

Arbeitsanleitung/Manual

# Relaxin ELISA KIT

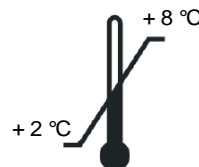
*Zur in vitro Bestimmung von Relaxin in Serum, Plasma, Urin,  
Zellkulturüberständen und Gewebe*

*For the in vitro determination of Relaxin in serum, plasma, urine,  
cell culture supernatant and tissue*

Gültig ab / Valid from 30.11.2007



K 9210



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim  
Tel.: ++49 6251 70190-0  
Fax: ++ 49 6251 849430  
e.mail: [Info@immundiagnostik.com](mailto:Info@immundiagnostik.com)  
[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

## Inhalt / Content

1. Deutsch
2. English

Weitere Informationen zu unseren Produkten finden Sie auf unserer  
Homepage

Additional information about our products is available on our homepage

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) ist für die quantitative Bestimmung von Relaxin in Serum, Plasma, Urin, Zellkulturüberständen und Gewebe geeignet. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

## 2. EINLEITUNG

Relaxin ist ein Peptidhormon der Insulinfamilie mit einem Molekulargewicht von 6500 Da. Seine Hauptfunktion ist die relaxierende Wirkung auf die glatte Muskulatur. Wegen der stark erhöhten Konzentration des Relaxins während der Ovulation und Schwangerschaft liegen die meisten Erkenntnisse über die Eigenschaften von Relaxin im Bereich der Reproduktionsmedizin und Gynäkologie vor. In letzter Zeit wurden jedoch neue Wirkungen von Relaxin entdeckt. Es wurde insbesondere gezeigt, dass Relaxin: (i) die Dilatation von Blutgefäßen in Organen und Geweben, wie z.B. Uterus, Brustdrüse, Lunge und Herz, fördert; (ii) chronotropisch auf das Herz wirkt; (iii) die Stimulation vom potentesten Vasokonstriktor, Endothelin-1, bei Herzinfarkt inhibiert; (iv) die Histaminfreisetzung aus den Mastzellen hemmt und auf diese Weise die allergischen Symptome bei Asthma lindert; (v) die Plättchenaggregation und -freisetzung aus den Megakaryozyten vermindert; (vi) die Hormonsekretion der Hypophyse beeinflusst; und (vii) zur Regulation des Flüssigkeitsgleichgewichts im Körper beiträgt.

Spezifische G Protein-gekoppelte Rezeptoren für Relaxin, LGR7 und LGR8, wurden im Gehirn (Wechselwirkung mit ADH-Sekretion), Uterus und Herzen (Einfluss auf die Herzfrequenz) identifiziert. Dschietzig et al. (2004) zeigten, dass Relaxin als Glukokortikoid-Rezeptor-Agonist agiert. In weiteren Arbeiten wird der Zusammenhang zwischen Relaxin und oxidativem Stress beschrieben. Bani et al. (1997) und Nistri (2003) berichten, dass Relaxinzusatz in die Reperfusionslösung von ischämischen Rattenherzen Schutz gegen oxidative Veränderungen des Myokardgewebes bietet. Dabei wird die Produktion von Malondialdehyd (Abbauprodukt bei der Lipidoxidation) und Myeloperoxidase (Marker für die Granulozytenaktivität) deutlich vermindert. Als Folge wird eine geringere Schädigung durch Ischämie / Reperfusion am Myokardgewebe, und dadurch bedingt, auch eine geringere Mortalitätsrate beobachtet. Dass das Peptidhormon ein unabhängiger Risikofaktor zur Voraussage der Mortalität bei männlichen Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz (TNI) ist, zeigen schließlich Hoher et al. (2004) an 245 Langzeitdialysepatienten.

## Indikationen

- Untersuchungen zum Schutz bei Reperfusion/Ischämie
- Untersuchungen zur Regulation der Zirkulation und Mikrozirkulation von Körperflüssigkeiten
- Untersuchungen zur Angiogenese
- Untersuchungen zur Immunmodulation
- Untersuchungen in der Reproduktionsmedizin
- Prognosefaktor zur Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten mit Niereninsuffizienz

## 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 9210MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 9210WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	100 ml
K 9210PV	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 50 ml
K 9210A2	AB	Detektionsantikörper, Kaninchen anti- Relaxin biotinyliert, Konzentrat	50 µl
K 9210ST	STD	Standardkonzentrat, lyophilisiert (Bereich siehe Spezifikation oder Etikett)	1 vial
K 9210K	CONJ	Konjugat, Streptavidin peroxidase- markiert, Konzentrat	50 µl
K 9210TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml
K 9210AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	15 ml

#### 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

#### 5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte 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 zentrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- Der **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml aqua bidest.), 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** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Der **AB** (biotinylierter Antikörper) wird **1:1000** in **Waschpuffer** verdünnt (10 µl AB + 10 ml Waschpuffer). Der unverdünnte Antikörper ist bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Die **verdünnte Antikörperlösung kann nicht aufbewahrt werden**.

- Das **CONJ** (Konjugat, Streptavidin, Peroxidase-markiert) wird **1:1000** in **Waschpuffer** verdünnt (10 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.**
- Der lyophilisierte **STD** (Standard) ist bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Der lyophilisierte **STD** wird mit **1 ml** aqua bidest. rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. Rekonstituierter Standard kann nicht gelagert werden.

Der **STD** (Standardkonzentrat, 1000 pg/ml) wird **1:4** in **SAMPLEBUF** (Probenverdünnungspuffer) verdünnt:

200 µl STD und 600 µl **SAMPLEBUF**.

Daraus folgt eine Konzentration von 250 pg/ml (S1, Standard 1).

Die Lösungen für die Standardkurve werden aus dem S1 mit **SAMPLEBUF** (Probenverdünnungspuffer) in **1:2 Verdünnungsschritten** wie folgt hergestellt.

**S1** = 250 pg/ml

**S2** = 250 µl **S1** + 250 µl **SAMPLEBUF** = 125 pg/ml

**S3** = 250 µl **S2** + 250 µl **SAMPLEBUF** = 62 pg/ml

**S4** = 250 µl **S3** + 250 µl **SAMPLEBUF** = 31 pg/ml

**S5** = 250 µl **S4** + 250 µl **SAMPLEBUF** = 16 pg/ml

**S6** = 250 µl **S5** + 250 µl **SAMPLEBUF** = 8 pg/ml

**S7** = 250 µl **S6** + 250 µl **SAMPLEBUF** = 4 pg/ml

**Als Standard 0 pg/ml wird SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer) verwendet.**

- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 6. PROBENVORBEREITUNG

Für den Test kann Serum, Plasma, Urin, Gewebe oder Seminalplasma eingesetzt werden. Die Proben sollten bei -20°C gelagert werden.

### *Probenverdünnung*

#### **Serum/Plasma**

Serum und Plasma Proben werden mindestens **1:3** mit SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer) vorverdünnt.

Serum und Plasma Proben können Rheumafaktor und heterophile Antikörper enthalten. Diese stellen eine potenzielle Interferenz dar, welche bei Sandwich Immunoassays zu falsch positiven Ergebnissen führen können. Daher empfehlen wir eine Probenvorbehandlung der Serum und Plasma Proben 2 x mit 5% (v/v) Anti Interferenzreagenz (Immundiagnostik Artikelnummer K 9212) wie folgt:

10 µl Anti Interferenzreagenz + 200 µl Probe

1 Stunde bei 4 °C schütteln

zentrifugieren und den Überstand abnehmen (vorbehandelte Probe).

#### **Urin**

Urine werden mindestens **1:4** mit SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer) vorverdünnt.

#### **Seminalplasma**

Seminalplasma wird mindestens **1:10** mit SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer) vorverdünnt.

#### **Gewebeextrakt**

- Gewebeproben (ab 200 mg) aus dem flüssigen Stickstoff entnehmen und in dem vorgefrorenen Schüttelbehälter im Micro-Dismembrator (30 Sek./1500RPM) pulverisieren.
- Mit 1 ml Phosphatpuffer (0,14 M NaCl; 2,6 mM KCl; 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 1 % Triton-X 100; pH 7,4 homogenisieren. Nach der Ultra-Zentrifugation (1 h/100.000 x g) im Überstand die Proteinkonzentration (Pierce-BCA oder wahlweise Peterson-Lowry Protein Assay) bestimmen.
- Den Zytosol-Überstand im Assay einsetzen.

## 7. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Testprinzip*

Der Test basiert auf der "Sandwich"-ELISA Technik. Es werden zwei ausgewählte polyklonale Antikörper, die humanes Relaxin erkennen, verwendet.

Teststandards und verdünnte Patientenproben, die auf Relaxin zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem hochaffinen polyklonalen anti-human Realaxin Antikörper beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das Relaxin von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Anschließend wird mit dem Detektionsantikörper (biotinylierter, polyklonaler anti-Relaxin Antikörper) inkubiert. Dann wird das Konjugat (Streptavidin, peroxidase-markiert) zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper - humanes Relaxin – Detektionsantikörper - Peroxidase-Konjugat. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. 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 dem Relaxin-Gehalt direkt proportional. Parallel dazu wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

### *Hinweise*

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung abzuarbeiten.

## Pipettierschema

1.	Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen
2.	Positionen für <b>STD</b> (Standard) und <b>SAMPLE*</b> (Probe) im Protokollblatt markieren
3.	Benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden
4.	Mikrotiterstreifen <b>5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
5.	<b>100 µl STD</b> (Standard) und <b>SAMPLE</b> (Probe) in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen pipettieren. Als STD 0 pg/ml den <b>SAMPLEBUF</b> (Probenverdünnungspuffer) einsetzen
6.	Streifen abdecken und <b>über Nacht (16 -22 h) bei 4 - 8 °C inkubieren</b>
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
8.	<b>100 µl AB</b> (Detektionsantikörper, biotinyliert) in alle Vertiefungen pipettieren
9.	Streifen abdecken und <b>2 Stunden bei 4 - 8°C inkubieren</b>

10. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
11. <b>100 µl CONJ</b> (Konjugat, Streptavidin, Peroxidase-markiert) in alle Vertiefungen pipettieren
12. Streifen abdecken und <b>1 Stunde bei 4 - 8°C inkubieren</b>
13. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
14. <b>100 µl SUB</b> (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren
15. <b>20 - 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C)</b> im Dunkeln inkubieren**
16. <b>50 µl STOP</b> (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen
17. Extinktion <b>sofort</b> im Mikrotiterplattenphotometer <b>bei 450 nm</b> gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gelesen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden

Wir empfehlen eine Vorbehandlung der Plasma und Serum Proben mit dem Immundiagnostik Anti Interferenzreagenz (Artikelnummer K 9212).

\*\*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. 0.01).

### 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 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. 0.01).

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/Plasma Proben

Um die Relaxin Konzentration im **Serum/Plasma** zu berechnen, wird die ermittelte Konzentration mit **3** multipliziert.

## Urinproben

Um die Relaxin Konzentration im **Urin** zu berechnen, wird die ermittelte Konzentration mit **4** multipliziert.

## Seminalplasma

Um die Relaxin Konzentration im **Seminalplasma** zu berechnen, wird die ermittelte Konzentration mit **10** multipliziert.

## Gewebeextrakt

Die ermittelten Konzentrationen werden mit **der gewählten Verdünnung** multipliziert um die tatsächlichen Konzentrationen zu ermitteln.

## 9. EINSCHRÄNKUNGEN

**Proben** mit hohen Relaxin Konzentrationen, die außerhalb der Standardkurve liegen, werden mit SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer) stärker verdünnt und nochmals bestimmt.

## 10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von kommerziell erhältlichen Kontrollen (wenn vorhanden) für die interne Qualitätskontrolle.

Wir empfehlen die Kontrollen bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen einer oder mehrere Werte außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Werte nicht gewährleisten.

### *Erwartete Ergebnisse*

#### Normwerte

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### *Präzision und Reproduzierbarkeit*

Intra-Assay (n=20)		
Probe	Relaxin [pg/ml]	VK [%]
1	23.9	5.1
2	66.0	5.2

Inter-Assay (n=20)		
Probe	Relaxin [pg/ml]	VK [%]
1	28.0	4.9
	42.0	7.9

### *Kreuzreaktivität*

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu Insulin gefunden.

### *Sensitivität*

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als  $B_0 + 2 \text{ SD}$ . Gemessen wurde 20 mal der Standard null.

Probe	Relaxin Mittelwert [OD]	Standardabweichung (SD)	Nachweisgrenze [pg/ml]
1	0.04	0.006	0.5

### *Linearität*

Zwei Patientenproben wurden mit Probenverdünnungspuffer verdünnt und im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt.

n= 2

Probe	Verdünnung	Erwartet [pg/ml]	Gemessen [pg/ml]
A	1:5	24.7	25.2
	1:6	20.6	21.0
	1:7	17.7	18.5
B	1:5	24.4	23.1
	1:6	20.4	20.0
	1:7	17.5	17.4

## 12. VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen 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 Thimerosal. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. 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 Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt 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.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

## 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in vitro* Diagnostik verwendet werden.
- 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, zurück zu senden.

## 15. LITERATUR

1. Armbruster et al. (2001) Eur J Med Res 6:1-9
2. Armbruster et al. (2001) Proceed third Intern Conference on Relaxin & Related Peptides, 2-27 October 2000, Broome, Australia , 273-274. Netherlands, Kluwer Academic Publishers. 2-10-200
3. Bani D (1997) Gen. Pharmac. 28:13-22
4. Bani D et al. (1998) A. J. Pathology 152:1367-1375
5. Nistri S et al. (2003) FASEB J 17 (14) 2109-2111
6. Dschietzig R, Stangl K (2002) CMLS 59: 1-13 (Review)
7. Dschietzig et al. (2004) Abstract of Fourth Intern Conference on Relaxin & Related Peptides, September 5-10, Jackson Hole, USA
8. Hoher B et al. (2004) Circulation 109: 2266-2268

**Verwendete Symbole:**



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n>  
Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

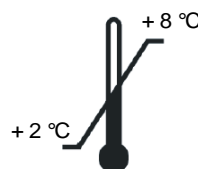
# Relaxin ELISA KIT

*For the in vitro determination of Relaxin in serum, plasma, urine,  
cell culture supernatant and tissue*

Valid from 30.11.2007



K 9210



## 1. INTENDED USE

The described Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) is intended for the quantitative determination of Relaxin in serum, plasma, urine, cell culture supernatant and tissue samples. It is for *in vitro* diagnostic use only.

## 2. INTRODUCTION

Relaxin is a peptide hormone with a molecular weight of 6500 Da that belongs to the insulin family. Its main function is the relaxation of smooth musculature. Because of the increased relaxin levels during ovulation and pregnancy most of the knowledge about its physiological properties is gained in the field of gynecology and reproductive sciences. Recently, novel sites of relaxin action have been recognized. In particular, it has been shown that relaxin: (i) promotes dilation of blood vessels in several organs and tissues, including the uterus, the mammary gland, the lung and the heart; (ii) has a chronotropic action on the heart; (iii) inhibits the stimulation of endothelin-1, the most potent vasoconstrictor in heart failure. (iv) inhibits the release of histamine by mast cells, thus being able to counteract experimental allergic asthma; (v) depresses aggregation of platelets and their release by megakaryocytes; (vi) influences the secretion of hormones by the pituitary gland; and (vii) contributes to the regulation of fluid balance.

Specific G protein-coupled receptors for relaxin, LGR7 and LGR8, have been found in the brain (interaction with ADH-secretion), uterus and heart (effect on the heart frequency). Dschietzig et al. (2004) report that relaxin acts as a glucocorticoid-receptor-agonist. Recent publications describe a relationship between relaxin and oxidative stress. Bani et al. (1997) and Nistri (2003) demonstrate, that relaxin added to reperfusion solutions protects myocardial tissue of ischemic rat hearts against oxidative damage. Moreover, the production of malondialdehyde (degradation product during lipid oxidation) and myeloperoxidase (marker for the activity of granulocytes) has been significantly reduced. As a result, reduced damage of the myocardial tissue during ischemia/reperfusion, and as a consequence, reduced death rates have been observed. Finally, Hocher et al. (2004) found relaxin as an independent risk factor predicting death in a survey of 245 male patients with end-stage renal disease (ESRD) on chronic hemodialysis.

## Indications

- Determination of the protection efficiency during reperfusion/ ischemia
- Regulation of blood pressure and heart frequency, microcirculation
- Studies of angiogenesis
- Studies of immunomodulation
- Examinations in the area of reproduction medicine
- Predicting factor for survival of ESRD-patients

## 3 MATERIAL SUPPLIED

Catalogue No	Content	Kit Components	Quantity
K 9210MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 9210WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	100 ml
K 9210PV	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	50 ml
K 9210A2	AB	Detection antibody, rabbit anti-Relaxin biotin labeled, concentrate	50 µl
K 9210ST	STD	Standard concentrate, lyophilized (for range see specification or label)	1 vial
K 9210K	CONJ	Conjugate, streptavidin peroxidase-labeled antibody, concentrate	50 µl
K 9210TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	15 ml
K 9210AC	STOP	ELISA stop solution, ready-to-use	15 ml

#### 4 MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000  $\mu$ l
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 nm  
(reference wave length 620 or 690 nm)

#### 5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100  $\mu$ l** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or at 37°C using a water bath before dilution. The **buffer concentrate** is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month.**
- The **AB** (biotinylated antibody) must be diluted **1:1000** in wash buffer (10  $\mu$ l AB + 10 ml wash buffer). The AB is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted antibody solution is not stable and can not be stored.**

- The CONJ (conjugate, streptavidin peroxidase-labeled) must be diluted **1:1000** in **wash buffer** (10 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 can not be stored.**
- The lyophilized **STD** (standard) and is stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label. The lyophilized **STD** must be reconstituted with **1 ml** aqua dest. Allow to dissolve for 10 minutes and then mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. Reconstituted standard is not stable and can not be stored.
- The STD (standard concentrate, 1000 pg/ml) must be diluted **1:4** with SAMPLEBUF (sample dilution buffer):

200 µl STD-concentrate + 600 µl SAMPLEBUF.

The obtained solution has a concentration of 250 pg/ml (S1, Standard 1).

The solutions for the standard curve are prepared from S1 in **1:2** dilution steps by adding SAMPLEBUF (sample dilution buffer) as follows:

**S1** = 250 pg/ml

**S2** = 250 µl **S1** + 250 µl SAMPLEBUF = 125 pg/ml

**S3** = 250 µl **S2** + 250 µl SAMPLEBUF = 62 pg/ml

**S4** = 250 µl **S3** + 250 µl SAMPLEBUF = 31 pg/ml

**S5** = 250 µl **S4** + 250 µl SAMPLEBUF = 16 pg/ml

**S6** = 250 µl **S5** + 250 µl SAMPLEBUF = 8 pg/ml

**S7** = 250 µl **S6** + 250 µl SAMPLEBUF = 4 pg/ml

**SAMPLEBUF (sample dilution buffer) is used as standard 0 pg/ml.**

- All other test reagents are ready to use. The test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8°C**.

## 6. SAMPLE PREPARATION

Serum, plasma, seminal plasma, tissue extract and cell culture supernatant are suited for this assay. The samples should be stored at -20°C until use.

### *Sample dilution*

#### **Serum/Plasma**

Serum and plasma samples must be diluted at least **1:3** with SAMPLEBUF (sample dilution buffer).

Serum and plasma samples could contain rheumatoid factor and heterophilic antibodies, which can cause false positive results in sandwich immunoassays. To reduce the potential interference from rheumatoid factor and heterophylic antibodies, the samples can be cleared by treating twice with 5% (v/v) Anti Interference Reagent (Immundiagnostik Catalog number K 9212) as follows:

10 µl anti interference reagent + 200 µl sample

shake for 1 hour at 4 °C

centrifuge and collect the supernatant (pre-cleared/pre-treated sample).

#### **Urine**

Urine samples should be diluted at **least 1:4** with SAMPLEBUF (sample dilution buffer).

#### **Seminal plasma**

Seminal plasma has to be diluted at least **1:10** with SAMPLEBUF (sample dilution buffer).

#### **Tissue extract**

- Pulverize about 200 mg of deep frozen tissue sample in a pre-frozen shaking holder of a micro-dismembrator (30 sec/1500 rpm).
- Homogenize the powder in 1 ml of phosphate buffer (0,14 M NaCl, 2,6 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 % Triton-X 100, pH 7,4 ). After ultra-centrifugation (1 h/100.000 x g), the protein concentration should be determined in the supernatant by the commercially available Pierce-BCA or Peterson-Lowry Protein Assay.
- Use the supernatant for measurement in the assay.

## 7. ASSAY PROCEDURE

### *Principle of the test*

The assay utilizes the “sandwich” technique with two selected polyclonal antibodies that bind to human Relaxin.

Assay standards and pre-diluted patient samples which are assayed for human Relaxin are added into the wells of a microplate coated with a high affine polyclonal anti-human Relaxin antibody. During the first incubation step, Relaxin is bound by the immobilized antibody. Then a detection antibody, biotin-labeled anti Relaxin, is added. Afterwards a peroxidase-conjugate is added into each microtiter well and a “sandwich” of capture antibody - human Relaxin - detection antibody- peroxidase-conjugate is formed. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as peroxidase substrate. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The color changes from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of Relaxin. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from the standard. Relaxin present in the patient samples is determined directly from this curve.

### *Procedural notes*

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Quality control guidelines should be observed.
- 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 wrong use.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

*Test procedure*

1.	Prior to use in the assay allow all reagents and samples to come to room temperature (18-26 °C) and mix well
2.	Mark the positions of <b>STD</b> (Standards) and <b>SAMPLE*</b> (Sample) on a protocol sheet
3.	Take microtiter strips out of the kit. Store unused strips covered at 2-8° C. Strips are stable until the expiry date stated on the label
4.	Wash each well <b>5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer</b> into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper
5.	Add <b>100 µl</b> of <b>STD</b> (Standards) and <b>SAMPLE</b> (Sample) in duplicate into respective well. Use SAMPLEBUF (sample dilution buffer) as STD 0 pg/ml
6.	Cover the plate tightly and <b>incubate over night (16 - 22 h) at 4 - 8 °C</b>
7.	Discard the contents of each well. Wash each well <b>5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer</b> into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper
8.	Add <b>100 µl AB</b> (detection antibody, biotinylated) into each well
9.	Cover the plate tightly and <b>incubate for 2 hours at 4 - 8 °C</b>

10. Discard the contents of each well. Wash each well <b>5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer</b> into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper
11. Add <b>100 µl CONJ</b> (conjugate, streptavidin peroxidase-labeled a) into each well
12. Cover the plate tightly and <b>incubate for 1 hour at 4 - 8 °C</b>
13. Discard the contents of each well. Wash each well <b>5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer</b> into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper
14. Add <b>100 µl of SUB</b> (substrate) into each well
15. Incubate for <b>20 - 30 minutes at room temperature (18-26°C)</b> in the dark*
16. Add <b>50 µl of STOP</b> (stop solution) into each well, mix thoroughly
17. Determine absorption <b>immediately</b> with an ELISA reader <b>at 450 nm</b> 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

\*We recommend a pretreatment of plasma and serum samples with the Immundiagnostik Anti Interference Reagent (Catalog number K 9212) prior to analysis.

\*\*The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend to observe the color change and to stop the reaction upon good differentiation.

## 8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend to use 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 calibrator has to be specified with a value smaller than 1 (e. g. 0.01).

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 for the optical density a linear ordinate and for the concentration a logarithmic abscissa. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator has to be specified with a value smaller than 1 (e. g. 0.01).

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

### Serum/plasma samples

For the calculation of the Relaxin concentration in **plasma/serum** the result has to be multiplied by **3**.

### Urine samples

For the calculation of the Relaxin concentration in **urine** samples, the result has to be multiplied by **4**.

### Seminal plasma samples

For the calculation of the Relaxin concentration in **seminal plasma** the result has to be multiplied by **10**.

### Tissue extract

To obtain the concentration of the samples multiply the estimated values by the used dilution factor.

## 9. LIMITATIONS

Samples with Relaxin levels greater than the highest standard value should be further diluted with SAMPLEBUF (sample dilution buffer) and re-assayed.

## 10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of commercial control samples for internal quality control if available.

Control samples should be analyzed 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.

### *Expected values*

#### Normal ranges

We recommend each laboratory to establish its own norm concentration range.

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Precision and reproducibility*

Intra-Assay (n=20)		
Sample	Relaxin [pg/ml]	VC [%]
1	23.9	5.1
2	66.0	5.2

Inter-Assay (n=20)		
Sample	Relaxin [pg/ml]	VC [%]
1	28.0	4.9
	42.0	7.9

### *Cross reactivity*

No cross reactivity with Insulin was observed.

### Sensitivity

The sensitivity was set as  $B_0 + 2SD$ . The zero-standard was measured 20 times.

Sample	Relaxin mean value [OD]	Standard variation (SD)	Detection limit [pg/ml]
1	0.04	0.006	0.5

### Linearity

Two patient samples were diluted with SAMPLEBUF (sample dilution buffer) and analyzed. The results are shown below:

n= 2

Sample	Dilution	Expected [pg/ml]	Measured [pg/ml]
A	1:5	24.7	25.2
	1:6	20.6	21.0
	1:7	17.7	18.5
B	1:5	24.4	23.1
	1:6	20.4	20.0
	1:7	17.5	17.4

## 12. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- The quality control guidelines should be followed.
- Human material used in the kit components was 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.
- Reagents of the kit package contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. The substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped out immediately with copious quantities of water.

## 13. TECHNICAL HINTS

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Substrate solution should remain colorless 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.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- 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 wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be lodged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

## 15. REFERENCES

1. Armbruster et al. (2001) Eur J Med Res 6:1-9
2. Armbruster et al. (2001) Proceed third Intern Conference on Relaxin & Relates Peptides, 2-27 October 2000, Broome, Australia , 273-274. Netherlands, Kluwer Academic Publishers. 2-10-200
3. Bani D (1997) Gen. Pharmac. 28:13-22
4. Bani D et al. (1998) A. J. Patholoy 152:1367-1375
5. Nistri S et al. (2003) FASEB J 17 (14) 2109-2111
6. Dschietzig R, Stangl K (2002) CMLS 59: 1-13 (Review)
7. Dschietzig et al. (2004) Abstract of Fourth Intern Conference on Relaxin & Related Peptides, September 5-10, Jackson Hole, USA
8. Hocher B et al. (2004) Circulation 109: 2266-2268

**Used symbols:**



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number