

## ZYMUTEST Fibronectin

Art.Nr. RK028A

ELISA-Komplettkit zur Bestimmung von Fibronectin-Antigen

Nur für *In-vitro*-Forschungszwecke

### VERWENDUNGSZWECK:

Der ZYMUTEST Fibronectin ELISA-Kit ist ein einstufiger Enzymimmunoassay zur Bestimmung von humanem Fibronectin im Plasma und anderen Flüssigkeiten die Fibronectin enthalten können.

### TESTPRINZIP:

ZYMUTEST Fibronectin ist ein einstufiger Sandwich-ELISA, der unter Verwendung eines hochgereinigten polyklonalen Kaninchen-Anti-Fibronectin-Antikörpers entwickelt wurde.

Zunächst wird das Immunkonjugat, ein Peroxidase (HRP)-konjugierter polyklonaler Anti-Fibronectin-Antikörper in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Unmittelbar darauf wird verdünntes Testplasma zugegeben, wodurch die Immunreaktion startet. In der Probe vorhandenes Fibronectin bindet durch freie Epitope gleichzeitig an die HRP-konjugierten Antikörper des Immunkonjugates und die polyklonalen Antikörper der Festphasenbeschichtung. Nach einem Waschschrift wird das Peroxidasesubstrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben und führt zur Blaufärbung des Testansatzes. Die Blaufärbung schlägt in eine Gelbfärbung um sobald die Reaktion durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt wird. Die Intensität der Färbung ist direkt proportional dem Fibronectingehalt der Probe.

### PROBENMATERIAL:

- Humanes Plasma mit Trinatriumcitrat oder Dinatrium-EDTA als Antikoagulant.
- Jede biologische Flüssigkeit, in der Fibronectin bestimmt werden soll.

### REAGENZIEN:

1. **COAT:** ELISA-Mikrotiterplatte, enthält 12 Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen, beschichtet mit hochgereinigtem polyklonalen Kaninchen-Anti-Fibronectin-Antikörper. Die Platte ist in einem hermetisch versiegeltem Aluminiumbeutel in Gegenwart eines Trockenmittels verpackt.
2. **SD:** 2 Flaschen mit je 60 ml B2F-Probendiluent, gebrauchsfertig.
3. **CaI:** 3 Flaschen Fibronectinkalibrator, lyophilisiert. Nach Rekonstitution mit 2,5 ml B2F-Probendiluent erhält man eine Kalibratorlösung mit einem Fibronectingehalt von ca. 50 ng/ml, die exakte, chargenspezifische, Konzentration [C] ist dem, der Packung beigelegten, Zertifikat zu entnehmen.
4. **CI:** 1 Flasche Fibronectinkontrolle I (Hoch), lyophilisiert.
5. **CI:** 1 Flasche Fibronectinkontrolle II (Niedrig), lyophilisiert.

**Anmerkung:** Die Fibronectin Sollwerte und Vertrauensbereiche der Kontrollen können von Charge zu Charge unterschiedlich sein, sind jedoch für jede Charge auf dem beiliegenden Datenblatt exakt angegeben.

6. **IC:** 3 Flaschen Anti-Fibronectin-HRP-Immunkonjugat, ein HRP-konjugierter polyklonaler Antikörper, lyophilisiert.
7. **CD:** 1 Flasche mit 25 ml B2F-Konjugatdiluent, gebrauchsfertig.
8. **WS:** 1 Flasche mit 50 ml 20-fach konzentrierter Waschlösung.
9. **TMB:** 1 Flasche mit 25 ml Peroxidasesubstrat: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, enthält Wasserstoffperoxid, gebrauchsfertig.
10. **SA:** 1 Flasche mit 6 ml 0,45M Schwefelsäure (Stopplösung), gebrauchsfertig.

**Anmerkung:** Es dürfen ausschließlich Komponenten aus derselben Charge der Testpackung miteinander verwendet werden. Komponenten aus unterschiedlichen Packungschargen dürfen für die Testdurchführung nicht verwendet werden.

### ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENHALTEN SIND:

- 8-Kanal-Pipette oder Multipette zur Abgabe von Volumina von 50-300 µl.
- 1-Kanal-Pipetten zur Abgabe von Volumina von 0-20 µl, 20-200 µl und 200-1000 µl.
- Waschgerät und Schüttler für Mikrotiterplatten.
- Lesegerät für Mikrotiterplatten mit einer Wellenlängeneinstellung von 450 nm.
- Aqua dest.

### VORBEREITUNG DER REAGENZIEN, LAGERUNG UND STABILITÄT:

In der Originalpackung, bei 2-8°C gelagert, sind die ungeöffneten Reagenzien bis zum auf der Testpackung angegebenen Verfalldatum haltbar.

1. **ELISA-Mikrotiterplatte:** Den Aluminiumbeutel öffnen und die für die jeweilige Testserie erforderliche Anzahl an Mikrotiterstreifen entnehmen. Nach Entnahme müssen die Mikrotiterstreifen innerhalb von 30 Minuten verwendet werden. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen können im Aluminiumbeutel, in Gegenwart des Trockenmittels und vor Feuchtigkeit geschützt, bei 2-8°C für 4 Wochen im mitgelieferten Minigrip-Kunststoffbeutel gelagert werden.
2. **B2F-Probendiluent:** Gebrauchsfertig. Nach Öffnen kann das Reagenz, unter der Voraussetzung, dass jegliche bakterielle Kontamination vermieden wird, für 4 Wochen bei 2-8 °C aufbewahrt werden. Das Reagenz enthält 0,05% Kathon CG.
3. **Fibronectinkalibrator:** Der Inhalt einer Flasche wird mit 2,5 ml B2F-Probendiluent rekonstituiert. Die Lösung ist bei Raumtemperatur mindestens 8 Stunden stabil.
4. **Fibronectinkontrolle I (Hoch):** Mit 1 ml B2F-Probendiluent rekonstituieren.
5. **Fibronectinkontrolle II (Niedrig):** Mit 1 ml B2F-Probendiluent rekonstituieren.

**Anmerkung:** Nach Rekonstitution sind die Kontrollen 8 Stunden bei Raumtemperatur, 24 Stunden bei 2-8°C oder 2 Monate bei -20°C oder tiefer stabil.

**Warnung:** Fibronectinkalibrator und Fibronectinkontrollen werden mit Fibronectin hergestellt, welches aus humanem Normalplasma gewonnen wird. Dieses wurde mit registrierten Methoden getestet und als negativ für HIV-Antikörper, HBs-Ag und HCV-Antikörper eingestuft. Kein Test kann jedoch die Anwesenheit infektiöser Stoffe vollständig ausschließen. Jedes Produkt humanen Ursprungs muss deshalb mit allen erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen als potenziell infektiös behandelt werden.

6. **Anti-Fibronectin-HRP-Immunkonjugat:** Jede Flasche wird mit 4 ml B2F-Konjugatdiluent rekonstituiert. Vor Gebrauch muss der Inhalt vollständig gelöst sein. Zur gleichmäßigen Durchmischung der Lösung ist die Flasche leicht zu schwenken. Das rekonstituierte Konjugat ist für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur oder mindestens 4 Wochen bei 2-8°C stabil.
7. **B2F-Konjugatdiluent:** Gebrauchsfertig. Nach Öffnen kann das Reagenz, unter der Voraussetzung, dass jegliche bakterielle Kontamination vermieden wird, für 4 Wochen bei 2-8°C aufbewahrt werden. Das Reagenz enthält 0,05% Kathon CG.
8. **Waschlösung:** Vorhandene Feststoffe sind durch Inkubation der Flasche für 15-30 Minuten bei 37°C im Wasserbad vollständig in Lösung zu bringen. Nach Durchmischung wird die erforderliche Menge 1:20 in Aqua dest. verdünnt (die in der Flasche enthaltenen 50 ml ermöglichen die Herstellung von 1 Liter verdünnter Waschlösung). Die konzentrierte Waschlösung kann in der Originalflasche bei 2-8°C gelagert und innerhalb von 4 Wochen nach Öffnen verbraucht werden. Die verdünnte Waschlösung kann 7 Tage bei 2-8°C aufbewahrt werden. Das Reagenz enthält 0,05% Kathon CG.
9. **TMB-Substrat:** Gebrauchsfertig. Nach Öffnen kann das Reagenz, unter der Voraussetzung, dass jegliche bakterielle Kontamination vermieden wird, für 4 Wochen bei 2-8°C aufbewahrt werden.
10. **Stopplösung:** Gebrauchsfertig.

**Vorsichtsmaßnahmen:** Schwefelsäure ist auch in verdünnter Konzentration von 0,45M ätzend. Wie ähnliche chemische Substanzen muss Schwefelsäure mit größtmöglicher Vorsicht gehandhabt werden. Jeglicher Kontakt mit Augen und Haut ist zu vermeiden. Bei der Handhabung sind Schutzbrille und Handschuhe zu tragen.

**Anmerkungen:** Vor Gebrauch ist die Testpackung für mindestens 30 Minuten auf Raumtemperatur zu bringen. Ungebrauchte Reagenzien sind bei 2-8°C zu lagern.

Stabilitätsstudien bei 30°C zeigen, dass die Reagenzien ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur verschickt werden können.

### TESTDURCHFÜHRUNG:

#### Probengewinnung:

Blut (9 Volumentteile) wird in 0,109 M Citrat als Antikoagulant (1 Volumentteil) abgenommen. Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei 2.500 g wird der Plasmaüberstand abgenommen. Das Citratplasma sollte bei 2-8°C innerhalb von 24 Stunden bzw. bei Raumtemperatur innerhalb von 8 Stunden verwendet oder bei -20°C oder tiefer für bis zu 6 Monate eingefroren und kurz vor Gebrauch für 15 Minuten bei 37°C aufgetaut werden. Aufgetaute Proben müssen innerhalb von 8 Stunden verwendet werden.

EDTA-Plasmen können auf gleiche Weise verwendet werden, die Lagerungsbedingungen entsprechen denen für Citratplasma.

#### Proben- oder Kontrollplasmen:

Die Proben müssen mit B2F-Probendiluent auf eine Konzentration < [C] ng/ml (siehe beiliegendes chargenspezifisches Zertifikat) verdünnt werden. Beispielsweise müssen humane Plasmen 1:8000, 1:16000 oder höher mit B2F-Probendiluent verdünnt werden. Für hohe Verdünnungen sind aufeinanderfolgende geometrische Verdünnungsschritte (z.B. 1:10, nochmals 1:10, etc.) angezeigt. Die mit 1 ml B2F-Probendiluent rekonstituierten Kontrollen I und II werden im Test unverdünnt eingesetzt.

## Kalibration

Mit dem [C] ng/ml Fibronectinkalibrator aus der Testpackung werden die nachstehenden Kalibratorverdünnungen hergestellt.

Fibronectinkonzentration [ng/ml]	C	C/2	C/5	C/10	C/20	0 ng/ml
Volumen [C] ng/ml Fibronectinkalibrator	1,0 ml	0,5 ml	0,2 ml	0,1 ml	0,05 ml	0,0 ml
Volumen B2F-Probendiluent	0,0 ml	0,5 ml	0,8 ml	0,9 ml	0,95 ml	1,0 ml

Die Kalibratorverdünnungen vorsichtig durchmischen.

Die Verdünnungen sind für mindestens **8 Stunden** bei Raumtemperatur stabil.

## Durchführung:

Die für die jeweilige Testserie erforderliche Anzahl an Mikrotiterstreifen aus dem Aluminiumbeutel entnehmen und in den mitgelieferten Rahmen einlegen. Die Reagenzzugabe erfolgt gemäß folgendem Pipettierschema:

Reagenz	Volumen	Durchführung
Anti-Fibronectin-HRP-Immunkonjugat (mit 4 ml B2F-Probendiluent rekonst.)	100 µl	Das Anti-Fibronectin-HRP-Immunkonjugat in die Mikrotitervertiefungen pipettieren
Fibronectinkalibratoren, Fibronectinkontrollen, Proben, B2F-Probendiluent (Blank)	100 µl	Kalibratoren, Kontrollen und Proben <b>unverzüglich</b> in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren
<b>Vorsichtig mischen (manuell oder Schüttler) und 60 Minuten bei Raumtemperatur (18-25 °C) inkubieren (Anm. a)</b>		
Waschlösung (20-fach in Aqua dest. verdünnt)	300 µl	5 aufeinanderfolgende Waschschrte mit dem Waschgerät durchführen (Anm. b).
TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Substrat	200 µl	Das Substrat sofort nach dem Waschen in die Mikrotitervertiefungen pipettieren. Die Zugabe des Substrates muss, Reihe für Reihe, genau und in exakten Zeitintervallen durchgeführt werden (Anm. b, c)
<b>Für exakt 5 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren (Anm. a)</b>		
0,45M Schwefelsäure (SA)	50 µl	In exakt den gleichen Zeitintervallen wie bei der Zugabe des Substrates die Farbentwicklung durch Zugabe von 0,45M Schwefelsäure abstoppen (Anm. c)
Nach 10 Minuten Wartezeit zur Stabilisierung die Absorption bei 450 nm (A450) messen (Anm. d).		

### Anmerkung:

- Während der Inkubationsphasen, insbesondere während der Farbentwicklung, darf die Platte nicht dem direkten Sonnenlicht ausgesetzt werden. Ein Mikrotiterplatten-Schüttler kann verwendet werden.
- Die Mikrotitervertiefungen dürfen zwischen der Zugabe einzelner Reagenzien oder nach einem Waschschrte niemals vollständig austrocknen. Um das Austrocknen der Mikrotitervertiefungen und damit eine Beschädigung der immobilisierten Komponenten zu verhindern, muss das folgende Reagenz innerhalb der nächsten 3 Minuten zugegeben werden. Falls erforderlich, können die Mikrotitervertiefungen mit Waschlösung gefüllt verbleiben und erst kurz vor der Zugabe des folgenden Reagenz geleert werden. Um eine Verringerung der Aktivität zu vermeiden, muss das Waschgerät die Mikrotitervertiefungen schonend waschen.
- Bei der Zugabe des Substrates müssen die Zeitintervalle, Reihe für Reihe, genau festgelegt und exakt eingehalten werden. Dies gilt in gleicher Weise für die Zugabe der Stopplösung.
- Für eine bichromatische Ableseung können Referenzwellenlängen von 690 nm oder 620 nm verwendet werden.

## ANGABE DER ERGEBNISSE:

- Auf Millimeterpapier (Maßstab lin-lin) wird die **Fibronectinkonzentration in ng/ml** auf der Abszisse (x-Achse) gegen die jeweilige Absorption **A450** auf der Ordinate (y-Achse) aufgetragen. Die Kurvenberechnung erfolgt z.B. mittels Akima oder smoothed cubic spline.
- Der Wert der Fibronectinkonzentration in der jeweiligen Verdünnung des Probenplasmas kann direkt von der erhaltenen Kalibrationskurve (eine Beispielkurve ist dem beiliegendem Datenblatt zu entnehmen) abgelesen werden. Um die Fibronectinkonzentration im Probenplasma zu erhalten, muss der erhaltene Wert noch mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden.
- Die Werte für die **Kontrollen I und II** werden direkt (ohne Verdünnungsfaktor) von der Kalibrationskurve abgelesen.

Alternativ dazu kann eine Software zur Auswertung von ELISA-Testen zur Berechnung der Konzentrationen (z.B. Dynex, Biolise, etc.) verwendet werden.

## ERWARTETE WERTE

Die Fibronectinkonzentration in humanem Normalplasma beträgt üblicherweise  $300 \pm 100$  µg/ml.

## PATHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN

Erhöhte Fibronectinkonzentrationen werden bei verschiedenen pathologischen Zuständen, wie Bluthochdruck während der Schwangerschaft, schwerem arteriellen Hochdruck, hyperkoagulatorischen Zuständen etc. beobachtet. Erniedrigte Fibronectinspiegel findet man bei Patienten mit disseminierter intravasaler Gerinnung.

## BIOCHEMIE

Fibronectin ist ein 450 kDa-Glykoprotein, das aus 2 Ketten mit annähernd gleicher Größe aufgebaut ist. Die beiden Ketten sind über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden. Als essentielle Komponente der extrazellulären Matrix ist Fibronectin an vielen biologischen Prozessen beteiligt und liegt auch in einer löslichen Form vor. Plasmatisches Fibronectin ist an der Plättchenaggregation, der Thrombusbildung und der Wundheilung beteiligt und kann mit zahlreichen Molekülen wie Fibrin (über Faktor XIIIa), Fibrinogen, Heparinen, Kollagenen etc. in Wechselwirkung treten.

## STANDARDISIERUNG

Der im ZYMUTEST Fibronectin Testkit enthaltene Kalibrator ist auf mehrere normale Poolplasmen (Citratplasma) bezogen.

## REAKTIVITÄT

Der ZYMUTEST Fibronectin Testkit kann Kreuzreaktionen mit dem Fibronectin anderer Wirbeltierarten zeigen (anderer als Kaninchen), im Speziellen mit Maus-Fibronectin.

## EMPFEHLUNGEN

Zur Bestimmung von Fibronectin sind hohe Plasmaverdünnungen (1:8000, 1:16000 oder höher) erforderlich. Zur Gewährleistung optimaler Präzision bei der Herstellung der Verdünnungen sind aufeinanderfolgende geometrische 1:10 Verdünnungsschrte angezeigt.

## REFERENZEN

- MW Mosesson, DL Amrani, Review: The structure and biological activities of plasma fibronectin, *Blood*, 1980, **56** (2):145-158.
- SI Miekka, KC Ingham, D Menache, Rapid methods for isolation of human plasma fibronectin, *Thromb Res*, 1982, **27**: 1-14.
- M Quitt, P Froom, E Aghai, E Balan, L Hornstein, Plasma fibronectin levels in patients with coronary artery disease, *Isr J Med Sci*, 1994, **30**: 907-909.
- SA Corbett, L Lee, CL Wilson, JE Schwarzbauer, Covalent cross-linking of fibronectin to fibrin is required for maximal cell adhesion to a fibronectin-fibrin matrix, *J Biol Chem*, 1997, **272** (40): 24999-25005.
- MK Magnusson, DF Mosher, Fibronectin - Structure, assembly and cardiovascular implications, *Art Thromb Vasc Biol*, 1988, **18**: 1363-1370.

