

# **ANGIOPOIETIN-2 MOUSE/RAT**

(EN) ELISA FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF MOUSE OR RAT  
ANGIOPOIETIN-2 IN SERUM OR PLASMA  
Cat. No. BI-ANG2MR . 12 x 8 TESTS

(DE) ELISA ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON MAUS ODER RATTEN  
ANGIOPOIETIN-2 IN SERUM ODER PLASMA  
Kat. Nr. BI-ANG2MR . 12 x 8 TESTE

FOR RESEARCH USE ONLY  
NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES

rev.no. 191105

This kit was developed and manufactured by:  
Biomedica Medizinprodukte GmbH, A-1210 Wien, Divischgasse 4  
Tel. +43/1/291 07 45, Fax +43/1/291 07 6389, E-mail [info@bmgrp.com](mailto:info@bmgrp.com)



## ***CONTENT / INHALT***

<b>ENGLISH</b>	<b>Page 3</b>
<b>DEUTSCH</b>	<b>Seite 9</b>

***[www.bmgrp.com](http://www.bmgrp.com)***

## 1) INTRODUCTION

Angiopoietin-2 (ANG2) is a 56.9 kDa glycosylated growth factor that is specific for endothelial cells (ECs) <https://www.uniprot.org/uniprot/O35608>. ANG2 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. Elevated ANG2 levels have also been observed in most cardiovascular disorders, such as coronary heart disease, congestive heart failure, and peripheral arterial disease. In terms of pathological angiogenesis, ANG2 has been widely explored in tumor-induced angiogenesis. The inhibition of ANG2 decreased the tumor size and metastatic efficacy. Thus, in cancer, targeting the TIE2-Angiopoietin pathway has shown promising results in some preclinical and clinical trials, including studies on recurrent or metastatic breast and renal cell carcinomas.

Areas of interest:

- Inflammation (Bowel disease, Chron's disease, cirrhosis, sepsis)
- Autoimmune disease (rheumatoid arthritis, psoriasis)
- Cardiovascular Disease
- Chronic kidney disease
- Cancer

## 2) CONTENTS OF THE KIT

CONT	KIT COMPONENTS	QUANTITY
PLATE	Detachable microtiter strips pre-coated with recombinant monoclonal Angiopoietin-2 antibody	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 15 ml
STOCK STD	Stock standard containing 1400 pmol/l of recombinant mouse Angiopoietin-2, red cap, lyophilised	1 vial
CTRL	Control, yellow cap, lyophilised, exact concentration see label	1 vial
AB	Polyclonal Angiopoietin-2 antibody, biotinylated, green cap, ready to use	1 x 13 ml
CONJ	Streptavidin-HRPO conjugate, amber cap, ready to use	1 x 13 ml
SUB	Substrate (TMB solution), blue cap, ready to use	1 x 13 ml
STOP	STOP (Stop solution), white cap, ready to use	1 x 7 ml

## 3) ADDITIONAL MATERIAL IN THE KIT

- 3 self-adhesive plastic films
- Quality control protocol
- Protocol sheet
- Instruction for use

#### 4) MATERIAL AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Precision pipettes calibrated to deliver 5 µl, 50 µl, and 100 µl and disposable tips
- Distilled or deionised water
- Polypropylene tubes for standard curve preparation
- Plate washer is recommended for washing, alternative multichannel pipette or manifold dispenser
- Refrigerator with 4°C (2-8°C)
- ELISA reader capable of measuring absorbance at 450 nm (with correction wavelength at 630 nm)
- 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 expiry date stated on the label of each reagent. Bring all reagents to room temperature before use.

Reconstituted STOCK STD and CTRL are stable at -25°C or lower until expiry date on label. STOCK STD and CTRL can undergo at least four freeze-thaw cycles.

##### **A. Sample preparation:**

Collect venous blood samples in 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. Samples are stable for up to four freeze-thaw cycles. Lipemic or haemolyzed samples may give erroneous results.

Samples with values above STD7 (1400 pmol/l) can be diluted with ASYBUF (Assay buffer).

Serum and plasma are suitable for use in this assay. Do not change sample type during studies.

##### **B. Preparation of CTRL (control):**

Reconstitute the CTRL (control) in 100 µl distilled or deionised water. Leave at room temperature (18-26°C) for 15 min and vortex gently prior to use. The exact concentration is stated on the label.

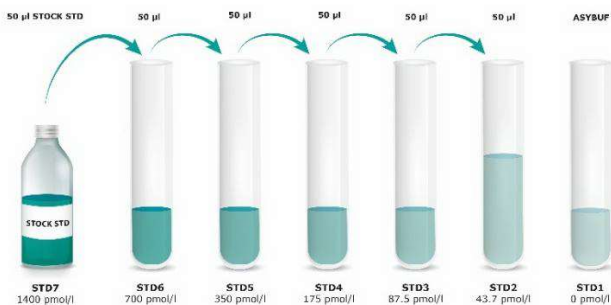
##### **C. Preparation of STOCK STD (stock standard):**

Reconstitute the mouse/rat Angiopoietin-2 STOCK STD (stock standard) in 100 µl distilled or deionised water. Leave at room temperature (18-26°C) for 15 min and vortex gently prior to use.

**D. Preparation of the standard curve:** *Always mix each tube thoroughly before the next step!*

- |  |
|--|
| 1. Use polypropylene tubes and mark them as STD6 to STD1 (Graph 1)   |
| 2. Mark STOCK STD as STD7.   |
| 3. Pipette 50 µl of ASYBUF (assay buffer) into each tube marked as STD6 to STD1.   |
| 4. Prepare a two-fold serial dilution to obtain STD6 to STD2: Pipette 50 µl of the reconstituted STOCK STD (= STD7) into the tube labelled STD6. Mix thoroughly. Continue serial dilutions for STD5, STD4, STD3, STD2. |
| 5. ASYBUF serves as the zero standard (=STD1, 0 pmol/l).   |

**Graph 1:** Preparation of STD7 to STD1



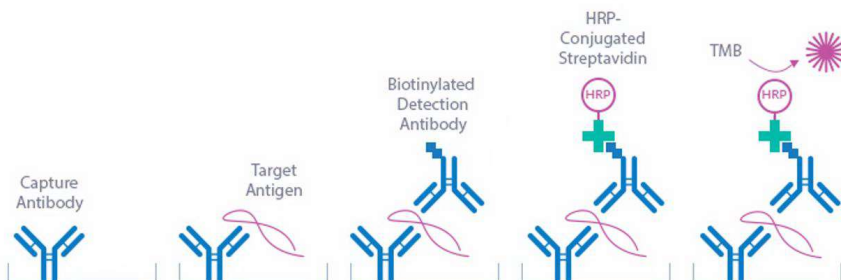
Standards diluted for sample measurement

### **Preparation of WASHBUF (wash buffer):**

Dilute the concentrate 1:20 (e.g. 50 ml WASHBUF + 950 ml distilled water). Crystals in the buffer concentrate will dissolve at room temperature (18-26°C). The undiluted WASHBUF is stable at 4°C (2-8°C) until 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.

### **6) PRINCIPLE OF THE ASSAY**

This kit is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative determination of mouse/rat Angiotensin-2 in serum and plasma samples. In a first step, STD/CTRL/Sample are pipetted into the wells of the microtiter strips, which are pre-coated with a recombinant monoclonal Angiotensin-2 antibody. Angiotensin-2 present in the sample binds to the pre-coated antibody in the well. After a first wash step, which removes non-specifically unbound material, detection antibody is added and forms a sandwich with the antigen bound on the plate. After another washing step the conjugate (streptavidin-HRP) is pipetted into the wells and reacts with the detection antibody. After another washing step, the substrate (TMB, tetramethylbenzidine) is pipetted into the wells. The enzyme catalysed color change of the substrate is directly proportional to the amount of mouse/rat Angiotensin-2 present in the sample. This color change is detectable with a standard microtiter plate ELISA reader. The concentration of Angiotensin-2 in the sample is determined directly from the dose response curve. The kit utilizes recombinant mouse Angiotensin-2 as a calibrator. Mouse, rat, bovine and human Angiotensin-2 share a high homology (>85%).



### **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 100 µl ASYBUF (assay buffer, red cap) into each well.
- 2) Add 5 µl STD/CTRL/SAMPLE in duplicates into the respective wells, swirl gently.
- 3) **Cover the plate 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). After final wash, remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel.
- 5) Add 100 µl AB (biotinylated anti-Angiotensin-2 antibody, green cap) into each well, swirl gently.
- 6) **Cover the plate tightly and incubate for 2 hours at room temperature (18-26°C) in the dark.**
- 7) Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (wash buffer). After final wash, remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel.
- 8) Add 100 µl CONJ (conjugate, amber cap) into each well, swirl gently.
- 9) **Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) in the dark.**
- 10) Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (wash buffer). After final wash, remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against a paper towel.
- 11) Add 100 µl SUB (substrate, blue cap) into each well, swirl gently.
- 12) **Incubate for 30 min at room temperature (18-26°C) in the dark.**

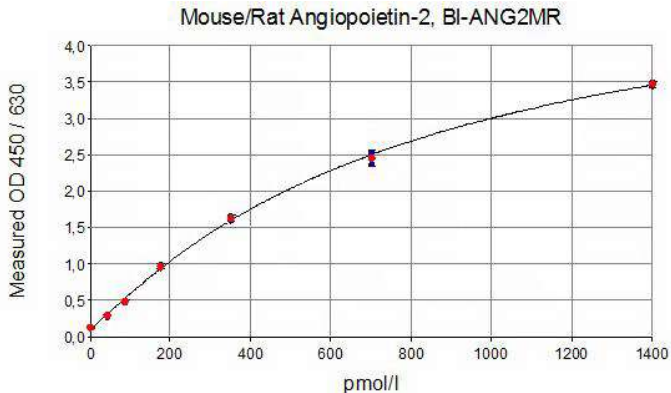
13) Add 50 µl STOP (stop solution, white cap) into each well, swirl gently.

14) 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 (reference wavelength 630 nm). Construct a standard curve from the absorbance read-outs of the standards using commercially available software capable of generating a four-parameter logistic (4-PL) fit. Alternatively, plot the standards' concentration on the x-axis against the mean absorbance for each standard on the y-axis and draw a best fit curve through the points on the graph. Curve fitting algorithms other than 4-PL have not been validated and need to be evaluated by the user. Obtain sample concentrations from the standard curve. If required, pmol/l can be converted into pg/ml by applying a conversion factor (1 pg/ml = 0.018 pmol/l; Mouse Angiopoietin-2 MW: 54.9 kDa). Respective dilution factors have to be considered when calculating the final concentration of the sample.

Example typical STD-curve:



The quality control (QC) protocol supplied with the kit shows the results of the final release QC for each kit lot. Data for OD 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 1.00 or more is obtained for the STD with the highest concentration and the value of the CTRL is in range (target range see label).

## 9) ASSAY CHARACTERISTICS

Method	Sandwich ELISA, HRP/TMB, 12x8-well detachable strips
Sample type	Mouse or rat serum, plasma
Standard range	0 – 1400 pmol/l (0 – 76,860 pg/ml)
Conversion factor	1 pg/ml = 0.018 pmol/l (MW: 54.9 kDa)
Sensitivity	LOD: 18.3 pmol/l, LLOQ: 21.9 pmol/l
Sample volume	5 µl / well
Incubation time and temp.	2 h / 2 h / 1 h / 30 min, room temperature
Specificity	Endogenous and recombinant mouse/rat Angiopoietin-2.
Precision	Within-run (n=5) ≤ 4%, In-between-run (n=4) ≤ 9%

Accuracy	Average % recovery			
	Mouse (n=4)	101		
	Rat (n=3)	100		
Dilution linearity of endogenous Angiotensin II	Average % of expected dilution			
		1+1	1+3	1+7
	Mouse (n=3)	100	102	101
	Rat (n=4)	92	94	104
Median Angiotensin II values in various cohorts	n	Angiotensin II [pmol/l]		
	Mouse serum	18	105	
	Mouse plasma	7	127	
	Rat serum (clinical cohort)	8	292	
	Rat plasma	11	127	

For further information on assay and sample characteristics please visit our website [www.bmgrp.com](http://www.bmgrp.com) or contact our customer service by e-mail [info@bmgrp.com](mailto:info@bmgrp.com) or by phone +43/ 1/ 29107-45.

### 10) PRECISION

Within-run (intra-assay): 2 samples of known concentrations were tested 5 times within 1 kit lot by 1 operator.

In-between-run (inter-assay): 2 samples of known concentrations were tested 4 times within 2 kit lots by 2 different operators.

Intra-assay (n= 5)	Sample 1	Sample 2	Inter-assay (n= 4)	Sample 1	Sample 2
Mean (pmol/l)	77	120	Mean (pmol/l)	144	182
SD (pmol/l)	3.0	2.2	SD (pmol/l)	4.5	16.6
CV (%)	4	2	CV (%)	3	9

Detailed information on the Angiotensin II Mouse/Rat ELISA, e.g. assay performance characteristics is available on our website [www.bmgrp.com](http://www.bmgrp.com).

### 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 colourless 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 liquid reagents contain  $\leq 0.1\%$  Proclin 950 as preservative. Avoid contact with skin and mucous membrane. 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) LITERATUR

1. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiotensin–Tie system. Augustin HG et al., *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009; 10(3):165–77.
2. Angiotensin-2: a multifaceted cytokine that functions in both angiogenesis and inflammation. Scholz A et al., *Ann N Y Acad Sci*, 2015; 1347(1):45–51.
3. Circulating angiotensin-2 and its soluble receptor Tie-2 concentrations are related to inflammatory markers in the general population. Schuld EA et al., *Cytokine*, 2018; 105:1-7.
4. Angiotensin-2 serum levels correlate with severity, early onset and cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. López-Mejías R et al., *Clin Exp Rheumatol*, 2013; 31(5):761-6.
5. Serum angiotensin-2 level as a potential biomarker in psoriasis vulgaris. Takahashi T et al., *J Dermatol* 2017; 44(2):205-206.
6. Angiotensin-2-driven vascular remodeling in airway inflammation. Tabruyn SP et al., *Am J Pathol*, 2010; 177(6):3233-43.
7. Circulating angiotensin-2 levels increase with progress of chronic kidney disease. David S et al., *Nephrol Dial Transplant*, 2010; 25:2571-2579.
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. 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
10. Biomarker Profiling in Stage 5 Chronic Kidney Disease Identifies the Relationship between Angiotensin-2 and Atrial Fibrillation. Bontekoe J et al., *Clin Appl Thromb Hemost*, 2018; doi: 10.1177/1076029618808909. [Epub ahead of print].
11. Angiotensin-2, Angiotensin-1 and subclinical cardiovascular disease in Chronic Kidney Disease. Tsai YC et al., *Scientific Reports*, 2016; 6:39400.
12. Angiotensin-2, its soluble receptor Tie-2 and subclinical cardiovascular disease in a population-based sample. Lorbeer R et al., *Heart* 2015; 101(3):178-84.
13. Angiotensin-1 and Angiotensin-2 Inhibitors: Clinical Developments. Gillen J et al., *Current Oncology Reports*, 2019; 21:22.
14. Multiple effects of angiotensin-2 blockade on tumors. Lewis CE and Ferrara N, *Cancer Cell* 2011, 12;19(4):431-3.
15. Inhibition of VEGF and Angiotensin-2 to Reduce Brain Metastases of Breast Cancer Burden. Bohn KA et al., *Front Pharmacol*, 2017; 11;8:193.



## 1) EINLEITUNG

Angiopoietin-2 (ANG2) ist ein für Endothelzellen (ECs) spezifischer glykosylierter Wachstumsfaktor von 56,9 kDa. Angiopoetin-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-Rezeptorsignalisierungssystem 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. Erhöhte ANG2-Spiegel wurden auch bei den meisten Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie z. B. koronarer Herzkrankheit, Herzinsuffizienz und peripherer arterieller Erkrankung beobachtet. Bei Krebspatienten hat das „targeting“ des TIE2-Angiopoietin-Signalwegs in einigen klinischen präklinischen und klinischen Studien, einschließlich Studien zu rezidivierenden oder metastasierten Brust- und Nierenzellkarzinomen, vielversprechende Ergebnisse gezeigt.

Interessengebiete:

- Entzündung (Darmkrankheit, chronische Krankheit, Leberzirrhose, Sepsis)
- Autoimmunerkrankung (rheumatoide Arthritis, Psoriasis)
- Kardiovaskuläre Erkrankungen
- Chronische Nierenerkrankungen
- Krebs

## 2) INHALT DES KITS

CONTENTS	KIT KOMPONENTEN	MENGE
PLATE	Rekombinanter monoklonaler anti-Angiopoietin-2 Antikörper beschichtet auf Mikrotiterplattenstreifen im Streifenhalter. Verpackt im Aluminiumbeutel mit Trockenmittel.	12 x 8 Tests
WASHBUF	Waschpuffer, 20fach Konzentrat, durchsichtiger Schraubverschluss	1 x 50 ml
ASYBUF	Assay Puffer, roter Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
STOCK STD	STOCK Standard (1400 pmol/l), rekombinantes Maus Angiopoietin-2, roter Schraubverschluss, lyophilisiert	1 Fläschchen
CTRL	Kontrolle, gelber Schraubverschluss, lyophilisiert (genaue Konzentration siehe Etikett)	1 Fläschchen
AB	Polyklonaler Ziege anti-Angiopoietin-2 Antikörper, biotinyliert, grüner Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 13 ml
CONJ	Konjugat (Streptavidin-HRPO), 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

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

#### 4) ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL UND GERÄTE

- Kalibrierte Präzisionspipetten für 5 µl, 50 µl, 100 µl, inkl. Pipettenspitzen
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Polypropylen Röhrchen für Herstellung der Standardkurve
- Mikrotiterplatten Wascher wird empfohlen, Alternativen: Mehrkanalpipetten oder Dispenser
- Kühlschrank mit 4°C (2-8°C)
- Mikrotiterplattenphotometer mit 450 nm Filter (630 nm Referenz)
- Millimeterpapier oder Software

#### 5) REAGENZIEN UND PROBENVORBEREITUNG

Alle Reagenzien des Kits sind vor Verwendung bei 4°C (2-8°C) bis zum Ablaufdatum (siehe Etikett des Reagenz) haltbar. Bringen Sie alle Reagenzien vor Verwendung im Test auf Raumtemperatur (18-26°C). Rekonstituierter STOCK STD und CTRL sind bei -25°C oder tiefer bis zum Ablaufdatum haltbar. Rekonstituierter STOCK STD und CTRL sind für 4 Frier/Tau-Zyklen stabil.

##### **A. Probenvorbereitung:**

Abnahme von venösem Blut mittels standardisierter Blutabnahmeröhrchen zur Gewinnung von Serum oder Plasma. Durchführung der Zentrifugation des Blutes laut Herstellerangaben der Probenentnahmebehälter, so schnell wie möglich. Das gewonnene Serum oder Plasma soll so schnell wie möglich gemessen werden. Für Langzeit Lagerung sollen die Proben aliquotiert und bei -25°C oder tiefer gelagert werden. Bis zu 4 Frier/Tau-Zyklen verändern die Messwerte nicht. Aufgetaute Proben so bald wie möglich abarbeiten. Lipämische und hämolytische Proben können falsche Ergebnisse liefern. Proben vor Verwendung gut mischen. Wir empfehlen Doppelbestimmung für alle Werte.

Proben mit Werten höher als STD7 (Standard 7, 1400 pmol/l) können mit ASYBUF (Assaypuffer) verdünnt und erneut getestet werden.

Serum- und Plasmaproben sind für diesen Test geeignet. Innerhalb einer Studie sollte der Probentyp nicht geändert werden.

##### **B. Vorbereitung der CTRL (Kontrolle):**

Lösen Sie das Lyophilisat des Fläschchen CTRL (Kontrolle) in 100 µl destilliertem Wasser und lassen Sie es bei Raumtemperatur (18-26°C) für 15 min stehen. Die genaue Konzentration ist am Etikett vermerkt. Vor Verwendung gut mischen.

##### **C. Vorbereitung des STOCK STD (Stock Standard):**

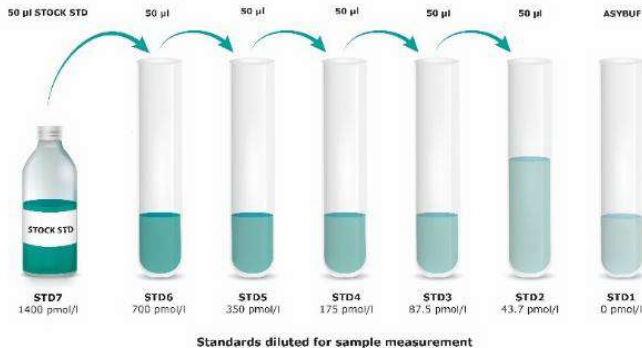
Lösen Sie das Lyophilisat des Fläschchen STOCK STD (Stock Standard) in 100 µl destilliertem Wasser und lassen Sie es bei Raumtemperatur (18-26°C) für 15 min stehen. Vor den weiteren Verdünnungen gut mischen.

##### **D. Vorbereitung der Standardkurve:**

- |    |  |
|----|--|
| 1. | Verwenden Sie Röhrchen aus Polypropylen und beschriften Sie diese mit STD6 bis STD1 (Graph 1).   |
| 2. | Markieren Sie den STOCK STD als STD7.  |
| 3. | Pipettieren Sie je 50 µl ASYBUF (Assay Puffer) in die Röhrchen STD6 bis STD1.  |
| 4. | Stellen Sie eine Verdünnungsreihe mit einer 2-fach Verdünnung her (s. Graphik 1) um STD6 -STD2 zu erhalten: Pipettieren Sie 50 µl des rekonstituierten STOCK STD (=STD7) in das Röhrchen, welches als STD6 beschriftet ist. Gut mischen. Danach führen Sie die weiteren Verdünnungen für STD5, STD4, STD3 und STD 2 durch. |
| 5. | ASYBUF (Assay Puffer) dient als 0-Standard (=STD1, 0 pmol/l).  |

*Mischen Sie jedes Röhrchen gründlich vor dem nächsten Schritt!*

**Graphik 1: Vorbereitung der Standardkurve**



**5. Vorbereitung des WASHBUF (Waschpuffer):**

Das mitgelieferte Konzentrat 1:20 verdünnen, zB. 50 ml WASHBUF + 950 ml destilliertes Wasser. Kristalle im Pufferkonzentrat lösen sich bei Raumtemperatur (18-26°C) auf. Das Konzentrat ist bei 4°C (2-8°C) bis zum Ablaufdatum haltbar. Der verdünnte Waschpuffer ist bei 4°C (2-8°C) bis zu einem Monat haltbar. Im Testsystem darf nur verdünnter WASHBUF (Waschpuffer) verwendet werden.

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

**6) TESTPRINZIP**

Der Test basiert auf der Methode eines Sandwich ELISA und dient zur quantitativen Bestimmung von Angiopoietin-2 in Maus bzw Ratten Serum- oder Plasmaproben. Der Kit verwendet rekombinantes Maus-Angiopoietin-2 als Kalibrator. Maus, Ratte, Rind und humanes Angiopoietin-2 weisen eine hohe Homologie auf (> 85%).

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 100 µl ASYBUF (Assay Puffer, roter Schraubverschluss) in alle Wells.
- 2) Pipettieren Sie 5 µl STD/CTRL/PROBE in Doppelbestimmung in die 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 AB (biotinylierter anti-Angiopoietin-2 Antikörper, grüner Schraubverschluss) in alle Wells, gut mischen.
- 6) **Streifen abdecken und 2 Stunden 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 CONJ (Konjugat, brauner Schraubverschluss) in alle Wells, gut mischen.

9) Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren.
10) 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.
11) Pipettieren Sie 100 µl SUB (Substrat, blauer Schraubverschluss) in alle Wells, gut mischen
<b>12) 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren.</b>
13) Pipettieren Sie 50 µl STOP (Stopplösung, weißer Schraubverschluss) in alle Wells, gut mischen.
14) Extinktion unmittelbar bei 450 nm messen, mit 630 nm als Referenz, falls möglich.

## 8) BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Messen Sie die 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 STD unter Verwendung von kommerziell erhältlichem Millimeterpapier oder einer geeigneten Software. Das Testsystem wurde mittels Logit-Log sowie einem 4 Parameter Algorithmus evaluiert. Andere Auswerte Algorithmen müssen vom Verwender evaluiert werden. Die Einheit pmol/l kann mit einem Umrechnungsfaktor in pg/ml umgerechnet werden (1 pg/ml = 0,018 pmol/l; Maus Angiopoietin-2 MW: 54,9 kDa).

### 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 1,00 oder höher erreicht und der Wert der CTRL im gültigen Bereich ist (Bereich siehe Etikett).

## 9) TESTMERKMALE

<b>Methode</b>	Sandwich ELISA, HRP/TMB, 12x8-well strips			
<b>Probentyp</b>	Maus oder Ratten Serum, Plasma			
<b>Standardbereich</b>	0 – 1400 pmol/l (0 – 76.860 pg/ml)			
<b>Umrechnungsfaktor pmol/l zu pg/ml</b>	1 pg/ml = 0,018 pmol/l (MW: 54,9 kDa)			
<b>Sensitivität</b>	LOD: 18,3 pmol/l, LLOQ: 21,9 pmol/l			
<b>Probenvolumen:</b>	5 µl / Well			
<b>Inkubationszeiten und Temperatur:</b>	2 h / 2 h / 1 h / 30 min, Raumtemperatur			
<b>Spezifität:</b>	Dieser Test detektiert rekombinantes und endogenes Maus und Ratten Angiopoietin-2.			
<b>Präzision:</b>	Intra-assay (n=5) ≤ 4%, Inter-assay (n=4) ≤ 9%			
<b>Wiederfindung:</b>	<b>Durchschnitt % Wiederfindung</b>			
	<b>Maus (n=4)</b>	101		
	<b>Ratte (n=3)</b>	100		
<b>Verdünnungslinearität von endogenem Angiopoietin-2</b>	<b>Durchschnitt % erwarteter VD</b>			
		<b>1+1</b>	<b>1+3</b>	<b>1+7</b>
	<b>Maus (n=3)</b>	100	102	101
	<b>Ratte (n=4)</b>	92	94	104
<b>Median Angiopoietin-2 Messwerte in verschiedenen Kohorten</b>		<b>n</b>	<b>Median Angiopoietin-2 [pmol/l]</b>	
	<b>Maus Serum</b>	18	105	
	<b>Maus Plasma</b>	7	127	
	<b>Ratten Serum (klinische Kohorte)</b>	8	292	
	<b>Ratten Plasma</b>	11	127	

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

### 10) PRÄZISION

Intra-assay: 2 Proben bekannter Konzentration wurden 5mal in 1 Test von 1 Operator getestet.

Inter-assay: 2 Proben bekannter Konzentration wurden 4mal in 2 Tests von 2 verschiedenen Operatoren getestet.

Intra-assay (n= 5)	Probe 1	Probe 2
Durchschnitt (pmol/l)	77	120
SD (pmol/l)	3,0	2,2
VK (%)	4	2

Inter-assay (n= 4)	Probe 1	Probe 2
Durchschnitt (pmol/l)	144	182
SD (pmol/l)	4,5	16,6
VK (%)	3	9

Detaillierte Informationen zum Angiotensin-2 Mouse/Rat ELISA, z.B. Testmerkmale finden Sie auf unserer Homepage [www.bmgrp.com](http://www.bmgrp.com).

### 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 flüssigen Reagenzien enthalten 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 / Opbevares 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-ANG2MR ANGIOPOIETIN-2 MOUSE/RAT** 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 100 µl ASYBUF (assay buffer, red cap) into each well.
- Step 2) Add 5 µl STD/CTRL/SAMPLE in duplicates into the respective wells, swirl gently.
- Step 3) Cover the plate tightly and incubate for 2 hours at room temperature (18-26°C) in the dark.**
- Step 4) Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (wash buffer). After the final wash, remove the remaining WASHBUF by strongly tapping plate against a paper towel.
- Step 5) Add 100 µl AB (biotinylated anti-Angiopietin-2 antibody, green cap) into each well, swirl gently.
- Step 6) Cover the plate tightly and incubate for 2 hours at room temperature (18-26°C) in the dark.**
- Step 7) Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (wash buffer). After the final wash, remove the remaining WASHBUF by strongly tapping plate against a paper towel.
- Step 8) Add 100 µl CONJ (conjugate, amber cap) into each well, swirl gently.
- Step 9) Cover tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) in the dark.**
- Step 10) Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (wash buffer). After the final wash, remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against a paper towel.
- Step 11) Add 100 µl SUB (substrate, blue cap) into each well, swirl gently.
- Step 12) Incubate for 30 min at room temperature (18-26°C) in the dark.**
- Step 13) Add 50 µl STOP (stop solution, white cap) into each well, swirl gently.
- Step 14) Measure absorbance immediately at 450 nm with reference 630 nm, if available.