

ANGIOPOIETIN-2

(EN) ELISA FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF HUMAN
ANGIOPOIETIN-2 IN SERUM, EDTA PLASMA, HEPARIN PLASMA, AND CITRATE PLASMA
Cat. No. BI-ANG2 . 12 x 8 TESTS

(DE) ELISA ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON HUMANEM
ANGIOPOETIN-2 IN SERUM, EDTA PLASMA, HEPARIN PLASMA UND CITRAT PLASMA
Kat. Nr. BI-ANG2 . 12 x 8 TESTE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES

www.bmgrp.com

Rev.no. 191104

This kit was developed and manufactured by:
Biomedica Medizinprodukte GmbH, A-1210 Wien, Divischgasse 4
Tel. +43/1/29107 45, Fax +43/1/29107 6389, e-mail info@bmgrp.com



CONTENT / INHALT

ENGLISH	Page 3
DEUTSCH	Seite 9

Detailed information on the Angiopoietin-2 ELISA, e.g. assay validation data, sample matrix comparisons, and stability data is available on our website.

Detaillierte Informationen und Validierungsdaten zum Angiopoetin-2 human ELISA, wie z.B. Probenmatrix Vergleiche und Probenstabilität finden Sie auf unserer Webseite.

www.bmgrp.com

1) INTRODUCTION

Angiopoietin-2 (ANG2) is a 56.9 kDa glycosylated growth factor that is specific for endothelial cells (ECs). ANG2 is expressed in embryonic vessels and contributes to the formation of new vasculature. In adults, it is restricted to sites of vascular remodeling (e.g. ovary, uterus, placenta) and wound healing. ANG2 is regulated by the cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF). Together with VEGF, ANG2 induces endothelial cell migration, proliferation, and vascular sprouting. During angiogenesis, ANG2 exerts its effects via the angiopoietin-1/TIE2 receptor signaling system on endothelial cells. Disruption of this signaling leads to the loss of endothelial integrity. In consequence, the endothelium responds to various pro-inflammatory cytokines and growth factors. Thus, ANG2 might cause vascular micro-inflammation in patients with chronic kidney disease (CKD). Various studies demonstrated that ANG2 levels increase with CKD stage and are associated with fluid overload and abnormal cardiac structure. Furthermore, ANG2 concentrations correlate with mortality in patients with CKD stages 4–5. Although ANG2 levels recover after successful kidney transplantation, ANG2 continues to be a cardiovascular risk factor in this population. In cancer, targeting the TIE2-Angiopoietin pathway has shown promising results in some pre-clinical and clinical trials, including studies on recurrent or metastatic breast and renal cell carcinomas.

Areas of interest:

- Ischemic pathologies (PAD, CAD)
- Inflammation (Bowel disease, Chron's disease, cirrhosis, sepsis)
- Autoimmune disease (rheumatoid arthritis, psoriasis)
- Artherosclerosis
- Chronic kidney disease
- Diabetic retinopathy
- Cancer

2) CONTENTS OF THE KIT

CONTENTS	KIT COMPONENTS	QUANTITY
PLATE	Recombinant human monoclonal angiopoietin-2 antibody pre-coated microtiter strips in stripholder packed in aluminium bag with desiccant	12 x 8 tests
WASHBUF	Wash buffer concentrate, 20x, natural cap	1 x 50 ml
ASYBUF	Assay buffer, red cap, ready to use	1 x 22 ml
STD	Standards (0; 12.5; 25; 50; 100; 200; 400 pmol/l) recombinant human angiopoietin-2, white caps, lyophilised	7 vials
CTRL	Controls A and B, yellow caps, lyophilized, exact concentrations see labels	2 vials
AB	Goat polyclonal anti-human angiopoietin-2 antibody, biotinylated, green cap, ready to use	1 x 7 ml
CONJ	Conjugate, (streptavidin-HRP), amber cap, ready to use	1 x 13 ml
SUB	Substrate (TMB solution), blue cap, ready to use	1 x 13 ml
STOP	Stop solution, white cap, ready to use	1 x 7 ml

3) ADDITIONAL MATERIAL IN THE KIT

- 2 self-adhesive plastic film
- Quality control protocol
- Protocol sheet
- Instruction for use

4) MATERIAL AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Precision pipettes calibrated to deliver 20 µl, 50 µl, 100 µl, 1000 µl and disposable tips
- Distilled or deionised water
- Plate washer is recommended for washing, alternative multichannel pipette or manifold dispenser
- Refrigerator with 4°C (2-8°C)
- Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 nm (with correction wavelength at 630 nm)
- EP-tubes for sample dilution
- Graph paper or software for calculation of results

5) REAGENTS AND SAMPLE PREPARATION

All reagents as supplied in the kit are stable at 4°C (2-8°C) until the expiry date stated on the label of each reagent.

Sample preparation/dilution:

Collect venous blood samples by using standardized blood collection tubes. Perform plasma or serum separation by centrifugation according to supplier's instructions of the blood collection devices. Assay the acquired samples immediately or aliquot and store at -25°C or lower. Lipemic or haemolyzed samples may give erroneous results. Samples are stable for up to four freeze-thaw cycles. Samples should be mixed well before assaying. We recommend duplicates for all values. Samples with values above STD7 (400 pmol/l) can be diluted further with ASYBUF (Assay buffer).

Samples must be diluted 1+10 with assay buffer (ASYBUF), e.g. 20 µl sample + 200 µl ASYBUF.

For further information on sample stability please visit our website www.bmgrp.com (see Validation Data) or contact our customer service by e-mail info@bmgrp.com or by phone +43/ 1/ 29107-45.

Reagent preparation/handling:

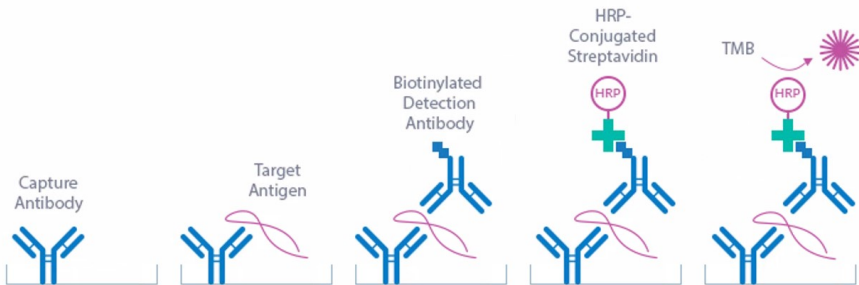
WASHBUF (wash buffer): Dilute the concentrate 1:20, e.g. 50 ml WASHBUF + 950 ml distilled or deionized water. Crystals in the buffer concentrate will dissolve at room temperature. The undiluted WASHBUF is stable at 4°C (2-8°C) until the expiry date stated on label. The diluted WASHBUF is stable up to one month at 4°C (2-8°C). Only use diluted WASHBUF when performing the assay.

STD (standards) + CTRL (controls): Pipette 200 µl of distilled or deionized water into each vial. Leave at room temperature (18-26°C) for 15 min. Vortex. Reconstituted STD and CTRL can be stored at -25°C or lower until expiry date stated on the label. STDs and CTRLs are stable for four freeze-thaw cycles.

STD / CTRL must be diluted 1+10 with assay buffer (ASYBUF), e.g. 20 µl STD / CTRL + 200 µl ASYBUF.

6) PRINCIPLE OF THE ASSAY

The Angiotensin II human ELISA kit is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative determination of angiotensin II in human serum and plasma samples. Standards, controls and samples must be pre-diluted 1+10 prior to assaying. In a first step, pre-diluted standard/control/sample and biotinylated antibody (goat polyclonal anti-human angiotensin II) are pipetted into the wells of the microtiter strips, which are pre-coated with a monoclonal anti-human angiotensin II antibody. Angiotensin II present in the standard/control/sample binds to the pre-coated antibody in the well and forms a sandwich with the anti-human angiotensin II antibody. In a washing step all non-specific unbound material is removed. In a second step, the conjugate (Streptavidin-HRP) is pipetted into the wells and reacts with the biotinylated antibody. After another washing step, the substrate (TMB, tetramethylbenzidine) is pipetted into the wells. The enzyme-catalyzed color change of the substrate is directly proportional to the amount of angiotensin II present in the sample. This color change is detectable with a standard microplate reader. A dose response curve of the absorbance (optical density, OD at 450 nm) using the values obtained from the standards versus the standard concentration is generated. The concentration of angiotensin II in the sample is determined directly from the dose response curve.



7) ASSAY PROTOCOL

All reagents and samples must be at room temperature (18-26°C) before use in the assay.

Mark position for STD/CTRL/SAMPLE (standard/control/sample) on the protocol sheet.

Take microtiter strips out of the aluminium bag. Store unused strips with desiccant at 4°C (2-8°C) in the aluminium bag. Strips are stable until expiry date stated on the label.

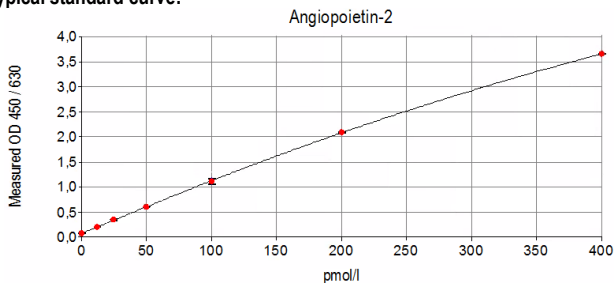
1. Pipette 50 µl **1+10 pre-diluted** STD/CTRL/SAMPLE (standard/control/sample) in duplicate into respective wells. See chapter 5) reagents and sample preparation for pre-dilution.
2. Add 50 µl AB (biotinylated anti angiotensin-2 antibody) into all wells, swirl gently.
3. **Cover tightly and incubate for 2 hours at room temperature (18-26°C), in the dark.**
4. Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (wash buffer, natural cap). After final wash, remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel.
5. Add 100 µl CONJ (Conjugate, amber cap) into each well, swirl gently.
6. **Cover tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C), in the dark.**
7. Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer, natural cap). After final wash, remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel.
8. Add 100 µl SUB (substrate, blue cap) into each well, swirl gently.
9. **Incubate for 30 min at room temperature (18-26°C), in the dark.**
10. Add 50 µl STOP (stop solution, white cap) into each well, swirl gently.
11. Measure absorbance immediately at 450 nm with reference 630 nm, if available.

8) CALCULATION OF RESULTS

Read the optical density (OD) of all wells on a plate reader using 450 nm wavelength (correction wavelength 630 nm). Construct the standard curve from the OD values of the STD. Use commercially available software or graph paper. Obtain sample concentration from this standard curve. The assay was evaluated with 4PL algorithm. Different curve fitting methods need to be evaluated by the user.

If required, the pmol/l concentration can be converted into pg/ml by applying a conversion factor (1 pg/ml = 0.018 pmol/l; MW: 54.9 kDa). Respective dilution factors have to be considered when calculating the final concentration of the sample.

Example of a typical standard curve:



The quality control protocol supplied with the kit shows the results of the final release QC for each kit lot. Data for optical density obtained by customers may differ due to various influences and/or due to the normal decrease of signal intensity during shelf life. However, this does not affect validity of results as long as an OD of 1.50 or more is obtained for the standard with the highest concentration and the values of the CTRLs are in range (target ranges see labels).

9) ASSAY CHARACTERISTICS

Method	Sandwich ELISA, HRP/TMB, 12x8-well detachable strips			
Sample type(s)	Serum, EDTA plasma, citrate plasma, heparin plasma			
Sample volume	20 µl / sample			
Assay time	2 h / 1 h / 30 min			
Sensitivity	LOD: 3.7 pmol/l (=203 pg/ml); LLOQ: 6.3 pmol/l (=346 pg/ml)			
Standard range	0 – 400 pmol/l (0 / 12.5 / 25 / 50 / 100 / 200 / 400)			
Conversion factor	1 pg/ml = 0.018 pmol/l; MW: 54.9 kDa			
Precision		n	CV (%)	
	Within-run	3	≤8	
	In-between-run	9	≤6	
Accuracy (Spike/Recovery of recombinant ANG2)		n	Recovery (%)	
			+36 pmol/l	+180 pmol/l
	Serum	6	81	93
	Citrate plasma	1	100	95
		n	+40 pmol/l	+200 pmol/l
	EDTA plasma	6	85	78
Heparin plasma	1	89	79	
Dilution linearity of endogenous Angiotensin-II		n	Recovery of expected dilution (%)	
			1+1	1+3
	Serum	6	105	105
	EDTA plasma	6	110	122
	Heparin plasma	1	107	109
Citrate plasma	1	104	115	

Specificity*	Endogenous and recombinant human Angiotensin II type 1 receptor antagonist (Angiotensin II type 1 receptor antagonist).		
Use	Research use only.		
Values of apparently healthy donors		n	Median Angiotensin II type 1 receptor antagonist (pmol/l)
	Serum	11	28
	EDTA plasma	11	24
	Heparin plasma	11	25
	Citrate plasma	11	23

*:according to epitope mapping and sequence analysis the Angiotensin II type 1 receptor antagonist ELISA should detect all 3 Angiotensin II type 1 receptor antagonist isoforms. No cross-reactivity with Angiotensin II type 1 receptor antagonist-1.

For further information on serum measurement and assay performance characteristics, matrix comparisons and stability data please visit our website www.bmgrp.com (see Validation Data) or contact our customer service by e-mail info@bmgrp.com or by phone +43/ 1/ 29107-45.

10) PRECISION

Within-run (intra-assay): 2 samples of known concentrations were tested 3 times within 1 kit lot by 1 operator.

In-between-run (inter-assay): 2 samples of known concentrations were tested 9 times within 2 kit lots by 2 operators.

Within-run (n=3)	Sample 1	Sample 2	In-between-run (n=9)	Sample 1	Sample 2
Mean (pmol/l)	25	201	Mean (pmol/l)	26	201
SD (pmol/l)	2.1	3.0	SD (pmol/l)	1.6	5.1
CV (%)	8	1	CV (%)	6	3

11) TECHNICAL HINTS

- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- Do not mix stoppers and caps from different reagents or use reagents between lots.
- Do not use reagents beyond expiration date.
- Protect reagents from direct sunlight.
- Substrate solution should remain colorless until added to the plate.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.

12) PRECAUTIONS

All test components of human source were tested against HIV-Ab, HCV-Ab and HBsAg and were found negative. Nevertheless, they should be handled and disposed as if they were infectious.

All liquid reagents contain ≤0.1% Proclin 950 as preservative. Proclin 950 is not toxic in concentrations used in this kit. It may cause allergic skin reactions – avoid contact with skin or eyes.

- Do not pipette by mouth.
- Do not eat, drink, smoke, or apply cosmetics where reagents are used.
- Wear gloves, glasses, and lab coat while performing this assay.
- Sulfuric acid is irritating to the eyes and skin. Avoid contact with skin and mucous. Irritations are possible. Flush with water if contact occurs!

13) LITERATURE

1. Biomedical significance of endothelial cell specific growth factor, angiotensin II type 1 receptor antagonist. Leem JC, Exp Mol Med, 2002;34(1):1–11.
2. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiotensin II type 1 receptor antagonist-Tie system. Augustin HG et al., Nat Rev Mol Cell Biol, 2009;10(3):165–77.

3. Crystal structures of the Tie2 receptor ectodomain and the angiotensin-2–Tie2 complex. Barton WA et al., *Nat Struct Mol Biol*, 2006;13(6):524–32.
4. Characterization and Expression of a Novel Alternatively Spliced Human Angiotensin-2. Kim I et al., *J Biol Chem*, 2000;275(24):18550–6.
5. Angiotensin-1 and Angiotensin-2 Inhibitors: Clinical Development. Gillen J et al., *Curr Oncol Rep*, 2019 ;21(3):22.
6. Targeting the Angiotensin-2/Tie-2 axis in conjunction with VEGF signal interference. Biel NM et al., *Cancer Lett*, 2016;380(2):525–33.
7. Angiotensin-2: a multifaceted cytokine that functions in both angiogenesis and inflammation: Angiotensin-2 and inflammation. Scholz A et al., *Ann N Y Acad Sci*, 2015;1347(1):45–51.
8. Circulating Angiotensin-2 levels predict mortality in kidney transplant recipients: a 4-year prospective case-cohort study. Molnar MZ et al., *Transpl Int*, 2014;27(6):541–52.
9. Circulating angiotensin-2 levels increase with progress of chronic kidney disease. David S et al., *Nephrol Dial Transplant*, 2010; 25: 2571-2579.
10. The interaction between fluid status and angiotensin-2 in adverse renal outcomes of chronic kidney disease. Tsai YC et al., *PLoS One*, 2017; 12 (3): e173906.
11. Angiotensin-2, Angiotensin-1 and subclinical cardiovascular disease in Chronic Kidney Disease. Tsai YC et al., *Scientific Reports*, 2016; 6:39400
12. Angiotensin-1 and Angiotensin-2 Inhibitors: Clinical Developments. Gillen J et al., *Current Oncology Reports*, 2019; 21:22

EINLEITUNG

Angiopoietin-2 (ANG2) ist ein für Endothelzellen (ECs) spezifischer glykosylierter Wachstumsfaktor mit einem Molekulargewicht von 56,9 kDa. Angiopoietin-2 wird in embryonalen Gefäßen exprimiert und trägt zur Bildung neuer Gefäße bei. Bei Erwachsenen ist es auf Orte des Gefäßumbaus (z.B. Eierstock, Gebärmutter, Plazenta) und der Wundheilung beschränkt. ANG2 wird durch das Zytokin VEGF (vascular endothelial growth factor) reguliert. Zusammen mit VEGF induziert ANG2 die Migration, Proliferation und das Sprießen von Endothelzellen. Während der Angiogenese übt ANG2 seine Wirkung über das Angiopoietin-1 / TIE2-Rezeptorsignalsystem auf Endothelzellen aus. Eine Unterbrechung dieser Signalübertragung führt zum Verlust der Endothelintegrität. Dementsprechend reagiert das Endothel auf verschiedene entzündungsfördernde Zytokine und Wachstumsfaktoren. Daher kann ANG2 bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung (CKD) eine vaskuläre Mikroentzündung verursachen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass der ANG2-Spiegel mit fortschreitender Niereninsuffizienz ansteigt und mit einer Flüssigkeitsüberladung und einer abnormalen Herzstruktur verbunden ist. Darüber hinaus korreliert die ANG2-Konzentration mit der Mortalität bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Stadium 4-5. Obwohl sich die ANG2-Spiegel nach erfolgreicher Nierentransplantation erholen, ist ANG2 weiterhin ein kardiovaskulärer Risikofaktor in dieser Population. Bei Krebspatienten hat das „targeting“ des TIE2-Angiopoietin-Signalwegs in einigen präklinischen und klinischen Studien, einschließlich Studien zu rezidivierenden oder metastasierten Brust- und Nierenzellkarzinomen, vielversprechende Ergebnisse gezeigt.

Interessengebiete:

- Ischämische Pathologien (PAD, CAD)
- Entzündung (Darmkrankheit, chronische Krankheit, Leberzirrhose, Sepsis)
- Autoimmunerkrankung (rheumatoide Arthritis, Psoriasis)
- Arteriosklerose
- Chronische Nierenerkrankung
- Diabetische Retinopathie
- Krebs

2) INHALT DES KITS

CONTENTS	KIT KOMPONENTEN	MENGE
PLATE	Rekombinanter monoklonaler anti-humaner Angiopoietin-2 Antikörper beschichtet auf Mikrotiterplattenstreifen im Streifenhalter. Verpackt im Aluminium Beutel mit Trockenmittel.	12 x 8 Tests
WASHBUF	Waschpuffer, 20-fach Konzentrat, durchsichtiger Schraubverschluss	1 x 50 ml
ASYBUF	Assaypuffer, roter Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
STD	Standards (0; 12,5; 25; 50; 100; 200, 400 pmol/l), rekombinantes humanes Angiopoietin-2, weiße Schraubverschlüsse, lyophilisiert	7 Fläschchen
CTRL	Kontrollen A und B, gelbe Schraubverschlüsse, lyophilisiert (genaue Konzentrationen siehe Etiketten)	2 Fläschchen
AB	Polyklonaler Ziegen-Anti-human Angiopoietin-2 Antikörper, biotinyliert, grüner Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 7 ml
CONJ	Konjugat (Streptavidin-HRP), brauner Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 13 ml
SUB	Substrat (TMB Lösung), blauer Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 13 ml
STOP	Stopp Lösung, weißer Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 7 ml

3) ZUSÄTZLICHES MATERIAL IM KIT

- 2 selbstklebende Abdeckfolien
- QC Protokoll
- Protokoll Blatt
- Arbeitsanleitung (Beipacktext)

4) ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL UND GERÄTE

- Kalibrierte Präzisionspipetten für 20 µl, 50 µl, 100 µl, 1000 µl inkl. Pipettenspitzen
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Mikrotiterplatten Wascher wird empfohlen, Alternativen: Mehrkanalpipetten oder Dispenser
- Kühlschrank mit 4°C (2-8°C)
- Mikrotiterplattenphotometer mit 450 nm Filter (630 nm Referenz)
- EP-Röhrchen für die Probenverdünnung
- Millimeterpapier oder Software

5) REAGENZEN UND PROBENVORBEREITUNG

Alle Reagenzien des Kits sind bei 4°C (2-8°C) bis zum Ablaufdatum (siehe Etikett des Reagenz) haltbar.

Probenvorbereitung:

Abnahme von venösem Blut mittels standardisierter Blutabnahmeröhrchen zur Gewinnung von Plasma oder Serum. Durchführung der Zentrifugation des Blutes laut Herstellerangaben der Probenentnahmebehälter, so schnell wie möglich. Das gewonnene Plasma oder Serum sollte sofort gemessen oder für Langzeitlagerung aliquotiert und bei -25°C oder tiefer gelagert werden. Bis zu vier Frier/Tau-Zyklen verändern die Messwerte nicht. Lipämische und hämolytische Proben können falsche Ergebnisse liefern. Proben vor Verwendung gut mischen. Wir empfehlen Doppelbestimmung für alle Werte.

Proben müssen 1+10 mit ASYBUF (Assaypuffer) verdünnt werden, z.B. 20 µl Probe + 200 µl ASYBUF.

Proben mit Werten höher als STD7 (Standard 7, 400 pmol/l) können mit ASYBUF (Assaypuffer) weiter verdünnt und erneut getestet werden.

Nähere Informationen zur Probenstabilität finden Sie auf unserer Website unter www.bmgrp.com (siehe Validation Data) oder kontaktieren Sie unseren Kundenservice per Email an info@bmgrp.com oder telefonisch unter +43/ 1/ 29107-45.

Rekonstitution/Handhabung:

WASHBUF (Waschpuffer): Das mitgelieferte Konzentrat wird 1:20 verdünnt (z.B. 50 ml WASHBUF + 950 ml destilliertes Wasser). Kristalle im Pufferkonzentrat lösen sich bei Raumtemperatur auf. Das Konzentrat ist bei 4°C (2-8°C) bis zum Ablaufdatum haltbar. Der verdünnte Puffer ist bei 4°C (2-8°C) bis zu einem Monat haltbar. Im Testsystem darf nur verdünnter WASHBUF (Waschpuffer) verwendet werden.

STD (Standards) und CTRL (Kontrollen): Lösen Sie das Lyophilisat in jeweils 200 µl destilliertem oder deionisiertem Wasser bei Raumtemperatur (18-26°C) für 15 min. Gut mischen. Die genaue Konzentration ist am Etikett vermerkt. Rekonstituierte STDs und CTRLs können bei -25°C oder tiefer bis zum Ablaufdatum gelagert werden. STD und CTRL sind für vier Frier/Tau-Zyklen stabil.

STD/CTRL müssen 1+10 mit ASYBUF (Assaypuffer) verdünnt werden, z.B. 20 µl STD/CTRL + 200 µl ASYBUF.

6) TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der Methode eines Sandwich ELISA und dient zur quantitativen Bestimmung von Angiopoietin-2 (ANG2) in humanen Blutproben. Standards, Kontrollen und Proben müssen vor Testansatz 1+10 verdünnt werden.

Zuerst werden Standard/Kontrolle/Probe und biotinylierter Detektionsantikörper (goat polyclonal anti-human-ANG2) in die entsprechenden Vertiefungen, welche mit einem rekombinanten monoklonalen anti-human ANG2-Antikörper beschichtet sind, pipettiert. Das in den Standard/Kontrolle/Probe vorhandene ANG2 bildet mit beiden Antikörpern einen stabilen Komplex. Durch Waschen werden die unspezifischen und nicht gebundenen Anteile entfernt. In einem zweiten Schritt wird Konjugat (Streptavidin-HRP) pipettiert, das mit dem biotinylierten Detektionsantikörper reagiert. Nach einem Waschschrift wird Substrat (TMB, Tetramethylbenzidin) in die Vertiefungen pipettiert. Die dadurch enzymatisch bedingte Farbentwicklung ist direkt proportional mit der ANG2 Konzentration in den Proben und kann mittels eines Mikrotiterplattenphotometer gemessen werden. Aus der jeweiligen Absorption und den Konzentrationen der STD wird eine Kalibrationskurve erstellt, von der die ANG2 Konzentration der Proben direkt ablesbar ist.

Schema siehe Kapitel 6) *PRINCIPLE OF THE ASSAY* im englischen Teil des Beipacktextes.

7) TESTPROTOKOLL

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen. Markieren Sie die Positionen für STD/CTRL/PROBE (Standard/Kontrolle/Probe) am Protokoll Blatt. Nehmen Sie die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Aluminium Beutel. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können mit Trockenmittel im Aluminium Beutel auf 4°C (2-8°C) bis zum angegebenen Ablaufdatum gelagert werden.

- 1) Pipettieren Sie 50 µl **1+10 verdünnte** STD/CTRL/PROBE (Standard/Kontrolle/Probe) in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen.
Für die 1+10 Verdünnung siehe Kapitel 5) Reagenzien und Probenvorbereitung.
- 2) Pipettieren Sie 50 µl AB (biotinylierter Antikörper, grüner Schraubverschluss) in alle Wells, gut mischen.
- 3) **Streifen abdecken und 2 Stunden bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren.**
- 4) Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
- 5) Pipettieren Sie 100 µl CONJ (Konjugat, brauner Schraubverschluss) in alle Wells, gut mischen.
- 6) **Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren.**
- 7) Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
- 8) Pipettieren Sie 100 µl SUB (Substrat, blauer Schraubverschluss) in alle Wells, gut mischen.
- 9) **Für 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren.**
- 10) Pipettieren Sie 50 µl STOP (Stopplösung, weißer Schraubverschluss) in alle Wells, gut mischen.
- 11) Absorption unmittelbar bei 450 nm messen, mit 630 nm als Referenz, falls möglich.

8) BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Messen Sie die Absorption (optische Dichte; OD) von allen Wells mit einem Mikrotiterplattenphotometer mit einem 450 nm Filter (Referenz 630 nm). Konstruieren Sie eine Standardkurve aus den OD Werten der STDs unter Verwendung von kommerziell erhältlichem Millimeterpapier oder einer geeigneten Software. Das Testsystem wurde mittels eines 4 Parameter Algorithmus evaluiert. Andere Auswertungsalgorithmen müssen vom Verwender evaluiert werden. Die Konzentration der Proben wird aus der Standardkurve abgelesen. Die Einheit pmol/l kann mit einem Umrechnungsfaktor in pg/ml umgerechnet werden (1 pg/ml = 0,018 pmol/l; Angiotensin-2 MW: 54,9 kDa). Eventuelle Verdünnungen müssen berücksichtigt werden.

Typische STD-Kurve:

Siehe Kapitel 8) *CALCULATION OF RESULTS* im englischen Teil des Beipacktextes.

In dem beige packten QC Protokoll sind die Resultate der QC Freigabe der entsprechenden Kit Lot vermerkt. Vom Verwender erhaltene Daten der OD können abweichend sein, bedingt durch verschiedene Einflüsse und/oder dem normalen Signalverlust des Kits während der Laufzeit. Dieser mögliche Signalverlust hat keinen Einfluss auf die Gültigkeit der Resultate, so lange die OD von STD7 den Wert 1,50 oder höher erreicht und die Werte der CTRL im gültigen Bereich sind (Bereiche siehe Etiketten).

9) TESTMERKMALE

Methode:	Sandwich ELISA, HRP/TMB, 12x8-well Streifen
Probentyp:	Serum, EDTA Plasma, Citrat Plasma, Heparin Plasma
Probenvolumen:	20 µl / Probe
Inkubationszeiten:	2 h / 1 h / 30 min
Sensitivität	LOD: 3.7 pmol/l (=203 pg/ml); LLOQ: 6.3 pmol/l (=346 pg/ml)

Standardbereich:	0 – 400 pmol/l (0 / 12,5 / 25 / 50 / 100 / 200 / 400)		
Umrechnungsfaktor	1 pg/ml = 0,018 pmol/l; MW: 54,9 kDa		
Präzision:		n	VK (%)
	Within-run	3	≤8
	In-between-run	9	≤6
Wiederfindung nach Spike mit rekombinatem ANG2		n	Wiederfindung (%)
			+36 pmol/l +180 pmol/l
	Serum	6	81 93
	Citrat Plasma	1	100 95
		n	+40 pmol/l +200 pmol/l
	EDTA Plasma	6	85 78
	Heparin Plasma	1	89 79
Verdünnungslinearität endogenes intaktes Angiopoietin-2		n	Wiederfindung nach Verdünnung (%)
			1+1 1+3
	Serum	6	105 105
	EDTA Plasma	6	110 122
	Heparin Plasma	1	107 109
	Citrat Plasma	1	104 115
Spezifität*	Endogenes und rekombinantes, humanes Angiopoietin-2.		
Verwendungszweck:	Research use only.		
Werte von anscheinend gesunden Spendern:		n	Median Angiopoietin-2 (pmol/l)
	Serum	11	28
	EDTA Plasma	11	24
	Citrat Plasma	11	23
	Heparin Plasma	11	25

*: aufgrund von Epitop Mapping und Sequenzanalyse werden alle 3 Isoformen von Angiopoietin-2 in diesem ELISA detektiert. Keine Kreuzreaktivität mit Angiopoietin-1.

Nähere Informationen zu den Testmerkmalen finden Sie auf unserer Website unter www.bmgrp.com (siehe Validation Data) oder kontaktieren Sie unseren Kundenservice per Email an info@bmgrp.com oder telefonisch unter +43/ 1/ 29107-45.

10) PRÄZISION

Within-run (Intra-assay): 2 Proben bekannter Konzentration wurden 3fach von 1 Operator getestet.

In-between-run (Inter-assay): 2 Proben bekannter Konzentration wurden 9fach von 2 Operatoren in 2 Kit Lots getestet.

Intra-assay (n=3)	Probe 1	Probe 2	Inter-assay (n=9)	Probe 1	Probe 2
Durchschnitt (pmol/l)	25	201	Durchschnitt (pmol/l)	26	201
SD (pmol/l)	2,1	3,0	SD (pmol/l)	1,6	5,1
VK (%)	8	1	VK (%)	6	3

11) TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien von verschiedenen Lots oder Tests dürfen nicht gemischt werden.
- Stöpsel und Verschlüsse von verschiedenen Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Abgelaufene Reagenzien dürfen nicht verwendet werden.
- Reagenzien sind vor direktem Sonnenlicht zu schützen.
- Substratlösung muss vor Verwendung farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen bei den Inkubationen mit Abdeckfolie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.

12) VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Bestandteile humanen Ursprunges wurden auf HIV-Ak, HCV-Ak und HBsAg getestet und negativ gefunden. Trotzdem sollten die Reagenzien als potentiell infektiös behandelt werden.

Alle flüssigen Reagenzien enthalten $\leq 0,01\%$ Proclin 950 als Konservierungsmittel. Vermeiden Sie Kontakt mit Augen, Haut und Schleimhaut. Proclin 950 ist in der verwendeten Konzentration nicht toxisch. Allergische Reaktionen sind möglich.

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Nicht Rauchen, Essen, Trinken oder Kosmetika benutzen während der Verwendung der Testreagenzien.
- Verwenden Sie Handschuhe, Schutzbrillen und Laborkleidung während der Testdurchführung.
- Schwefelsäure reizt Augen und Haut. Bei Berührung gründlich mit Wasser spülen.

13) LITERATUR

Siehe Kapitel 13) *LITERATURE* im englischen Teil des Beipacktextes.

Notes/Notizen:

SYMBOLS



Expiry date / Verfallsdatum / Date de péremption / Data di scadenza / Fecha de caducidad / Data de validade / Uiterste gebruiksdatum / Udløbsdato / Utgångsdatum / Termin Ważności / Lejárati idő / Doba expirácie / Doba expirace



Consider instructions for use / Bitte Gebrauchsanweisung beachten / Consultez la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las instrucciones de utilización / Consulte as instruções de utilização / Raadpleeg de gebruiksaanwijzing / Se brugsanvisningen / Läs anvisningarna före användning / Proszę przeczytać instrukcję wykonania / Vegyük figyelembe a használati utasításban foglaltakat / Postupujte podľa pokynov na použitie / Postupujte dle návodu k použití



Lot-Batch Number / Charge-Chargennummer / Lot-Code du lot / Lotto-Numero di lotto / Lote-Código de lote / Lote-Código do lote / Lot-Partijnummer / Lot-Batchkode / Lot-Satskod / Numer serii / Lot-Batch szám / Číslo šarže / Číslo šarže



Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por / Vervaardigd door / Fabrikation af / Tillverkad av / Wyprodukowane pr / Gyártotta / Vyrobené / Vyrobeno



Catalogue Number / Bestellnummer / Numéro de référence / Numero di riferimento / Número de referencia / Número de referência / Referentienummer / Referencenummer / Katalognummer / Numer katalogowy / Katalógusszám / Katalógové číslo / Katalogové číslo



Store at between / Lagerung bei zwischen / Conserver à entre / Conservare a tra / Conservar a temp. entre / Armazene a entre / Bewaar bij tussen / Opbevaars mellem / Förvaras vid / Przechowywać w / Tároljuk között / Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí



Contains sufficient for x tests / Inhalt ausreichend für x Tests / Contient suffisant pour x tests / Contenuto sufficiente per x test / Contiene suficiente para x pruebas / Contém suficiente para x testes / Bevat voldoende voor x bepalingen / Indeholder tilstrækkeligt til x prøver / Innehållet räcker till x analyser / Zawartość na x testów / Tartalma X teszt elvégzésére elegendő / Obsahuje materiál pre x testov / Obsahuje materiál pro x testů

BI-ANG2 ANGIOPOIETIN-2

ASSAY PROTOCOL AND CHECKLIST

PREPARATION OF REAGENTS:

- Bring all reagents to room temperature (18-26°C).
- Prepare reagents and samples as instructed.
- Take microtiter strips out of the aluminium bag and mark positions on the protocol sheet.
- Bring unused components to the storage temperature mentioned in the package insert.

TEST PROCEDURE:

- Step 1) Pipette 50 µl **1+10 pre-diluted** STD/CTRL/SAMPLE (standard/control/sample) into respective wells.
- Step 2) Add 50 µl AB (antibody, green cap) into each well, swirl gently.
- Step 3) Cover tightly and incubate for 2 hours at room temperature (18-26°C), in the dark.**
- Step 4) Aspirate and wash wells with 300 µl WASHBUF (wash buffer, natural cap) five times. Remove remaining buffer by strongly tapping the plate against a paper towel.
- Step 5) Add 50 µl CONJ (conjugate, amber cap) into each well, swirl gently.
- Step 6) Cover tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C), in the dark.**
- Step 7) Aspirate and wash wells with 300 µl WASHBUF (wash buffer, natural cap) five times. Remove remaining buffer by strongly tapping the plate against a paper towel.
- Step 8) Add 100 µl SUB (substrate, blue cap) into each well, swirl gently.
- Step 9) Incubate for 30 minutes at room temperature (18-26°C), in the dark.**
- Step 10) Add 50 µl STOP (stop solution, white cap) into each well, swirl gently.
- Step 11) Measure absorbance immediately at 450 nm with reference 630 nm, if available.