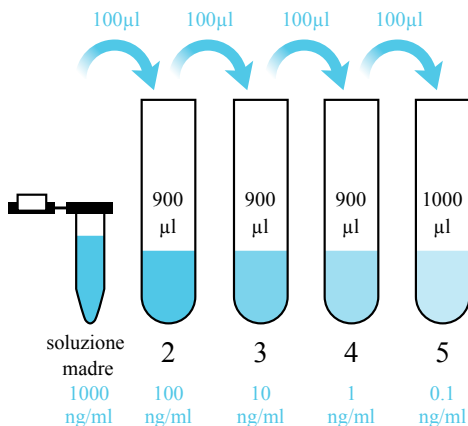


Figura 4. Guida visiva delle diluizioni standard

Figura 3. Mappa di caricamento dell'immunoplastra



6. Preparare le diluizioni standard con il peptide standard reidratato come mostrato nella Figura 2 e nella Figura 4 nella pagina precedente. Agitare bene ogni provetta nell'agitatore a vortice dopo ogni diluizione seriale.
7. Lasciare i pozzetti A1 e A2 vuoti per i bianchi.
8. Distribuire 50 µl di tampone di dosaggio 1x nei pozzetti B1 e B2. Questi rappresenteranno il legame totale.
9. Distribuire 50 µl della soluzione standard a minor concentrazione di peptide (#5) nei pozzetti C1 e C2. Successivamente, distribuire il peptide standard #4 nei pozzetti D1 e D2 e proseguire così nell'ordine opposto alla diluizione standard.

*Nota: i peptidi standard devono essere sempre testati in duplicato.*

10. Distribuire 50 µl di controllo positivo reidratato nei pozzetti H1 e H2.

*Nota: i controlli positivi devono essere sempre testati in duplicato.*

11. Distribuire 50 µl di campioni sconosciuti/preparati nei pozzetti designati, anche in questo caso in duplicato.

*Nota: ogni laboratorio deve stabilire i fattori di diluizione appropriati e preparare i campioni in modo tale da assicurare che i livelli di peptidi siano identificabili e compresi nell'intervallo lineare della curva standard.*

12. Distribuire 25 µl di anticorpo primario reidratato in tutti i pozzetti tranne quelli dei bianchi (A1 e A2).

*Nota: si SCONSIGLIA l'utilizzo di una pipetta multicanale per caricare l'anticorpo primario.*

13. Diluire 25 µl di peptide biotinilato reidratato in tutti i pozzetti tranne quelli dei bianchi (A1 e A2).

*Nota: si SCONSIGLIA l'utilizzo di una pipetta multicanale per caricare il peptide biotinilato.*

14. Sigillare l'immunoplastra con un sigillante acetico (APS). Incubare l'immunoplastra per 2 ore a temperatura ambiente (20-23°C).

*Nota: si consiglia l'agitazione orbitale a 300-400 rpm durante tutte le incubazioni.*

15. Centrifugare il flaconcino di SA-HRP (3.000-5.000 rpm) per 5 secondi. Pipettare 12 µl di SA-HRP in 12 ml di tampone di dosaggio 1x e agitare bene la soluzione nell'agitatore a vortice.

16. Rimuovere il sigillante acetico APS dall'immunoplastra e gettare il contenuto dei pozzetti. Lavare ogni pozzetto con 350 µl di tampone di dosaggio 1x, gettare il tampone, ribaltare l'immunoplastra e asciugarla tamponando. Ripetere 4 volte.
17. Distribuire 100 µl di soluzione SA-HRP in ogni pozzetto
18. Sigillare nuovamente l'immunoplastra con il sigillante acetico APS. Incubare per 1 ora a temperatura ambiente (20-23°C).  
*Nota: si consiglia l'agitazione orbitale a 300-400 rpm per la durata delle incubazioni.*
19. Rimuovere il sigillante acetico APS dall'immunoplastra e gettare il contenuto dei pozzetti. Lavare ogni pozzetto con 350 µl di tampone di dosaggio 1x, gettare il tampone, ribaltare l'immunoplastra e asciugarla tamponando. Ripetere 4 volte.
20. Distribuire 100 µl di soluzione di substrato TMB in ogni pozzetto.  
*Nota: il TMB è fotosensibile. Si consiglia fortemente di coprire l'immunoplastra dopo aver aggiunto la soluzione di substrato TMB per proteggerla dalla luce.*
21. Sigillare nuovamente l'immunoplastra con il sigillante acetico APS. Incubare per 1 ora a temperatura ambiente (20-23°C).  
*Nota: si consiglia l'agitazione orbitale a 300-400 rpm per la durata delle incubazioni.*
22. Rimuovere il sigillante acetico APS dall'immunoplastra. NON lavare l'immunoplastra o gettare il contenuto dei pozzetti.
23. Distribuire 100 µl di HCl 2N in ogni pozzetto per fermare la reazione. Il colore nei pozzetti dovrebbe virare da blu a giallo. Picchiettare con delicatezza sulla piastra per facilitare il mescolamento.  
*Nota: effettuare i passi successivi nell'arco di 20 minuti.*
24. Caricare l'immunoplastra nel lettore di piastre per microtitolazione e misurare l'assorbanza O.D. a 450 nm.

## ULTERIORI RACCOMANDAZIONI

1. Non mescolare mai reagenti con numero di lotto differente.
2. Possono essere testati plasma, siero, terreni di coltura, omogenati di tessuto, liquido cefalorachidiano (CSF), urina o qualsiasi liquido biologico se i campioni sono preparati adeguatamente e il livello di peptidi nel campione è sufficientemente elevato per la sensibilità del kit specifico.
3. Livelli elevati di proteine interferenti possono causare variazioni nei risultati del campione. E' pertanto indispensabile selezionare la procedura di preparazione dei campioni adeguata per ottenere risultati ottimali. Si prega di consultare la letteratura in merito alla metodologia specifica.
4. Evitare di toccare il fondo quando si maneggia la piastra. Impronte digitali o macchie possono influire sulla lettura della O.D..
5. Il lavaggio a mano può causare grandi variazioni nel coefficiente dei duplicati. Per ridurre questo fattore, rimuovere il liquido dalla piastra ribaltando e tamponando la piastra su di un materiale assorbente.
6. Ogni volta che viene utilizzato un nuovo puntale, assicurarsi che questo sia fissato correttamente e privo di bolle d'aria. Per una miglior variazione intra-saggio, aspirare ed espellere più volte un reagente o un campione dal suo contenitore per inumidire le pareti della pipetta prima di caricarla.
7. Evitare di immergere l'intera punta della pipetta nei reagenti e nei campioni. All'apice della punta possono accumularsi goccioline che possono causare un caricamento eccessivo di soluzione nel pozzetto e influenzare i risultati del saggio.
8. Se questa procedura viene effettuata al di fuori della temperatura ambiente consigliata (20-23°C), i risultati del saggio possono subire alterazioni.
9. Eventuali modifiche al protocollo esistente (p.es. diluizioni standard, tecnica di pipettaggio, tecnica di lavaggio, tempi o temperatura di incubazione, condizioni di conservazione e scadenza del kit) possono influenzare la sensibilità, la specificità e i risultati del saggio.

## CALCOLO DEI RISULTATI

1. Riportare sull'asse X (scala logaritmica) la concentrazione degli standard da #5 a #1 (da 0,1 a 1000 ng/ml).
2. Riportare sull'asse Y (scala lineare) l'assorbanza (O.D.) a 450 nm.
3. Inserire l'O.D. per ogni concentrazione peptidica standard direttamente sulla sua coordinata dell'asse X.
4. Die OD für jede Standard-Peptidkonzentration direkt über der zugehörigen X-Achsen-Koordinate eintragen.
5. Disegnare la curva di regressione (best fit) congiungendo questi punti. Essa dovrebbe mostrare una relazione inversa tra la concentrazione del peptide e l'assorbanza. All'aumento della concentrazione di peptide standard, il colore giallo diminuisce, riducendo così l'assorbanza (O.D.)

*Nota: si consiglia fortemente l'utilizzo di un software di curve fitting per una curva logistica a 4 parametri o con funzione log-logit.*

6. Per determinare la concentrazione di peptide in un campione sconosciuto, collocare inizialmente la sua assorbanza (O.D.) sull'asse Y. Disegnare nel grafico una linea orizzontale da quella assorbanza all'intersezione con la curva standard. La coordinata dell'asse X in questo punto di intersezione corrisponderà alla concentrazione di peptide (ng/ml) nel campione analizzato.

*Nota: moltiplicare la concentrazione di peptide misurata per uno qualsiasi dei fattori di diluizione utilizzati nella preparazione del campione originale.*

7. Fare riferimento ai valori accettabili per i controlli positivi presenti nella scheda di controllo qualità. Se i valori di controllo positivi non sono compresi nell'intervallo specificato nella scheda di controllo qualità, il saggio non è valido.

Nota: l'estrazione dei peptidi è consigliata per la maggior parte dei campioni. Questo permetterà di eliminare le molecole interferenti presenti nei liquidi biologici e permetterà la diluizione o la concentrazione dei campioni.

### **Prelievo generale del sangue e raccolta del plasma:**

1. Raccogliere i campioni ematici in provette vacutainer con tappo lilla (n. catalogo VT-6450) con EDTA e in grado di contenere fino a 7 ml di sangue.
2. Agitare delicatamente le provette vacutainer più volte subito dopo aver raccolto il sangue per prevenire la coagulazione.
3. Trasferire il sangue nelle provette da centrifuga contenenti aprotinina (n. catalogo RK-APRO) e agitarle nuovamente più volte con delicatezza per inibire l'attività delle proteasi.

Nota: si consiglia di utilizzare 0,6 TIU, o 100 µl, di aprotinina per 1 ml di sangue raccolto. Se le provette vacutainer con tappo lilla sono a prova di centrifuga, l'aprotinina può essere aggiunta direttamente in esse.

4. Centrifugare il sangue a 1.600 x g per 15 minuti a 4°C e raccogliere il plasma.

Nota: il plasma può essere conservato a -70°C e resterà stabile per un massimo di un mese.

5. Per l'estrazione dei peptidi dal campione, acidificare il plasma con un pari quantitativo di tampone A (n. catalogo RK-BA-1). Mescolare e centrifugare da 6.000 a 17.000 x g per 20 minuti a 4°C. Questo sarà caricato nella SEP-COLUMN C-18.

Nota: si consiglia almeno 1 ml di plasma per l'estrazione dei peptidi. E' possibile effettuare l'estrazione utilizzando volumi più piccoli se si adeguano opportunamente i volumi di tampone ricostituente ed eluente.

## Preparazione generale del tessuto:

1. Far bollire il tessuto in 75% di AcOH (acido acetico) per 20 minuti a 100°C.
2. Omogeneizzare il tessuto nel tampone di lisi, in genere con un basso pH.
3. Centrifugare l'omogenato di tessuto a 12.000 rpm per 20 o 30 minuti a 4°C.
4. Per estrarre i peptidi dal campione, prelevare 1 ml di supernatante e aggiungere 1 ml di tampone A (n. catalogo RK-BA-1) per acidificare il campione. Centrifugare da 6.000 fino a 17.000 x g per 20 minuti e raccogliere il supernatante. Questo sarà caricato nella C-18 SEP-COLUMN. La centrifugazione su ghiaccio consente di inibire le peptidasi.

Nota: se è necessario effettuare un saggio delle proteine separato, identificare e rimuovere un'aliquota prima di aggiungere il tampone A. Questo tampone contiene materiali che possono interferire con l'analisi delle proteine.

## Estrazione dei peptidi dal campione:

1. Equilibrare una SEP-COLUMN contenente 200 mg di C18 (n. catalogo RK-SEPCOL-1). Lavare una volta con 1 ml di tampone B (n. catalogo RK-BB-1) e in seguito tre (3) volte con 3 ml di tampone A.
2. Caricare la soluzione campione acidificata (plasma, siero, tessuto, ecc.) nella SEP-COLUMN C-18 pre-equilibrata.
3. Lavare lentamente la colonna due volte con 3 ml di tampone A e gettare il liquido di lavaggio.
4. Eluire una volta il peptide lentamente con 3 ml di tampone B e raccogliere l'eluente in una provetta di polistirene.

Nota: garantire un flusso continuo di tutte le soluzioni durante la procedura di estrazione. Per un trattamento e un recupero ottimali dei campioni evitare che entrino bolle d'aria nella matrice C-18.

5. Far evaporare l'eluente fino a farlo essiccare in un concentratore centrifugo o con un metodo sostitutivo adeguato.

Nota: i risultati migliori si ottengono combinando un concentratore centrifugo (ad es. Speedvac) e un liofilizzatore (crio-essiccamento). Utilizzare prima un concentratore centrifugo per circa 15 minuti per essiccare il campione rimuovendo lo strato organico. Effettuare poi il congelamento rapido (snap-freezing) del campione restante, seguito dal crio-essiccamento durante la notte mediante un liofilizzatore. Se non è disponibile un concentratore centrifugo, effettuare il crio-essiccamento nelle ore notturne utilizzando il liofilizzatore. Ciò sarà sufficiente.

6. Mantenere l'estratto secco a  $-20^{\circ}\text{C}$  ed effettuare il saggio il prima possibile. Utilizzare il tampone di dosaggio 1x per ricostituire l'estratto secco nella concentrazione desiderata. Se il valore del peptide non rientra nel range di identificazione, diluire o concentrare opportunamente il campione.

Nota: per esempio, se 1 ml di plasma è stato estratto, essiccato e poi ricostituito in 250  $\mu\text{l}$  di tampone di dosaggio 1x, il campione originale avrà ora una concentrazione 4x.

## BIBLIOGRAFIA

1. Porstmann, T. and Kiessig, S.T., Enzyme Immunoassay Techniques, An Overview, *Journal of Immunological Methods*, 150: 5-21 (1992).
2. Avrameas, S., Amplification Systems in Immunoenzymatic Techniques, *Journal of Immunological Methods*, 150: 23-32 (1992).
3. Hofbauer KH, Jensen BL, Kurtz A, Sandner P. Tissue hypoxigenation activates the adrenomedullin system in vivo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000 Feb;278(2):R513-9.

# SCHEMA DEL SAGGIO

A	B	C	D	E	F	G	H	
○	○	○	○	○	○	○	○	1
○	○	○	○	○	○	○	○	2
○	○	○	○	○	○	○	○	3
○	○	○	○	○	○	○	○	4
○	○	○	○	○	○	○	○	5
○	○	○	○	○	○	○	○	6
○	○	○	○	○	○	○	○	7
○	○	○	○	○	○	○	○	8
○	○	○	○	○	○	○	○	9
○	○	○	○	○	○	○	○	10
○	○	○	○	○	○	○	○	11
○	○	○	○	○	○	○	○	12



USA

Phoenix Pharmaceuticals, Inc.

330 Beach Rd.  
Burlingame, California 94010  
Tel: 650-558-8898, 1-800-988-1205  
Fax: 650-558-1686  
info@phoenixpeptide.com  
www.phoenixpeptide.com



Europe

Phoenix Europe GmbH

Viktoriastrasse 3-5  
D-76133 Karlsruhe, Germany  
Tel: +49 (721) 12 08 150  
Fax: +49 (721) 12 08 15 15  
europe@phoenixpeptide.eu