

Urotensin II ELISA Kit

*Zur in-vitro-Bestimmung von Urotensin II in Serum
und Plasma*

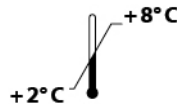
*For the in vitro determination of urotensin II
in serum and plasma*

EU: IVD / CE

US: Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Gültig ab / Valid from 27.03.2014

REF K 1010



RUO



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG / KLINISCHE RELEVANZ	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	2
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	3
6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG	4
7. TESTDURCHFÜHRUNG	4
<i>Testprinzip</i>	4
<i>Pipettierschema</i>	5
8. ERGEBNISSE	6
9. EINSCHRÄNKUNGEN	7
10. QUALITÄTSKONTROLLE	7
<i>Referenzwerte</i>	7
11. TESTCHARAKTERISTIKA	7
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	7
13. TECHNISCHE MERKMALE	8
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	8
15. LITERATUR	9

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von Urotensin-II aus Serum und Plasma geeignet. Nur für wissenschaftliche Forschung. Nicht für diagnostische Zwecke.

2. EINLEITUNG / KLINISCHE RELEVANZ

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 GPR14-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 vasokonstriktorisches 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. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 1010MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	96
K 1010WP	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 1010AP	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
K 1010A2	TRACER	Tracer, biotinyliertes Urotensin II	1 x 100 µl
K 1010K	CONJ	Konjugat (streptavidinmarkierte Peroxidase)	1 x 200 µl
K 1010ST	STD	Standards, lyophilisiert	2 x 5 vials
K 1010TMB	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 1010AC	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer

* 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 ($\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$).

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** (Waschpuffer) ist bei **2–8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die **lyophilisierten STD** (Standards) sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Standards werden mit **250 µl Reinstwasser** rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Standards können 4 Tage bei 2–8 °C gelagert werden**.
- Der **Tracer** (biotinylierter Urotensin-II-Tracer) wird **1:101 in Assaypuffer** verdünnt (50 µl Tracer + 5 ml Assaypuffer). Unverdünnter Tracer ist bei 2–8 °C bis

zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünnter Tracer ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**

- Das **Konjugat** (CONJ) wird unmittelbar vor Gebrauch **1:101 in Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Unverdünntes Konjugat ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konjugat ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

Serum und Plasma

Serum- und Plasmaproben sollten bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert werden. Die Proben werden vor der Bestimmung **1:10 in ASYBUF** (Assaypuffer) verdünnt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser Urotensin-II-ELISA dient zur quantitativen Erfassung von Urotensin II aus humanem Serum oder Plasma.

Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven ELISA. Die zu untersuchenden Proben bzw. Standards werden zusammen mit einem biotinylierten Urotensin-II-Tracer in einer mit einem polyklonalen anti-Urotensin-II-Antikörper beschichteten ELISA-Platte inkubiert. Während der Inkubation kompetitiert das freie Zielantigen in den Proben mit dem biotinylierten Urotensin-II-Tracer um die Bindung der polyklonalen anti-Urotensin-II-Antikörper. Beim zweiten Inkubationsschritt wird Streptavidin-markierte Peroxidase zugegeben, die an den biotinylierten Urotensin-II-Tracer bindet. Nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Komponenten wird das Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. 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 Urotensin-II-Konzentration in der Probe reduziert sich die Konzentration des an den anti-Urotensin-II-Antikörper gebundenen biotinylierten Urotensin-II-Tracers und das Signal nimmt ab. Aus den ermittelten Standardwerten wird eine Standardkurve, optische Dichte (Absorption bei 450 nm) gegen Standardkonzentration, erstellt, aus der die Konzentrationen der

Proben berechnet werden.

Pipettierschema

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

Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können in der Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Mikrotiterstreifen 5 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	50 µl STD (Standards) und vorverdünnte Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	Je Vertiefung 50 µl verdünnten Tracer hinzufügen.
4.	Streifen abdecken und 2 Stunden bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln inkubieren.
5.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
6.	100 µl verdünntes CONJ in jede Vertiefung pipettieren.
7.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
8.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
9.	100 µl SUB (Substrat) in jede Vertiefung pipettieren.
10.	10–20 Minuten bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren*.
11.	100 µl STOP (Stopplösung) in jede Vertiefung pipettieren und kurz mischen.

12.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.
-----	--

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

8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion:

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z.B. 0,001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

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

3. Gewichtete Spline-Funktion

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

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

Serum-/Plasmaproben

Der ermittelte Urotensin-II-Spiegel der Serum- und Plasmaproben wird mit dem Verdünnungsfaktor 10 multipliziert.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben, deren OD höher ist als die des höchsten Standards, sollten stärker verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden. Bei der folgenden Auswertung ist der veränderte Verdünnungsfaktor zu beachten.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik 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 die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzwerte

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

–

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu Forschungszwecken verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen 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.

13. 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.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums 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.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigegeführten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma 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, zurückzusenden.

15. LITERATUR

1. Ames, R.S. et al., 1999. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature*, **401**(6750), pp.282–6.
2. Coulouarn, Y. et al., 1998. Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**(26), pp.15803–8.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



Nur für Forschungszwecke

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Urotensin II ELISA Kit

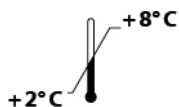
*For the in vitro determination of urotensin II
in serum and plasma*

EU: IVD / CE

US: Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Valid from 27.03.2014

REF K 1010



RUO



Immundiagnostik AG

Table of Contents

1. INTENDED USE _____ 13

2. INTRODUCTION _____ 13

3. MATERIAL SUPPLIED _____ 13

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED _____ 14

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS _____ 14

6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION _____ 15

7. ASSAY PROCEDURE _____ 15

Principle of the test _____ 15

Test procedure _____ 15

8. RESULTS _____ 17

9. LIMITATIONS _____ 17

10. QUALITY CONTROL _____ 17

Reference range _____ 18

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS _____ 18

12. PRECAUTIONS _____ 18

13. TECHNICAL HINTS _____ 18

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE _____ 19

15. REFERENCES _____ 19

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of urotensin II in serum and plasma. For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

2. INTRODUCTION

Urotensin II can be found in the spinal cord tissue from many different species (fish, vertebrae, primates) and probably plays a role there as a hormone in the neurosecretory 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 endothel cells of the blood vessels.

In vitro diagnostics on isolated blood vessels have shown that urotensin II acts as a vaso-constrictive "somatostatin-similar" peptide, nevertheless, the vaso-constrictive capacity far exceeds that of the afore mentioned vaso-active substances, e.g. 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. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 1010MTP	PLATE	Holder with precoated strips	96
K 1010WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 1010AP	ASYBUF	Assay buffer, ready-to-use	1 x 100 ml
K 1010A2	TRACER	Tracer, biotinylated urotensin II	1 x 100 µl
K 1010K	CONJ	Conjugate (streptavidin-labelled peroxidase)	1 x 200 µl
K 1010ST	STD	Standards, lyophilized	2 x 5 vials
K 1010TMB	SUB	TMB Substrate (Tetramethylbenzidin), ready to use	1 x 15 ml
K 1010AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted **1:10 in ultra pure water** before use (100 ml concentrate + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or 37 °C before dilution of the buffer solutions. The **buffer concentrate** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted buffer solution** (wash buffer) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for one month**.
- The **lyophilized standards** (STD) are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the **STD** (standards) must be reconstituted with **250 µl of ultra pure water**. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to ensure complete reconstitution. **Reconstituted standards and controls can be stored at 2–8 °C for four days.**
- The **TRACER** (biotinylated urotensin II tracer) must be diluted **1:101 in assay buffer** (50 µl TRACER + 5 ml assay buffer). The undiluted conjugate is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted tracer is not stable and cannot be stored.**

- The **conjugate** (CONJ) must be diluted **1:101 in wash buffer** (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The undiluted conjugate is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted conjugate is not stable and cannot be stored.**
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8 °C**.

6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum and plasma samples

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

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This assay is based on the method of competitive ELISA. As a first preparation step, a biotinylated urotensin II tracer is incubated with the samples or standards in microtiter plate wells coated with polyclonal anti-urotensin II antibodies. During the incubation, the free target antigen in the samples competes with the biotinylated urotensin II tracer for the binding of the polyclonal anti-urotensin II antibodies immobilized on the microtiter plate wells. The unbound components are removed by a washing step. During a second incubation step, a streptavidin-labeled peroxidase antibody, which binds to the biotinylated urotensin II tracer, is added into each microtiter well. After a washing step to remove the unbound components, the peroxidase substrate tetramethylbenzidine (TMB) is added. Finally, the enzymatic reaction is terminated by an acidic stop solution. The color changes from blue to yellow and the absorbance is measured in the photometer at 450 nm. The intensity of the yellow color is inverse proportional to the urotensin II concentration in the sample; this means, high urotensin II concentration in the sample reduces the concentration of the biotinylated urotensin II tracer bound to the immobilized anti-urotensin II antibodies and lowers the photometric signal. A dose response curve of absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from the standard.

Test procedure

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

Take as many **microtiter strips** as needed from kit. Store unused strips in the aluminium wrapper at 2–8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Wash each well 5 x with 250 µl diluted wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
2.	Add 50 µl STD (standards) and prediluted sample in duplicates into the respective wells.
3.	Add 50 µl diluted TRACER per well.
4.	Cover and incubate for 2 hours shaking on a horizontal mixer at room temperature (15–30 °C).
5.	Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 x with 250 µl diluted wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
6.	Add 100 µl diluted CONJ (conjugate).
7.	Cover and incubate for 1 hour shaking on a horizontal mixer at room temperature (15–30 °C).
8.	Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 x with 250 µl diluted wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper
9.	Add 100 µl SUB (TMB substrate)
10.	Incubate for 10–20 min in the dark at room temperature (15–30 °C)*.
11.	Add 100 µl STOP (stop solution) and mix shortly
12.	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 as a reference.

* The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend observing the color change and stopping the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the "4 parameter algorithm".

1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the 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 the optical density and a linear abscissa for the concentration.

3. Spline algorithm

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

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

Serum and plasma samples

The obtained urotensin II levels of serum and plasma samples have to be multiplied with the dilution factor of 10.

9. LIMITATIONS

Samples with an OD higher than the OD of the highest standard should be further diluted and re-assayed. For the following analysis, the changed dilution factor has to be taken into consideration.

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik 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 sample are outside the acceptable limits.

Reference range

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

–

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for research use only.
- Control samples should be analyzed with each run.
- 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 color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric 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 breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on 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.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Ames, R.S. et al., 1999. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature*, **401**(6750), pp.282–6.
2. Coulouarn, Y. et al., 1998. Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**(26), pp.15803–8.

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



For research use only



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number