

# ***big* ENDOTHELIN**

ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF HUMAN *big* ENDOTHELIN  
IN SERUM, EDTA-PLASMA, URINE AND CELL CULTURE SUPERNATANTS.  
CAT. NO. BI-20082. 12 X 8 TESTS

ENZYMIMMUNOASSAY ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON HUMAN *big* ENDOTHELIN  
IN SERUM , EDTA-PLASMA, HARN ODER ZELLKULTURÜBERSTAND  
KAT. NR. BI-20082. 12 X 8 TESTE

rev.no. 080401 (replacing 071231)

Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, A-1210 Wien, Divischgasse 4  
Tel. +43/1/291 07 45, Fax +43/1/291 07 85, E-mail [export@bmgrp.at](mailto:export@bmgrp.at)



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

## **CONTENT / INHALT**

- 1) ENGLISH .... 3**
- 2) DEUTSCH ... 7**

*Additional Information on our products is available on our website.  
Zusätzliche Information zu unseren Produkten ist auf unserer Homepage erhältlich.*

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

## 1) INTRODUCTION

Big Endothelin-1 (Big ET), a small 38-amino-acid peptide, is the biological precursor of Endothelin (1-21), the most potent vasoconstrictor known today. Various cell types including vascular endothelial cells and non-vascular cells (eg. mesangial, kidney and epithelial cells), produce Endothelin.

Cleavage of Big ET by the Endothelin Converting Enzyme (ECE) leads to the active ET (1-21) and to the C-terminal fragment (22-38). The physiological importance of cleavage of Big ET is indicated by the reported 140-fold increase in vasoconstrictor activity upon cleavage to ET-1, although both peptides can be determined in about equimolar concentrations in plasma. It was demonstrated that the half-life of ET (1-21) in plasma is less than one minute, whereas clearance of Big ET is much slower.

### POSSIBLE INDICATIONS

- Prognostic value in heart failure and acute myocardial infarction
- renal insufficiency
- during and after graft rejection
- increased plasma levels: hypocholesterolemia
- arteriosclerosis
- pulmonary hypertension and scleroderma

## 2) CONTENTS OF THE KIT

CONT	KIT COMPONENTS	QUANTITY
PLATE	Polyclonal sheep anti Big Endothelin-1 antibody coated microtiter strips in strip holder packed in alu bag with desiccant	12 x 8 tests
WASHBUF	Wash buffer concentrate 20x, natural cap	1 x 50 ml
STD	Standards, synthetic human Big Endothelin-1 (1-38) in human plasma, lyophilised, white caps, exact concentration after reconstitution see label	5 vials lyophilised
CTRL	Control, synthetic human Big Endothelin-1 (1-38) in human plasma, lyophilised, yellow cap, exact concentration after reconstitution see label	1 vial lyophilised
CONJ	monoclonal anti Big Endothelin antibody HRP labelled, amber cap, ready to use	1 x 22 ml
SUB	Substrate (TMB solution), blue cap, ready to use	1 x 22 ml
STOP	Stop solution, white cap, ready to use	1 x 7 ml
Cell culture STOCK	Big Endothelin-1 stock, synthetic human Big Endothelin-1 (1-38), lyophilised, red cap, exact concentration after reconstitution see label	1 vial lyophilised

## 3) ADDITIONAL MATERIAL ADDED TO THE KIT

- 1 self-adhesive plastic film
- QC protocol
- Protocol sheet
- Instruction manual for use

## 4) MATERIAL AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Precision pipettes calibrated to deliver 50-1000 µl and disposable tips
- ELISA reader for absorbance at 450 nm (reference 620 nm)
- Graph paper or software for calculation of results
- Plate washer is recommended for washing
- Distilled or deionised water

## 5) REAGENTS AND SAMPLE PREPARATION

Reconstitution / Handling:

- STD (Standards, white caps) 1 to 5 reconstitute in 0.5 ml distilled water at room temperature (18-26°C) for 20 min, shake well. Reconstituted standards are stable at -20°C until expiry date stated on label. Avoid repeated freeze-thaw cycles.
- CTRL (Controls, yellow caps) reconstitute in 0.5ml distilled water at room temperature (18-26°C) for 20 min, shake well. Reconstituted control is stable at -20°C until expiry date stated on label. Avoid repeated freeze-thaw cycles.
- WASHBUF (Wash buffer) dilute the concentrate 1:20 with distilled water. (eg. 50 ml concentrate + 950 ml distilled water) Crystals in the buffer concentrate will dissolve at room temperature. Buffer is stable at 2-8°C until expiry date stated on label.
- Cell culture STOCK (Big Endothelin-1 stock, amber vial with red cap) in 2 ml of cell culture medium, at room temperature (18-26°C) for 20 min, shake well. The solution contains 10 fmol/ml Big Endothelin-1. Reconstituted standard is stable at -20°C until expiry date stated on the label. Avoid repeated freeze-thaw cycles!

Sample type:

Serum, EDTA-plasma, urine and cell culture supernatants are suitable for use in this assay. Note that Big ET levels can differ between serum and EDTA-plasma (see chapter. 9). Therefore don't change sample type during studies.

Sample collection:

Freshly collected EDTA-plasma or serum is put on ice immediately and centrifuged within one day. Samples should be stored at -20°C, for long-term storage store at -70°C.

Urine samples can be used without any pre-treatment.

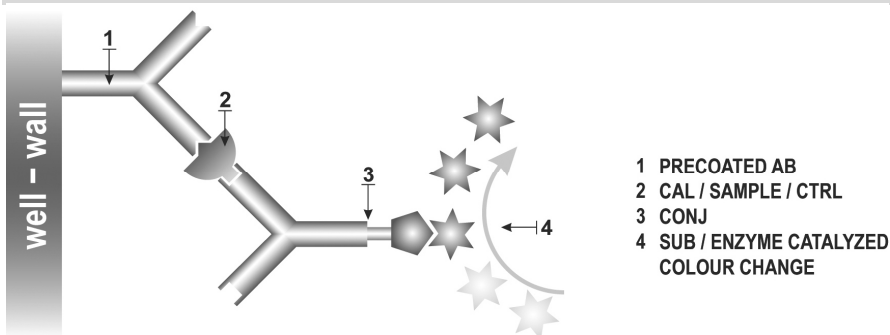
All samples should undergo only 4 freeze-thaw cycles. Lipemic or hemolyzed samples may give erroneous results. Samples should be mixed well before assaying. We recommend duplicates for all values.

For cell culture:

Do not use plasma-standards 1-5 (white caps) and control (yellow cap)!

- Prepare a serial dilution of the cell culture -STOCK (Big Endothelin-1 stock) with cell culture medium down to appr. 0.6 fmol/ml (e.g. 10/ 5 / 2.5 / 1.25 / 0.625 fmol/ml). Cell culture medium is used as a zero standard.
- Dilute cell culture supernatant according to the expected concentration with the culture medium. Dilution of supernatant is dependent on amount of Big ET secreted by the respective cell type.

## 6) PRINCIPLE OF THE ASSAY



## 7) ASSAY PROTOCOL

All reagents and samples must be at room temperature (18 - 26°C) before use in the assay.
Mark position for BLANK/STD (Standards)/SAMPLE/CTRL (Control) on the supplied protocol sheet.
Take microtiter strips out of the alu bag, take a minimum of one well as Blank. Store unused strips with desiccant at 2-8°C in the alu bag. Strips are stable until expiry date stated on the label.
Add 50 µl STD/SAMPLE/CTRL (Standard, white caps/Sample/Control, yellow cap) in duplicate into respective well, except blank.
Add 200 µl CONJ into each well, except blank, swirl gently.
<b>Cover tightly and incubate 4 hours at room temperature (18-26°C) in the dark.</b>
Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer), remove remaining WASHBUF by hitting plate against paper towel after the last wash.
Add 200 µl SUB (Substrate) into each well.
<b>Incubate for 30 minutes at room temperature (18-26°C) in the dark.</b>
Add 50 µl STOP (Stop solution) into each well, shake well.
Measure absorbance immediately at 450 nm with reference 620 nm, if available.

## 8) CALCULATION OF RESULTS

Subtract the blank extinction from all other values. Construct the standard curve from the standard values. Use commercially available software or graph paper. Obtain sample concentration from this calibration curve. The assay has been evaluated using a 4PL algorithm. Different curve fitting methods need to be evaluated by the user. Respective dilution factors have to be considered.

The quality control protocol supplied with the kit shows the results of the final release QC for each kit. 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 optical density of 1.50 is obtained for the standard with the highest concentration.

## 9) ASSAY CHARACTERISTICS

Reference data:	Serum: Median: 0.06 fmol/ml EDTA-Plasma: Median: 0.20 fmol/ml Each laboratory should establish its own reference data
Standard range:	0-9 fmol/ml
Sample volume:	50 µl Serum, EDTA-plasma, urine or cell culture supernatants
Detection Limit:	(0 fmol/ml + 3 SD): 0.02 fmol/ml
Incubation time:	4 h / 30 min
Cross reactivity:	ET1/2/3 (1-21): <1%, ET2 (1-37): <1%, ET1/2 (1-38): <1%, porcine Big ET (1-39): 21%, Big ET-1/2 (22-38) : <1%, Big ET- 2 (22-37) : <1%, Sarafotoxin: <1%, rat BigET-1 (1-39): 10%

Recovery:

3 plasma samples have been spiked with 3 levels of synthetic Big Endothelin-1

n = 3	10 fmol/ml	5 fmol/ml	1 fmol/ml
Recovery (fmol/ml)	10.9	4.7	0.7
Recovery (%)	109%	94%	74%

## 10) PRECISION

Intra-Assay (n=16)			Inter-Assay (n=12)		
Mean (fmol/ml)	7.3	2.6	Mean (fmol/ml)	7.4	2.3
SD	0.4	0.1	SD	0.4	0.3
CV%	5%	4%	CV%	6%	9%

## 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 test components of human source were tested with 3<sup>rd</sup> generation tests against HIV-Ab and HBsAg; and were found negative.

Nevertheless, they should be handled and disposed as if they were infectious.

All liquid reagents contain 0.01% Proclin 300 as preservative.

Proclin 300 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.
- Avoid all contact with the reagents by using gloves.
- Sulfuric acid is irritating to eyes and skin. Flush with water if contact occurs. Avoid contact with skin and mucous. Irritations are possible – Flush with water after contact!!

## 13) LITERATURE

- "The role of big endothelin-1 in colorectal cancer"  
Arun C. et al., Int J Biol Markers 2002 Oct-Dec;17(4):268-74
- "Plasma levels and vascular effects of endothelin and big endothelin in patients with stable and unstable angina pectoris undergoing coronary bypass grafting".  
Lockowandt U et al., Eur J Cardiothorac Surg 2002 Feb;21(2):218-23
- "Prognostic value of hemodynamic vs big endothelin measurements during long-term therapy in advanced heart failure patients".  
Frey B et al., Chest 2000 Jun;117(6):1713-9

## 1) EINLEITUNG

Big Endothelin-1 (Big ET), ein 38 Aminosäuren langes Peptid, ist die biologische Vorstufe von Endothelin (1-21), dem stärksten derzeit bekannten Vasokonstriktor. Endotheline werden nicht nur in Endothelzellen der Gefäße, sondern auch in verschiedenen anderen Zelltypen wie Mesangial-, Nieren- und Epithelzellen produziert.

Nach der Synthese im Zytoplasma wird Big ET an der Endothelzellwand proteolytisch vom Endothelin Converting Enzyme (ECE), einer Metallo-endopeptidase, gespalten. Es entsteht die biologisch aktive Form ET (1-21) und das C-terminale Fragment (22-38). Dabei steigt die vasokonstriktorische Aktivität auf das etwa 140-fache, wodurch die physiologische Bedeutung des Peptides verdeutlicht wird. ET und Big ET zirkulieren in etwa equimolaren Mengen im Blut, ET hat eine Halbwertszeit von weniger als einer Minute. Big ET hingegen wird erst etwa nach einer Stunde auf die Hälfte seiner Konzentration abgebaut. Biologische, biochemische und pathophysiologische Wirkungen von Endothelinen sind in neueren Publikationen zusammengefasst.

### Mögliche INDIKATIONEN

- Kardiovaskulärer Stress wie Herzinfarkt, Niereninsuffizienz und Transplantabstossung
- Hypercholesterinämie
- Sklerodermie
- pulmonärer Hochdruck
- Arteriosklerose
- Onkologie

## 2) INHALT DES KITS

CONT	KIT KOMPONENTEN	MENGE
PLATE	Polyklonaler Schaf anti Big Endothelin-1 Antikörper, beschichtet auf Mikrotiterplattenstreifen im Streifenhalter. Verpackt im Alu Säckchen mit Trockenmittel	12 x 8 Teste
WASHBUF	Waschpuffer, 20fach Konzentrat, durchsichtige Kappe	1 x 50 ml
STD	Standards, synthetisches human Big Endothelin-1 (1-38) in human Plasma, weiße Kappen, lyophilisiert, genaue Konzentration nach Rekonstitution siehe Etikett	5 x lyophilisiert
CTRL	Kontrolle, synthetisches human Big Endothelin-1 (1-38) in human Plasma, gelbe Kappe, lyophilisiert, genaue Konzentration nach Rekonstitution siehe Etikett	1 x lyophilisiert
CONJ	Konjugat, (monoklonaler anti Big Endothelin (1-38) Antikörper HRPO), braune Kappe, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
SUB	Substrat (TMB Lösung), blaue Kappe, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
STOP	Stopp Lösung H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , weiße Kappe, gebrauchsfertig	1 x 7 ml
Cell culture STOCK	Big Endothelin-1 Stock, synthetisches human Big Endothelin-1 (1-38), rote Kappe, lyophilisiert, genaue Konzentration nach Rekonstitution siehe Etikett	1 x lyophilisiert

## 3) ZUSÄTZLICHES MATERIAL IM KIT

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- QC Protokoll
- Arbeitsanleitung (Beipacktext)
- Protokoll Blatt

## 4) ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL UND GERÄTE

- Kalibrierte Präzisionspipetten für 50-1000 µl, inkl. Pipettenspitzen
- Mikrotiterplattenphotometer mit 450nm Filter (620nm Referenz)
- Millimeterpapier oder Software
- Mikrotiterplatten Wascher wird empfohlen
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

## 5) REAGENZEN UND PROBENVORBEREITUNG

### Rekonstitution / Handhabung

- STD (Standards, weiße Kappen): Lösen Sie das Lyophilisat von Standard 1 bis 5 in jeweils 0,5 ml destilliertem Wasser bei Raumtemperatur (18-26°C) für 20 min, gut mischen. Die Lösung ist bei -20°C bis zum Ablaufdatum haltbar. Vermeiden Sie Einfrier-Auftau Zyklen.
- CTRL (Kontrollen, gelbe Kappe): Lösen Sie das Lyophilisat in 0,5 ml destilliertem Wasser bei Raumtemperatur (18-26°C) für 20 min, gut mischen. Die Lösung ist bei -20°C bis zum Ablaufdatum haltbar. Vermeiden Sie Einfrier-Auftau Zyklen.
- 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. Der verdünnte Puffer ist bei 2-8°C bis zum Ablaufdatum haltbar. Im Testsystem darf nur verdünnter WASHBUF (Waschpuffer) verwendet werden.
- Cell culture STOCK (Big Endothelin-1 stock, gelb mit roter Kappe): Lösen Sie das Lyophilisat in 2 ml Zellkulturmedium bei Raumtemperatur (18-26°C) für 30 min, gut mischen. Die Lösung enthält 10 fmol/ml Big Endothelin-1 und ist bei -20°C bis zum Ablaufdatum haltbar. Vermeiden Sie Einfrier-Auftau Zyklen.

### Probenmatrix:

In diesem Test können Serum und EDTA-Plasma, Harn und Zellkulturüberstände gemessen werden. Der Big ET Wert kann zwischen Serum und EDTA-Plasma variieren. Vermeiden Sie daher die Probenmatrix während einer Studie zu wechseln.

### Probenlagerung:

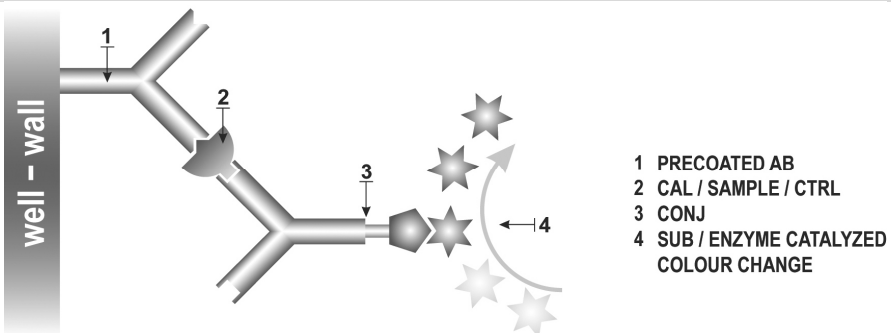
Frisch abgenommenes Serum oder EDTA Plasma wird sofort auf Eis gestellt und innerhalb eines Tages abzentrifugiert. Proben sind bei -20°C zu lagern, Langzeitlagerung bei -70°C. Vermeiden Sie Einfrier-Auftau Zyklen, bis maximal 4 Zyklen sind möglich. Lipämische oder hämolytische Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Vor dem Einsatz im Test Proben gut mischen. Wir empfehlen, alle Werte in Doppelbestimmungen durchzuführen. Verwenden Sie ausschließlich verdünnte Reagenzien für den Test.

### Direkte Bestimmung von Big Endothelin-1 in Zellkulturüberständen

STD und CTRL (Plasma Standard, weiße Kappen und Kontrolle, gelbe Kappe) nicht verwenden.

- Mit dem rekonstituierten cell culture -STOCK (Big Endothelin-1 stock) eine Verdünnungsreihe bis etwa 0,6 fmol/ml in Zellkulturmedium herstellen. (z.B. 10 / 5 / 2,5 / 1,25 / 0,625 fmol/ml). Verwenden Sie Zellkulturmedium als 0 Standard.
- Verdünnen Sie die Zellkulturüberstände je nach erwarteter Big Endothelin Konzentration mit Zellkulturmedium.

## 6) TESTPRINZIP



## 7) TESTPROTOKOLL

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen.
Markieren Sie die Positionen für BLANK/STD/PROBE/CTRL (Leerwert/Standard/Probe/Kontrolle) am Protokollblatt
Nehmen Sie die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Alu Säckchen. Mindestens 1 Well für den Leerwert reservieren. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können mit Trockenmittel im Alu Säckchen. bis zum angegebenen Ablaufdatum gelagert werden.
Pipettieren Sie 50 µl STD /SAMPLE/CTRL(Standard weiße Kappen/Probe/Kontrolle gelbe Kappe) in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen, mit Ausnahme des Leerwertes.
Pipettieren Sie 200 µl CONJ (Konjugat) in alle Wells, mit Ausnahme des Leerwertes.
<b>Streifen abdecken und 4 Stunden bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunklen inkubieren.</b>
Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit 300 µl verdünnten WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
Pipettieren Sie 200 µl SUB (Substrat) in alle Wells.
<b>30 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren.</b>
Pipettieren Sie 50 µl STOP (Stopplösung) in alle Wells, mischen.
Extinktion unmittelbar bei 450 nm messen, mit 620 nm als Referenz, falls möglich.

Falls die Extinktion des höchsten Standards außerhalb des Messbereiches des Photometers liegt, kann sofort bei 405 nm, mit 620 nm als Referenz (falls möglich) gemessen werden.

## 8) BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Die OD des Leerwertes ist von allen Wells abzuziehen. Konstruieren Sie eine Standardkurve aus den Werten der Standards unter Verwendung von kommerziell erhältlichem Millimeterpapier oder einer geeigneten Software. Die Konzentration der Proben wird aus der Standardkurve abgelesen. Eventuell verwendete Verdünnungen müssen berücksichtigt werden.

Auf dem beige packten QC Protokoll sind die Resultate bei der QC Freigabe des Kits vermerkt. Vom Verwender erhaltene Daten der optischen Dichte (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 des höchsten Standards den Wert 1,50 erreicht.

## 9) TESTMERKMALE:

Referenz Daten:	Serum: Median: 0,06 fmol/ml EDTA-Plasma: Median: 0,20 fmol/ml Jeder Verwender sollte eigene Referenzdaten erheben.
Meßbereich:	0-9 fmol/ml
Probenvolumen:	50 µl Serum, EDTA-Plasma , Harn oder Zellkulturüberstand
Detektionsgrenze:	(0 fmol/ml + 3 SD): 0,02 fmol/ml
Inkubationszeiten:	4 h / 30 min
Kreuzreaktivitäten:	ET1/2/3 (1-21): <1%, ET2 (1-37): <1%, ET1/2 (1-38): <1%, Schwein Big ET (1-39): 21%, Big ET-1/2 (22-38) : <1%, Big ET- 2 (22-37) : <1%, Sarafotoxin: <1%, rat BigET-1 (1-39): 10%

Wiederfindung:

3 Plasmen wurden mit 3 verschiedenen Konzentrationen von Big Endothelin-1 versetzt.

n = 3	10 fmol/ml	5 fmol/ml	1 fmol/ml
Wiederfindung (fmol/ml)	10,9	4,7	0,7
Wiederfindung (%)	109%	94%	74%

## 10) PRÄZISION

Intra-Assay (n=16)			Inter-Assay (n=12)		
Durchschnitt (fmol/ml)	7,3	2,6	Durchschnitt (fmol/ml)	7,4	2,3
SD	0,4	0,1	SD	0,4	0,3
CV%	5%	4%	CV%	6%	9%

## 11) TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien von verschiedenen Lots oder Testen dürfen nicht gemischt werden.
- Stöpsel oder 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 mit Testen der 3. Generation auf HIV-Ak und HBsAg getestet und negativ gefunden. Trotzdem sollten die Reagenzien als potentiell infektiös behandelt werden.

Alle flüssigen Reagenzien enthalten 0,01% Proclin 300 als Konservierungsmittel.

Proclin 300 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 zur Vermeidung jedes Kontaktes mit Reagenzien.
- Schwefelsäure reizt die Augen und die Haut. Bei Berührung gründlich mit Wasser spülen.

## 13) LITERATUR

- "The role of big endothelin-1 in colorectal cancer"  
Arun C et al., Int J Biol Markers 2002 Oct-Dec;17(4):268-74
- "Plasma levels and vascular effects of endothelin and big endothelin in patients with stable and unstable angina pectoris undergoing coronary bypass grafting".  
Lockowandt U et al., Eur J Cardiothorac Surg 2002 Feb;21(2):218-23
- "Prognostic value of hemodynamic vs big endothelin measurements during long-term therapy in advanced heart failure patients".  
Frey B et al., Chest 2000 Jun;117(6):1713-9

# 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



In vitro Diagnostic Medical Device (for in Vitro Diagnostic Use) / In vitro Diagnostikum (zur In-vitro-Diagnostik) / Dispositif médical de diagnostic in vitro (Pour usage diagnostique in vitro) / Dispositivo medico per diagnostica in vitro (per uso diagnostico in vitro) / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro (para uso diagnóstico in vitro) / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro (Para utilização de diagnóstico "in vitro") / Medisch hulpmiddel voor diagnostiek in vitro (Voor diagnostisch gebruik in vitro) / Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik (Udelukkende til in vitro diagnostisk anvendelse) / Medicinteknisk produkt avsedd för in vitro-diagnostik (För in vitro-diagnostiskt bruk) / Wyrób medyczny do Diagnostyki In Vitro / In vitro orvosdiagnosztikai termék / In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určené pre diagnostiku „in vitro“) / In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určeno pro diagnostiku „in vitro“)



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 / Katalógové 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 Teste / 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 / Innehåller räcker till x analyser / Zawartość na x testów / Tartalma X teszt elvégzésére elegendő / Obsahuje materiál pre x testov / Obsahuje materiál pro x testů

# ***BI-20082 big ENDOTHELIN***

## ***ASSAY PROTOCOL AND CHECKLIST***

- Bring all reagents to room temperature (18-26°C).
- Prepare reagents and samples as instructed.
- Bring unused and prepared components to the storage temperature mentioned in the package insert.
- Take microtiter strips out of the alu bag and mark positions on the protocol sheet.
- Add 50 µl STD/SAMPLE/CTRL (standard/sample/control) into all wells except blank.
- Add 200 µl CONJ (conjugate) into all wells except blank, swirl gently.
- Cover tightly and incubate for 4 hours at room temperature (18-26°C) in the dark.**
- Aspirate and wash wells with 300 µl WASHBUF (wash buffer) five times. Remove remaining buffer by hitting plate against paper towel.
- Add 200 µl SUB (substrate) into each well.
- Incubate for 30 minutes at room temperature (18-26°C) in the dark.**
- Add 50 µl STOP (Stop solution) into each well.
- Read Optical Density at 450 nm with reference 620 nm, if available.