



1. WSTĘP

1.1. Zastosowanie

Test **DRG Renin ELISA** jest testem immunoenzymatycznym do pomiaru aktywnej reniny w surowicy i osoczu.

2. ZASADA TESTU

Zestaw DRG Renin ELISA jest testem immunoenzymatycznym stałej fazy (ELISA), opierającym się na zasadzie kanapkowej (sandwich). Mikrostudzienki są opłaszczone przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko unikatowemu miejscu antygenowemu na cząsteczce reniny.

Próbkę pacjenta zawierającą endogenną reninę inkubuje się w studzience opłaszczonej swoistym przeciwciałem wraz z Buforem do oznaczeń. Formowany jest kompleks kanapkowy (sandwich). Po inkubacji niezwiązany materiał jest wymywany a dodawany jest kompleks enzymu streptawidyna-peroksydaza, a po inkubacji , niezwiązany koniugat enzymu jest wymywany.

Ilość związanej peroksydazy jest proporcjonalna do stężenia reniny w próbce.

Po dodaniu roztworu substratu, intensywność koloru jest wprost proporcjonalna do stężenia aktywnej reniny w próbce.



3. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

- 1) Niniejszy zestaw przeznaczony jest wyłącznie do zastosowania diagnostycznego w warunkach in vitro. Do zastosowania przez osoby fachowe.
- 2) Wszystkie odczynniki niniejszego zestawu testowego, które zawierają ludzką surowicę lub osocze, przebadano z wynikiem ujemnym na obecność HIV I/II, antygenu HBs i HCV procedurami zatwierdzonymi przez FDA. Mimo tego, wszystkimi odczynnikami należy posługiwać się i wyrzucać je jak substancje potencjalnie niebezpieczne.
- 3) Przed rozpoczęciem oznaczenia należy uważnie przeczytać całą instrukcję obsługi. Należy posługiwać się aktualną wersją ulotki informacyjnej, dołączonej do zestawu. Należy upewnić się, że wszystko jest zrozumiałe.
- 4) Mikro płytki zawiera odrywane paski. Niewykorzystane studzienki muszą być przechowywane w temperaturze 2° do 8°C, w szczelnie zamkniętej torebce foliowej. Należy je stosować w ramce zawartej w zestawie.
- 5) Próbkę i odczynniki zestawu należy pipetować jak najszybciej, w tej samej kolejności w każdym etapie oznaczenia.
- 6) Należy używać jednego pojemnika tylko dla pojedynczego odczynnika. To szczególnie dotyczy pojemników na substrat. Posługiwanie się pojemnikiem do odmierzania roztworu substratu, który wcześniej wykorzystywano do roztworu sprzężonego, może prowadzić do wystąpienia zabarwienia roztworu. Nie wlewać odczynników z powrotem do fiolek, gdyż może dojść do zanieczyszczenia odczynników.
- 7) Należy dobrze wymieszać zawartość mikro płytki , aby zagwarantować uzyskanie dobrych wyników oznaczenia. Nie stosować ponownie raz użytych studzienek.



-
- 8) Podczas oznaczenia nie wolno dopuścić do wyschnięcia studzienek; odczynniki należy dodawać bezpośrednio po zakończeniu etapów płukania.
 - 9) Przed rozpoczęciem oznaczenia należy pozostawić odczynniki, aby osiągnęły temperaturę pokojową (21 - 26°C). Temperatura wpływa na odczyt absorbancji, natomiast nie ma wpływu na wyniki oznaczeń próbek pacjentów.
 - 10) Nigdy nie pipetować ustami i unikać kontaktu odczynników i próbek ze skórą i błonami śluzowymi.
 - 11) Nie palić, nie jeść, nie pić i nie stosować kosmetyków w miejscach, gdzie stosuje się próbki i odczynniki zestawu.
 - 12) Przy posługiwaniu się próbkami i odczynnikami stosować jednorazowe rękawiczki lateksowe. Zanieczyszczenie odczynników lub próbek drobnoustrojami może prowadzić do uzyskania fałszywych wyników.
 - 13) Próbkami i odczynnikami należy posługiwać się zgodnie z procedurami określonymi w odpowiednich krajowych wytycznych i regulacjach dotyczących bezpieczeństwa biologicznego.
 - 14) Nie stosować odczynników po upływie terminu ważności podanego na etykietach zestawu.
 - 15) Należy przestrzegać wszystkich objętości podanych w protokole. Optymalne wyniki oznaczenia można uzyskać tylko przy stosowaniu kalibrowanych pipet.
 - 16) Nie mieszać i nie stosować elementów zestawów o różnych numerach serii. Zaleca się nie wymienianie studzienek z różnych płytek nawet w obrębie tej samej serii. Zestawy mogą być transportowane lub przechowywane w różnych warunkach i charakterystyki wiązania płytek mogą się nieznacznie różnić.



-
- 17) Unikać kontaktu z roztworem zatrzymującym reakcję, zawierającym 0,5 M H₂SO₄. Może powodować podrażnienie skóry i oparzenia.
 - 18) Niektóre odczynniki zawierają Proclin, BND i MIT jako środki konserwujące. W przypadku kontaktu z oczami lub skórą, zanieczyszczone miejsce należy natychmiast przepłukać wodą.
 - 19) Substrat TMB wywiera podrażniający wpływ na skórę i błony śluzowe. W przypadku ewentualnego kontaktu, przemyć oczy dużą ilością wody, a skórę mydłem i dużą ilością wody. Przed użyciem należy wymyć zanieczyszczone przedmioty. W razie kontaktu wziewnego, wyprowadzić osobę na otwarte powietrze.
 - 20) Substancje chemiczne i przygotowane lub stosowane należy traktować odczynniki jak niebezpieczne odpady, zgodnie z krajowymi wytycznymi lub regulacjami dotyczącymi bezpieczeństwa biologicznego.
 - 21) Informacje dotyczące niebezpiecznych substancji zawartych w zestawie można znaleźć w Karcie Charakterystyki Substancji Niebezpiecznej. Karty Charakterystyki Substancji Niebezpiecznej dla tego produktu dostępne są na życzenie bezpośrednio w firmie DRG



4. Odczynniki:

4.1. Odczynniki zawarte w zestawie

1. **Mikropłytki**, paski 12x8 (odłamywane), 96 studzienek;
Opłaszczony przeciwciałem anti-renina (monoklonalnym)

2. **Standardy** (Standard 0-5), 6 fiolek (liofilizowane), 1 ml
Stężenia: 0-4-16-32-64-128 pg/ml
Patrz „Przygotowanie odczynników”
Zawiera konserwanty nie zawierające rtęci.

3. **Kontrole (Niska & Wysoka)**, 2 fiołki (liofilizowane), 1 ml;
Dla wartości kontroli należy zapoznać się z dokumentami Kontroli Jakości
Patrz „Przygotowanie odczynników”
Zawiera konserwanty nie zawierające rtęci.

4. **Bufor do oznaczeń**, 1 fiołka, 20 ml, gotowy do użycia
Zawiera konserwanty nie zawierające rtęci.

5. **Roztwór Sprzężony Enzymu**, 1 fiołka, 14 ml, gotowy do użycia
Przeciwciało anti-renina (monoklonalne) sprzężone z HRP
Zawiera konserwanty nie zawierające rtęci.



6. **Roztwór Substratu**, 1 fiolka, 14 mL, gotowy do użycia

Tetrametylobenzydyna (TMB)

7. **Roztwór Zatrzymujący Reakcję**, 1 fiolka, 14 mL, gotowy do użycia

Zawiera 0.5 M H₂SO₄

8. **Roztwór płuczący**, 1 fiolka, 30 mL (40x stężony)

Patrz „Przygotowanie Odczynników”

UWAGA: Dodatkowy Bufor do badania do rozcieńczania próbek jest dostępny na życzenie.

4.2. Odczynniki nie zawarte w zestawie

- Kalibrowany czytnik mikroplamki (450±10 nm)
- Kalibrowane nastawne precyzyjne mikropipety.
- Bibuła
- Stoper
- Woda destylowana
- wytrząsarka mikroplamki 300-700 rpm

4.3. PRZECHOWYWANIE ODCZYNNIKÓW

Nieotwarte odczynniki, przechowywane w temperaturze 2 – 8°C, zachowują reaktywność do upływu terminu ważności. Nie stosować odczynników po tej dacie. Otwarte odczynniki muszą być przechowywane w temperaturze 2 – 8°C. Mikrostudzienki muszą być



przechowywane w temperaturze 2 – 8°C. Po otwarciu torebki foliowej należy uważnie zamknąć ją szczelnie ponownie.

Otwarty zestaw zachowuje reaktywność przez 6 tygodni jeżeli jest przechowywany, jak opisano powyżej.

4.4. Przygotowanie odczynników

Przed użyciem pozostawić wszystkie odczynniki oraz wymaganą liczbę pasków, do osiągnięcia temperatury pokojowej.

Standardy

Rozpuścić liofilizowaną zawartość fiolek ze standardem w 1 ml wody destylowanej. Pozostawić na minimum 10 minut do rozpuszczenia. Wymieszać delikatnie przed użyciem.

Uwaga: Rozpuszczone standardy zachowują stabilność przez 14 dni w temperaturze 2-8°C. Przy dłuższym przechowywaniu należy je zamrozić w temperaturze -20°C

Kontrole

Rozpuścić liofilizowaną zawartość fiolek ze standardem w 1 ml wody destylowanej.

Pozostawić na minimum 10 minut do rozpuszczenia. Wymieszać delikatnie przed użyciem.

Uwaga: Rozpuszczone standardy zachowują stabilność przez 14 tygodni w temperaturze 2-8°C. Przy dłuższym przechowywaniu należy je zamrozić w temperaturze -20°C

Roztwór Płuczący

Dodać dejonizowanej wody do 40x stężonego Roztworu Płuczącego.



Rozcieńczyć 30 ml stężonego Roztworu Płuczącego przy pomocy 1170 ml wody dejonizowanej do objętości końcowej 1200 ml.

Rozcieńczony Roztwór Płuczący jest stabilny przez 2 tygodnie w temperaturze pokojowej.

4.5. Utylizacja Zestawu

Zestaw należy utylizować zgodnie z krajowymi przepisami prawnymi. Specjalne informacje dotyczące niniejszego produktu zawarte są w Karcie Charakterystyki Substancji Niebezpiecznej.

4.6. Uszkodzone zestawy testowe

W przypadku każdego poważnego uszkodzenia zestawu testowego lub jego elementów należy poinformować o tym na piśmie DRG[®], nie później niż jeden tydzień po otrzymaniu zestawu. Nie należy w oznaczeniu stosować poważnie uszkodzonych pojedynczych elementów zestawu. Należy je przechowywać do momentu uzgodnienia ostatecznego rozwiązania. Następnie należy się ich pozbyć zgodnie z obowiązującymi przepisami prawnymi.

5. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE PRÓBEK

W oznaczeniach można stosować surowicę i osocze.

Nie stosować hemolitycznym, lipemicznym bądź żółtaczkowym próbek.

Uwaga: Próbkę zawierającą azydek sodu nie mogą być stosowane w oznaczeniach.

Warunki, w których próbki muszą być pobierane i starannie kontrolowane, ponieważ szereg czynników fizjologicznych może wpływać na wydzielanie reniny. Obejmują one:

- Postawa: dawca próbki musi być w pozycji leżącej na dłużej niż 1 godzinę lub pionowo przez ponad 1 godzinę
- Dienne oscylacje reniny: pobieranie próbek powinno być między 7 rano a 10 rano, jeśli to



Revised 25 Mar. 2013 rm (Vers. 8.1)

USA: 

możliwe.

- Dieta: zawartość sodu w diecie musi być znana i w końcu zweryfikowane przez pomiar natiurezy ciągu 24 godzin,
- leki: na poziom aktywnej reniny mogą mieć wpływ leki przeciwnadciśnieniowych (np diuretyki, inhibitory konwertazy angiotensyny, beta-adrenergiczne, leki rozszerzające naczynia, inhibitory reniny)
- Ciąża: poziom nieaktywnej i aktywnej reniny wzrasta podczas ciąży
- Cykl miesięczkowy: poziom aktywnej reniny wzrasta w drugiej fazie cyklu (należy pobrać próbki w pierwszej fazie)
- Wiek: poziom aktywnej reniny zmniejsza się z wiekiem

Uwaga: Surowica od dawców nowotworowych może zawierać podwyższone stężenie reniny.

5.1. Pobieranie próbek

Surowica:

Pobrać krew z żyły (np. przy użyciu Sarstedt Monovette nr 02.1388.001), pozostawić do wytworzenia skrzepu i oddzielić surowicę przez wirowanie w temperaturze pokojowej. Nie wirować próbek przed wytworzeniem skrzepu.

Osocze:

Pełną krew należy pobrać do probówek do wirowania zawierających środek przeciwkrzepliwy i odwirować bezpośrednio po pobraniu.



5.2. Przechowywanie i przygotowanie próbek

Próbki należy przechowywać zamknięte korkiem, w temperaturze pokojowej, NIE w temperaturze 2°C - 8°C przed oznaczeniem, ponieważ może nastąpić krioaktywacja proreniny w temperaturze 2°C - 8°C, dając fałszywe wyniki reniny (12,13)

Jeżeli próbki nie mogą być oznaczone w ciągu 4 godzin od pierwszego pobrania, należy je zamrozić, w temperaturze -20°C lub niższej.

Zalecane jest szybkie zamrażanie i rozmrażanie, aby uniknąć zakresu temperatury 2°C - 8°C.

Można zastosować kąpiel z suchego lodu/etanolu w celu szybkiego zamrożenia.

5.3. Rozcieńczenie Próbek

Jeżeli wynik pierwszego oznaczenia wskazuje, że próbka zawiera wyższe stężenie reniny niż najwyższy standard, próbkę taką można rozcieńczyć Buforem do Badań i oznaczyć ponownie, jak opisano w Procedurze oznaczenia.

Przy obliczaniu wyników stężenia reniny należy uwzględnić ten współczynnik rozcieńczenia.

Przykład:

- a) Rozcieńczenie w stosunku 1:2 75 µl próbki+ 75 µl Buforu do badań (dobrze wymieszać)
- b) Rozcieńczenie w stosunku 1:5: 30 µl próbki + 120 µl Buforu do badań (dobrze wymieszać)



6. PROCEDURA OZNACZENIA

6.1. Uwagi Ogólne

- Przed użyciem wszystkie odczynniki i próbki należy pozostawić do osiągnięcia temperatury pokojowej. Wszystkie odczynniki należy wymieszać bez wytwarzania piany.
- Po rozpoczęciu oznaczenia wszystkie jego etapy należy wykonywać bez przerw.
- Dla uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego, należy stosować nowe jednorazowe plastikowe końcówki pipet do pipetowania każdego standardu, kontroli i próbki.
- Absorbancja jest funkcją czasu inkubacji i temperatury. Przed rozpoczęciem oznaczenia zaleca się przygotowanie wszystkich odczynników, zdjęcie korków, umieszczenie wszystkich potrzebnych studzienek w statywie, itp. Dzięki temu każdy etap pipetowania zajmie taką samą ilość czasu i nie będzie pomiędzy nimi żadnych przerw.
- Zgodnie z ogólną zasadą, reakcja enzymatyczna jest liniowo proporcjonalna do czasu i temperatury
- Pipetowanie wszystkich standardów, próbek i kontroli należy wykonać w ciągu 6 minut (Szczególnie należy o tym pamiętać przy pipetowaniu manualnym).

6.2. Procedura Testu

W ramach każdego oznaczenia należy sporządzić krzywą standardową.

1. W statywie umieścić pożądaną liczbę studzienek
2. Dodać 150 ul Buforu do badań do wszystkich studzienek
3. Do odpowiednich studzienek odmierzyć po **50 ul standardu, kontroli i próbek**, nowymi jednorazowymi końcówkami do pipet.



-
4. Inkubować przez **90 minut** w temperaturze pokojowej na wytrząsarce 300-700 rpm
 5. Energicznie wytrząsnąć zawartość studzienek.

4-krotnie płukać studzienki rozcieńczonym roztworem wmywającym (300 µl na studzienkę). Energicznie uderzyć studzienkami o bibułę w celu usunięcia resztek ich zawartości.

Ważna uwaga: czułość i precyzja tego oznaczenia w dużym stopniu zależą od właściwego wykonania procedury płukania!
 6. Do każdej studzienki dodać **100 µl Konjugatu Enzymu**
 7. Inkubować przez **90 minut** w temperaturze pokojowej na wytrząsarce 300-700 rpm.
 8. Energicznie wytrząsnąć zawartość studzienek.

4-krotnie płukać studzienki rozcieńczonym roztworem wmywającym (300 µl na studzienkę). Energicznie uderzyć studzienkami o bibułę w celu usunięcia resztek ich zawartości.

Ważna uwaga: czułość i precyzja tego oznaczenia w dużym stopniu zależą od właściwego wykonania procedury płukania!
 9. Do każdej studzienki dodać **100 ul Roztworu Substratu**
 10. Inkubować przez **15 minut** w temperaturze pokojowej.
 11. Zatrzymać reakcję enzymatyczną przez dodanie do każdej studzienki **100 ul Roztworu zatrzymującego reakcję.**
 12. Odczytać absorbancję (OD) każdej studzienki przy długości fali **450 ± 10 nm** przy użyciu czytnika płytek. Zaleca się odczytanie studzienek w ciągu **10 minut** od dodania *roztworu zatrzymującego reakcję*



6.3. Obliczanie wyników

1. Dla każdego zestawu standardów, kontroli i próbek pacjenta obliczyć średnią wartość absorbancji.
2. Skonstruować krzywą standardową przez naniesienie średniej absorbancji uzyskanej dla każdego standardu wobec podanego stężenia reniny w danym standardzie, przy czym wartość absorbancji należy nanieść na osi pionowej (Y), a stężenie reniny na osi poziomej (X).
3. Przy użyciu średniej wartości absorbancji dla każdej próbki, z krzywej standardowej określić odpowiednie stężenie.
4. Metoda automatyczna: Wyniki w IFU można obliczyć automatycznie przy użyciu dopasowania 4 PL (4-parametrowego logistycznego). Zalecaną metodą jest dopasowanie 4-parametrowe logistyczne. Inne funkcje obróbki danych mogą dać nieco inne wyniki.
5. Stężenie w próbkach można odczytać bezpośrednio z tej krzywej standardowej. Próbkę, w której stężenie jest wyższe od stężenia w najwyższym standardzie, należy dodatkowo rozcieńczyć lub oznaczyć jako >128 pg/ml. Przy obliczaniu wyników stężenia należy uwzględnić ten współczynnik rozcieńczenia.



6.4. Przykładowa Krzywa Standardowa

Poniżej przedstawiono typowy przykład krzywej standardowej, mającej charakter jedynie ilustracyjny.

Standard	Jednostki gęstości optycznej (450 nm)
Standard 0 (0 pg/ml)	0,09
Standard 1 (4 pg/ml)	0,19
Standard 2 (16 pg/ml)	0,44
Standard 3 (32 pg/ml)	0,78
Standard 4 (64 pg/ml)	1,14
Standard 5 (128 pg/ml)	2,48

7. KONTROLA JAKOŚCI

Dobra praktyka laboratoryjna wymaga oznaczania kontroli przy okazji sporządzania każdej krzywej standardowej. Należy oznaczyć statystycznie istotną liczbę kontroli w celu wyznaczenia wartości średnich i dopuszczalnych przedziałów wartości dla zagwarantowania właściwej charakterystyki testu.

Zaleca się stosowanie próbek kontrolnych, zgodnie z krajowymi przepisami prawnymi. Zaleca się stosowanie próbek kontrolnych w celu zagwarantowania codziennej wiarygodności wyników oznaczenia. Należy oznaczać próbki kontrole zawierające zarówno prawidłowe, jak i patologiczne stężenia analizowanej substancji.



W certyfikacie kontroli jakości dołączonym do zestawu podano stężenia LH w odpowiednich kontrolach.

Podane wartości i przedziały wartości zawarte w certyfikacie kontroli jakości zawsze dotyczą zestawu o danym numerze serii i nie należy posługiwać się nimi do bezpośredniego porównywania wyników.

Zaleca się także uczestnictwo w krajowych lub międzynarodowych programach oceny jakości w celu zagwarantowania dokładności wyników.

Należy stosować odpowiednie metody statystyczne do analizy wartości kontrolnych. Jeżeli wyniki oznaczenia nie mieszczą się w ustalonych dopuszczalnych przedziałach wartości dla próbek kontrolnych, wyniki uzyskane dla próbek pacjenta należy uznać za niewiarygodne.

W takim przypadku proszę sprawdzić następujące kwestie: przyrządy do pipetowania i stopery, czynnik, daty ważności odczynników, warunki przechowywania i inkubacji, metody aspiracji i wymywania.

Po sprawdzeniu wspomnianych wyżej kwestii i nie znalezieniu błędu, proszę skontaktować się ze swoim dystrybutorem lub bezpośrednio z firmą DRG.

8. OGRANICZENIA PROCEDURY

Wiarygodne i powtarzalne wyniki uzyska się, gdy procedurę testu przeprowadzono wg pełnego zrozumienia instrukcji z ulotką i przestrzegania dobrej praktyki laboratoryjnej. Wszelkie niewłaściwe obchodzenie się z próbkami lub modyfikacje tego testu mogą wpłynąć na wyniki.

8.1. Substancje zakłócające

Hemoglobina (do mg/ml), bilirubina (do mg/ml) oraz triglicerydy nie mają wpływu na wyniki oznaczenia



9. ASPEKTY PRAWNE

9.1. Wiarygodność wyników testu

Oznaczenie musi być wykonane ściśle według instrukcji użytku producenta. Dodatkowo użytkownik musi ściśle przestrzegać zasad GLP (Dobrej Praktyki Laboratoryjnej) i innych mających zastosowanie standardów krajowych i/lub przepisów prawnych. Ma to szczególne znaczenie w zakresie stosowania kontrolnych odczynników. Ważne jest, aby w procedurze oznaczenia zawsze uwzględnić wystarczającą liczbę kontroli dla zweryfikowania dokładności i precyzji oznaczenia.

9.2. Odpowiedzialność

Wszystkie modyfikacje niniejszego zestawu testowego i/lub wymiana lub wymieszanie jakichkolwiek składników z różnych serii testów mogą mieć niekorzystny wpływ na uzyskane wyniki i wiarygodność całego testu. Takie modyfikacje i/lub wymiany czynią każde żądanie wymiany zestawu testowego bezzasadnym.

Roszczenia składane w związku z błędną interpretacją wyników badań laboratoryjnych są także bezzasadne. W przypadku każdego roszczenia odpowiedzialność producenta nie będzie przekraczać wartości zestawu testowego. Producent nie ponosi odpowiedzialności za żadne uszkodzenie zestawu testowego w czasie transportu.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Imai T, Miyazaki H, Hirose S, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA for human renin precursor. Proc. Natl. Acad. Sci. (1983) 80, 7405–7409.
2. Reudelhuber TL, Ramla D, Chiu L, et al. Proteolytic processing of human prorenin in renal and non-renal tissues. Kidney Int. (1994) 46, 1522–1524.
3. Neves FA, Duncan KG, Baxter JD. Cathepsin B is a prorenin processing enzyme. Hypertension (1996) 27, 514–517.
4. Müller DN, Luft FC. Direct renin inhibition with aliskiren in hypertension and target organ damage. Clin J Am Soc Nephrol. (2006) 1, 221-8.



-
5. Toffelmire EB, Slater K, Corvol P, et al. Response of plasma prorenin and active renin to chronic and acute alterations of renin secretion in normal humans. Studies using a direct immunoradiometric assay. *J Clin Invest.* (1989) 83, 679–687.
 6. Carey RM, Padia SH. Angiotensin AT2 receptors: control of renal sodium excretion and blood pressure. *Trends Endocrinol Metab.* (2008) 19, 84-7.
 7. Koeppen BM, Stanton BA. *Renal Physiology* (4th ed.). Philadelphia, PA. Mosby Physiology Monograph Series, 2007.
 8. Navar LG, Inscho EW, Majid DSA, et al. Paracrine regulation of the renal microcirculation. *Physiol. Rev.* (1996) 76, 425–536.
 9. Müller MW, Todorov V, Krämer BK, Kurtz A. Angiotensin II inhibits renin gene transcription via the protein kinase C pathway. *Pflugers Arch.* (2002) 444, 499-505.
 10. Spät A, Hunyady L. Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiol Rev.* (2004) 84, 489-539.
 11. Nguyen G., Delarue F., Burcklé C., et al. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest.* (2002) 109, 1417–1427.
 12. Pitarresi TM., Rubattu S, Heinrikson R, Sealey JE. Reversible cryoactivation of recombinant human prorenin. *J.Biol.Chem.* (1992) 267, 11753-9.
 13. Nicar MJ. Specimen processing and renin activity in plasma. *Clin. Chem.* (1992) 38, 598.