

Rat Adiponectin

ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von
Ratten-Adiponektin
Deutsch

Enzyme Immunoassay for quantitative Determination of
Rat Adiponectin
English

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

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



REF **E091-R**



Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH



Symbol /Table of Content / Inhaltsverzeichnis

: 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

according to DIN EN 980 and EDMA recommendations Standard News 6 2001



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/ Αεγυμίσκυρπäv/ 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/ Vá rugám sã respectați instrucțiunile de utilizare/ Upoštečajte 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 door/Fabrikation af /Tillverkad av/ Wyprodukowane przez/ Gyártotta / Vyrobené/ Vyrobeno v/ Производител/ Тootja/Κατασκευάζεται από/ Produs de/Proizvajalec/ Valmistaja



Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/Numero di riferimento/Número de referencia/ Número de Referência/ Referentienummer/Referencenummer /Beställningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/Katalógovné číslo/ Objednací číslo/Каталожен 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 rozmezí/ Температурно ограничение/ Säililata temperatuuridel/ 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/ Contenido suficiente per x test/ Contenido suficiente para x pruebas/ Conteúdo suficiente para x testes/ Bevat voldoende voor x bepalingen/ Indeholder tilstrækkeligt til x prøver/Innehållet räcker till x analyser/ Zawartość na x testów/ Tartalma x teszt elvégzésére elegendő/ Obsahuje materiál pre x testov / Obsah dostahuje 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 slunečnému světlu/ Да се предпазва от слънчева светлина/ Kaitsta otsese päikesekiirguse eest/ Κρατήστε το μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία/ Țineți 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/ Pretrepat/ Protřepat/ Разклатане/ 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 μικροπιλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitrská plošča/ Mikrotitruslevy



Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituere dans/ Ricostituire nel/ Reconstituier en/ Reconstituier em/ reconstituieren in/ Rekonstituér i/ rekonstituera/ Rekonstytiować w/ Helyreállítás/ Znovu připravit 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



Antibody and Enzyme Conjugate/ Antikörper und Enzym Konjugat/ anticorps conjugué 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)/ Koniugat antyciał i enzymów/ Antitest és enzim páros/ Protílátkový a enzymatický konjugát/ Protílátkový a enzymatický konjugát/ Антитяло и ензим конюгат/ Antikehad ja ensüümi konjugaat/ Σύμπλοκο αντισώματος-ενζύμου/ Compuși din anticorpi și enzime/ Antitelesa in konjugat encima/ Vasta-aine ja entsymi konjugaatti



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/ Diluati în tamponul X/ Razredčiti v pufru X/ laimennetaan x puskuriin



Standard X /Standard X/ Etalon X/ Standard X/ Estándar X/ Standard X/ standaard X/ Standard X/ standard X/ Standard X/ Standard X/ Štandard X/ Стандарт X/ Standard X/ Πρότυπο X/ Standard X/ Standardni X/ Kalibraattori X

| | |
|---|--|
| Control | KS1 Control Serum / Kontrollserum/ Contôle sérique/ Siero di controllo/ Suero de control/ Soro de Control/ / KS2 / controleserum/ Kontrollserum/ Kontrollserum/ Serum kontrolne/ Ellenőrző szérum/ Kontrolné sérum/ Kontrolní 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/ Vaskebufferkonzentrat/ Vaskebufferkonzentrat/ tvättbuffertkoncentrat/ Bufor plukania koncentrat/ Mosópuffer koncentrátum/ Koncentrát vymývacieho pufru/ Концентрат на промивен буфер/ Pesupuhvri kontsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralne pufru/ Pesuliuositiiviste |
| WASHBUF | Washing Buffer / Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón de lavado/Tampão de Lavagem/ wasbuffer/ Vaskebuffer/ tvättbuffert/ Bufor plukania/ Mosópuffer/ Vymývací pufer/ Vymývací pufr/ Промивен буфер/ Pesupuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare /Izpiralni pufer/ Pesuliuos |
| SUBST TMB | S Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ substraat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Szubstrátum/ 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 plytkę/ Tányér leragasztása/ Oblepiť podložku lepiacou páskou/ Olepiť podložku lepící páskou/ Пластика с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerkiileplindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperitiġi placa cu o bandă adezivă/ Prelepiti ploščo/ Peitã 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)./ Mesure l'absorbance en l'espace de 30 min 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 450 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)./ Merať 30 minút pri 450 nm/Měřit 30 minut při 450 nm/ Отчитане в рамките на 30 min при 450 nm (референтен филтър ≥ 590 nm)./ Mõõtmise 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/ Literatura/ 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 zu Forschungszwecken.

Nicht für humane oder tierische, therapeutische oder diagnostische Zwecke.

Nur zum In-vitro-Gebrauch.

Nur zum Gebrauch durch Fachpersonal.

Vor Gebrauch ist die gesamte Packungsbeilage zu lesen!

For Research Use Only.

Not for use in diagnostic procedures.

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

For in vitro use only.

For professional use only.

Read entire protocol before use.

| | |
|--|---|
| Symbols/ Symbole /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ symbolen/ Symboler/ Symboler/Symbole/ Szimbólumok/ Symboly/ Symboly/ Символи/ Sümbolid/ Σύμβολα/ Simboluri/ Simboli/ Symbolit | 3 |
|--|---|

Packungsbeilage Deutsch

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Mediagnost Ratten Adiponektin ELISA E091-R | 6 |
| Verwendungszweck | 6 |
| Einführung | 6 |
| Inhalt der Testverpackung | 7 |
| Zusätzlich benötigtes Material | 8 |
| WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN | 8 |
| Methode | 9 |
| Geeignete Proben | 9 |
| Lagerung der Proben | 9 |
| Proben Vorbereitung | 9 |
| Technische Hinweise | 9 |
| Testdurchführung | 11 |
| Auswertung | 12 |
| Berechnung der Standardkurve | 12 |
| Leistungsmerkmale | 13 |

Package Insert English

Table of Content

| | |
|--|----|
| Intended Use | 14 |
| Introduction | 14 |
| Reagents Provided | 15 |
| Materials Required but not provided | 15 |
| WARNINGS AND PRECAUTIONS | 16 |
| Method | 17 |
| Specimen | 17 |
| Storage of the samples | 17 |
| Sample Preparation | 17 |
| Technical Recommendations | 17 |
| Assay Procedure | 19 |
| Calculation of Results | 20 |
| Performance Characteristics | 20 |
| Literatur / Literature | 22 |
| KURZANLEITUNG–MEDIAGNOST Ratten-Adiponektin ELISA E091-R | 23 |
| SUMMARY – MEDIAGNOST RAT Adiponectin ELISA E091-R | 24 |

PACKUNGSBEILAGE DEUTSCH

Mediagnost Ratten Adiponektin ELISA E091-R

- ist geeignet für Adiponektin Bestimmungen in **Rattenserum** und **-plasma**
- ist **schnell**: Inkubationszeit insgesamt nur 2 Stunden und 30 Minuten.
- Einzel-Standards mit **0,25, 0,75, 1,5, 3, 6,5, bzw. 10 ng/ml** nativem Ratten-Adiponektin sind im Kit enthalten.
- 2 Kontrollseren zur **Qualitätssicherung**
- verwendet **hochaffine monoklonale Antikörper** gegen Ratten-Adiponektin
- Testplatten enthalten **einzel abbrechbare Vertiefungen**

Verwendungszweck

Messung von Adiponektin in Rattenserum und –plasma für Forschungszwecke.

Einführung

Adiponektin wurde in den 90iger Jahren des letzten Jahrhunderts erstmalig als von Fettzellen produziertes Hormon beschrieben. Adiponektin ist in die Regulation des Energie- und Fettstoffwechsels involviert. So soll die Konzentration dieses Hormons in der Zirkulation das Risiko an Atherosklerose zu erkranken sowie den Grad der Insulin-Resistenz reflektieren. Aufgrund der besonderen Bedeutung dieser Erkrankungen in den industrialisierten Staaten wird der Wirkungsmechanismus dieses Adipokins sowie seine Bedeutung als Biomarker intensiv beforscht. Neben unterschiedlichen Zellkulturmodellen sowie Studien am Menschen stellen Maus und Ratte einen geeigneten Modellorganismus für präklinische Studien dar.

Aus diesem Grund wurde der vorliegende Testkit entwickelt und technisch validiert, er soll als **Werkzeug für die Messung von Adiponektin im Rattenmodell** im Rahmen der Grundlagenforschung und präklinischer Studien dienen.

Im Folgenden wird, auch wenn ein Vergleich von Mensch und Maus nur begrenzt möglich ist, für Sie als Hintergrundinformation die Adiponektin-Physiologie *beim Menschen* cursorisch dargestellt:

Adiponektin ist ein 30 kDa Protein dessen Anteil an Serumproteinen 0.01% umfasst. Die Synthese des Proteins erfolgt hauptsächlich durch Adipocyten, aber auch Muskelzellen und Leberzellen sind in der Lage Adiponektin zu synthetisieren. Als einziger natürlicher Induktor der Synthese ist bisher IGF-I bekannt. Es besteht aus einer Kollagen-ähnlichen N-terminalen und einer globulären C-terminalen Domäne [1]. In vivo tritt Adiponektin in unterschiedlichen Oligomeren auf. Neben dem Trimer und dem Ditrimer existieren hochmolekulare Multimere [1-3]. Zwei verschiedene Rezeptoren sind bisher bekannt, beide Rezeptoren werden ubiquitär exprimiert, die Verteilung in den Geweben differiert jedoch. So wird der Adiponektin Rezeptor 1 (AdipoR1) besonders im Muskel- und AdipoR2 besonders im Lebergewebe synthetisiert [4].

Die Bedeutung für den menschlichen Organismus ist noch nicht aufgeklärt. Erste Studien zeigen, dass Adiponektin negativ mit dem BMI korreliert ist und somit Bedeutung für den Energiestoffwechsel bspw. über die Regulation der Fettsäureoxidation besitzen könnte. Neben der Korrelation zum BMI besteht ein Zusammenhang zwischen der Adiponektinkonzentration und der Insulin-Resistenz [5-7] und damit auch eine Verknüpfung zum Typ II Diabetes. Auch stellt Adiponektin eine Verbindung zwischen Glucose- und Fettstoffwechsel dar [8, 9].

Eine besondere diagnostische Wertigkeit für die hochmolekularen Multimere, wie verschiedentlich beschrieben, konnte in einer vergleichenden Studie von drei kommerziellen Testsystemen nicht nachgewiesen werden [10]. Hier konnte auch eine hervorragende diagnostische Sensitivität und Spezifität des Mediagnost E09 für den Nachweis von verminderter Glucose-Toleranz und Typ II Diabetes gezeigt werden [10].

Desweiteren ist Adiponektin an inflammatorischen Prozessen beteiligt [11-15] und damit von Bedeutung für die Entstehung von Arteriosklerose [4, 5, 16] und Koronarenentzündungen [17, 18], so könnte die Bestimmung der Adiponektinkonzentration im Plasma dazu dienen, das Risiko von Koronarerkrankungen abzuschätzen [19, 20]. Daneben beeinflusst Adiponektin weitere physiologische Prozesse wie beispielsweise die Angiogenese [21, 22].

Inhalt der Testverpackung

| | | |
|----|--------------------------------|--|
| 1) | MTP | Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen , die in 12 abnehmbare Streifen á 8 Vertiefungen (einzeln abbrechbar) aufgeteilt ist. Die Platte ist mit einem Antikörper gegen Ratten-Adiponektin beschichtet. |
| 2) | CAL | Standards A-F , lyophilisiert, enthalten natives Ratten-Adiponektin. Die Verdünnungen der Standardkurve decken einen Bereich von 0,25 bis 10 ng/ml (0,25, 0,75, 1,5, 3, 6,5 und 10 ng/ml) Adiponektin ab und werden in je 1 ml Verdünnungspuffer VP rekonstituiert. Für den Assay werden jeweils 100 µl pro Vertiefung eingesetzt. Falls die Standards für mehr als eine Assay-Durchführung benötigt werden sollten, empfehlen wir die rekonstituierten Standards gefroren bei -20°C zu lagern. Achtung: die Standards dürfen nur einmal aufgetaut werden – gegebenenfalls bitte in geeigneten Volumina aliquotiert lagern ! |
| 3) | DILU | Verdünnungspuffer VP , 125 ml , gebrauchsfertig, bitte zum Rekonstituieren der Standards A – F, der Kontrollseren KS1 & KS2 sowie für die Verdünnung der Proben verwenden. |
| 4) | Control | Kontrollseren KS1 & KS2 , je 250 µl , lyophilisiert, enthalten Rattenserum und müssen in 250 µl Verdünnungspuffer VP rekonstituiert werden. Die Ratten-Adiponektin Soll-Konzentration und der Schwankungsbereich ist auf dem Etikett angegeben. Es sollte im Assay in der gleichen Verdünnung wie die jeweiligen Proben bestimmt werden, die Soll-Konzentration erhält man nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor . |
| 5) | Ab CONJ | Antikörper-POD-Konjugat AK , 12 ml , gebrauchsfertig , enthält eine Mischung von biotinyliertem anti-Adiponektin Antikörper und POD(Meerrettich-Peroxidase)-markiertem Streptavidin. Für den Assay werden jeweils 100 µl pro Vertiefung eingesetzt. |
| 6) | 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. |
| 7) | SUBST | Substrat S , 12 ml , gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase-(POD)-Substrat, stabilisiertes H ₂ O ₂ -Tetramethylbenzidin |
| 8) | H ₂ SO ₄ | Stopplösung SL , 12 ml , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure |
| 9) | | Abdeckfolie für Mikrotiterplatten, 2 Stück, selbstklebend |

Zusätzlich benötigtes Material

Messbehälter für die Verdünnung vom Washbuffer (WP)
Destilliertes oder entmineralisiertes Wasser zum Verdünnen des Waschpuffers WP, 950 mL
Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen
Vortex-Mischgerät
Mikrotiterplattenschüttler (350 rpm)
Mikrotiterplattenwisher (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 E091-R Kit ist nur zum In-vitro Gebrauch und nicht zur inneren Anwendung bei Mensch und Tier geeignet. 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.

Die Materialien nicht verwenden, wenn sie offensichtlich beschädigt, mikrobiell kontaminiert oder ausgelaufen sind.

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.

Rattenserum

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

Die Reagenzien **A-F, AK, VP** enthalten als Konservierungsmittel (0,01%)

2-Methyl-4-isothiazolin-3-one Solution

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

Die Reagenzien **A-F, AK, VP, WP** enthalten als Konservierungsmittel (0,01%) (w/w)

5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one und 2-methyl-2H-isothiazol-3-one

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.

Methode

Der Mediagnost ELISA für Ratten-Adiponektin E091-R ist ein sogenannter Sandwich-Assay unter Verwendung zweier spezifischer und hochaffiner Antikörper. Der an die Mikrotiterplatte gekoppelte erste Antikörper bindet das Adiponektin aus der Probe. Im nachfolgenden Schritt bindet am derart immobilisierten Adiponektin der zweite spezifische anti-Adiponektin-Antikörper. Dieser ist biotinyliert und liegt als Mischung mit einem Streptavidin-Peroxidase-Enzymkonjugat vor. In der anschließenden Substratreaktion führt eine spezifische enzymatische Reaktion zu einem Farbumschlag. Die Intensität der daraus resultierenden Färbung ist proportional zum Adiponektin-Gehalt der Proben.

Geeignete Proben

Geeignet sind Rattenserum- und -plasmaproben.

Der Einfluß von Heparin (30 IE/mL), EDTA (6,8 mM) und NaCitrat (0,015 M) auf die Messung wurde bestimmt. PBS wurde mit entsprechenden Mengen der Substanzen sowie recombinantem Ratten Adiponektin versetzt und die Wiederfindung bestimmt. Es konnten keine signifikanten Auswirkungen auf die Wiederfindung detektiert werden.

Hämolytische Reaktionen sind zu vermeiden. Das Blut koagulieren lassen und das Serum durch Zentrifugation abtrennen.

Lagerung der Proben

| | |
|--------------------|--------------|
| Lagerung bei RT | max. 2 Tage |
| Lagerung bei -20°C | max. 2 Jahre |

Die Proben dürfen nicht öfter als fünfmal eingefroren/aufgetaut werden.

Proben Vorbereitung

Die Proben müssen in Verdünnungspuffer VP verdünnt werden.

Wir empfehlen im Allgemeinen eine Serum- oder Plasma-Verdünnung von **1:1500**. Individuell können Werte aber stark variieren, es empfiehlt sich dies zu prüfen und eventuell die Probenverdünnung anzupassen.

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).

Bei sachgemäßer Handhabung ist die Haltbarkeit der Reagenzien nach Öffnung nicht beeinträchtigt.

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 fuselndem 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 schwungvolles 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 fuselndem Zellstoff gründlich entfernt werden.

Standards und Kontrollen

Für die Rekonstitution der lyophilisierten Komponenten (Standards A-F, KS1 & KS2) muss der im Kit erhaltene Verdünnungspuffer VP verwendet werden. 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 muss vermieden werden.

Die rekonstituierten Standards und Kontrollen können bei -20°C für 2 Monate gelagert werden. Wiederholte Gefrier-/Tauzyklen sind zu vermeiden.

Waschpuffer

Das benötigte Volumen des Waschpuffers wird vorbereitet, indem das 20fach Konzentrat im Verhältnis 1:20 mit entionisiertem Wasser verdünnt wird. Der endverdünnte Waschpuffer kann 4 Wochen bei 2° - 8°C gelagert werden und ist vor Gebrauch auf Raumtemperatur zu bringen.

Testplatte

Nicht verwendete Streifen der Testplatte sind zusammen mit dem Trockenkissen luftdicht in der Originalfolie bei 2° - 8°C zu lagern. Die Haltbarkeit ist bei sachgerechter Lagerung nicht eingeschränkt.

Substrat

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

Testdurchführung

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

Bei der Testdurchführung müssen Standards, Kontrollseren und die jeweiligen Proben möglichst in 15 Minuten pipettiert werden.

Alle Inkubationen müssen bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) erfolgen

Das Antikörper-POD-Konjugat AK 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 auf die Testplatte gegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

- 1) In die ersten Vertiefungen werden 100 µl Verdünnungspuffer VP pipettiert (Leerwert). Im Anschluss daran werden jeweils 100 µl der Standardlösungen oder der verdünnten Kontrollen oder Proben in die Vertiefungen gegeben.
- 2) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **1 Stunde** bei Raumtemperatur inkubiert (unter Schütteln 350 rpm).
- 3) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Lösungen abgesaugt und die Platte mit **300 µl Waschpuffer WP / Vertiefung dreimal** gewaschen. Der Waschpuffer sollte vor dem Absaugen mindestens 15 Sekunden in den Vertiefungen verbleiben.
- 4) Im Anschluss an den letzten Waschschrift werden **100 µl des Antikörper-POD-Konjugates AK** in jede Vertiefung pipettiert.
- 5) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **1h** bei Raumtemperatur inkubiert (unter Schütteln 350 rpm).
- 6) Nach Abschluss dieser Inkubation wird die Platte wie in Schritt 3) beschrieben gewaschen
- 7) In jede Vertiefung werden **100 µl der Substratlösung S** pipettiert.
- 8) Die Platte wird **30 Minuten** im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert
- 9) Nach Ablauf der Inkubationszeit wird in jede Vertiefung **100 µl Stopplösung SL** pipettiert.
- 10) Die Ausmessung der Farbreaktion erfolgt **innerhalb von 30 Minuten** bei **450 nm** (Referenzfilter **≥590 nm**).

Auswertung

Berechnung der Standardkurve

Zur Auswertung des Testes muss gewährleistet sein, dass die Extinktionen des Leerwertes 0,25 Einheiten nicht überschreiten, Standard F muss dagegen Extinktionen über 1,0 Einheiten erreichen.

Proben, die höhere Extinktionen als der Standard F erzielen, liegen außerhalb der Standardkurve, zur sicheren Bestimmung müssen diese Proben in einer zweiten Testdurchführung bei höherer Verdünnung nochmals bestimmt werden.

Die bereitgestellten Standards enthalten folgende Adiponektin-Konzentrationen:

| Standard | A | B | C | D | E | F |
|----------|------|------|-----|---|-----|----|
| ng/ml | 0,25 | 0,75 | 1,5 | 3 | 6,5 | 10 |

- 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) Aus der Standardkurve erhält man derart die Adiponektin-Konzentration der verdünnten Kontrollen KS1 & KS2 bzw. der verdünnten Proben (mit der individuellen Verdünnung, allgemein für Serum- und Plasma empfohlen 1:1500). Die **Multiplikation** des jeweiligen berechneten Adiponektin-Gehaltes **mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor** ergibt dann die Adiponektin-Konzentration der unverdünnten Ausgangslösungen (je nach gewählter Einheit der Konzentration der Standards !).

Leistungsmerkmale

Standard

Die Standards des ELISA E091-R bestehen aus **nativem Adiponektin** in Konzentrationen von **0,25, 0,75, 1,5, 3, 6,5, bzw. 10 ng/ml**. Das native Adiponektin wurde mit rekombinantem Protein kalibriert (Hersteller:R&D Systems, Wiesbaden)

Sensitivität

Die analytische Sensitivität des ELISA E091-R beträgt **< 0,081 ng/ml** (entsprechend 0,0081 ng pro Vertiefung; zweifache Standardabweichung des Null-Standards in 16facher Bestimmung).

Interassay Variabilität

| | Probe 1 | Probe 2 | Probe 3 | Probe 4 | Probe 5 | Probe 6 | Probe 7 |
|-------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Mittel [µg/mL] | 1,62 | 7,06 | 7,97 | 7,22 | 11,23 | 8,55 | 7,24 |
| SA | 0,03 | 0,40 | 0,27 | 0,28 | 1,25 | 0,42 | 0,35 |
| VK% | 2,16 | 5,70 | 3,39 | 3,82 | 11,16 | 4,93 | 4,85 |
| n | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |

Intraassay Variabilität

| | Probe 1 | Probe 2 |
|-------------------|---------|---------|
| Mittel [µg/mL] | 12,702 | 5,709 |
| SA | 0,197 | 0,191 |
| VK% | 1,55 | 3,34 |
| n | 20 | 20 |

Linearität

| Verdünnung | Probe 1 µg/mL | Verdünnung | Probe 2 µg/mL | Probe 3 µg/mL |
|------------|------------------|------------|------------------|------------------|
| 1:600 | 5,2 | 1:1000 | 7,703 | 7,703 |
| 1:1200 | 5,091 | 1:2000 | 7,455 | 7,455 |
| 1:2400 | 5,286 | 1:4000 | 7,657 | 7,657 |
| 1:4800 | 5,117 | 1:8000 | 7,598 | 7,598 |
| 1:9600 | 5,008 | 1:16000 | 7,066 | 7,066 |

PACKAGE INSERT ENGLISH

Mediagnost Rat Adiponectin ELISA E091-R

- is suited for Adiponectin determination in **Rat Serum** and **Plasma** samples,
- is **fast**: incubation time a total of 2 hours and 30 minutes
- Single Standards with **0.25, 0.75, 1,5, 3, 6,5, and 10 ng/ml** native Rat Adiponectin are provided in the Kit
- 2 Control Sera are provided for quality control
- uses **high affinity monoclonal antibodies** against rat Adiponectin
- Microtiter plates are separately breakapart

Intended Use

Measurement of Adiponectin in Rat serum and plasma samples for research use.

Introduction

Adiponectin was described for the first time in the early 90th of the last century as an endocrine factor produced by adipocytes. Adiponectin is involved in regulation of energy- and fat metabolism. So its concentration in the circulation is said to reflect the risk of atherosclerosis and the degree of insulin resistance. Based on the high incidence of these diseases, adiponectin was and still is object of intensive research regarding the underlying biological mechanisms and regarding its value as biomarker. Beside different cell culture models and studies with human patients, mice and rats are suitable model organisms for basic research and pre-clinical studies.

Therefore we developed and validated this testsystem as a tool for adiponectin measurements in rats usable in research and pre-clinical studies.

Even if the comparability of rats and humans is limited we offer some background information on *human* adiponectin physiology in the following section:

Adiponectin is a 30kDa protein which percentage in serum proteins is 0.01%. It is mainly synthesized by Adipocytes, but also muscle cells and hepatocytes have the ability to synthesize Adiponectin. Until now, IGF-I is the only known natural inductor of the synthesis. It consists of a Collagen-like N-terminal and a globular C-terminal domain [1]. In vivo Adiponectin appears with different oligomers. Beside the trimer and dimer also high molecular multimers exist [1-3]. Up to now two different receptors are known, both receptors are ubiquitarily expressed, though the distribution in the tissues varies. The Adiponectin Receptor 1 (AdipoR1) is especially in muscle- and AdipoR2 in liver tissue synthesized [4].

The significance for the organism is not clear until now. First studies show, that adiponectin correlates negatively with BMI and thus it could have relevance for the energy metabolism for example through the regulation of fatty acid oxidation. Beside the correlation with BMI, Adiponectin level is associated with the Insulin-Resistance [5-7] and so also linked with Type II Diabetes. Adiponectin is associated also with glucose- und lipometabolism [8, 9].

The formerly proposed diagnostic value of the high molecular weight form of adiponectin was not verified using a commercially available testsystem for the determination of HMW adiponectin [10]. Blueher et al. clearly demonstrate that regarding the diagnosis of insulin resistance, measured by whole body glucose uptake below 40 $\mu\text{mol}/\text{kg}\cdot\text{min}$, total adiponectin as determined with the Mediagnost E091-R, is with an area of 0.92 under the receiver-operating curve, of greater diagnostic value [10].

Furthermore it is involved in inflammatory processes [11-15] and therewith it is of importance for appearance of arteriosclerosis [4, 5, 16] and coronaritis [17, 18], thus the determination of Adiponectin level in plasma could serve to estimate the risk of coronary disease [19, 20]. Beside this Adiponectin influences further physiological processes as for example the angiogenesis [21, 22].

Reagents Provided

| | | |
|----|------------------------------------|---|
| 1) | MTP | Microtiter plate , ready for use: Microtiter plate with 96 wells, dived up in 12 stripes à 8 wells (separately breakapart), coated with anti-Rat Adiponectin antibody. |
| 2) | CAL | Standards A-F , lyophilised, contain native Rat Adiponectin. Standard values are between 0.25 - 10 ng/ml (0.25, 0.75, 1.5, 3, 6.5 und 10 ng/ml) Adiponectin and have to be reconstituted in 1 ml (each) Dilution Buffer VP . 100 µl per well are used in the assay. If the standards are required for more than one assay process we recommend to store the reconstituted Standards frozen at -20°C. Attention: Standards should be thawed only once – where required please store aliquoted in adequate volumes. |
| 3) | DILU | Dilution buffer VP, 125 ml , ready for use, please use for the reconstitution of Standards A-F, Control Sera KS1 & KS2 and for the serum dilution. |
| 4) | Control | Control Serum KS1 & KS2 , each 250 µl lyophilised: Contains rat Serum and has to be reconstituted in 250 µl Dilution Buffer VP . The Adiponectin target value concentration and the respective range is given the vial label. The dilution of the Control Sera KS 1&2 should be according to the dilution of the respective samples, the target value concentration should be obtained by multiplication with the respective dilution factor . |
| 5) | Ab CONJ | Antibody-POD-Conjugate AK, 12 ml, ready for use , contains a mixture of biotinylated anti-Adiponectin antibody and HRP (Horseradish Peroxidase)-labelled Streptavidin. Use 100 µl/well in the assay. |
| 6) | WASHBUF 20x | Washing Buffer (WP), 50 ml, 20 X concentrated solution. Washing Buffer (WP) has to be diluted 1:20 with distilled or demineralised water before use (e.g. add the complete contents of the flask (50 ml) into a graduated flask and fill up with A.dest. to 1000 ml). Attention: After dilution the Washing Buffer is only 4 weeks stable, dilute only according to requirements. |
| 7) | SUBST | Substrate (S), 12 ml , ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP)-substrate, stabilised H ₂ O ₂ Tetramethylbencidine. |
| 8) | H₂SO₄ | Stopping Solution (SL), 12 ml , ready for use, 0.2 M sulphuric acid, Caution acid! |
| 9) | | 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
 Graduated cylinder for diluting Washing Buffer (WP)
 Distilled or deionized water for dilution of the Washing Buffer (WP), 950 mL
 Vortex-mixer
 Microtiter plate shaker (350 rpm)
 Microtiter plate washer (recommended)
 Micro plate reader ("ELISA-Reader") with filter for 450 and ≥ 590 nm.
 Polyethylene PE/Polypropylene PP tubes for dilution of samples

WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

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

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

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.

Caution: This kit contains material of human and/or animal origin.

No known test methods can offer total assurance of the absence of infectious agents; therefore all components and specimens should be treated as potentially infectious.

Following components contain < 0.01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one solution as preservative : **A-F, AK, VP**

| | |
|--------|--|
| R34 | 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 |
| S36/37 | Wear suitable protective clothing and gloves |
| S45 | In case of accident or if you feel unwell seek medical advice |

Following components contain < 0.01%(w/w) 5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one as preservative: **A-F, AK, VP, WP**

| | |
|--------|--|
| 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 |

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. |

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.

TMB-Substrate (S) contains 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine. Store and Incubate in the dark.

| | |
|------------|--|
| 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.

Method

The Mediagnost ELISA for Adiponectin E091-R is a so-called Sandwich-Assay using two specific and high affinity antibodies. The Adiponectin in the samples binds to the first antibody coated on the microtiter plate. In the following step the second specific anti-Adiponectin-Antibody binds in turn to the immobilised Adiponectin. The second antibody is biotinylated and will be applied in a mixture with a Streptavidin-Peroxidase-Enzyme Conjugate. In the closing substrate reaction the turn of the colour will be catalysed quantitatively depending on the Adiponectin-level of the samples.

Specimen

Serum and plasma samples of rats can be used in this assay.

Influence of Heparin (30IE/mL), EDTA (6,8mM) and NaCitrat (0,015M) on the measurement of Adiponectin has been investigated by recovery experiments. PBS was enriched with recombinant Rat Adiponectin and the above mentioned substances. No significant influence on the recovery of adiponectin was detected.

Hemolytic reactions have to be avoided. The blood has to be allowed to clot and after complete clotting, serum is separated by centrifugation.

Storage of the samples

Storage at RT max. 2 days

Storage at -20°C max. 2 years

More than five freeze/thaw cycles are not possible.

Sample Preparation

Samples have to be diluted in Dilution Buffer (VP).

A sample dilution of 1:1500 is in general suitable. However, the Adiponectin levels can vary individually significant, we would therefore recommend to check this and adjust the dilution respectively.

Technical Recommendations

The assay has to be conducted strictly according the test protocol herein.

Reagents with different lot numbers cannot be mixed. The microtiterplate and reagents are stable until the indicated expiry if stored unopened and protected from sunlight at 2 – 8°C.

The shelf life of the components after opening is not affected, if used appropriately.

Bring all reagents to room temperature (20 - 25°C) before use. 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 microtitre 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 microtitre 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 microtitre 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

For the reconstitution of the lyophilised components (Standards A - F and Control Sera KS1 &KS2) the kit Dilution Buffer VP has to be used. It is recommended to keep reconstituted reagents at room temperature for 15 minutes and then to mix them thoroughly but gently (no foam!) with a Vortex mixer.

The reconstituted standard and controls can be stored for 2 months at –20°C. Repeated freeze/thaw cycles have to be avoided.

Washing Buffer

The required volume of washing buffer is prepared by 1:20 dilution of the provided 20fold concentrate with deionised water. The diluted Washing Buffer is stable for 4 weeks at 2-8°C. It has to be at room temperature for usage!

Microtiter plate

Unused microtiter plate stripes have to be stored airtight together with the desiccant bag at 2-8°C . The labelled expiry is not influenced in case of proper storage.

Assay Procedure

All determinations (Standards, Control Sera KS1 & KS2 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 Sera and the samples should be pipetted as fast as possible (e.g., <15 minutes).

All incubations have to be conducted at room temperature (20-25°C)

To avoid distortions due to differences in incubation times, Antibody-POD-Conjugate AK 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 **100 µl** Dilution Buffer VP in the first wells. Subsequently add 100 µl Standard or 100 µl of diluted Control Sera or diluted samples.
- 2) Cover the wells with sealing tape and incubate the plate for **1 hour at room temperature** (shake at 350 rpm)
- 3) After incubation aspirate the contents of the wells and wash the wells **3 times 300 µl Washing Buffer WP** / well. The washing buffer should incubate for at least for 15 seconds/cycle.
- 4) Following the last washing step pipette **100 µl** of the **Antibody-POD-Conjugate AK** in each well.
- 5) Cover the wells with sealing tape and incubate the plate for **1 hour at room temperature** (shake at 350 rpm).
- 6) After incubation wash the wells **3 times** with Washing Buffer as described in step 3
- 7) Pipette **100 µl of the TMB Substrate** Solution in each well.
- 8) Incubate the plate for **30 minutes in the dark at room temperature (20 - 25°C)**.
- 9) Stop the reaction by adding **100 µl of Stopping Solution**.
- 10) Measure the colour reaction within 30 minutes at 450nm (**reference filter ≥590 nm**).

Calculation of Results

Establishing the Standard Curve

For the evaluation of the assay it is preconditioned that the absorbance values of the blank should be below 0.25, these of standard F should be above 1.0.

Samples, which yield higher absorbance values than Standard F are beyond the standard curve, for reliable determinations these samples should be tested anew with a higher dilution.

Standards are provided in the following concentrations (use the concentration unit as preferred):

| Standard | A | B | C | D | E | F |
|----------|------|------|-----|---|-----|----|
| ng/ml | 0.25 | 0.75 | 1.5 | 3 | 6.5 | 10 |

- 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. **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).
- 6) The Adiponectin concentration of the diluted sample or the diluted control sera KS1&2 in ng/ml (or µg/ml according the chosen unit for the standards) is calculated in this way, the Adiponectin concentration of the **undiluted sample** and of KS1 & KS2 is calculated **by multiplication** with the respective dilution factor.

Performance Characteristics

Standards

The Standards of the **ELISA E091-R** are prepared from **native Adiponectin** in concentrations of **0.25, 0.75, 1.5, 3, 6.5 and 10 ng/ml**. The native Adiponectin was calibrated against the recombinant Protein (Manufacturer: R&D Systems, Wiesbaden).

Sensitivity

The analytical sensitivity of the ELISA E091-R yields < 0,081 ng/ml (equal to 0,0081ng per well; as 2xSD of zero standard in 16fold determination).

Interassay Variability

| | Sample 1 | Sample 2 | Sample 3 | Sample 4 | Sample 5 | Sample 6 | Sample 7 |
|-----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Mean [µg/mL] | 1.62 | 7.06 | 7.97 | 7.22 | 11.23 | 8.55 | 7.24 |
| SD | 0.03 | 0.40 | 0.27 | 0.28 | 1.25 | 0.42 | 0.35 |
| VC% | 2.16 | 5.70 | 3.39 | 3.82 | 11.16 | 4.93 | 4.85 |
| n | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |

Intraassay Variability

| | Sample 1 | Sample 2 |
|-----------------|----------|----------|
| Mean [µg/mL] | 12.702 | 5.709 |
| SD | 0.197 | 0.191 |
| VC% | 1.55 | 3.34 |
| n | 20 | 20 |

Linearity

| Dilution | Sample 1 µg/mL | Dilution | Sample 2 ng/mL | Sample 3 µg/mL |
|----------|-------------------|----------|-------------------|-------------------|
| 1:600 | 5.2 | 1:1000 | 7.703 | 7.703 |
| 1:1200 | 5.091 | 1:2000 | 7.455 | 7.455 |
| 1:2400 | 5.286 | 1:4000 | 7.657 | 7.657 |
| 1:4800 | 5.117 | 1:8000 | 7.598 | 7.598 |
| 1:9600 | 5.008 | 1:16000 | 7.066 | 7.066 |

Literatur / Literature

1. Nakano, Y., et al., *Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma*. J Biochem (Tokyo), 1996. **120**(4): p. 803-12.
2. Pajvani, U.B., et al., *Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9073-85.
3. Tsao, T.S., et al., *Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways*. J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 50810-7.
4. Shimada, K., T. Miyazaki, and H. Daida, *Adiponectin and atherosclerotic disease*. Clin Chim Acta, 2004. **344**(1-2): p. 1-12.
5. Higashiura, K., et al., *Correlations of adiponectin level with insulin resistance and atherosclerosis in Japanese male populations*. Clin Endocrinol (Oxf), 2004. **61**(6): p. 753-9.
6. Spranger, J., et al., *Adiponectin is independently associated with insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome*. Clin Endocrinol (Oxf), 2004. **61**(6): p. 738-46.
7. Zoico, E., et al., *Adipocytokines, fat distribution, and insulin resistance in elderly men and women*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2004. **59**(9): p. M935-9.
8. Ye, J.M., et al., *PPARalpha /gamma ragaglitazar eliminates fatty liver and enhances insulin action in fat-fed rats in the absence of hepatomegaly*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **284**(3): p. E531-40.
9. Yamauchi, T., et al., *Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1288-95.
10. Blüher (Blueher), M., et al., *Total and high-molecular weight adiponectin in relation to metabolic variables at baseline and in response to an exercise treatment program: comparative evaluation of three assays*. Diabetes Care, 2007. **30**(2): p. 280-5.
11. Delaigle, A.M., et al., *Induction of adiponectin in skeletal muscle by inflammatory cytokines: in vivo and in vitro studies*. Endocrinology, 2004. **145**(12): p. 5589-97.
12. Winzer, C., et al., *Plasma adiponectin, insulin sensitivity, and subclinical inflammation in women with prior gestational diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2004. **27**(7): p. 1721-7.
13. Xydakis, A.M., et al., *Adiponectin, inflammation, and the expression of the metabolic syndrome in obese individuals: the impact of rapid weight loss through caloric restriction*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(6): p. 2697-703.
14. Motoshima, H., et al., *Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **315**(2): p. 264-71.
15. Wolf, A.M., et al., *Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **323**(2): p. 630-5.
16. Okamoto, Y., et al., *Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Circulation, 2002. **106**(22): p. 2767-70.
17. Schlegel, A., *Adiponectin and risk of coronary heart disease*. Jama, 2004. **292**(1): p. 40; author reply 40.
18. Choi, K.M., et al., *Inflammation, Insulin Resistance, and Glucose Intolerance in Acute Myocardial Infarction Patients without a Previous Diagnosis of Diabetes Mellitus*. J Clin Endocrinol Metab, 2004.
19. Nakamura, Y., et al., *Implications of plasma concentrations of adiponectin in patients with coronary artery disease*. Heart, 2004. **90**(5): p. 528-33.
20. Pischon, T., et al., *Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men*. Jama, 2004. **291**(14): p. 1730-7.
21. Shibata, R., et al., *Adiponectin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of amp-activated protein kinase signaling*. J Biol Chem, 2004. **279**(27): p. 28670-4.
22. Fernandez-Real, J.M., et al., *Adiponectin is associated with vascular function independent of insulin sensitivity*. Diabetes Care, 2004. **27**(3): p. 739-45.

KURZANLEITUNG–MEDIAGNOST Ratten-Adiponektin ELISA E091-R

| Reagenz: | Rekonstitution: | Verdünnung: |
|---|---------------------------------------|--|
| Standards A-F | in 1 ml Verdünnungspuffer VP | |
| Kontrollseren KS1 & KS2 | in 250 µl Verdünnungspuffer VP | 1:1500 mit Verdünnungspuffer VP |
| Waschpuffer WP | | 1:20 mit Aqua. dest. (z.B. den gesamten Flascheninhalt von (50 ml) im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen) |
| Probenverdünnung: z.B. 1:1500 | | |

Testdurchführung in Doppelbestimmungen:

| Pipetieren | Reagenzien | Position |
|---|--|---------------------------|
| 100 µl | Verdünnungspuffer VP | A1/2 |
| 100 µl | Standard A (0,25 ng/ml) | B1/2 |
| 100 µl | Standard B (0,75 ng/ml) | C1/2 |
| 100 µl | Standard C (1,5 ng/ml) | D1/2 |
| 100 µl | Standard D (3 ng/ml) | E1/2 |
| 100 µl | Standard E (6,5 ng/ml) | F1/2 |
| 100 µl | Standard F (10 ng/ml) | G1/2 |
| 100 µl | Kontrollserum KS1 | H1/2 |
| 100 µl | Kontrollserum KS2 | A3/4 |
| 100 µl | Probenverdünnung | nachfolgende Vertiefungen |
| Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken. | | |
| Inkubation: 1 h bei RT, 350 rpm | | |
| 3x 300 µl | Absaugen und die Platte 3x mit je 300 µl Waschpuffer WP / Vertiefung waschen. | In jede Vertiefung |
| 100 µl | Antikörper-POD-Konjugat AK | In jede Vertiefung |
| Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken. | | |
| Inkubation: 1 h bei RT, 350 rpm | | |
| 3x 300 µl | Absaugen und die Platte 3x mit je 300 µl Waschpuffer WP / Vertiefung waschen. | In jede Vertiefung |
| 100 µl | Substratlösung S | In jede Vertiefung |
| Inkubation: 30 min im Dunklen bei RT | | |
| 100 µl | Stopplösung SL | In jede Vertiefung |
| Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm). | | |

SUMMARY – MEDIAGNOST RAT Adiponectin ELISA E091-R

| Reagent preparation: | Reconstitution: | Dilution |
|-------------------------------|------------------------------|---|
| Standards A-F | in 1 ml Dilution Buffer VP | |
| Control Sera KS1 & KS2 | in 250 µl Dilution Buffer VP | 1:1500 with Dilution Buffer VP |
| Washing Buffer WP | | 1:20 with Aqua. dest. (e.g., add the complete contents of the flask (50 ml) into a graduated flask and fill with A.dest. to 1000 ml). |
| Sample Dilution: e.g. 1 :1500 | | |

Assay Procedure for Double Determination:




| Pipette | Reagents | Position |
|---|---|-----------------|
| 100 µl | Dilution Buffer VP | A1/2 |
| 100 µl | Standard A (0.25 ng/ml) | B1/2 |
| 100 µl | Standard B (0.75 ng/ml) | C1/2 |
| 100 µl | Standard C (1.5 ng/ml) | D1/2 |
| 100 µl | Standard D (3 ng/ml) | E1/2 |
| 100 µl | Standard E (6.5 ng/ml) | F1/2 |
| 100 µl | Standard F (10 ng/ml) | G1/2 |
| 100 µl | Control Serum KS1 | H1/2 |
| 100 µl | Control Serum KS2 | A3/4 |
| 100 µl | Sample dilution | following wells |
| Cover the wells with the sealing tape. | | |
| Incubation: 1 h at RT, 350 rpm | | |
| 3x 300 µl | Aspirate the contents of the wells and wash 3x with 300 µl Wash Buffer WP | each well |
| 100 µl | Antibody-POD-Conjugate AK | each well |
| Cover the wells with the sealing tape. | | |
| Incubation: 1 h at RT, 350 rpm | | |
| 3x 300 µl | Aspirate the contents of the wells and wash 3x with 300 µl Wash Buffer WP | each well |
| 100 µl | Substrate Solution S | each well |
| Incubation: 30 min in the Dark at RT | | |
| 100 µl | Stopping Solution SL | each well |
| Measure the absorbance within 30 min at 450 nm with ≥590 nm as reference wavelength. | | |

REF E091-R  **International Test description**



| | | | |
|---------------------------|-----------|--------------------------------|----------------------------------|
| CAL A-F | A -F | Rec in 1 ml VP | |
| Control | KS1 & KS2 | Rec in 250 µl VP | 1:1500 DILU VP |
| WASHBUF 20x | WP | | 1:20 DILU A. dest. |

| | |
|--------------------|------------------------------|
| SPE | 1:1500 DILU VP |
| °C 20-25 °C | |

| | | |
|-------------|--|------|
| 100 µl | VP | A1/2 |
| 100 µl | CAL A (0.25 ng/ml) | B1/2 |
| 100 µl | CAL B (0.75 ng/ml) | C1/2 |
| 100 µl | CAL C (1.5 ng/ml) | D1/2 |
| 100 µl | CAL D (3 ng/ml) | E1/2 |
| 100 µl | CAL E (6.5 ng/ml) | F1/2 |
| 100 µl | CAL F (10 ng/ml) | G1/2 |
| 100 µl | CONTROL KS1 1:1500 DILU VP | H1/2 |
| 100 µl | CONTROL KS2 1:1500 DILU VP | A3/4 |
| 100 µl | SPE 1:1500 DILU VP | |
| TAPE | | |

 1 h  20-25  350 rpm

| | |
|-------------|-----------------------------|
| 3x 300 µl | 3x WASHBUF WP |
| 100 µl | AbCONJ AK |
| TAPE | |

 1 h  20-25  350 rpm

| | |
|-----------|----------------------------------|
| 3x 300 µl | 3x WASHBUF WP |
| 100 µl | SUBST TMB S |

 0.5 h  20-25 

| | |
|----------------|--|
| 100 µl | H₂SO₄ SL |
| MEASURE | |