

m/rIGFBP-3 - ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von
**Maus- und Ratten-
Insulin-like Growth Factor Bindungsprotein-3**
Deutsch

Enzyme Immunoassay for quantitative Determination of
**Mouse- and Rat-
Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3**
English

**Nur zu Forschungszwecken!
Nicht zur diagnostischen Anwendung geeignet.**

**For Research Use Only.
Not for use in diagnostic procedures.**



REF E031

**mediagnost**[®]

Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH



: Aspenhastr. 25 • D-72770 Reutlingen / Germany
Telefon: + 49 - (0) 7121 51484-0 • Fax: + 49 - (0) 7121 51484-10
E-Mail: contact@mediagnost.de • <http://www.mediagnost.de>

Symbols/ Symbole /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ symbolen/ Symboler/ Symboler/Symbole/ Szimbólumok/ Symboly/ Symboly/ Символи/ Sümbolid/ Σύμβολα/ Simboluri/ Simboli/ Symbolit

DIN EN ISO 15223-1



Expiry date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Data di scadenza/ Fecha de caducidad/ Data de validade/ Uiterste gebruiksdatum/ Udløbsdato/ Bäst före-datum/ Termin ważności/ Lejárati idő/ Čas expirácie/ Doba expirace/ Срок на годност/ Aegumiskuupäev/ Ημερομηνία λήξης/ Data de expirare/ Rok uporabe/ Viimeinen käyttöpäivä



Consider instructions for use/ Bitte Gebrauchsanweisung beachten/ Consultez la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las instrucciones de uso/ Respeitar as instruções de utilização./ A.u.b de gebruiksaanwijzing volgen/ Se brugsanvisningen/ Läs anvisningarna före användning/ Proszę przeczytać instrukcję obsługi/ Vegye figyelembe a használati utasításban foglaltakat/ Postupujte podľa pokynov na použitie/ Dodržujte návod k použití/ Моля, спазвайте инструкцията за употреба/ Palun järgige kasutusjuhendit./ Λάβετε υπόψη σας τις οδηγίες χρήσης/ Vă rugăm să respectați instrucțiunile de utilizare/ Upošteвайте navodila za uporabo!/ Lue käyttöohje huolellisesti!



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/ Partisatskod/ Numer serii/ Tétel-sarzs szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/Partii – partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-număr lot/ Številka serije/ erä



Manufactured by/ Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/Fabricado por/ Fabricado por/ Vervaardigd doo/Fabrikation af /Tillverkad av/ Wyprodukowane przez/ Gyártotta / Vyrobené/ Vyrobeno v/ Производител/ Tootja/ Κατασκευάζεται από/ Proodus de/ Proizvajalec/ Valmistaja



Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referência/ Referentienummer/ Referencennummer /Beställningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/Katalógové číslo/ Objednací číslo/Καταλογен номер/Tellimisnumber/ Αρ. παραγγελίας/Număr comandă/ Številka naročila/ viite tai tilausnumero



Store at between/ Lagerung bei zwischen/ Conserver à entre/ Conservare a tra/ Conservar a temp. Entre/ Armazenar entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevares mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezi/ Температурно ограничение/ Säilitada temperatuuriidel/ Φύλαξη σε θερμοκρασία/ Depozitare între/ Skladiščenje med/ Säilytys x-y Celsiusasteen lämpötilassa



Contains sufficient for x tests/ Inhalt ausreichend für x Tests/ Contient suffisant pour x tests/ Contenuto sufficiente per x test/ Contenido suficiente para x pruebas/ Conteúdo suficiente para x testes/ Bevat voldoende voor x bepalingen/ Ineholder tilstrækkeligt til x prøver/ Innehållet räcker till x analyser/ Zawartość na x testów/ Tartalma x teszt elvégzésére elegendő/ Obsahuje materiál pre x testov / Obsah dostačuje pro x testů/ Съдържание достатъчно за x тестове/ Sisust jätkub x katse jaoks/ Το περιεχόμενο επαρκεί για x δοκιμές/ Conținut suficient pentru x teste/ Vsebina zadostuje za x preizkusov/ Sisältö riittää x testille



Keep away from sunlight/ Nicht dem Sonnenlicht aussetzen/ Conserver à l'abri de la lumière/ Conservare al riparo della luce solare/ No exponer a la luz solar/ Proteger da luz solar/ Niet aan zonlicht blootstellen/ Må ikke udsættes for sollys/ Utsätt inte för solljus/ Nie wystawiać na słońce/ Napfénytől távol tartandó/ Nevystavovat' slnečnému svetlu/ Nevystavovat slunečnímu světlu/ Да се предпазва от слънчева светлина/ Kaitsta otsese päikesekiirguse eest/ Κρατήστε το μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία/ Τηνεți departe de lumina soarelui/ Ne izpostavljajte sončni svetlobi/ suojaa auringonvalolta



Incubation time/ Inkubationszeit/ Temps d'incubation/ Tempo d'incubazione/ Tiempo de incubación/ Tempo de incubação/ incubatietijd/Inkubationstid/ inkubationstid/ Czas inkubacji/ Inkubációs idő/ Inkubačná lehota/ Inkubační doba/ Инкубационен период/ Inkubatsiooniaeg/ Χρόνος επώασης/ Timp de incubare/ Inkubacijska doba/ inkubaatioaika



incubate at / Inkubation bei/ Incuber à/ Incubare a/incubar a/Incubar a/ incubatietemperatuur/ Inkubation ved/ inkubation vid/ Inkubacja przy/ Inkubáció hőmérséklete/Inkubácia pri/ Inkubace při/Инкубира се при/ Inkubatsioon temperatuuril/ Επώαση στους/ Incubare la/ Inkubacija pri/ inkubaatiolämpötila



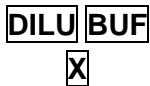
Shaking/ Schütteln/ Mélanger/ Agitare/ Agitar/ Agitação/ Schudden/ Ryster/ Skaka/ Wstrząsanie/ Rázás/ Pretrepať/ Protřepat/ Разклащане/ Raputada/ Ανακινήστε/ Vibrare/ Stresite/ Sekoita
Mikrotiterplate/ Mikrotiterplatte/ plaque de microtitrage/ Piastra di microtitolazione/ Placa de microtitulación/ Placa de Microtitulação/ microtiterplaat/ Mikrotiterplade/ mikrotiterplatta/ microtiterplaat/ Płytko microtiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiiterplaat/ Τρυβλίο μικροπιτλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitriska plošča/ Mikrotitrauslevy



Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituir en/ Reconstituir em/ reconstituieren in/ Rekonstituér i/ rekonstituera/ Rekonstytuować w/ Helyreállítás/ Znovu pripravit' za/ Znovu připravit za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti / Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ rekonstituoi
Sample/ Probe /Echantillon/ campione/ Muestra/ Amostra/ monster/ Prøve/ prov/ Próbka/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probă/ Vzorec/ Näyte



AK Antibody and Enzyme Conjugate/ Antikörper und Enzym Konjugat/ anticorps conjuguée et conjugué enzymatique/ Coniugato di anticorpo ed enzima/ Conjugado de anticuerpos y enzimas/ Conjugado Anticorpo-Enzima/ antilichaam- en enzymconjugaat/ Antistoffer og enzym-konjugat/ antikropp- och enzymkonjugat (antikropp och enzym, konjugat)/ Konjugat antyciał i enzymów/ Antitest és enzim páros/ Protílátkový a enzymatický konjugát/ Protílátkový a enzymatický konjugát/ Антицяло и ензим конюгат/ Antikehad ja ensüümi konjugaat/ Σύμπλοκο αντισώματος-ενζύμου/ Compuși din anticorpi și enzime/ Antitelesa in konjugat encima/ Vasta-aine ja entsümi konjugaati



VP Dilute in Buffer X/ Verdünnen in Puffer X/ Diluer dans le tampon X/ Diluire nel tampone X/ Diluir en tampón X/ Diluir no Tampão X/ verdunnen in buffer X/ Fortyndes i buffer X/ spädi i buffert X/ Rozcieńczenie w buforze X/ Hígítás X pufferben/ Riedit' v pufri X/ Ředit v pufru X/ Разреждане в буфер X/ Lahjendada puhvriss X/ Αραιώστε σε ρυθμιστικό διάλυμα X/ Diluați în tamponul X/ Razredčiti v pufru X/ laimennetaan x puskuriin



A-G Standard X /Standard X/ Etalon X/ Standard X/ Estándar X/ Standard X/ standaard X/ Standard X/ standard X/ Standard X/ Standard X/ Standard X/ Standard X/ Πρότυπο X/ Standard X/ Standardni

	X/ Standardix
BUF X	VP Buffer / puffer/ Tampon / Tampone / Tampón /Tampão / buffer/ buffer/ buffert/ Bufor / puffer/ pufer/ pufr/ бυφερ/ puhver/ ρυθμιστικό διάλυμα / Tampon /pufer/ puskuriliuos
Control	KS1/KS2 Control Serum / Kontrollserum/ Contôle sérique/ Siero di controllo/ Suero de control/ Soro de Controlo/ controleserum/ Kontrolserum/ Kontrollserum/ Serum kontrolne/ Ellenőrző szérum/ Kontrolné sérum/ Kontrolni sérum/ Контролен сeрyм/ Kontrollseerum/ Ορός ελέγχου/Ser de control/ Kontrolni serum/ Kontrolli seerumi
WASHBUF 20x	WP Washing Buffer Concentrate/ Waschpufferkonzentrat/ Tampon de lavage conc./ Tampone di lavaggio concentrato/ Tampón de lavado concentrado/ Tampão de Lavagem Concentrado/ wasbuffer, geconcentreerd/ Vaskebufferkoncentrat/ Vaskebufferkoncentrat/ tvättbuffertkoncentrat/ Bufor płukania koncentrat/ Mosópuffer koncentrátum/ Koncentrát vymývacieho pufru/ Концентрат на промивен бυφερ/ Pesupuhvri kontsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralneга pufru/ Pesuliuositiiviste
WASHBUF	Washing Buffer / Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón de lavado/Tampão de Lavagem/ wasbuffer/ Vaskebuffer/ tvättbuffert/ Bufor płukania/ Mosópuffer/ Vymývací pufer/ Vymývací pufr/ Промивен бυφερ/ Pesupuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare /Izpiralni pufer/ Pesuliuos
SUBST TMB	S Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ substraat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Szubsztrátum/ Substrát/ Substrát/ Субстрат Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraattiliuos
H₂SO₄	SL Stop Solution/ Stopp Lösung/ Stop Solution/ Soluzione di stop/ Stop Solución/ Solução Stop/ stopoplossing/ Stopopløsning/ Stopplösning/ Stop roztwór/ Megállító oldat/ Roztok na ukončenie/ Roztok pro ukončení/ Стопирач разтвор/ Stopp-lahus/ Διάλυμα διακοπής/ Soluție de oprire/ Stop raztopina/ Pysäytysliuos
TAPE	Cover Plate with sealing tape /Platte abkleben/ Recouvrir la microplaque avec bande adhésive/ Coprire la piastra con nastro adesivo/ Cubrir la placa con una cinta adhesiva/ Cobrir a Placa com fita adesiva/ plaatje met tape afdekken/ Afdækningsplade med tape/ maskera platta/ Odkleić płytkę/ Tányér leragasztása/ Oblepit podložku lepiacou páskou/ Olepit podložku lepící páskou/ Плака с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerikleerplindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperiți placa cu o bandă adezivă/ Prelepiti ploščo/ Peitä mikrotitrauslevy oheisella teipillä
MEASURE	Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590nm)/Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)./ Measure lábsorbance en l'espacce de 30 min à450 nm avec ≥590nm longueur d'onde pour référence/Misurazione entro 30 min. a 450 nm (filtro di riferimento ≥ 590 nm)./ Medición de la placa dentro de los siguientes 30 min a 450 nm (filtro de referencia ≥ 590nm)/ Medir a placa dentro de 30 min a 450 nm (Filtro de referência ≥590nm)/ Binnen 30 minuten bij 450 nm meten (referentiefilter ≥ 590 nm)./ Mål plade i løbet af 30 min ved nm (referencefilter ≥590nm)/ Mät inom 30 min vid 450 nm (referensfilter ≥ 590 nm)./ Pomiar w ciągu 30 min przy 450 nm (filtr odniesienia ≥ 590 nm)./ Ki mérés 30 percen belül 450 nm-nél (referenciaszűrő ≥ 590 nm)./ Merat' 30 minut pri 450 nm/Měřit 30 minut při 450 nm/ Отчитане в рамките на 30 min при 450 nm (референтен филтър ≥ 590 nm)./ Měřtmine 30 min jooksul 450 nm korral (võrdlusfilter ≥ 590 nm). Μέτρηση εντός 30 min στα 450 nm (φίλτρο αναφοράς ≥ 590 nm)./ Măsurare în decurs de 30 min la 450 nm (filtru de referință ≥ 590 nm)./ Izmerite ploščico v 30 min pri 450 nm (referenčni filter ≥590nm) / Mittaa 30 minuutin aikana 450 nm:ssä (referenssi suodatin ≥ 590 nm)
Literatur	Literature/ Literatur/ Bibliographie/ Letterario/ Bibliografia/ Literatura documentação/ literatuur/ Litteratur/ litteratur/ Literatura/ Irodalom/ Literatúra/ Literatura/ Литература// Kirjandus/ Βιβλιογραφία/ Bibliografie/ literatura/ Lähdeluettelo
International Test description	International test description/ internationale Testanleitung/ description internationale de test/ Istruzioni per il test internazionali/ Descripción de ensayo internacional/ Descrição internacional do teste/ internationale testbeschrijving/ internationell testbeskrivning/ Opis testu międzynarodowego/ nemzetközi teszt-útmutató/ Medzinárodný návod k testu/ Mezinárodní návod k testu/ rahvusvaheline katse kirjeldus/ Διεθνείς οδηγίες για εργαστηριακές δοκιμές/ instrucțiuni internaționale pentru testare/ mednarodna navodila za preizkus/ Kansainvälinen käyttöohje
End	in all required wells/ in allen benötigten Vertiefungen/ dans tous les godets requis/ in tutti i pozzetti richiesti/ en todos los pozos requeridos/ em todos os tubos necessários/ in alle nodige putjes/ i alle nødvendige brønde/ i alla nödvändiga brunnar/ we wszystkich potrzebnych wgłębieniach/ minden szükséges forrásban/ vo všetkých potrebných miestach/ ve všech potřebných místech/ във всички необходими ямки/ kõigis vajalikes süvendites/ σε όλες τις απαραίτητες κοιλότητες/ în toate cavitățile necesare/ v vseh zahtevanih vdolbinah /kaikkiin tarvittaviin mikrotitrauslevyn syvennyksiin

Nur zum In-vitro-Gebrauch.

Nur zum Gebrauch durch Fachpersonal.

Nur zu Forschungszwecken.

Nicht für humane oder tierische, therapeutische oder diagnostische Zwecke.

Vor Gebrauch ist die gesamte Packungsbeilage zu lesen!

For in vitro use only!

For Research Use Only!

For professional use only!

CAUTION: Not for human or animal therapeutic or diagnostic use.

Read entire protocol before use!

Symbols/ Symbole /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ symbolen/ Symboler/ Symboler/Symbole/ Szimbólumok/ Symboly/ Symboly/ Символи/ Sümbolid/ Σύμβολα/ Simboluri/ Simboli/ Symbolit	2
---	---

Packungsbeilage Deutsch

TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN + EINSATZMÖGLICHKEITEN	5
EINFÜHRUNG	5
EINSATZMÖGLICHKEITEN	5
ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG	5
PROBEN: EIGNUNG, VORBEREITUNG UND LAGERUNG	7
MATERIALIEN	8
Inhalt der Testpackung	8
Zusätzlich benötigte Materialien	8
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	9
TECHNISCHE HINWEISE	10
TESTDURCHFÜHRUNG	11
AUSWERTUNG	12
Berechnung der Standardkurve	12
TECHNICAL FEATURES+APPLICATIONS	14

Package Insert English

INTRODUCTION	14
INTENDED USE	14
PERFORMANCE CHARACTERISTICS AND VALIDATION	14
SPECIMEN COLLECTION, PREPARATION AND STORAGE	15
REAGENTS PROVIDED	16
MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	16
WARNINGS AND PRECAUTIONS	17
TECHNICAL NOTES	18
ASSAY PROCEDURE	19
CALCULATION OF RESULTS	20
ESTABLISHING THE STANDARD CURVE	20
LITERATURE / LITERATUR	22
KURZANLEITUNG–MEDIAGNOST MAUS-/ RATTEN-IGFBP-3 ELISA E031	24
SUMMARY – MEDIAGNOST MOUSE- / RAT-IGFBP-3 ELISA E031	26

PACKUNGSBEILAGE DEUTSCH

TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN + EINSATZMÖGLICHKEITEN

- ◆ Quantitativer Nachweis von Maus/Ratten IGFBP-3 ohne Probenvorbehandlung
- ◆ Inter-Assay Varianz 9,06 % und Intra-Assay Varianz 4,63 %
- ◆ Analytische Sensitivität von 0,018 ng/mL, (18 pg/mL, bzw. 1,8 pg/Well)

EINFÜHRUNG

Wachstumshormon, Insulin-like Growth Factors und deren Bindungsproteine bilden ein endokrines System, das nicht nur das Längenwachstum in Menschen reguliert, sondern auch viele andere physiologische und pathophysiologische Prozesse wie den Energiestoffwechsel oder das Wachstum von Tumoren beeinflusst.

Die Wirkung des Wachstumshormons erfolgt hauptsächlich durch die Produktion von IGF-I. IGF-I wird nicht nur von der Leber, dem Hauptsyntheseort für zirkulierendes IGF-I, sondern auch von anderen Geweben gebildet. Die biologische Verfügbarkeit von IGF wird dabei vom Bindungsprotein (IGFBP) reguliert. Daher sind die Konzentrationen an freiem IGF im menschlichen Blut sehr gering. Erst nach der proteolytischen Spaltung der Bindungsproteine (IGFBP 1-7), werden IGFs freigesetzt und können an den IGF-Rezeptor, einem Tyrosinkinaserzeptor, binden und diesen aktivieren. Die aktivierten Rezeptoren initiieren eine Reihe intrazellulärer Signalkaskaden. Einige der IGFBPs regulieren nicht nur die Verfügbarkeit von IGFs, sondern haben zusätzlich auch IGF-unabhängige Wirkungen in der Zellphysiologie.

IGFBP-3 ist im Blut das häufigste IGFBP, es ist daher von großer Bedeutung für die Regulation der Bioverfügbarkeit von IGF. Dies zeigt sich auch an der Bedeutung der IGFBP-3 Serumkonzentration in der Wachstumsstörung-Diagnostik. Eine Regulation erfolgt z.B. auch über die Ernährungssituation, verschiedene Diäten etwa beeinflussen die IGFBP-3 Konzentrationen (Bielohuby et al, 2010). Weiterhin wurde gezeigt, dass IGFBP-3 Apoptose induzieren kann, das Tumorwachstum fördert und die Migration von Zellen inhibiert - abhängig vom Gewebe und Tumorstadium.

Maus-/Rattenmodelle für in vivo Experimente werden oft für Untersuchungen von IGF-abhängigen und unabhängigen Wirkungen von IGFBP-3 eingesetzt, insbesondere im Bereich der Tumorforschung. Für diesen Zweck bietet Mediagnost mit dem E031 ein verlässliches und sensitives Testsystem für die Bestimmung von IGFBP-3 in Maus- und Rattenproben.

EINSATZMÖGLICHKEITEN

Dieser Enzymimmunoassay Kit ist für die quantitative Bestimmung von IGFBP-3 Konzentrationen in Maus- und Ratten- Serum und Plasma, sowie in Zellkulturmedium in wissenschaftlichen Untersuchungen einsetzbar.

ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG

Der Mediagnost ELISA für Maus/Ratten-IGFBP-3 E031 ist ein so genannter Sandwich-Assay unter Verwendung zweier spezifischer und hochaffiner Antikörper. Der an die Mikrotiterplatte gekoppelte erste Antikörper bindet das IGFBP-3 aus der Probe. Im nachfolgenden Schritt bindet am so immobilisierten Maus/Ratten-IGFBP-3 der zweite spezifische, biotinylierte Antikörper und daran bindet ein Streptavidin-Peroxidase-Enzymkonjugat. In der abschließenden Substratreaktion wird hochspezifisch der Farbumschlag katalysiert, quantitativ abhängig vom m/rIGFBP-3-Gehalt der Proben.

Die Standards des ELISA E031 bestehen aus **rekombinantem Maus IGFBP-3** in Konzentrationen von **0,078; 0,156; 0,313; 0,625; 1,25; 2,5 und 5 ng/mL**.

Analytische Sensitivität:

Leerwert in 21facher Bestimmung plus 2fache Standardabweichung = 0,018 ng/mL

Spezifität

Seren der unten genannten Spezies wurden 1:301 verdünnt im Testsystem eingesetzt. Es konnte keine Kreuzreaktivität nachgewiesen werden mit:

Kaninchen, Katze, Huhn, Meerschweinchen, Ziege, Schaf, Pferd, Esel, Schwein, Hund, Rind.

Kreuzreaktivität mit rekombinantem humanem IGFBP3: 0,03%

Die Wiederfindung von rek. Maus IGFBP-3 wurde in **Zellkulturmedium, DMEM** mit 89,4%, in ZKM incl. 5% FCS mit 92,6% bestimmt.

ZKM ist daher als Probenmatrix für den E031 geeignet.

Tabelle 1: Verdünnungslinearität (hier: typische Ergebnisse zweier verschiedener Mausseren)

Verdünnung:	Probe 1 (rekalkuliert, ng/mL)	Probe 2 (rekalkuliert, ng/mL)
1:100	351,8	367,6
1:200	369,1	414,5
1:400	384,5	423,4
1:800	381,3	411,0
1:1600	379,2	421,9
1 :3200	386,1	455,7
MW / SA / VK%	375,3 / 12,9 / 3,46	415,7 / 28,4 / 6,83

MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient

Die **Inter-** und **Intra-Assay** Variationskoeffizienten sind **kleiner als 9,06 % bzw. 4,63 %** Beispielhafte Bestimmungen sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 2 : Inter-Assay-Varianz (n=61 bzw. 56)

	Mittelwert (ng/mL)	Standardabweichung (ng/mL)	VK (%)
Probe 1	484.3	38.50	8,00
Probe 2	343.6	31,15	9,06

Tabelle 3: Intra-Assay-Varianz (n=16)

	Mittelwert (ng/mL)	VK (%)
Probe 1	123,8	4,63
Probe 2	395,0	1,99

PROBEN: EIGNUNG, VORBEREITUNG UND LAGERUNG

Geeignete Proben

Geeignet sind **Maus-/Ratten-Serum** und **EDTA-** und **Citrat-Plasma Proben** (hier die Verdünnung im Primärröhrchen beachten). **Heparin-Plasmaproben** werden mit etwa 15% tieferen Werten gefunden. Des Weiteren ist Zellkulturmedium als Probenmatrix einsetzbar.

Generell sollten Proben so schnell wie möglich nach der Abnahme gekühlt werden. Falls zwischen Abnahme und Bestimmung ein längerer Zeitraum liegt, sollten die unverdünnten Proben bei -20°C in fest verschließbaren Plastikgefäßen aufbewahrt werden. Bei -20°C sind die Proben mindestens 2 Jahre haltbar (Die Lagerung von Proben, über einen Zeitraum von 2 Jahren bei -20°C , zeigte keinen Einfluss auf den Messwert). Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Proben sollte minimiert werden (gegebenenfalls subaliquotieren) Dreimaliges Auftauen und Einfrieren von Proben zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf den Messwert.

Die hohe Sensitivität des Assays erlaubt m/rIGFBP-3 Messungen in kleinen Probenvolumina, deren Größe eher durch die Pipettiergenauigkeit als durch die Menge von m/rIGFBP-3 begrenzt wird. Für die meisten Untersuchungen (z.B. Serum- oder Plasmaproben und keine Extremwerte zu erwarten) sollten **Verdünnungen von 1:301 in Verdünnungspuffer VP geeignet** sein, damit ergibt sich ein Assay-Bereich von 0,018 bis 1505 ng/mL. Gegebenenfalls kann, je nach individuell erwarteten m/rIGFBP-3-Werten, geringer oder stärker in Verdünnungspuffer VP verdünnt werden.

Vorschlag Verdünnungsprotokoll:

1,5 mL **Verdünnungspuffer VP** in PE-/PP-Gefäße vorlegen (bei größeren Serien empfiehlt sich hierfür die Verwendung eines Multi-Steppers), dazu **5 μL Serum-** oder Plasma pipettieren (Proben sind 1:301 verdünnt) und **jeweils sofort mischen**. Nach dem Mischen **bitte innerhalb von 1 Stunde** von dieser Lösung **100 μL pro Bestimmung** im Assay einsetzen.

MATERIALIEN

Inhalt der Testpackung

1)	MTP	Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen, die in 12 abnehmbare Streifen à 8 Vertiefungen (einzeln abbrechbar) aufgeteilt ist. Die Platte ist mit einem Antikörper gegen Maus/Ratten-IGFBP-3 beschichtet.
2)	STD	Standards A-G, 750 µL , lyophilisiert, enthalten rekombinantes Maus-IGFBP-3. Die Standardkurve deckt einen Bereich von 0,078 bis 5 ng/mL (0,078, 0,156, 0,313, 0,625, 1,25, 2,5 und 5 ng/mL) mIGFBP-3 ab, die einzelnen Standards werden mit je 750 µL Probenpuffer VP rekonstituiert. Für den Assay werden jeweils 100 µL pro Vertiefung eingesetzt.
3)	BUF	Verdünnungspuffer VP, 125 mL, gebrauchsfertig.
4)	Control	Kontrollseren KS1 und KS2, je 100 µL , lyophilisiert. KS1 enthält Maus-Serum und KS2 Ratten-Serum. Beide müssen in je 100 µL Verdünnungspuffer VP rekonstituiert werden. Die m/rlIGFBP-3 Soll-Konzentrationen und die Schwankungsbereiche sind auf dem Zertifikat angegeben. Sie sollen im Assay in den gleichen Verdünnungen wie die jeweiligen Proben eingesetzt werden.
5)	Ab	Antikörperkonjugat AK, 12 mL , enthält biotinylierten anti-Maus/Ratten-IGFBP-3 Antikörper, gebrauchsfertig.
6)	CONJ	Enzymkonjugat EK, 12 mL , enthält POD (Meerettich-Peroxidase)-markiertes Streptavidin, gebrauchsfertig.
7)	WASHBUF 20x	Waschpuffer WP, 50 mL , 20-fach konzentrierte Lösung, bitte vor Gebrauch 1:20 mit A.dest. oder entmineralisiertem Wasser verdünnen (z.B. den gesamten Flascheninhalt von 50 mL im Standzylinder auf 1000 mL auffüllen). Achtung: endverdünnt ist der Waschpuffer nur 4 Wochen haltbar, bitte nur nach Bedarf ansetzen.
8)	SUBST	Substrat S, 12 mL , gebrauchsfertig, Meerettich-Peroxidase-(POD)-Substrat, stabilisiertes H ₂ O ₂ -Tetramethylbenzidin
9)	H ₂ SO ₄	Stopplösung SL, 12 mL , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure
10)		Abdeckfolie für Mikrotiterplatten, 2 Stück, selbstklebend

Zusätzlich benötigte Materialien

Destilliertes oder entmineralisiertes Wasser zum Verdünnen des Waschpuffers WP, 950 mL
 Messbehälter für Verdünnung von Waschpuffer
 Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen
 Vortex-Mischgerät
 Mikrotiterplattenschüttler (350 rpm)
 Mikrotiterplattenwasher (empfohlen)
 Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und ≥590 nm
 Polyethylen PE/ Polypropylen PP Röhrchen zum Verdünnen der Proben

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Mediagnost Kit ist nur für In-vitro Gebrauch und nicht zur inneren Anwendung bei Mensch und Tier geeignet. **Nur zum Gebrauch durch Fachpersonal.** Dieses Produkt darf nur exakt wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben eingesetzt werden. Mediagnost GmbH kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht, soweit keine gesetzliche Regelung anderes besagt.

Bitte verwenden Sie keine abgelaufenen, offensichtlich beschädigten, mikrobiell kontaminierten oder ausgelaufenen Reagenzien.

VORSICHT: Dieser Kit enthält Material humanen und/oder tierischen Ursprungs. Die Bestandteile des Kits sind so zu handhaben, als ob sie infektiös wären.

Angemessene Vorsichtsmaßnahmen und die Regeln der guten Laborpraxis müssen bei Lagerung, Gebrauch und Entsorgung der Bestandteile des Kits eingehalten werden. Die Entsorgung der Bestandteile des Kits muss nach den örtlichen Vorschriften erfolgen.

Tierisches Serum: Maus / Ratte

in folgenden Komponenten enthalten: **KS1 und KS2**

2-Methyl-4-Isothiazolin-3-one

als Konservierungsmittel <0.01% in folgenden Komponenten enthalten: **AK, EK, VP**

R34	Verursacht Verätzungen
R43	Kann bei Hautkontakt zur Sensibilisierung führen
S26	Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen
S36/37	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung und –handschuhe tragen.
S45	Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen

5-Chloro-2-Methyl-2H-Isothiazolin-3-one and 2-methyl-2H-Isothiazol-3-one

als Konservierungsmittel <0.01% in folgenden Komponenten enthalten: **AK, EK, VP, WP**

R36/38	Reizend für Augen und Haut
R43	Kann bei Hautkontakt zur Sensibilisierung führen
S26	Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen
S28.1	Im Falle von Hautkontakt sofort mit viel Wasser waschen

Substratlösung (S)

Das TMB-Substrat (S) enthält 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin.

R20/21/R22	Gesundheitsschädlich bei Inhalation, Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
R36/37/38	Reizend/Irritierend für Augen, Haut und Atmungssystem
S26	Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen
S36/37	Geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

Stopplösung (SL)

Die Stopplösung enthält 0,2 M Schwefelsäure (H₂SO₄)

R36/38	Reizt die Augen und die Haut
S26	Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.
S36/37	Geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

Erste-Hilfe Maßnahmen:

Nach Hautkontakt: Nach Berührung mit der Haut während mindestens 15 Minuten mit genügend Wasser abwaschen. Kontaminierte Kleidung und Schuhe wechseln.

Nach Augenkontakt: Nach Berührung mit den Augen während mindestens 15 Minuten mit genügend Wasser spülen. Ausreichende Spülung durch Spreizung der Augenlider sicherstellen.

Nach Verschlucken: Mund mit Wasser ausspülen, vorausgesetzt die Person ist bei Bewusstsein. Sofort einen Arzt zuziehen.

TECHNISCHE HINWEISE

Der Assay ist strikt nach dem Testprotokoll durchzuführen.

Reagenzien mit unterschiedlichen Lot-Nummern sollten nicht vermischt werden. Die Testplatte und alle Reagenzien sind ungeöffnet lichtgeschützt und bei **2° - 8°C** gelagert mindestens haltbar **bis zum Verfallsdatum (s. Etikett)**.

Die Haltbarkeit der Reagenzien nach dem erstmaligen Öffnen ist bei sachgemäßer **Lagerung für vier Wochen** gewährleistet. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

Alle Komponenten des Kits müssen **vor Gebrauch auf Raumtemperatur** gebracht werden, die evtl. in manchen Puffern vorhandenen Präzipitate müssen vor Gebrauch durch Mischen und Erwärmen wieder gelöst werden.

Inkubation bei Raumtemperatur bedeutet: Inkubation bei 20 - 25°C.

Die Inkubationen sollen geschüttelt bei mittlerer Umdrehungsfrequenz eines für Mikrotiterplatten geeigneten Schüttlers erfolgen. Wir empfehlen 350 rpm. Bauartbedingt können individuell Abweichungen von diesem Wert möglich sein, dann muss die Umdrehungsfrequenz angepasst werden. Zu geringes Schütteln kann durch ungenügende Vermischung der Lösungen zu verringerten optischen Dichten, hohen Streuungen und/oder falschen Werten führen, zu starkes Schütteln dagegen zu erhöhten optischen Dichten und/oder falschen Werten.

Korrektes Waschen ist von grundlegender Bedeutung für den sicheren, richtigen und präzisen Ablauf des Testes. Ungenügendes Waschen ist eine häufige Ursache für nicht valide Testdurchführungen. Mögliche Folgen sind unkontrollierte unspezifische Variationen der gemessenen optischen Dichten, die zu falschen Ergebnisberechnungen der Proben führen können. Mögliche Hinweise darauf sind z.B. hohe Leerwerte und variabel streuende Messwerte.

Zum Waschen muss der mitgelieferte und auf Gebrauchskonzentration verdünnte Waschpuffer verwendet werden. Das Waschvolumen pro Waschzyklus und Vertiefung muss mindestens 300 µL betragen.

Die mögliche Gefährdung durch den Umgang mit zumindest potentiell infektiösem Material muss beachtet werden.

Bei Gebrauch eines speziellen automatischen Mikrotiterplattenwashers ist unbedingt dessen Gebrauchsanweisung zu befolgen. Die Geräteeinstellungen müssen u.a. der Mikrotiterplattengeometrie und den Parametern der Waschspezifikation angepasst werden. Es ist zu beachten, dass die Dispensier- und Absaugkapillaren des Gerätes nicht die Oberfläche der Vertiefungen der Mikrotiterplatte beschädigen. Die verbleibende Restflüssigkeit nach jedem Absaugen muss minimiert werden. Nach Ende des gesamten Waschvorganges sollte die Menge der verbleibenden Restflüssigkeit überprüft und ggfs. verringert werden durch mehrmaliges Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fesselndem Zellstoff.

Manuelles Waschen ist eine gute Alternativoption. Die Waschflüssigkeit kann dabei per Multistepper, Mehrkanalpipette oder auch mit einer Spritzflasche dispensiert werden. Die Waschflüssigkeit kann durch schwingvolles Ausschwenken der Mikrotiterplatte über einem Becken entfernt werden. Falls Absaugvorrichtungen eingesetzt werden, ist darauf zu achten, dass die Oberflächen der Vertiefungen der Mikrotiterplatte nicht beschädigt werden. Nach jedem einzelnen Waschzyklus sollte die verbleibende Restflüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fesselndem Zellstoff gründlich entfernt werden.

Standards und Kontrollen

Die Standards **A – G** und Kontrollseren **KS1 + KS2** werden mit dem im Kit enthaltenen Verdünnungspuffer **VP** rekonstituiert. Es empfiehlt sich zum Rekonstituieren die Reagenzien 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen zu lassen und sie anschließend kräftig mit einem Vortex-Mixer zu mischen. Schaumbildung sollte jedoch vermieden werden.

Die **rekonstituierten Standards A - G und Kontrollen KS1 + KS2 können bei -20°C für 4 Wochen gelagert werden**. Wiederholte Gefrier-/Tauzyklen sind zu vermeiden. 3 Zyklen zeigten in unseren Versuchen keine Auswirkungen. Wenn mehrere unabhängige m/rIGFBP-3-Messungen über

eine längere Periode mit einem Kit geplant sind, wird vorherige Aliquotierung der Komponenten in passende Volumina empfohlen.

Mikrotiterplatte

Nicht verwendete Streifen der **Mikrotiterplatte MTP** sind zusammen mit dem Trockenkissen luftdicht in dem wiederverschließbaren Klippbeutel bei 2° - 8°C zu lagern. Die Streifen nur in dem mitgelieferten Rahmen verwenden.

Waschpuffer

Der 1:20 gebrauchsfertig verdünnte **Waschpuffer WP** ist 4 Wochen bei 2-8°C haltbar, bitte nur nach Bedarf ansetzen.

Substrat

Die Substratlösung **S**, stabilisiertes H₂O₂-Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich–Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

TESTDURCHFÜHRUNG

Bei der **Testdurchführung** sollten Standards **A-G**, Kontrollseren **KS1 + KS2** und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden (z.B. in 15 Minuten). Das Antikörperkonjugat **AK** und Enzymkonjugat **EK** sowie nachfolgend die Substratlösung **S** sollten in der gleichen Reihenfolge und in dem gleichen Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Ebenso sollte die Stopplösung **SL** in der gleichen Reihenfolge und im gleichen Zeitintervall wie die Substratlösung **S** auf die Testplatte gegeben werden. Dies verhindert Variationen und Verschiebungen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

Die Messungen (Standards, Kontrolle und Proben) sollten stets in Doppelbestimmung durchgeführt werden. Um optimale Ergebnisse zu erhalten, ist auf genaues Pipettieren und strikte Befolgung des Testprotokolls zu achten.

- 1) In die Positionen A1/2 je **100 µL Verdünnungspuffer VP** geben, sowie
- 2) in die Positionen B1/2 je **100 µL Standard A (0,078 ng/mL)**,
in die Positionen C1/2 je **100 µL Standard B (0,156 ng/mL)**,
in die Positionen D1/2 je **100 µL Standard C (0,313 ng/mL)**,
in die Positionen E1/2 je **100 µL Standard D (0,625 ng/mL)**,
in die Positionen F1/2 je **100 µL Standard E (1,25 ng/mL)**,
in die Positionen G1/2 je **100 µL Standard F (2,5 ng/mL)**,
in die Positionen H1/2 je **100 µL Standard G (5 ng/mL)**.

Zur Kontrolle der korrekten Durchführung des Tests können je **100 µL** der 1:301 in **Probenpuffer VP** (oder entsprechend der jeweiligen Verdünnung der Proben) verdünnten **Kontrolle KS1 und KS2** in die Positionen A3/4 und B3/4 gegeben werden.

In die restlichen Vertiefungen können je **100 µL der verdünnten Proben** (i.a., 1:301 in **Verdünnungspuffer VP** verdünnt) pipettiert werden.

Die Verdünnungen bitte sofort nach Probenzugabe mischen und innerhalb von 60 Minuten verwenden.

- 3) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **1 Stunde** bei **Raumtemperatur** inkubiert (unter Schütteln 350 rpm).
- 4) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Lösungen abgesaugt und die Platte mit **300 µL Waschpuffer WP** / Vertiefung **fünfmal** gewaschen.
- 5) Nach dem letzten Waschschrift werden **100 µL Antikörperkonjugat AK** in jede Vertiefung pipettiert.
- 6) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **1 Stunde** bei **Raumtemperatur** inkubiert (unter Schütteln 350 rpm).

- 7) Nach Abschluss dieser Inkubation wird die Platte wie in Schritt 4) beschrieben **fünfmal** gewaschen.
- 8) Nach dem letzten Waschschrift werden **100 µL Enzymkonjugat EK** in jede Vertiefung pipettiert.
- 9) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **15 min** bei **Raumtemperatur** inkubiert (unter Schütteln 350 rpm).
- 10) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Lösungen abgesaugt und die Platte mit **300 µL Waschpuffer WP** / Vertiefung **fünfmal** gewaschen.
- 11) In jede Vertiefung werden **100 µL der Substratlösung S** pipettiert.
- 12) Die Platte wird **15 Minuten im Dunkeln** bei **Raumtemperatur** inkubiert.
- 13) Nach Ablauf der Inkubationszeit wird in jede Vertiefung **100 µL Stopplösung SL** pipettiert.
- 12) Die Ausmessung der Farbreaktion erfolgt **innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm (Referenzfilter ≥590 nm)**.

AUSWERTUNG

Berechnung der Standardkurve

Zur Auswertung des Testes sollte gewährleistet sein, dass die Extinktionen des Leerwertes 0,25 Einheiten nicht überschreiten, Standard G sollte dagegen Extinktionen über 1,0 Einheiten erreichen. Proben, die höhere Extinktionen als der Standard G erzielen, liegen außerhalb der Standardkurve, zur sicheren Bestimmung sollten diese Proben in einer zweiten Testdurchführung bei höherer Verdünnung nochmals bestimmt werden.

Die bereitgestellten Standards enthalten folgende **IGFBP-3-Konzentrationen**:

Standard	A	B	C	D	E	F	G
ng/mL	0,078	0,156	0,313	0,625	1,25	2,5	5

- 1) Ermittlung des **Mittelwerts** der optischen Dichte des Leerwertes aus den Doppelbestimmungen (Vertiefung A1/A2).
- 2) Von den Mittelwerten der optischen Dichte der Standardkonzentrationen und der Proben wird der mittlere Leerwert abgezogen.
- 3) Die Standardkonzentrationen (x-Achse) werden gegen die gemessene optische Dichte (y-Achse) aufgetragen.
- 4) Die Berechnung der Standardkurve sollte durch ein statistisches Programm erfolgen, da die Kurve i. Allg. nicht ideal durch eine lineare Regression beschrieben wird. **Ein höhergradiges Polynom, 4-Parameter-Anpassungen** oder **nicht-lineare Regression** sind zur Auswertung geeignet, in manchen Fällen kann eine Spline oder Punkt-zu-Punkt Anpassung angebracht sein.
- 5) Die **Multiplikation** des jeweiligen hiermit **für die Proben berechneten IGFBP-3-Gehaltes mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor der Proben** ergibt die IGFBP-3-Konzentration in ng/mL, Division durch 1000 liefert die Werte in µg/mL bzw. gleichwertig mg/Liter (Bsp: ein Messwert wird mit 3 ng/mL gefunden, Probe war 1:301 verdünnt eingesetzt: $3 \times 301 = 903$ ng/mL, oder 0,903 µg/mL bzw. 0,903 mg/L, je nach gewünschter Einheit).

Die hier beispielhaft gezeigte Standardkurve (Abbildung 1) darf **nicht für die Auswertung** Ihres Testes genutzt werden. Für jeden Test ist eine eigene Standardkurve anzufertigen.

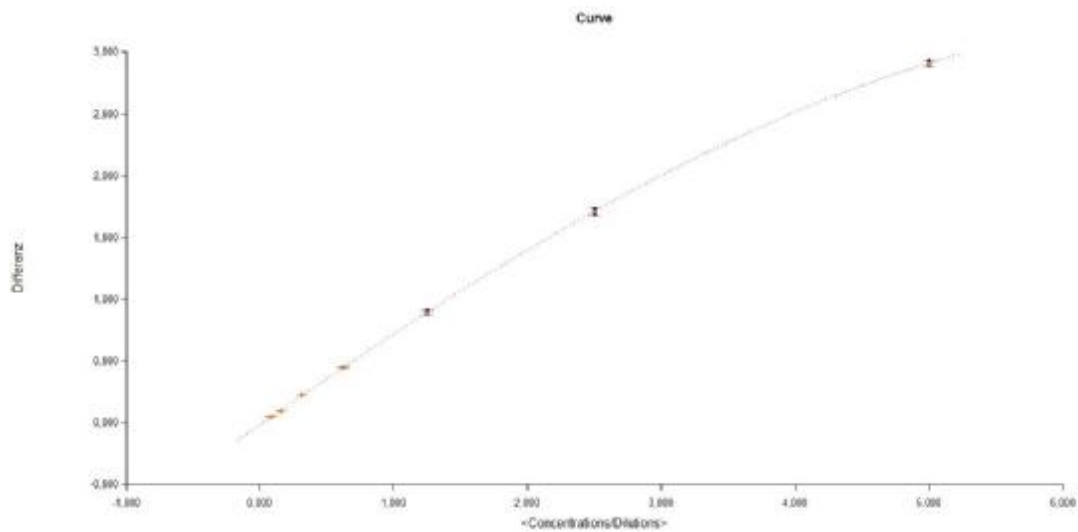


Abb. 1: Typische Standardkurve mit einem Polynom 3. Grades zur Berechnung der Standardkurve

Beispielhafte Berechnung der IGFBP-3– Konzentration einer unverdünnten Probe:
OD 450 nm

Gemessene Extinktion der Probe: 1,0115
Gemessene Extinktion des Nullwertes: 0,1045

Aus der Differenz der Probenextinktion und der Extinktion des Leerwertes (0,91) **berechnet Ihr Auswertungsprogramm** mit der entsprechenden Kurvenanpassung (hier: Polynom 3. Grades) die IGFBP-3 Konzentration der Probe durch Auflösen der Gleichung aus Abb. 1 nach x. In diesem Fall ergibt sich eine IGFBP-3 Konzentration in der Probe nach

$$0,91 = -0,00339 \times X^3 + -0,0166 \times X^2 + 0,753 \times X - 0,0166$$

$$1,265 = X$$

Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor 1:301 ergibt für die Probe 380,7 ng/mL IGFBP-3.

PACKAGE INSERT ENGLISH

TECHNICAL FEATURES+APPLICATIONS

- ◆ Quantitative determination of mouse/rat IGFBP-3 without sample pretreatment
- ◆ Inter-Assay variation of 9.06% and Intra-Assay variation of 4.63%
- ◆ Analytical sensitivity of 0.018 ng/mL (18 pg/mL; 1,8 pg/well)

INTRODUCTION

Growth Hormone, Insulin-like Growth Factors and their binding proteins build up an endocrine system regulating not only longitudinal growth in humans but also influencing a broad variety of other physiological and pathophysiological processes like energy metabolism or tumor growth. Most effects of Growth Hormone (GH) are exerted by Insulin-like Growth Factors (IGF) mainly produced by the liver but also locally by specific tissues. The effects of IGF are also regulated, specific binding proteins (IGFBP 1-7) regulate bioavailability of IGF. After proteolytic cleavage of the binding proteins IGF is set free and able to bind to its receptor. The autophosphorylation of this tyrosine kinase receptor activates intracellular signalling cascades. Some of these IGFBPs not only regulate the availability of IGF but also exert IGF-independent effects on cell physiology.

IGFBP-3 is the most abundant IGFBP in circulation and therefore of special relevance in regulation of IGF effects. This is reflected by the indicative value of serum IGFBP-3 concentration in diagnostics of growth disturbances. Regulation is effected e.g. through nourishing situation; Different diets for example affect the IGFBP-3 concentration (Bielohuby et al, 2010). IGFBP-3 has also been shown to be able to induce apoptosis, promote tumor growth and inhibit cellular migration and metastasis dependent on tissue and tumor stage.

Been made e.g. also by the nourishing situation, different diets about the IGFBP-3 concentrations affects a regularization.

INTENDED USE

This enzyme immunoassay kit is suited for measuring IGFBP-3 in mouse and rat serum and plasma and in cell culture medium.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS AND VALIDATION

The Mediagnost ELISA for mouse/rat IGFBP-3 (m/rIGFBP-3) E031 is a so-called Sandwich-Assay. It utilizes two specific and high affinity antibodies for this protein. The IGFBP3 in the sample binds to the immobilized first antibody on the microtiter plate. In the following step, the biotinylated and Streptavidin-Peroxidase conjugated second specific anti-mouse IGFBP-3-Antibody binds in turn to the immobilised mIGFBP-3. In the closing substrate reaction the turn of the colour will be high specific catalysed, quantitatively depending on the m/rIGFBP-3-level of the samples.

The standards of the ELISA E031 are **recombinant mouse IGFBP-3** in concentrations of **0.078, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.50 and 5 ng/mL**.

Sensitivity

The **analytical sensitivity** of the ELISA E031 yields **0.018 ng/mL** (2 SD of zero standard in 21fold determination).

The **Inter-** and **Intra-Assay** variation coefficients were found less than **9,06 %** and **4.63 %**. Exemplary determinations are shown in table 1 and table 2.

Table 1: Inter-Assay-Variation (n=61 or 56)

	Mean Value	Standard Deviation	VC%
Sample 1	484,3	38,50	8,00
Sample 2	343,6	31,15	9,06

Table 2: Intra-Assay-Variation (n=16)

	Mean Value	VC %
Sample 1	123.8	4.63
Sample 2	395.0	1.99

Specificity

Serum of the cited species was diluted (1:301) and used as sample in this assay system. No cross reactivity was detected for:

Rabbit, Cat, Chicken, Guinea pig, Goat, Sheep, Horse, Donkey, Pig, Dog, Bovine.

Cross reactivity with recombinant human IGFBP3: 0.03%

The recovery of rec. mouse IGFBP-3 in **cell culture medium** DMEM was found to be 89.4%, and, in DMEM incl. 5% FCS 92.6%. Therefore, cell culture medium seems to be suitable as sample matrix.

Table 3: Linearity (results of 2 different mouse sera)

Dilution:	Sample 1 (recalculated, ng/mL)	Sample 2 (recalculated, ng/mL)
1:100	351.8	367.6
1:200	369.1	414.5
1:400	384.5	423.4
1:800	381.3	411.0
1:1600	379.2	421.9
1:3200	386.1	455.7
AV / SD / VC%	375.3 / 12.9 / 3.46	415.7 / 28.4 / 6.83

AV = Average Value , SD = Standard Deviation; VC = Coefficient of Variation

SPECIMEN COLLECTION, PREPARATION AND STORAGE

Mouse and Rat Serum-, EDTA- and Citrate- (in this case please note the usual dilution of the sample collection vial) Plasma samples are applicable. In Heparin-Plasma samples the levels were found approx. 15% decreased. Further, cell culture medium was found to be suitable.

Samples should be handled as recommended in general: as fast as possible and chilled as soon as possible. In case there will be a longer period between the sample withdrawal and determination store the undiluted samples frozen -20°C or below in tightly closable plastic tubes.

Storage of samples at -20°C min. 2 years.

The storage of samples over a period of 2 years at -20°C, showed no effect on the measured value. Avoid repeated freeze-thaw cycles of samples (if required, please subaliquote) although m/rIGFBP-3 levels were found to be unaffected by three cycles in our experiments.

The high sensitivity of the assays allows m/rIGFBP-3 determinations in small sample volumes, which is limited by pipetting accuracy rather than the amount of m/rIGFBP-3. In most determinations (e.g. serum- or plasma samples and no extreme values expected) the dilution of **1:301 with Dilution Buffer VP is suitable**, the respective covered range would be 0.018 to 1505 ng/mL. Where required, depending on the expected IGFBP-3-values, the dilution with **Dilution Buffer VP** can be higher or lower.

Suggestion for dilution protocol:

Pipette 1.5 mL Dilution Buffer VP in PE-/PP-Tubes (application of a multi-stepper is recommended in larger series), add 5 µL Serum- or Plasma (dilution 1:301) and mix each tube immediately. After mixing use 100 µL of this solution within 1 hour per determination in the assay.

REAGENTS PROVIDED

1)	MTP	Microtiter plate , ready for use: Microtiter plate with 96 wells, divided up in 12 strips with 8 wells separately breakable, coated with anti-mouse/rat IGFBP-3 Antibody, packed in a laminate bag.
2)	STD	Standards A-G , lyophilised, contain recombinant mouse IGFBP-3. Standard values are between 0.078 – 5 ng/mL (0.078, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25 2.5 and 5 ng/mL) mIGFBP-3, Standards are reconstituted with 750 µL Dilution Buffer VP each . Use 100 µL pro well in the assay.
3)	BUF	Dilution Buffer VP, 125 mL , ready for use.
4)	Control	Control Sera KS1 and KS2, 100 µL , lyophilised. KS1 contains mouse serum and KS2 rat serum. Please reconstitute in 100 µL Dilution Buffer VP . The m/rIGFBP-3 target values and the respective ranges are given on the label of the vial. The dilution should be according to the dilution of the respective samples.
5)	Ab	Antibody Conjugate AK, 12 mL , contains biotinylated anti-mouse IGFBP-3 antibody, ready for use. Pipette 100 µL per well.
6)	CONJ	Enzyme Conjugate EK, 12 mL , contains HRP (Horseradish-Peroxidase)-labelled Streptavidin, ready for use. Pipette 100 µL per well.
7)	WASHBUF 20x	Washing Buffer WP, 50 mL , 20 X concentrated solution. Dilute 1:20 with Aqua dest. The 1:20 diluted Washing Buffer WP is only 4 weeks stable at 2-8°C. Please dilute only according to daily requirements.
8)	SUBST	Substrate S, 12 mL , ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP)-substrate, stabilised H ₂ O ₂ Tetramethylbencidine.
9)	H ₂ SO ₄	Stopping Solution SL, 12 mL , ready for use, 0.2 M sulphuric acid, Caution acid!
10)		Sealing tape for covering of the microtiter plate, 2 x, adhesive.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Precision pipettes and multichannel pipettes with disposable plastic tips
- Distilled or deionized water for dilution of the Washing Buffer (WP), 950 mL
- Graduated cylinder for diluting Washing Buffer (WP)
- Vortex-mixer
- Microtiter plate shaker (350 rpm)
- Microtiter plate washer (recommended)
- Micro plate reader ("ELISA-Reader") with filter for 450 and ≥590 nm
- Polyethylen PE/Polypropylen PP tubes for dilution of samples

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For in-vitro use only. For professional use only.

Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood. The Mediagnost GmbH is not liable for any loss or harm caused by non-observance of the instructions, as far as no law withstands.

Precipitates in buffers should be dissolved before use by thorough mixing and warming. **Temperature WILL affect the absorbance** readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.

Disposal of containers and unused contents should be done in accordance with federal and local regulatory requirements.

Do not use obvious damaged or microbial contaminated or spilled material.

Do not use expired reagents.

Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step. Use separate pipette tips for each sample, control and reagent to avoid cross contamination. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.

Caution: This kit contains material of human and/or animal origin, therefore all components and specimens should be treated as potentially infectious.

Animal sera of Mouse and/or Rat origin are contained in controls KS1 and KS2.

Stop solution contains 0.2 M Sulfuric Acid (H₂SO₄)

R36/38 Irritating to eyes and skin

S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice

S28.1 After contact with skin, wash immediately with plenty of water

S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves.

2-Methyl-4-Isothiazolin-3-one

contained in following components: **AK, EK, VP**

< 0,01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one Solution

R34 Causes burns

R43 Sensibilisation through skin contact possible

S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice

S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves

S45 In case of accident or if you feel unwell seek medical advice

5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-Isothiazol-3-one

contained in following components: **AK, EK, VP, WP**

< 0,01% (w/w) 5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-Isothiazol-3-one Solution

R36/38 Irritating to eyes and skin

R43 Sensibilisation through skin contact possible

S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice

S28.1 After contact with skin, wash immediately with plenty of water

TMB-Substrate (S) contains 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine.

R20/21/R22 Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed

R36/37/38 Irritating to eyes, respiratory system and skin

S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice

S28.1 After contact with skin, wash immediately with plenty of water

S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves

General first aid procedures:

Skin contact: Wash affected area thoroughly with water. Discard contaminated cloths and shoes.

Eye contact: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water at least 15 minutes. In order to assure an effectual rinsing spread the eyelids.

Ingestion: If swallowed, wash out mouth thoroughly with water. Immediately see a physician.

Do not eat, drink or smoke in these areas.

Never pipette the materials with the mouth.

Spilled material must be wiped off immediately and should become disinfected. Clean contaminated areas and equipment with a suitable detergent.

TECHNICAL NOTES

In conducting the assay, follow strictly the test protocol.

Reagents with different lot numbers should not be mixed.

The microtiter plate and all reagents are stable unopened until the expiry date, if stored in the dark at 2° - 8°C (see label).

The shelf life of the components **after initial opening is** warranted for **4 weeks**, if stored appropriately.

Before use, all kit components should be brought to room temperature at 20 - 25°C. Possible precipitations in the buffers have to be resolved before usage by mixing and / or warming.

Incubation at room temperature means: Incubation at 20-25°C

The incubation steps should be performed at mean rotation frequency of a particularly suitable microtiter plate shaker. We are recommending 350 rpm. Due to certain technical differences deviations may occur, in case the rotation frequency must become adjusted. Insufficient shaking may lead to inadequate mixing of the solutions and thereby to low optical densities, high variations and/or false values, excessive shaking may result in high optical densities and/or false values.

Proper washing is of basic importance for a secure, reliable and precise performance of the test. Incomplete washing is common and will adversely affect the test outcome. Possible consequences may be uncontrolled unspecific variations of measured optical densities, potentially leading to false results calculations of the examined samples. Effects like high background values or high variations may indicate washing problems.

All washing must be performed with the provided washing buffer diluted to usage concentration. Washing volume per washing cycle and well must be 300 µL at least.

The danger of handling with potentially infectious material must be taken into account.

When using an automatic microtiter plate washer, the respective instructions for use must be carefully followed. Device adjustments, e.g. for plate geometry and the provided washing parameters, must be performed. Dispensing and aspirating manifold must not scratch the inside well surface. Provisions must be made that the remaining fluid volume of every aspiration step is minimized. Following the last aspiration step of each washing cycle, this could be controlled, and possible remaining fluid could then be removed, by inverting the plate and repeatedly tapping it dry on non fuzzy absorbent tissue.

Manual washing is an adequate alternative option. Washing Buffer may be dispensed via a multistepper device, a multichannel pipette, or a squirt bottle. The fluid may be removed by dynamically swinging out the microtiter plate over a basin. If aspirating devices are used, care has to be taken that the inside well surface is not scratched. Subsequent to every single washing step, the remaining fluid should be removed by inverting the plate and repeatedly tapping it dry on non fuzzy absorbent tissue.

Standards and Controls

The Standards **A – G** and **Control Sera KS1** and **KS2** are reconstituted with the **Dilution Buffer VP** provided in the Kit. It is recommended to keep the reconstituted reagents at room temperature for 15 minutes and then to mix them thoroughly but gently (no foam should result) with a Vortex mixer.

The reconstituted standards **A-G** and controls **KS1** and **KS2** can be stored for **4 weeks at –20°C**.

Repeated freeze/thaw cycles have to be avoided (3 cycles in our experiments didn't have an influence on the assay).

In case you plan to perform multiple independent determinations over a longer period with one kit, you should aliquot the components prior to freezing into suitable smaller volumes. This is strongly recommended

Washing Buffer

The 1:20 diluted **Washing Buffer WP** is 4 weeks stable at 2-8°C. Please dilute only according to daily requirements.

Microtiter plate

After initial opening, store the unused strips and **microtiter wells** airtight together with the desiccant at 2-8°C in the clip-lock bag. Use it in the provided frame.

Substrate Solution

The **Substrate Solution S**, stabilised H₂O₂-Tetramethylbencidine, is photosensitive – store and incubate in the dark.

ASSAY PROCEDURE

NOTES: All determinations (Standards, Control Serum and samples) should be assayed in duplicate. For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended. When performing the assay, the Standards, Control Serum and the samples should be pipette as fast as possible (e.g., <15 minutes). To avoid distortions due to differences in incubation times, **Antibody Conjugate AK** and **Enzyme –Conjugate EK** as well as the following **Substrate Solution S** should be added to the plate in the same order and in the same time interval as the samples. **Stop Solution SL** should be added to the plate in the same order as the Substrate Solution.

- 1) Add **100µL Dilution Buffer VP** in positions A1/2.
- 2) Pipette in positions B1/2 **100 µL each Standard A (0.078 ng/mL)**,
pipette in positions C1/2 **100 µL each Standard B (0.156 ng/mL)**,
pipette in positions D1/2 **100 µL each Standard C (0.313 ng/mL)**,
pipette in positions E1/2 **100 µL each Standard D (0.625 ng/mL)**,
pipette in positions F1/2 **100 µL each Standard E (1.25 ng/mL)**,
pipette in positions G1/2 **100 µL each Standard F (2.5 ng/mL)**,
pipette in positions H1/2 **100 µL each Standard G (5 ng/mL)**.

To control the correct accomplishment **100 µL** of the 1:301 (or in respective dilution rate of the sample) in Dilution Buffer **VP** diluted **Control Sera KS1** and **KS2** can be pipetted in positions A3/4 and B3/4.

Pipette **100 µL each** of the **diluted sample** (generally 1:301 diluted in Dilution Buffer **VP**) in the rest of the wells, according to requirements. Please mix the dilutions immediately after sample addition and use within 60 minutes.

- 3) Cover the wells with the sealing tape and incubate the plate for **1 hour at room temperature** (shake at 350 rpm).
- 4) After incubation aspirate the contents of the wells and wash the wells **5 times** with **300 µL Washing Buffer WP**.

- 5) Following the last washing step, pipette **100 µL** of the **Antibody Conjugate AK**. Cover the wells with the sealing tape and incubate **1 hour** at **room temperature** (shake at 350 rpm).
- 6) After incubation wash the wells **5 times** with **Washing Buffer WP** as described in step 4)
- 7) Following the last washing step, pipette **100 µL** of the **Enzyme Conjugate EK**. Cover the wells with the sealing tape and incubate **15 min** at **room temperature** (shake at 350 rpm).
- 8) After incubation aspirate the contents of the wells and wash the wells **5 times** with **300 µL Washing Buffer WP**.
- 9) Pipette **100 µL** of the **TMB-Substrate solution S** in each well.
- 10) Incubate the plate for **15 Minutes in the dark** at **room temperature**.
- 11) After incubation pipette **100 µL Stop Solution SL** in each well.
- 12) Measure the absorbance **within 30 minutes at 450 nm** (Reference filter **≥590 nm**).

CALCULATION OF RESULTS

For the evaluation of the assay it is required that the absorbance values of the blank should be below 0.25, and the absorbance of standard G should be above 1.00.

Samples, which yield higher absorbance values than **Standard G**, are beyond the standard curve, for reliable determinations such samples should be retested at a higher dilution.

Establishing the standard curve

The standards provided contain the following concentration of **mlGFBP-3**:

Standard	A	B	C	D	E	F	G
ng/mL	0.078	0.156	0.313	0.625	1.25	2.5	5

- 1) Calculate the **mean absorbance** value for the blank from the duplicated determination (well A1/A2).
- 2) Subtract the mean absorbance of the blank from the mean absorbances of all other values.
- 3) Plot the standard concentrations on the x-axis versus the mean value of the absorbance of the standards on the y-axis.
- 4) Recommendation: Calculation of the standard curve should be done by using a computer program because the curve is in general (without respective transformation) not ideally described by linear regression. **A higher-grade polynomial, or four parametric logistic (4-PL) curve fit** or **non-linear regression** are usually suitable for the evaluation (as might be spline or point-to-point alignment in individual cases).
- 5) The **IGFBP-3 concentration in ng/mL** of the samples can be **calculated by multiplication with the respective dilution factor**, division by 1000 converts the values in µg/mL or equal mg/Litre (Example: a measured value was 3 ng/mL, Sample was 1:301 diluted: 3 x 301= 903 ng/mL, or 0.903 µg/mL or 0.903 mg/L, according the requested unit).

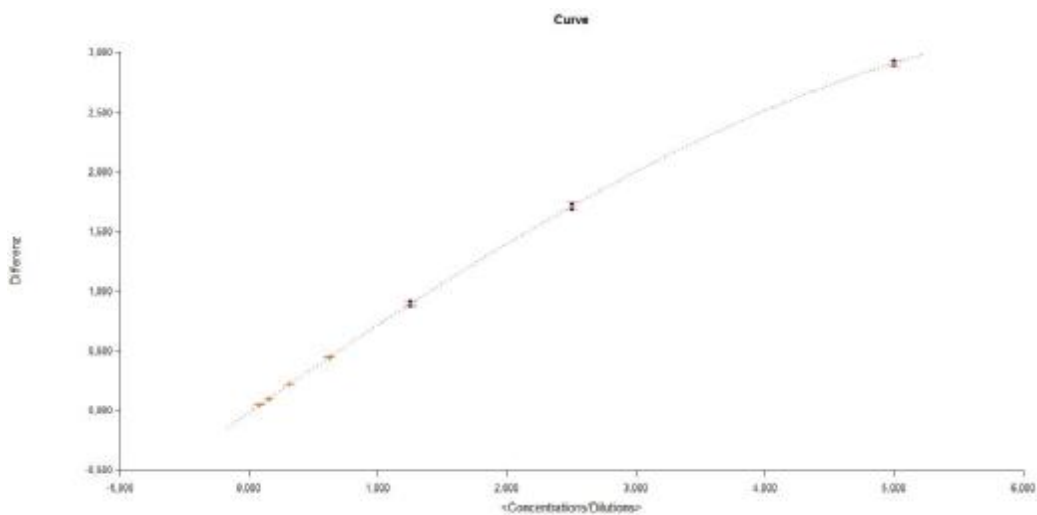


Fig. 1: Exemplary Standard Curve with a polynomial 3rd degree as curve fit.

The exemplary shown standard curve in Fig.1 **cannot be used** for calculation of your test results. You have to establish a standard curve for each test you conduct!

Exemplary calculation of the IGFBP-3 concentration of a diluted sample:

OD 450 nm

Measured extinction of your sample 1.0115

Measured extinction of the blank 0.1045

Your **measurement program** will calculate the IGFBP-3 concentration of the sample automatically by using the difference of sample and blank for the calculation. You only have to determine the most suitable curve fit (here: polynomial 3rd degree).

In this exemplary case the following equation is solved by the program to calculate the IGFBP-3 concentration in the sample:

$$0.91 = -0.00339 \times X^3 + -0.0166 \times X^2 + 0.753 \times X - 0.0166$$

$$1.265 = X$$

Multiplication by dilution factor (1:301) gives the IGFBP-3 concentration of the sample with

380.7 ng/mL

LITERATURE / LITERATUR

Silha JV, Murphy LJ: Insulin-like growth factor binding proteins in development. *Adv Exp Med Biol.* 2005;567:55-89

Yakar S, Sun H, Zhao H, Pennisi P, Toyoshima Y, Setser J, Stannard B, Scavo L, Leroith D: Metabolic effects of IGF-I deficiency: lessons from mouse models. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2005 Sep;3(1):11-19

Silha JV, Murphy LJ: Insights from insulin-like growth factor binding protein transgenic mice. *Endocrinology.* 2002 Oct;143(10):3711-4.

Firth SM, Baxter RC: Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev.* 2002 Dec;23(6):824-854

Schneider MR, Lahm H, Wu M, Hoeflich A, Wolf E: Transgenic mouse models for studying the functions of insulin-like growth factor-binding proteins. *FASEB J.* 2000 Apr;14(5):629-40

Bielohuby M, Matsuura M, Herbach N, Kienzle E, Slawik M, Hoeflich A, Bidlingmaier M. Short Term Exposure to Low-Carbohydrate / High Fat Diets Induces Low Bone Mineral Density and Reduces Bone Formation in Rats. *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 25, No. 2, February 2010, pp 275–284

KURZANLEITUNG

MEDIAGNOST MAUS-/ RATTEN-IGFBP-3 ELISA E031

Rekonstitution/ Verdünnung von Reagenzien		
Standards A-G	Rekonstitution in Verdünnungspuffer VP	je 750 µL
Kontrollserum KS1 und KS2	Rekonstitution in Verdünnungspuffer VP	100 µL
Waschpuffer WP	verdünnen in A. dest. (z.B. die gesamte Menge von 50 mL im Standzylinder auf 1000 mL auffüllen)	1:20
Probenverdünnung + Kontrollserum KS1 und KS2: 1:301 in Verdünnungspuffer. Davon 100 µL pro Bestimmung innerhalb von max. 60 min einsetzen		
Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.		

Testdurchführung Doppelbestimmung (Vorschlag):

Pipettieren	Reagenzien	Position
100 µL	Verdünnungspuffer VP als Leerwert	A1 und A2
100 µL	Standard A (0,078 ng/mL)	B1 und B2
100 µL	Standard B (0,156 ng/mL)	C1 und C2
100 µL	Standard C (0,313 ng/mL)	D1 und D2
100 µL	Standard D (0,625 ng/mL)	E1 und E2
100 µL	Standard E (1,25 ng/mL)	F1 und F2
100 µL	Standard F (2,5 ng/mL)	G1 und G2
100 µL	Standard G (5 ng/mL)	H1 und H2
100 µL	Kontrollserum KS1 (verdünnt)	A3 und A4
100 µL	Kontrollserum KS2 (verdünnt)	B3 und B4
100 µL	Probenverdünnung	in die Vertiefungen nach Bedarf
mischen, mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.		

Inkubation: 1 h bei RT, 350 rpm

5x 300 µL	Absaugen und die Platte 5x mit je 300 µL Waschpuffer WP / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µL	Antikörperkonjugat AK	In jede Vertiefung

Inkubation: 1 h bei RT, 350 rpm

5x 300 µL	Absaugen und die Platte 5x mit je 300 µL Waschpuffer WP / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µL	Enzymkonjugat EK	In jede Vertiefung

Inkubation: 15 min bei RT, 350 rpm

5x 300 µL	Absaugen und die Platte 5x mit je 300 µL Waschpuffer WP / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µL	Substratlösung S	In jede Vertiefung

Inkubation: 15 min im Dunklen bei RT

100 µL	Stopplösung SL	In jede Vertiefung
Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (≥ 590 nm Referenz),		

SUMMARY – MEDIAGNOST MOUSE- / RAT-IGFBP-3 ELISA E031

Reconstitution/ Dilution of Reagents		
Standards A-G	Reconstitution in Dilution Buffer VP	750 µL each
Control Sera KS1 and KS2	Reconstitution in Dilution Buffer VP	100 µL
Washing Buffer WP	dilute in A. dest. (e.g. add the complete contents of the flask 50 mL into a graduated flask and fill with A.dest. to 1000 mL)	1:20
Sample Dilution + Control Serum KS1 and KS2: 1:301 in Dilution Buffer VP, mix directly and use within max. 60 min. Use 100 µL per determination.		
Before assay procedure bring all reagents to room temperature		

Proposal of Assay Procedure for Double Determination:

Pipette	Reagents	Well Positions
100 µL	Dilutionbuffer VP as Blank	A1 and A2
100 µL	Standard A (0,078 ng/mL)	B1 and B2
100 µL	Standard B (0,156 ng/mL)	C1 and C2
100 µL	Standard C (0,313 ng/mL)	D1 and D2
100 µL	Standard D (0,625 ng/mL)	E1 and E2
100 µL	Standard E (1,25 ng/mL)	F1 and F2
100 µL	Standard F (2,5 ng/mL)	G1 and G2
100 µL	Standard G (5 ng/mL)	H1 und H2
100 µL	Control Serum KS1 (diluted)	A3 und A4
100 µL	Control Serum KS2 (diluted)	B3 und B4
100 µL	Sample dilution	Pipette sample in the rest of the wells according to requirements

Cover the wells with the sealing tape

Incubation: 1 h at RT, 350 rpm

5x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 5x with 300 µL each WP/well	each well
100 µL	Antibody Conjugate AK	each well

Incubation: 1 h at RT, 350 rpm

5x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 5x with 300 µL each WP/well	each well
100 µL	Enzyme Conjugate EK	each well

Incubation: 15 min at RT, 350 rpm

5x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 5x with 300 µL each WP/well	each well
100 µL	Substrate Solution S	each well

Incubation: 15 min in the dark at RT

100 µL	Stop Solution SL	each well
Measure the absorbance within 30 min at 450 nm (≥590 nm Reference)		

REF E031  **INTERNATIONAL TEST DESCRIPTION**

STD A-G	A-G	Rec in 750 µL BUF VP	100 µL
Control	KS1 and KS2	Rec in 100 µL BUF VP	100 µL
WASHBUF 20x	WP		1:20 DILU A. dest.
SPE + Control 1:301	DILU BUF VP	↔ A max. 1 h	100 µL
°C 20-25 °C			
100 µL	BUF VP		A1/2
100 µL	STD A (0.078 ng/mL)		B1/2
100 µL	STD B (0.156 ng/mL)		C1/2
100 µL	STD C (0.313 ng/mL)		D1/2
100 µL	STD D (0.625 ng/mL)		E1/2
100 µL	STD E (1.25 ng/mL)		F1/2
100 µL	STD F (2.5 ng/mL)		G1/2
100 µL	STD G (5 ng/mL)		H1/2
100 µL	CONTROL KS1 1:301	DILU BUF VP	A3/4
100 µL	CONTROL KS2 1:301	DILU BUF VP	B3/4
100 µL	SPE 1:301	DILU BUF VP	
TAPE			

A 1 h **°C** 20-25 **↔** 350 rpm

5x 300 µL	5x WASHBUF WP
100 µL	Ab AK
TAPE	

A 1 h **°C** 20-25 **↔** 350 rpm

5x 300 µL	5x WASHBUF WP
100 µL	CONJ EK
TAPE	

A 15 min **°C** 20-25 **↔** 350 rpm

5x 300 µL	5x WASHBUF WP
100 µL	SUBST TMB S

A 15 min **°C** 20-25 

100 µL	H₂SO₄ SL
MEASURE	