

IVD



# Allgemeines Protokoll Zum ENZYM-IMMUNOASSAY-SET

(Bereich: 0-25 ng/ml)



PHOENIX PHARMACEUTICALS, INC.

<b>1. Inhalt des Sets.....</b>	<b>2</b>
<b>2. Zusätzlich benötigtes Material.....</b>	<b>2</b>
<b>3. Lagerung.....</b>	<b>3</b>
<b>4. Vorsichtsmaßnahmen .....</b>	<b>3</b>
<b>5. Entsorgung der Reagenzien .....</b>	<b>3</b>
<b>6. Einleitung.....</b>	<b>4</b>
<b>7. Allgemeines Prinzip des Enzym-Immunoassays .....</b>	<b>4</b>
<b>8. Zusammenfassung des Assayprotokolls.....</b>	<b>5</b>
<b>9. Assayprotokoll.....</b>	<b>6</b>
A. Rehydratation von Peptid und Antikörper .....	6
B. Standard-Peptidverdünnungen .....	7
C. Befüllen der Immunoplaten.....	8
D. Inkubation der Immunoplaten.....	8
<b>10. Zusätzliche Empfehlungen.....</b>	<b>10</b>
<b>11. Berechnung der Ergebnisse.....</b>	<b>11</b>
<b>12. Empfohlene Methode zur Peptidextraktion .....</b>	<b>12</b>
A. Blutentnahme und Plasmagewinnung.....	12
B. Allgemeine Gewebepräparation .....	13
C. Extraktion von Peptiden aus der Probe .....	13
<b>13. Quellen .....</b>	<b>14</b>

### ACHTUNG:

Gerät in der Erprobungsphase. Gebrauch gesetzlich auf Erprobungszwecke beschränkt. Nur zu Forschungszwecken. Nicht zum Gebrauch in diagnostischen Verfahren.

## INHALT DES SETS

1. EIA-Assay-Pufferkonzentrat (50ml, 20x)..... **Katalog-Nr. EK-BUF**
2. Vorbeschichtete EIA-Platte (96 Wells, 1 Platte)..... **Katalog-Nr. EK-PLATE**
3. Plattenversiegelungsfolie (APS) (3 Stück)..... **Katalog-Nr. EK-APS**
4. Primärer Antikörper (Kaninchen-Anti-Peptid-IgG)  
(1 Ampulle, lyophilisiert)
5. Standardpeptid (1 Ampulle, lyophilisiert)
6. Biotinyliertes Peptid (1 Ampulle, lyophilisiert)
7. Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase  
(SA-HRP) (30µl).....**Katalog-Nr. EK-SA-HRP**
8. Positivkontrolle (2 Ampullen, lyophilisiert)
9. Substratlösung (TMB) (12ml, gebrauchsfertig) .....**Katalog-Nr. EK-SS**
10. 2N HCL (15ml, gebrauchsfertig) .....**Katalog-Nr. EK-HCL**
11. Allgemeines Protokoll (1 Heft)

## ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

1. Mikrotiterplatten-Reader (450nm) (erforderlich)
2. Mikropipette mit Einmalspitzen (erforderlich)
3. Saugfähiges Material als Löschpapier (erforderlich)
4. Vortex (erforderlich)
5. Software zur Kurvenanpassung mit Fähigkeit zur 4-Parameter-Logistik (empfohlen)
6. Orbitalplattenschüttler (300-400 rpm) (empfohlen)
7. Mikrotiterplatten-Waschgerät (empfohlen)
8. Mehrkanalpipette (50-100µl) (empfohlen)
9. Lösungsreservoir (empfohlen)
10. Zentrifuge (optional)
11. EDTA Lavendar Vacutainer Blutsammelröhrchen (optional).....  
.....**Katalog-Nr. VT-6450**
12. Aprotinin (30 TIU) (optional) .....**Katalog-Nr. RK-APRO**
13. C18 SEP-SÄULE (optional) .....**Katalog-Nr. RK-SEPCOL-1**
14. Puffer A (optional) ..... **Katalog-Nr. RK-BA-1**
15. Puffer B (optional)..... **Katalog-Nr. RK-BB-1**

## LAGERUNG

1. Set sofort nach dem Empfang bei 4 °C lagern. Nicht einfrieren. Ungeöffnete Testsets bleiben stabil bis zum Ablauf des Verfallsdatums, wenn wie beschrieben gelagert.
2. Es wird sehr empfohlen, alle Lösungen so bald wie möglich nach der Rekonstitution zu benutzen. Rehydrierte Lösungen des biotinylierten Standardpeptids oder primäre Antikörper sollten innerhalb von 5 Tagen (4 °C) benutzt werden. Standardverdünnungen müssen direkt vor Durchführung des Assays hergestellt werden.
3. Nicht gebrauchte Streifen/Säulen können von der vorbeschichteten Immunplatte entfernt werden. Bitte die Streifen zusammen mit einem Trockenmittel zurück in die wiederverschließbare Originalfolie geben, verschließen und das Ganze bei 4 °C lagern. Vermeiden, dass sich Feuchtigkeit in den Wells sammelt.
4. Falls nötig, den 1x-Assay-Puffer, rekonstituierte Lösungen des Standardpeptids, des biotinylierten Peptids, des Antikörpers und der SA-HRP bei 4 °C lagern.

## VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Das Set enthält 2N HCL und ein Konservierungsmittel, das reizend wirken kann. Bei der Arbeit mit diesen Reagenzien oder deren Handhabung Handschuhe tragen.
2. Zur Minimierung des Risikos einer mikrobiellen Kontamination sollten stets eine Schutzbrille und/oder Handschuhe getragen werden.

## ENTSORGUNG DER REAGENZIEN

Reagenzien sind nach den örtlichen Bestimmungen zu entsorgen.

Phoenix Pharmaceuticals, Inc. garantiert, dass seine Produkte den Informationen in dieser Publikation entsprechen. Der Käufer muss die Eignung des Produkts für den speziellen eigenen Bedarf bestimmen und optimale Probenkonzentrationen ermitteln.

## EINLEITUNG

Dieses Enzym-Immunoassay-Set dient der Messung der Konzentration eines spezifischen Peptids und seiner verwandten Peptide im Plasma basierend auf dem Prinzip des „kompetitiven“ Enzym-Immunoassays. Das Set wird als Hilfsmittel zur Bestimmung verschiedener Antigene in menschlichen Proben verwendet.

## ALLGEMEINES PRINZIP DES ENZYM-IMMUNOASSAYS

Die Immunoplatte in diesem Set ist mit einem sekundären Antikörper vorbeschichtet, dessen unspezifische Bindungsstellen blockiert sind. Der sekundäre Antikörper kann an das Fc-Fragment des primären Antikörpers (Peptidantikörper) binden. Das Fab-Fragment des primären Antikörpers bindet dann kompetitiv an das biotinylierte Peptid und das Zielpeptid in der Standardpeptidlösung oder der unbekannt Probe. Das biotinylierte Peptid interagiert mit Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (SA-HRP), was die Substratlösung katalysiert. Durch Zugabe der Stopplösung sollte sich die Farbe in jedem Well von blau in gelb umwandeln. Die Intensität der entstandenen gelben Farbe ist direkt proportional zur Menge des biotinylierten Peptid-SA-HRP-Komplexes, aber umgekehrt proportional zur Menge des Peptids (in der Standardlösung oder der unbekannt Probe). Dies liegt an der Konkurrenz zwischen dem biotinylierten Peptid und dem Zielpeptid bei der Bindung mit dem primären Antikörper. Eine Standardkurve lässt sich erstellen, wenn man die gemessene OD als Funktion der verschiedenen bekannten Standardpeptidkonzentrationen darstellt. Unbekannte Peptidkonzentrationen in Proben lassen sich dann durch Extrapolation aus dieser Standardkurve ableiten.

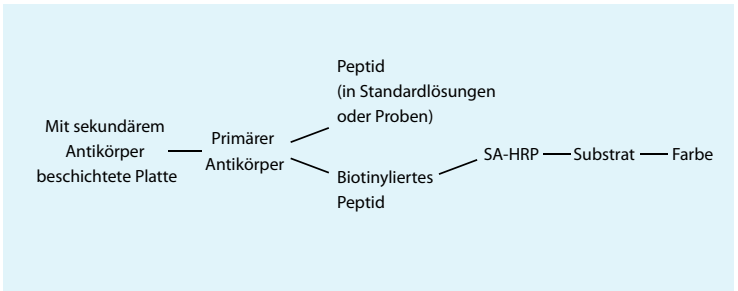


Abbildung 1. Diagramm der molekularen Wechselwirkungen, die in diesem Set genutzt werden

## ZUSAMMENFASSUNG DES ASSAYPROTOKOLLS

50  $\mu\text{l}$ /Well Standard, Probe oder Positivkontrolle hinzufügen,  
25  $\mu\text{l}$  primären Antikörper und 25  $\mu\text{l}$  biotinyliertes Peptid,  
**außer in den Leerwert (Blank)**

Bei Raumtemperatur (20-23 °C) 2 Stunden lang inkubieren

Immunplatte 4-mal mit 350  $\mu\text{l}$ /Well 1x-Assay-Puffer waschen

100  $\mu\text{l}$ /Well SA-HRP-Lösung hinzufügen

Bei Raumtemperatur (20-23 °C) 1 Stunde lang inkubieren

Immunplatte 4-mal mit 350  $\mu\text{l}$ /Well 1x-Assay-Puffer waschen

100  $\mu\text{l}$ /Well TMB-Substratlösung hinzufügen

Bei Raumtemperatur (20-23 °C) 1 Stunde lang inkubieren

Reaktion mit 100  $\mu\text{l}$ /Well 2N HCL beenden

Extinktion (OD) bei 450 nm messen und Ergebnisse berechnen

**Hinweis:** Dieses Protokoll vor Durchführung des Assays vollständig durchlesen. Jedes Set enthält ausreichend Reagenzien für 96 Wells und kann 40 Duplikatproben testen.

## ASSAYPROTOKOLL

**Hinweis:** Das Set und all seine Bestandteile sollten auf Raumtemperatur gebracht werden (20-23°C), bevor die Ampullen geöffnet werden und mit dem Assay begonnen wird. Vor dem Öffnen der Mikrozentrifugenröhrchen zur Rekonstitution 5 Sekunden lang bei ~3.000 rpm zentrifugieren, damit alles lyophilisierte Material am Boden des Röhrchens ist.

1. Das 20x-EIA-Assay-Pufferkonzentrat mit 950 ml destilliertem Wasser verdünnen. Vor Gebrauch gründlich mischen. Dies ist die 1x-Assay-Pufferlösung zur Verdünnung oder Rekonstitution aller anderen Proben und Reagenzien während des Assays.

**Hinweis:** Wenn im 20x-Assay-Puffer Kristalle vorhanden sind, kann die Flasche ca. 30 Minuten lang bzw. so lange, bis keine Kristalle mehr sichtbar sind, in ein warmes Wasserbad gegeben werden.

2. Das Standardpeptid in 1 ml des 1x-Assay-Puffers rekonstituieren und gründlich im Vortex mischen. Die Lösung mindestens 10 Minuten lang bei Raumtemperatur (20-23 °C) für eine vollständige Auflösung stehen lassen. Dies ist die Standard-Stammlösung. Sofort vor Gebrauch im Vortex mischen.
3. Den primären Antikörper in 5 ml des 1x-Assay-Puffers rekonstituieren und gründlich im Vortex mischen. Die Lösung mindestens 5 Minuten lang bei Raumtemperatur für eine vollständige Auflösung stehen lassen. Vor Gebrauch noch einmal im Vortex mischen.
4. Das biotinylierte Peptid in 5 ml des 1x-Assay-Puffers rekonstituieren und gründlich im Vortex mischen. Die Lösung mindestens 5 Minuten lang bei Raumtemperatur für eine vollständige Auflösung stehen lassen. Vor Gebrauch noch einmal im Vortex mischen.
5. Die Positivkontrolle in 200 µl des 1x-Assay-Puffers rekonstituieren und gründlich im Vortex mischen. Die Lösung mindestens 5 Minuten lang bei Raumtemperatur für eine vollständige Auflösung stehen lassen. Vor Gebrauch noch einmal im Vortex mischen.

### Peptid-Standardlösungen wie folgt herstellen:

Standard ID / Nummer	1x-Assay-Puffer-Volumen	Standardpeptid-Volumen	Konzentration
Stamm	1000 $\mu$ l	(Pulver)	1000ng/ml
#1	975 $\mu$ l	25 $\mu$ l Stammlösung	25ng/ml
#2	800 $\mu$ l	200 $\mu$ l of #1	5ng/ml
#3	800 $\mu$ l	200 $\mu$ l of #2	1ng/ml
#4	800 $\mu$ l	200 $\mu$ l of #3	0.2ng/ml
#5	800 $\mu$ l	200 $\mu$ l of #4	0.04ng/ml

Abbildung 2. Tabelle zu den Standardverdünnungen

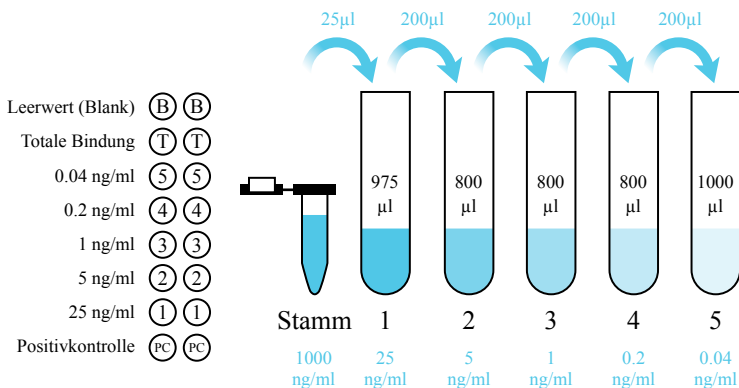


Abbildung 3. Diagramm zur Befüllung der Immunoplatte

Abbildung 4. Optische Darstellung der Standardverdünnungen



6. Standardverdünnungen aus dem rehydrierten Standardpeptid herstellen, wie in Abbildung 2 und 4 auf der vorherigen Seite dargestellt. Jedes Röhrchen nach jedem Verdünnungsschritt gründlich im Vortex mischen.
7. Well A1 und A2 auf der Immunoplatte als Leerwert leer lassen.
8. 50 µl des 1x-Assay-Puffers in Well B1 und B2 geben. Diese stellen die totale Bindung dar.
9. 50 µl der am wenigsten konzentrierten Peptid-Standardlösung (#5) in Well C1 und C2 geben. Dann Peptid-Standard #4 in Well D1 und D2, und so weiter in umgekehrter Reihenfolge wie bei der Standardverdünnung.  
**Hinweis:** Standardpeptide sollten immer doppelt getestet werden.
10. 50 µl rehydrierte Positivkontrolle in Well H1 und H2 geben.  
**Hinweis:** Positivkontrollen sollten immer doppelt getestet werden.
11. 50 µl der unbekanntes/vorbereiteten Proben wieder doppelt in die entsprechenden Wells geben.  
**Hinweis:** Jedes Labor muss die geeigneten Verdünnungsfaktoren sowie die Präparation für die Proben selbst so bestimmen, dass die Peptidwerte nachweisbar sind und sich im linearen Bereich der Standardkurve befinden.
12. 25 µl rehydrierten primären Antikörper in jeden Well geben, außer in die Blindvertiefungen (A1 und A2).  
**Hinweis:** Eine Mehrkanalpipette wird NICHT empfohlen zur Befüllung mit dem primären Antikörper.
13. 25 µl rehydriertes, biotinyliertes Peptid in jeden Well geben, außer in die Leerwerte (A1 und A2).  
**Hinweis:** Eine Mehrkanalpipette wird NICHT empfohlen zur Befüllung mit dem biotinylierten Peptid.
14. Die Immunoplatte mit einer Plattenversiegelungsfolie (APS) versiegeln. Die Immunoplatte 2 Stunden lang bei Raumtemperatur (20-23 °C) inkubieren.  
**Hinweis:** Orbitales Schütteln bei 300-400 rpm wird für die Dauer jeder Inkubation empfohlen.
15. Die SA-HRP-Ampulle 5 Sekunden lang zentrifugieren (3.000-5.000 rpm). 12 µl SA-HRP in 12 ml 1x-Assay-Puffer pipettieren und die Lösung gründlich im Vortex mischen.

16. Die APS von der Immunoplatte nehmen und den Inhalt der Wells entsorgen. Jeden Well mit 350 µl 1x-Assay-Puffer waschen, den Puffer entsorgen, die Immunoplatte umdrehen und mit Löschpapier trocknen. 4-mal wiederholen.
17. 100 µl SA-HRP-Lösung in jeden Well geben.
18. Die Immunoplatte erneut mit einer Plattenversiegelungsfolie versiegeln. 1 Stunde lang bei Raumtemperatur (20-23 °C) inkubieren.  
**Hinweis:** Orbitales Schütteln bei 300-400 rpm wird für die Dauer jeder Inkubation empfohlen.
19. Die APS von der Immunoplatte nehmen und den Inhalt der Wells entsorgen. Jeden Well mit 350 µl 1x-Assay-Puffer waschen, den Puffer entsorgen, die Immunoplatte umdrehen und mit Löschpapier trocknen. 4-mal wiederholen.
20. 100 µl der TMB-Substratlösung in jeden Well geben.  
**Hinweis:** TMB ist lichtempfindlich. Nach Hinzufügung der TMB-Substratlösung wird sehr empfohlen, die Immunoplatte abzudecken, um diese vor Licht zu schützen.
21. Die Immunoplatte erneut mit einer Plattenversiegelungsfolie versiegeln. 1 Stunde lang bei Raumtemperatur (20-23 °C) inkubieren.  
**Hinweis:** Orbitales Schütteln bei 300-400 rpm wird für die Dauer jeder Inkubation empfohlen.
22. Die APS von der Immunoplatte nehmen. NICHT die Immunoplatte waschen oder den Inhalt der Wells entsorgen.
23. 100 µl 2N HCL in jedes Well geben, um die Reaktion zu stoppen. Die Farbe in den Wells sollte sich von blau in gelb umwandeln. Die Platte leicht antippen, um für eine gründliche Mischung zu sorgen.  
**Hinweis:** Innerhalb von 20 Minuten mit dem nächsten Schritt fortfahren.
24. Die Immunoplatte auf einen Mikrotiterplatten-Reader geben und die Extinktion (OD) bei 450 nm messen.

1. Reagenzien mit verschiedenen Chargennummern sollten nie vermischt werden.
2. Es können Plasma, Serum, Kulturmedien, Gewebehomogenate, CSF, Urin oder jede andere biologische Flüssigkeit getestet werden, solange die Proben angemessen vorbereitet werden und der Peptidgehalt darin hoch genug ist für die Empfindlichkeit des jeweiligen Sets.
3. Hohe Anteile störender Proteine können Variationen im Probenergebnis verursachen. Deshalb ist es unerlässlich, das richtige Verfahren zur Probenvorbereitung zu wählen, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Spezifische Methoden finden Sie in der Literatur.
4. Vermeiden Sie bei der Handhabung der Platte das Berühren des Bodens. Jeder Fingerabdruck oder Fleck kann die OD-Ablesung beeinträchtigen.
5. Manuelles Waschen kann zu hohen Abweichungen im Koeffizienten der Duplikate führen. Um diesen Faktor zu verringern, sollten Flüssigkeiten aus der Platte entfernt werden, indem diese umgedreht und vorsichtig auf saugfähigem Material ausgeklopft wird.
6. Jedes Mal, wenn eine neue Spitze verwendet wird, muss überprüft werden, ob diese sicher sitzt und keine Luftblasen enthält. Für eine bessere Intraassay-Variation wird ein Reagens oder eine Probe einige Male aspiriert und zurück in den Behälter gegeben, um die Pipettenspitze anzufeuchten, bevor sie befüllt wird.
7. Ein Eintauchen der gesamten Pipettenspitze in die Reagenzien und Proben ist zu vermeiden. Tröpfchen können sich am Ende der Spitze sammeln, was zu einer übermäßigen Befüllung des Wells führen und das Assayergebnis beeinträchtigen kann.
8. Wird dieses Verfahren außerhalb des empfohlenen Raumtemperaturbereichs (20-23 °C) durchgeführt, kann dies die Assayergebnisse beeinträchtigen.
9. Modifikationen am vorhandenen Protokoll (d.h. an den Standardverdünnungen, der Pipettiertechnik, der Waschtechnik, der Inkubationszeit oder -temperatur, den Lagerbedingungen und dem Verfallsdatum) können die Empfindlichkeit, Genauigkeit und die Ergebnisse des Assays beeinträchtigen.

1. Auf die X-Achse (logarithmische Skala) die Konzentration von Standard #5 bis #1 auftragen (0,04 bis 25 ng/ml).
2. Auf die Y-Achse (lineare Skala) die Extinktion (O.D.) bei 450 nm auftragen.
3. Den Durchschnitt aus allen Duplikatablesungen (Standard, Positivkontrolle, Proben) ermitteln und die durchschnittliche OD-Ablesung der Leerwerte (Blanks) abziehen.
4. Die OD für jede Standard-Peptidkonzentration direkt über der zugehörigen X-Achsen-Koordinate eintragen.
5. Die passendste Kurve durch diese Datenpunkte ziehen. Es sollte sich ein umgekehrtes Verhältnis zwischen Peptidkonzentration und Extinktion ergeben. Wenn die Standard-Peptidkonzentration steigt, vermindert sich die Gelbfärbung und damit auch die Extinktion (OD).

**Hinweis:** Der Gebrauch einer Software zur Kurvenanpassung mit Fähigkeit zur 4-Parameter-Logistik oder Log-Logit-Funktionalität wird sehr empfohlen.

6. Zur Bestimmung der Peptidkonzentration in unbekanntem Proben wird zunächst die Extinktion (OD) an der Y-Achse lokalisiert. Dann wird eine horizontale Linie durch den Graphen von der Extinktion bis zur Schnittstelle mit der Standardkurve gezogen. Die X-Achsen-Koordinate an diesem Schnittpunkt entspricht der Peptidkonzentration (ng/ml) in der Assayprobe.

**Hinweis:** Die gemessene Peptidkonzentration wird mit dem/ den Verdünnungsfaktor(en) bei der Vorbereitung der Originalprobe multipliziert.

7. Siehe Datenblatt zur Qualitätskontrolle für akzeptable Werte der Positivkontrollen. Liegen die Werte der Positivkontrollen nicht innerhalb des im Datenblatt zur Qualitätskontrolle angegebenen Bereichs, so ist das Assay ungültig.

**Hinweis:** Für die meisten Proben wird eine Peptidextraktion empfohlen. Dies hilft bei der Eliminierung von störenden Molekülen in biologischen Flüssigkeiten und ermöglicht eine Verdünnung oder Konzentration der Probe.

### **Blutentnahme und Plasmagewinnung allgemein:**

1. Blutproben werden in Lavendar Vacutainer Blutentnahmeröhrchen (Katalog-Nr. VT-6450) gesammelt, die EDTA enthalten und bis zu 7 ml Blut aufnehmen können.
2. Die Lavendar Vacutainer Röhrchen nach der Blutentnahme mehrmals leicht schütteln, um eine Koagulation zu vermeiden.
3. Dann wird das Blut in Zentrifugenröhrchen mit Aprotinin gegeben (Katalog-Nr. RK-APRO) und noch einmal mehrmals leicht geschüttelt, um die Aktivität von Proteasen zu hemmen.

**Hinweis:** 0,6 TIU oder 100 µl Aprotinin pro 1 ml Blut werden empfohlen. Sind die Lavendar Vacutainer Röhrchen zentrifugentauglich, kann das Aprotinin auch direkt hineingegeben werden.

4. Das Blut bei 1.600 x g 15 Minuten lang bei 4 °C zentrifugieren und das Plasma sammeln.

**Hinweis:** Plasma kann bei -70 °C aufbewahrt werden und bleibt bis zu einem Monat stabil.

5. Zur Peptidextraktion aus der Probe wird das Plasma mit der gleichen Menge Puffer A (Katalog-Nr. RK-BA-1) angesäuert. Mischen und bei 6.000 bis 17.000 x g 20 Minuten lang bei 4 °C zentrifugieren. Das Ganze kommt in die C-18 SEP-SÄULE.

**Hinweis:** Mindestens 1 ml Plasma wird zur Peptidextraktion empfohlen. Es kann möglich sein, die Extraktion mit geringerem Volumen durchzuführen, solange das Volumen des Rekonstitutions- und Elutions- Puffers entsprechend angepasst wird.

### Extraktion von Peptiden aus der Probe:

1. Gewebe 20 Minuten lang bei 100 °C in 75%-iger HoAc (Essigsäure) kochen.
2. Gewebe im Lysepuffer, normalerweise mit niedrigem pH-Wert, homogenisieren.
3. Das Gewebehomogenat bei 12.000 rpm 20 bis 30 Minuten lang bei 4 °C zentrifugieren.
4. Zur Peptidextraktion aus der Probe wird 1 ml Überstand genommen und mit 1 ml Puffer A (Katalog-Nr. RK-BA-1) kombiniert und damit die Probe angesäuert. Bei 6.000 bis 17.000 x g 20 Minuten lang zentrifugieren und Überstand einsammeln. Das Ganze kommt in die C-18 SEP-SÄULE. Durch Zentrifugation auf Eis werden Peptidasen gehemmt.

**Hinweis:** Ist ein separates Proteinassay erforderlich, wird ein Aliquot weggenommen, bevor der Puffer A hinzugefügt wird. Dieser Puffer enthält Stoffe, die die Proteinanalyse stören könnten.

### Extraktion von Peptiden aus der Probe:

1. Eine SEP-SÄULE mit 200 mg C18 (Katalog-Nr. RK-SEPCOL-1) äquilibrieren. Einmal mit 1 ml Puffer B waschen (Katalog-Nr. RK-BB-1) und danach dreimal (3) mit 3 ml Puffer A.
2. Die angesäuerte Probenlösung (Plasma, Serum, Gewebe etc.) kommt in die voräquilibrierte C-18 SEP-SÄULE.
3. Die Säule zweimal langsam mit 3 ml Puffer A waschen und die Waschflüssigkeit entsorgen.
4. Das Peptid einmal langsam mit 3 ml Puffer B eluieren und das Elutionsmittel in einem Polystyrolröhrchen sammeln.

**Hinweis:** Beim Extraktionsverfahren für einen konstanten Strom aller Lösungen sorgen. Für eine optimale Probenverarbeitung und Rückgewinnung dürfen keine Luftblasen in die C-18-Matrix gelangen.

5. Elutionsmittel in einem Zentrifugenkonzentrator oder durch eine geeignete Ersatzmethode bis zur Trockenheit verdampfen lassen.

**Hinweis:** Eine Kombination aus Zentrifugenkonzentrator (d.h. Speedvac) und Lyophilisator (Gefriertrockner) bringt die besten Ergebnisse. Zuerst wird die Probe im Zentrifugenkonzentrator ca. 15 Minuten lang getrocknet und die organische Schicht entfernt. Der Rest der Probe wird schockgefroren und über Nacht mit dem Lyophilisator gefriergetrocknet. Ist der Zentrifugenkonzentrator keine akzeptable Lösung, reicht die Gefrier Trocknung über Nacht im Lyophilisator aus.

6. Das getrocknete Extrakt wird auf  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gehalten und das Assay so bald wie möglich durchgeführt. Mit dem 1x-Assay-Puffer wird das getrocknete Extrakt auf die gewünschte Konzentration rekonstituiert. Fällt der Peptidwert nicht in den nachweisbaren Bereich, wird die Probe entsprechend verdünnt oder konzentriert.

**Hinweis:** Wurde beispielsweise 1 ml Plasma extrahiert, getrocknet und dann in 250  $\mu\text{l}$  1x-Assay-Puffer rekonstituiert, dann wurde die Originalprobe dadurch einer 4-fachen Konzentration unterzogen.

## QUELLEN

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.

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, Deutschland  
Tel: +49 (721) 12 08 150  
Fax: +49 (721) 12 08 15 15  
europe@phoenixpeptide.eu