

m/rIGF-I ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von

Maus-/Ratten-insulinähnlichem Wachstumsfaktor I (IGF-I) (IGFBP-blockiert)

Deutsch

Enzyme Immunoassay for Quantitative Determination of

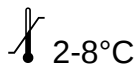
Mouse/ Rat Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) (IGFBP-blocked)

English

für Forschungsanwendungen / for research use only

Not for use in diagnostic procedures.

zum Gebrauch durch Fachpersonal! / for professional use!



h E25



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

	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 kasutusjuhendi/ Λάβετε υπόψη σας τις οδηγίες χρήσης/ Vá rugám szárespectați instrucțiunile de utilizare/ Upošteвайте navodila za uporabo/ Lue käyttöohje huolellisesti!
g	Lot-Batch Number/ Charge-Chargennummer/ Lot-Code du lot/ Lotto-Numero di lotto/ Lote-Código de lote/ Lote-Código do Lote/Lot-Partijnummer/ Lot-Batchcode/ Partisatskod/ Numer serii/ Tétel-sarzs szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/Partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-număr lot/ Številka serije/ Erä
M	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/ Τοττα/ Κατασκευάζεται από/ Produs de/ Proizvajalec/ Valmistaja
h	Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/ Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referência/ Referentienummer/ Referencennummer/ Beställningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/ Katalógovő číslo/ Objednací číslo/ Каталоген 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/ Armazena entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevares mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí/ Температурно ограничение/ Säilidat temperatuuridel/ Φύλαξη σε θερμοκρασία/ Depozitare între/ Skladičenje med/ Säilytys x-y Celsiusasteen lämpötilassa
X	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/ 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 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
W	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/ Utsatt inte för solljus/ Nie wystawiać na słońce/ Napfénytől távol tartandó/ Nevystavovat' slnečnému svetlu/ Nevystavovat slu w nečnómu světlu/ Да се предпазва от слънчева светлина/ Kaitsta otsese päikesekiirguse eest/ Κρατήστε το μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία/ Τηνεji departe de lumina soarelui/ Ne izpostavljajte sončni svetlobi/ suojaa auringonvalolta
A	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
°C	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
«	Mix tubes with a Vortex mixer/ Mix Röhrchen mit Vortex Mixer/ Mélanger à l'aide d'un vortex/ Miscelare la provetta con agitatore Vortex/ Tubos de mezcla con mezclador de vortex/ Misturar os tubos com um agitador Vortex/ buisjes mengen met een Vortex/ Blanderør med Vortex-mixer/ Blanda rören med en vortexblandare/ Miksowanie rurek w mikserze Vortex/ Csővecskék keverése örvénykeverővel/ Premiešať pomocou prístroja Vortex/ Promícháť pomocí přístroje Vortex/ Разбъркване на епруветките с миксер Vortex/ Segada torukesi Vortexi mikseriga/ Αναμίξτε τους σωληνίσκους με αναδευτήρα Vortex/ Amestecați eprubetele cu ajutorul unui agitator vortex/ Mešanje cevčic z mešalnikom Vortex/ Sekoita putket Vortex sekoittajalla
MTP	Mikrotiterplate/ Mikrotiterplatte/ plaque de microtitrage/ Piastra di microtitolazione/ Placa de microtitulación/ Placa de Microtitulação/ Mikrotiterplaat/ Mikrotiterplade/ mikrotiterplatta/ mikrotiterplaat/ Plytka microtiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiterplaat/ Τρυβλίό μικροπιλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitrská plošča/ Mikrotitruslevy
Rec in	Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituir en/ Reconstituir em/ Rekonstituieren in/ Rekonstituér i/ Rekonstituera/ Rekonstituować w/ Helyreállítás/ Znovu připravit za/ Znovu připravit za/ Разтваряне в/ Moodustada uesti/ Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ Rekonstitui
SPE	Sample/ Probe/ Echantillon/ Campione/ Muestra/ Amostra/ Monster/ Prøve/ prov/ Próbká/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probă/ Vzorec/ Näyte
Ab	Antibody Conjugate/ Antikörperkonjugat/ Anticorps conjugué/ Coniugato di anticorpo/ Conjugado de anticuerpos/ Conjugado anticorpo/ Antilichaamconjugaat/ Antistoffer-konjugat/ Antikroppskonjugat/ Koniugat antycial/ Antitest páros/ Protílátkový konjugát/ Protílátkový konjugát/ Антиляло конюгат/ Antikehad konjugaat/ Σύμπλοκο αντισώματος/ Compuși din anticorpi/ Antitelesa konjugat/ Vasta-aine konjugaatti

CONJ	Enzyme Conjugate/ Enzymkonjugat/ Conjugué enzymatique/ Coniugato di enzima/ Conjugado de enzimas/ Conjugado Enzima/ Enzymconjugaat/ Enzym-konjugat/ Enzymkonjugat/ Koniugat enzymów/ Enzim páros/ Enzymatický konjugát/ Enzymatický konjugát/ ензим конюгат/ Ensüümi konjugaat/ Σύμπλοκο –ενζύμου/ Compuși din enzime/ Encima konjugat/ Enzymi-konjugaatti
BUF	Buffer/ Puffer/ Tampon/ Tampone/ Tampón/ Tampão/ Buffer/ Buffer/ Buffert/ Bufor/ Puffer/ Pufer/ Pufr/ Буфер/ Puhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα/ Tampon/ Pufer/ Puskuri
DILU BUF X	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/ Rozcieńczanie w buforze X/ Hígítás X pufferben/ Riediť v pufrí X/ Ředit v pufru X/ Разреждане в буфер X/ Lahjendada puhvris X/ Αραιώστε σε ρυθμιστικό διάλυμα X/ Diluați în tamponul X/ Razredžiti v pufru X/ Laimennetaan x puskuriin
STD	Standard X/ Standard X/ Etalon X/ Standard X/ Estándar X/ Standard X/ Standaard X/ Standard X/ standard X/ Standard X/ Standard X/ Standard X/ Etalon X/ Стандарт X/ Standard X/ Πρότυπο X/ Standard X/ Standardni X/ Standardi X
Control	Control Serum X/ Kontrollserum X/ Contôle sérique X/ Siero di controllo X/ Suero de control X/ Soro de Controllo X/ controleserum X/ Kontrolserum X/ Kontrollserum X/ Serum kontrolne X/ Ellenőrző szérum X/ Kontrolné serum X/ Kontrolní serum X/ Контролен сѐрум X/ Kontrollseerum X/ Ορός ελέγχου X/ Ser de control X/ Kontrolni serum X/ Kontrolli seerumi X
WASHBUF 20x	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/ Mosópufer koncentrátum/ Koncentrát vymývacieho pufru/ Концентрат на промивен буфер/ Pesupuhvri konsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralnega pufru/ Pesuliuositiiviste
WASHBUF	Washing Buffer/ Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón de lavado/Tampão de Lavagem/ wasbuffer/ Vaskebuffer/ tvättbuffert/ Bufor plukania/ Mosópufer/ Vymývací pufr/ Vymývací pufr/ Prosmivnen bufer/ Pesupuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare /Izpiralni pufer/ Pesuliuos
SUBST TMB	Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ substraat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Szubsztrátum/ Substrát/ Substrát/ Субстрат Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraattiliuos
H₂SO₄	Stopping Solution/ Stopplösung/ Stop Solution/ Soluzione di stop/ Stop Solución/ Solução Stop/ stopoplossing/ Stopopløsning/ Stoppløsning/ Stop roztwór/ Megállító oldat/ Roztok na ukončenie/ Roztok pro ukončení/ Стопираш 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/ Oblepiti podložku lepiacom páskou/ Olepit podložku lepicí páskou/ Пластика с лентата за запечатване/ Katta plaat isoleerkeelplindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperiti placa cu o bandă adezivă/ Prelepiti ploščo/ Peitää mikrotitrauslevy oheisella teipillä
MEASURE	Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590 nm)/ Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)/ Mesure l'absorbance en l'espace de 30 min à 450 nm avec ≥590 nm 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 ≥ 590 nm)/ Binnen 30 minuten bij 450 nm meten (referentiefilter ≥ 590 nm)/ Mål plade i løbet af 30 min ved nm (referencefilter ≥590 nm)/ 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 (Referenčný filter ≥590 nm)/ Měřit 30 minut při 450 nm (Referenční filtr ≥ 590 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/ Bibliografía/ 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/ instructiuni 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/ kaiktiin tarvittaviin mikrotitrauslevyn syvennyksiin

INHALTSVERZEICHNIS / TABLE OF CONTENTS

DEUTSCH	m/rIGF-I ELISA E25 Gebrauchsanweisung.....	5
1	ZWECKBESTIMMUNG	5
2	EINFÜHRUNG	5
3	TESTPRINZIP.....	6
4	WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	7
5	PROBEN.....	8
6	MATERIALIEN	9
7	TECHNISCHE HINWEISE	10
8	TESTDURCHFÜHRUNG	11
9	AUSWERTUNG	12
10	ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG.....	13
ENGLISH	m/rIGF-I ELISA E25 INSTRUCTIONS FOR USE	16
11	LITREATURE / LITERATUR	27
12	INTERNATIONAL ASSAY DESCRIPTION	28

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!

DEUTSCH m/rIGF-I ELISA E25 Gebrauchsanweisung

m/rIGF-I ELISA E25	96 Bestimmungen
Regulatorischer Status	Für Forschungsanwendungen
Testprinzip	Enzymimmunoassay
Dauer (Inkubationszeit)	2 h
Probenpuffer	gebrauchsfertig
Waschpuffer	20fach Konzentrat
Standard	5 Einzel-Standards mit 0,5 - 18 ng/ml rekombinantes IGF-I
Kalibration	Die Kalibration des Assays erfolgte mittels rekombinantem IGF-I
Assay Bereich	0,315 ng/mL – 1800 ng/mL
Kontrolle	2 Serumkontrollen, niedrige bzw. hohe Konzentration, lyophilisiert
Probe	Maus- und Rattenserum und Plasmen.
Erforderliches Probenvolumen	10 µL empfohlen, mindestens 5 µL
Proben Verdünnung	1:100
Analytische Sensitivität	Ø 0,315 ng/mL
Intra- / Interassay Variation	Ø < 10 %

1 ZWECKBESTIMMUNG

Messung von IGF-I in Maus- und Rattenserum und Plasmen.

2 EINFÜHRUNG

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. Er soll als **Werkzeug für die Messung von IGF-I im Maus-/Rattenmodell** im Rahmen der Grundlagenforschung und präklinischer Studien dienen.

Im Folgenden wird, auch wenn ein Vergleich von Mensch und Maus-/Ratte nur begrenzt möglich ist, als Hintergrundinformation das IGF-I System *beim Menschen* kurz dargestellt:

Insulin-like growth factors (IGF)-I und-II spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Proliferation, Differenzierung und spezifischer Funktionen vieler Zelltypen (1-3). IGF-I ist identisch mit Somatomedin C (Sm-C) (4) und hat ein Molekulargewicht von 7649 Dalton (5). Seine wichtigsten Regulatoren sind das Wachstumshormon (WH) und die Ernährung.

Im Gegensatz zu vielen anderen Hormonen sind IGFs mit hoher Affinität an spezifische Bindungsproteine (IGFBP) gebunden. Sieben verschiedene Bindungsproteinen sind derzeit bekannt (7,8,22). Sie binden entweder IGF-I und IGF-II mit ähnlicher Affinität oder weisen eine Präferenz für IGF-II auf (9,10). Ein Hauptproblem bei der Messung von IGF-I resultiert aus der Interferenz mit IGFBPs im Assay. Die direkte Bestimmung in unbehandelten Serumproben (11) führt zu falschen Ergebnissen, weil auf Grund der extrem langsamen Dissoziation des IGF-I/IGFBP-3-Komplexes während der Assay-Inkubationszeit nur ein Teil des IGF-I der Messung zur Verfügung steht. In Abhängigkeit vom Verhältnis von IGF-I zu IGFBPs in der Probe kommt es zu Interferenzen: (s. beispielhaft in Abb.1)

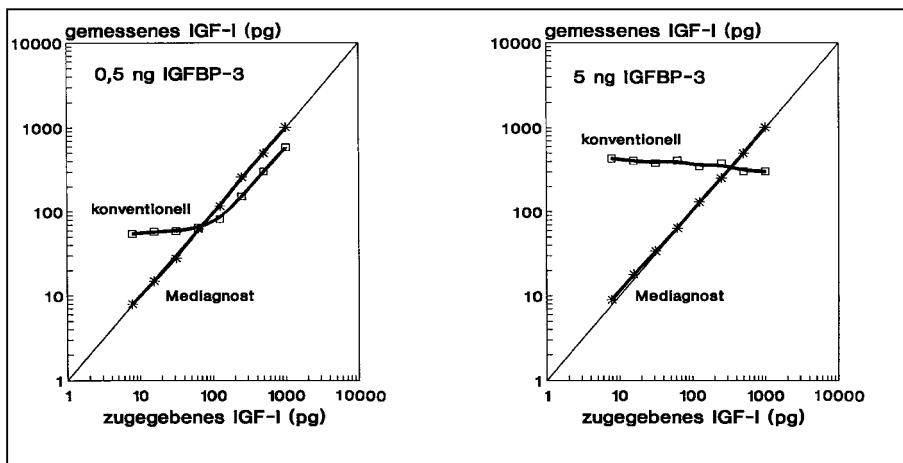


Abb. 1: Interferenz von IGFBP bei IGF-I-Messungen. Bekannte IGF-I-Konzentrationen wurden in Gegenwart von 0,5 ng (links) bzw. 5 ng (rechts) hIGFBP-3 mit einem konventionellen Assay (□) bzw. einem IGFBP-blockierten Mediagnost Assay gemessen.

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurde ein einfacher Assay entwickelt, der vor der eigentlichen Messung keine besondere Probenvorbereitung erfordert, abgesehen von einer Ansäuerung oder Verdünnung in einem speziell zusammengesetzten Puffersystem.

3 TESTPRINZIP

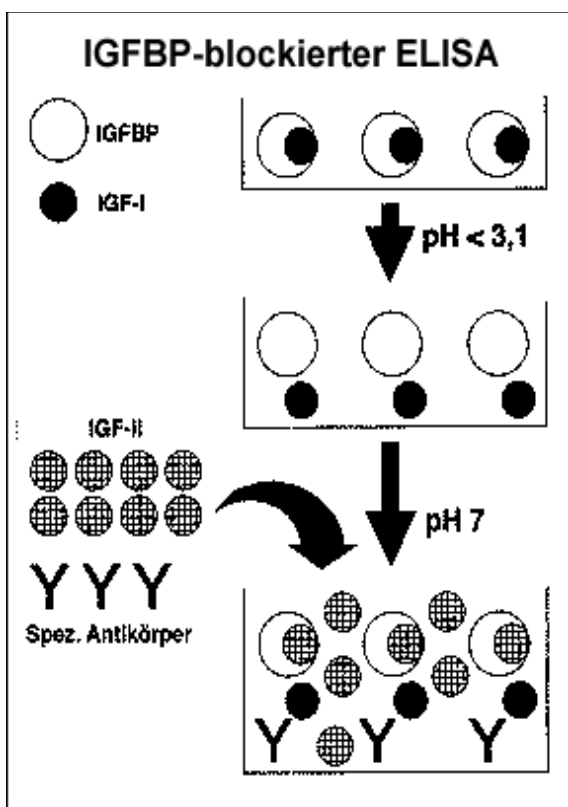


Abb. 2. Prinzip des IGFBP-blockierten ELISA.

Um IGF-I von den IGFBPs zu dissoziieren, müssen die Proben in einem sauren Puffer verdünnt werden (Abb. 2). Die verdünnten Proben werden dann in die Vertiefungen pipettiert, der pH wird dabei neutralisiert. Nach Neutralisation der Probe besetzt das in hohem Überschuss vorhandene IGF-II die IGF-Bindungsstellen der Bindungsproteine. Dies erlaubt die problemlose Messung des nun freien IGF-I. Bei diesem Verfahren werden also nicht die IGFBP-Moleküle per se entfernt, sondern lediglich deren Funktion und damit ihre Interferenz im Assay neutralisiert. Wegen der extrem niedrigen Kreuzreaktivität des IGF-I-Antikörpers mit IGF-II stört der hohe Überschuss an IGF-II die Interaktion mit IGF-I nicht.

Im weiteren Verlauf wird der Assay wie ein konventioneller ELISA unter Verwendung eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugates fortgeführt.

4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Nur zum In-vitro Gebrauch. Nur zum Gebrauch durch Fachpersonal.

Nur für Forschungsanwendungen

Der Mediagnost E25 Kit ist nur zum In-vitro Gebrauch für Forschungszwecken 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.

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

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

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. Ein Sicherheitsdatenblatt ist auf Nachfrage verfügbar.

Ratten/ Mausserum:

in folgenden Komponenten enthalten: Kontrollserum KS1 und Kontrollserum KS2

Reagenzien

A-E, AK, EK, PP, WP

enthalten als Konservierungsmittel eine Mischung aus **5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one** und **2-methyl-4-isothiazolin-3-one** (<0,015%)

H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
P272	Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
P261	Einatmen von Dampf vermeiden.
P333+P313	Bei Hautreizung oder –ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P302+P352	BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.
P501	Entsorgung des Inhalts /des Behälters gemäß den örtlichen / regionalen / nationalen / internationalen Vorschriften.

Substratlösung (S)

Das TMB-Substrat (S) enthält 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin (<0.05%)

H315	Verursacht Hautreizungen.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H335	Kann Atemwege reizen.
P261	Einatmen von Staub/ Rauch/ Gas/ Nebel/ Dampf/ Aerosol vermeiden.
P305+P351+	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen.
P338	Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

Stopplösung (SL)

Die Stopplösung enthält 0,2 M Schwefelsäure (H₂SO₄)

H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
H314	Verursacht schwere Verätzung der Haut und schwere Augenschäden.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
P301+P330+	BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen.
P331	KEIN Erbrechen herbeiführen.
P305+P351+	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen.
P338	Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
P309+P310	BEI Exposition oder Unwohlsein: Sofort GIFT INFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

4.1 Erste-Hilfe Maßnahmen:

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

Nach Augenkontakt: Nach Berührung mit den Augen mindestens 15 Minuten lang 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.

5 PROBEN

5.1 Probenmaterial

Geeignet sind Seren und Heparin,- EDTA und Citratplasmen von Ratten und Mäusen. Eine eventuelle Verdünnung der Proben durch das Antikoagulans muss berücksichtigt werden.

Der Einfluss von Heparin (30 IE/mL), EDTA (6,8 mM) und NaCitrat (0,015 M) auf die Messung wurde bestimmt. Pufferlösung wurde mit entsprechenden Mengen der Substanzen sowie rekombinatem Maus-/Ratten IGF-I versetzt und die Wiederfindung bestimmt. Es konnten keine signifikanten Auswirkungen auf die Wiederfindung detektiert werden: Die durchschnittliche Wiederfindung betrug 108%.

Zellkulturmedium ist nach Vorverdünnung von 1:2 mit Probenpuffer PP als Probenmatrix geeignet.

5.2 Probenentnahme

Hämolytische Reaktionen sind zu vermeiden.

Das Blut koagulieren lassen und das Serum durch Zentrifugation abtrennen.

5.3 Erforderliches Probenvolumen: 10 µL empfohlen, (Mindestvolumen 5 µL)

5.4 Probenstabilität

In fest verschlossenen, geeigneten Probengefäßen

- Lagerung bei 20-25°C max. 2 Tag
- Lagerung bei -20°C max. 2 Jahre
- Gefrier-Auftau-Zyklen max. 2

Die Proben sollten nicht öfter als zweimal eingefroren/aufgetaut werden. IGF-I erwies sich nach mehrfachen Frier/Tauzyklen in Proben als instabil, entsprechend wurden Messwerte tiefer bestimmt.

5.5 Probenverdünnung

- Verdünnung: **1:100** mit Probenpuffer **PP**
- Beispiel: **10 µL** Probe werden zu **990 µL Probenpuffer PP** gegeben (Verdünnungsfaktor 100). Nach dem Mischen werden von dieser Lösung 50 µl pro Bestimmung im Assay eingesetzt. mindestens 15 min, max. 120 min inkubieren. Davon **50 µL** pro Bestimmung einsetzen.
- Individuell können Werte aber stark variieren, es empfiehlt sich dies zu prüfen und eventuell die Probenverdünnung anzupassen.
- Gegebenenfalls kann, je nach erwarteten **IGF-I-Werten**, stärker oder geringer in **Probenpuffer PP** verdünnt werden.
- Achtung: Serum- und Plasmaproben müssen mind. **1:10** in **Probenpuffer PP** verdünnt werden, um eine ausreichende Ansäuerung der Proben zu erreichen.

6 MATERIALIEN

6.1 Inhalt der Testpackung

Die im Kit gelieferten Reagenzien sind ausreichend für 96 Tests einschließlich der Standardkurve.

MTP	Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, beschichtet mit Hamster-anti-m/r-IGF-I-Antikörper. Die Vertiefungen sind einzeln abbrechbar.	(8x12) Vertiefungen
A-E	Standards , lyophilisiert (rekombinantes IGF-I), die Konzentrationen sind auf dem Qualitätszertifikat angegeben.	5 x 1 mL
KS1	Kontrollserum 1 , lyophilisiert, (Maus-/Rattenserum), die Konzentration ist auf dem Qualitätszertifikat in ng/mL angegeben.	1 x 500 µL
KS2	Kontrollserum 2 , lyophilisiert, (Maus-/Rattenserum), die Konzentration ist auf dem Qualitätszertifikat in ng/mL angegeben.	1 x 500 µL
AK	Antikörperkonjugat , gebrauchsfertig, Ziegen-anti-m/rIGF-I-Antikörper biotinyliert.	1 x 7 mL
EK	Enzymkonjugat (POD) , gebrauchsfertig, Streptavidin-Peroxidase-Konjugat.	1 x 12 mL
PP	Probenpuffer , gebrauchsfertig	1 x 125 mL
WP	Waschpuffer WP , 20fach konzentrierte Lösung	1 x 50 mL
S	Substrat S , gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase (POD)-Substrat, stabilisiertes Tetramethylbenzidin.	1 x 12 mL
SL	Stopplösung SL , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure.	1 x 12 mL
-	Abdeckfolie für die Mikrotiterplatte	2 x
	Packungsbeilage	1 x
-	Qualitätszertifikat	1 x

6.2 Nicht mitgelieferte, benötigte Materialien

- Entmineralisiertes Wasser oder destilliertes Wasser (Aqua destillata) (**A. dest.**), 950 mL.
- Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen
- Einmalröhrchen aus Polyethylen PE/ Polypropylen PP Röhrchen zum Verdünnen der Proben
- Vortex-Mixer
- Mikrotiterplattenschüttler (350 rpm)
- Mikrotiterplattenwasher (empfohlen)
- Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und ³ 590 nm

7 TECHNISCHE HINWEISE

Lagerbedingungen

Nach Erhalt sollte der Test-Kit bei 2 - 8°C (rekonstituierte Reagenzien bei -20°C) bis zum Verfallsdatum gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

Haltbarkeit

Nicht verwendete Streifen **der Testplatte** sind zusammen mit dem Trockenkissen **luftdicht** in dem wiederverschließbaren Klippbeutel bei 2° - 8°C zu lagern. Die Streifen bitte nur in dem mitgelieferten Rahmen verwenden. **Rekonstituierte Komponenten** (Standard und Kontrollserum) können bei -20°C für 2 Monate gelagert werden. Zur weiteren Verwendung schnell aber schonend Auftauen (keine Temperaturerhöhung über Raumtemperatur und kein übermäßiges Vortexen), bis zu 1 dieser Einfrier-Auftauzyklen zeigten keinen signifikanten Einfluss auf den Test. **Achtung:** die Standards dürfen nur einmal aufgetaut werden – gegebenenfalls aliquotieren. Der 1:20 gebrauchsfertig verdünnte Waschpuffer **WP** ist **nur 4 Wochen** haltbar.

Vorbereitung der Reagenzien

Alle Komponenten des Kits müssen **vor Gebrauch auf Raumtemperatur** 20-25°C gebracht werden, die evtl. in manchen Puffern vorhandenen Präzipitate müssen vor Gebrauch durch Mischen und Erwärmen wieder gelöst werden. Reagenzien aus Kits mit unterschiedlichen Chargen-Nummern sollten nicht vermischt werden.

Rekonstitution

Die Standards und Kontrollserum werden mit dem im Kit enthaltenen Probenpuffer **PP** 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.

Verdünnung

Nach der Rekonstitution werden die Kontrollseren im gleichen Verhältnis wie die Proben mit dem Verdünnungspuffer **VP** verdünnt.

Das benötigte Volumen des Waschpuffers **WP** wird vorbereitet, indem das 20fach Konzentrat im Verhältnis 1:20 mit Aqua dest. verdünnt wird.

Inkubation

Inkubation bei Raumtemperatur bedeutet: **Inkubation bei 20 - 25°C**. Die Substratlösung **S**, stabilisiertes H₂O₂-Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich–Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

Testdurchführung

Die Messungen (Leerwert, Standards **A - E**, Kontrollseren **KS1 und KS2** 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 sollten Standards **A - E**, Kontrollseren **KS1 und KS2** und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden z.B. in 15 Minuten). Das Enzymkonjugat **EK** sowie nachfolgend die Substratlösung **S** und die Stopplösung **SL** sollten in der gleichen Reihenfolge und in dem gleichen Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

Schütteln

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.

Waschen

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.

Bei Gebrauch eines speziellen **automatischen Mikrotiterplattenwashers** ist unbedingt dessen Gebrauchsanweisung zu befolgen. Die Geräteeinstellungen müssen u.a. der Mikrotiterplattegeometrie 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 Alternative. 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 fuselndem Zellstoff gründlich entfernt werden.

8 TESTDURCHFÜHRUNG

Vorbereitung der Reagenzien

Reagenzpräparation:		Rekonstitution:	Verdünnung:
A-E	Standards	in 1 mL Probenpuffer PP	-
KS1	Kontrollserum 1	in 500 µL Probenpuffer PP	1:100 mit PP
KS2	Kontrollserum 2	in 500 µL Probenpuffer PP	1:100 mit PP
WP	Waschpuffer	-	1:20 mit Aqua dest.

Proben mit Probenpuffer **PP 1:100** verdünnen, **sofort mischen**, mindestens 15 min, **max. 120 min inkubieren**. Davon **50 µl pro Bestimmung** einsetzen

Vor der Testdurchführung alle **Reagenzien** auf **Raumtemperatur (20-25°C)** bringen.

Testdurchführung in Doppelbestimmung:

Pipettieren	Reagenzien	Position
50 µL	Antikörper-Konjugat AK	in alle benötigten Vertiefungen pipettieren
50 µL	Probenpuffer PP (Leerwert)	A1/A2
50 µL	Standard A (0,5 ng/mL)	B1/B2
50 µL	Standard B (2,5 ng/mL)	C1/C2
50 µL	Standard C (6 ng/mL)	D1/D2
50 µL	Standard D (12 ng/mL)	E1/E2
50 µL	Standard E (18 ng/mL)	F1/F2
50 µL	Kontrollserum KS1 (1:100 verdünnt)	G1/G2
50 µL	Kontrollserum KS2 (1:100 verdünnt)	H1/H2
50 µL	Probe (1:100 verdünnt)	in die restlichen Vertiefungen nach Bedarf pipettieren

Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.

Proben-Inkubation: 1 h bei 20 - 25°C, 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

Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.

Inkubation: 30 Minuten bei 20-25°C, 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

Substrat S Inkubation: 30 Minuten im Dunklen bei 20 - 25°C

100 µL	Stopplösung SL	In jede Vertiefung
--------	-----------------------	--------------------

Messung der Absorption innerhalb von 30 min bei **450 nm** (Referenzfilter ≥ 590 nm).

9 AUSWERTUNG

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

9.1 Erstellung der Standardkurve

Die bereitgestellten Standards enthalten folgende IGF-I-Konzentrationen:

Standard	A	B	C	D	E
ng/mL	0,5	2,5	6	12	18

- 1) Ermittlung des **Mittelwertes** 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 IGF-I-Konzentration der verdünnten Kontrollen KS1 & KS2 bzw. der verdünnten Proben (mit der individuellen Verdünnung, allgemein für Serum- und Plasma empfohlen 1:100). Die **Multiplikation** des jeweiligen berechneten IGF-I-Gehaltes **mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor** ergibt dann die IGF-I-Konzentration der unverdünnten Ausgangslösungen

9.2 Beispiel einer typische Standardkurve

Die exemplarischen Daten und die Standardkurve in der Abbildung 3 können **nicht** für die Berechnung der Testergebnisse genutzt werden! Für jeden Test muss eine eigene Standardkurve mitgeführt werden.

	Leerwert	A	B	C	D	E
ng/mL	0	0,5	2,5	6	12	18
OD (450-620 nm)	0,07	0,114	0,614	1,283	1,690	1,923

Die hier beispielhaft gezeigte Standardkurve (Abbildung 3) darf **nicht für die Auswertung** Ihres Testes genutzt werden. Für jeden Test ist eine eigene Standardkurve anzufertigen.

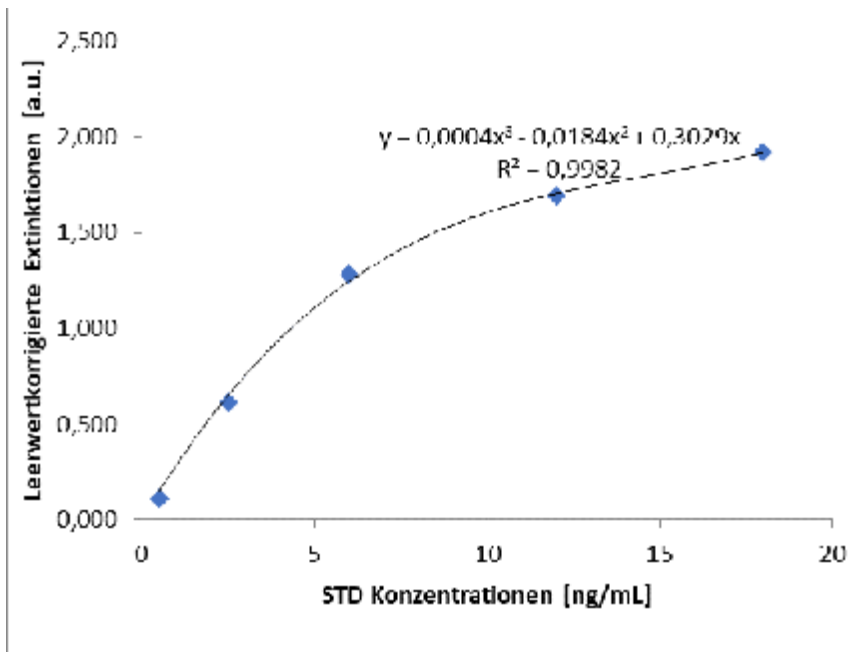


Abb. 3 Typische Standardkurve mit einem Polynom 3. Grades zur Berechnung der Standardkurve

Beispielhafte Berechnung der IGF-I – Konzentration einer unverdünnten Probe:

9.3 Beispielhafte Berechnung der m/IGF-I-Konzentration

Gemessene Extinktion der Probe: 1,3525
 Gemessene Extinktion des Nullwertes: 0,07

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

$$1,283 = 0,0004x^3 - 0,0184x^2 + 0,3029x \quad 6,107 = x$$

und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (**1:100**) somit eine IGF-I Konzentration in der unverdünnten Probe von 610,7 ng/mL

$$6,107 \times 100 = 610,7 \text{ ng/mL}$$

10 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG

10.1 Sensitivity

Die Sensitivität wurde durch Messen des Leerwertes und der Berechnung der theoretischen Konzentration des Leerwertes +2 SA bestimmt. Die analytische Sensitivität des Mediagnost E25 beträgt als Mittelwert Ø 0,315 ng/mL (Bereich 0,262-0,405).

10.2 Präzision

Intra-Assay-Varianz

Mehrere Proben wurden 16 in dem gleichen Assay gemessen. Beispielhafte Ergebnisse sind in der Tabelle 1 gezeigt, im Durchschnitt betrug der Variationskoeffizient Ø < 10%.

Tabelle 1 Intra-Assay Variabilität. Die IGF-I Konzentrationen wurden innerhalb eines Tests in Doppelbestimmung ermittelt und die Variabilität als Variationskoeffizient (VK) berechnet.

	Anzahl Bestimmungen	Mittelwert (µg/L)	Standardabweichung (µg/L)	VK (%)
Probe 1	16	246	13,09	5,32
Probe 2	16	684	52,27	7,64
Probe 3	16	679	93,61	13,79

Inter-Assay-Varianz

Serumproben wurden in unabhängigen Assays gemessen. Im Durchschnitt betrug der Variationskoeffizient $\emptyset < 10\%$. Beispielhafte Ergebnisse sind in Tabelle 2 detailliert dargestellt.

Tabelle 2 Inter-Assay Variabilität Die IGF-I Konzentrationen wurden in unabhängigen Tests in Doppelbestimmung ermittelt und die Variabilität als Variationskoeffizient (VK) berechnet.

	Anzahl Bestimmungen	Mittelwert (µg/L)	Standardabweichung (µg/L)	VK (%)
Probe 1	24	291	20	7
Probe 2	26	695	51	7
Probe 3	23	773	76	10
Probe 4	23	256	15	6
Probe 5	26	151	21	14
Probe 6	26	444	37	8
Probe 7	26	127	12	9
Probe 8	26	686	59	9
Probe 9	26	581	50	9
Probe 10	26	178	12	7

10.3 Methoden Vergleich

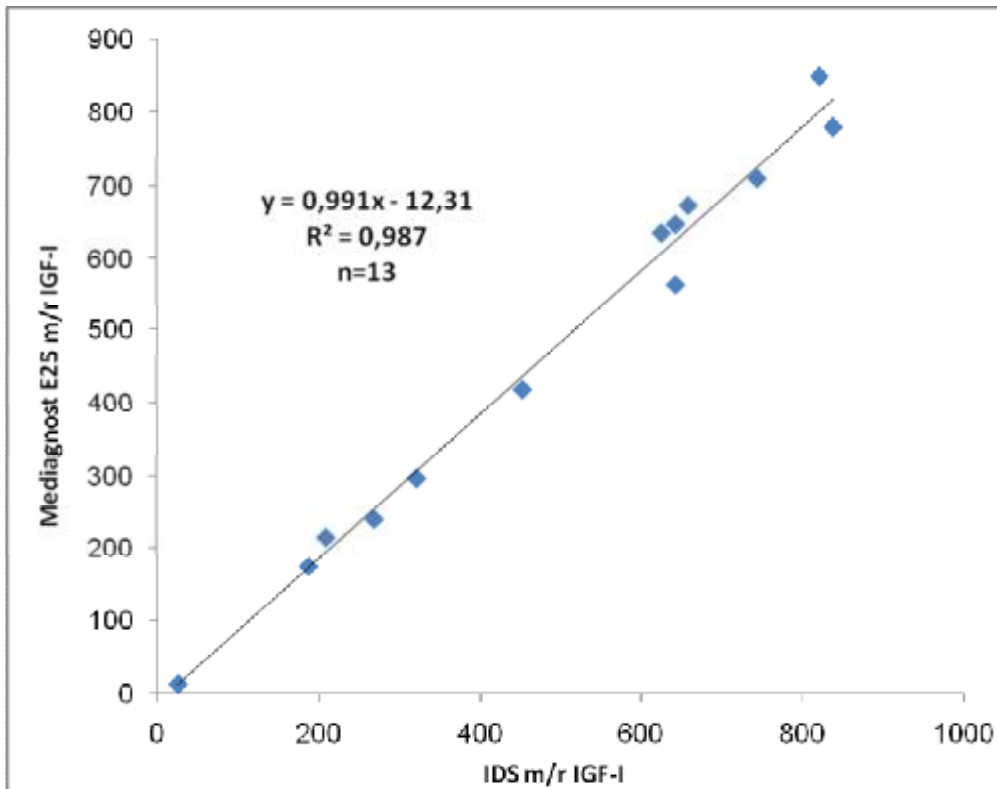


Abbildung 4 Methoden Vergleich des Mediagnost E25 m/r IGF-I ELISA dem IDS m/r IGF-I ELISA.

10.4 Linearität

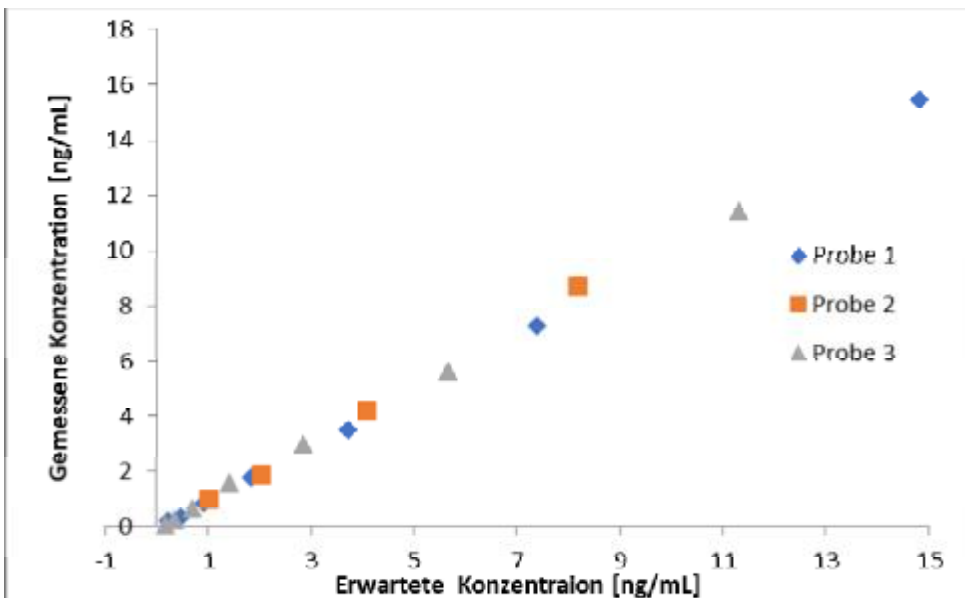


Abbildung 5 Linearität. Vergleich der theoretisch erwarteten und der gemessenen IGF-I Konzentration in den jeweiligen Verdünnungen. Von einer 1:10 Verdünnung bis zu einer Konzentration von 0,5 ng/mL ist die Linearität der Probenverdünnung gegeben.

ENGLISH m/rIGF-I ELISA E25 INSTRUCTIONS FOR USE

TABLE OF CONTENTS

ENGLISH	m/rIGF-I ELISA E25 INSTRUCTIONS FOR USE	16
1	INTENDED USE	17
2	INTRODUCTION	17
3	PRINCIPLE.....	18
4	WARNINGS AND PRECAUTIONS	19
5	SAMPLES.....	20
6	MATERIALS	21
7	TECHNICAL NOTES.....	22
8	ASSAY PROCEDURE.....	23
9	EVALUATION OF RESULTS	24
10	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	25
11	LITREATURE / LITERATUR	27
12	INTERNATIONAL ASSAY DESCRIPTION	28

m/rIGF-I ELISA, E25	96 Determinations
Regulatory Status	For Research Use Only.
Principle of the test	Enzyme Immunoassay
Duration (incubation period)	2 h
Sample Buffer	Ready for use
Washing Buffer	20fold concentrated
Standard	Single Standards 0.5 - 18 ng/ml
Calibration	The assay is calibrated against recombinant IGF-I
Assay Range	0.315 ng/mL – 1800 ng/mL
Control	2 Serum Controls, low and high concentrations, lyophilised
Sample	mouse / rat serum and plasma
Required sample volume	10 µL recommended, at least 5 µL
Sample dilution	1:100
Analytical Sensitivity	Ø 0.315 ng/mL
Intra- / Interassay Variance	Ø < 10 %

1 INTENDED USE

Measurement of IGF-I in mouse / rat serum and plasma.

2 INTRODUCTION

Beside different cell culture models and studies with human material, mice and rats are suitable model organisms for basic research and pre-clinical studies. Thus, we developed this test system as a tool for IGF-I measurements in mice and rat for usage in research and pre-clinical studies. Even if the comparability of mice and humans is limited, we offer some background information on the human IGF-I system in the following section:

Insulin-like growth factors (IGF) I and II play a pivotal role in regulating the proliferation and differentiation of many cell types (1-3). IGF-I is identical with Somatomedin C (Sm-C) (4) and has a molecular weight of 7649 daltons (5). Its major regulators are growth hormone (GH) and nutrition (6). In contrast to many other peptide hormones, IGFs are avidly bound to specific binding proteins (IGFBP). The seven IGFBPs which are known at present (7,8,22) either bind IGF-I and IGF-II with similar affinities or show a preference for IGF-II (9,10).

A major problem of IGF-I measurement results from the interference of IGFBPs in the assay. Direct determinations in untreated serum samples (11) give false values because of the extremely slow dissociation of the IGF-I/IGFBP-3 complexes during the assay incubation. Depending on the ratio IGF-I to IGFBP in the sample interference comes up (see example Figure 1)

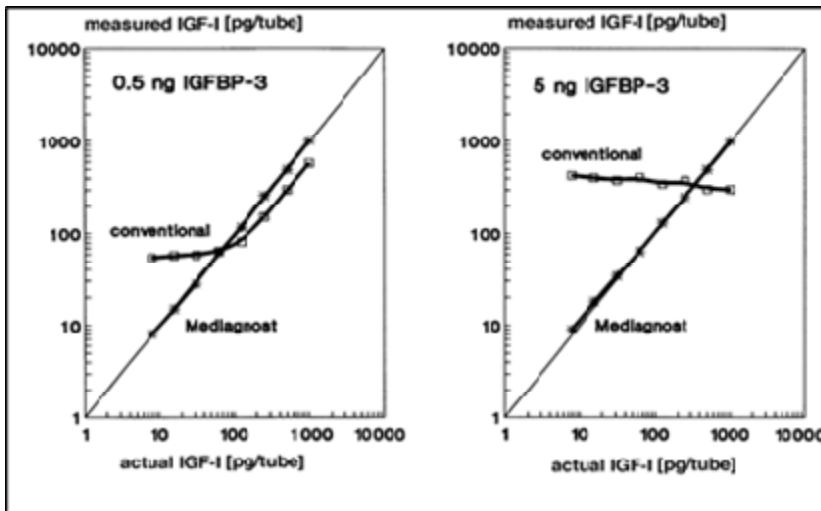


Figure 1 Interference of IGFBP in IGF-I measurements. Known concentrations of IGF-I were assayed in the presence of 0.5 ng (left) or 5 ng (right) hIGFBP-3 by a conventional (□) and by the IGFBP-blocked assay (*).

To avoid these difficulties, an uncomplicated assay was developed, in which special sample preparation, except acidification or dilution in a specially designed buffer system, is not required before measurement.

3 PRINCIPLE

The Mediagnost ELISA for m/r IGF-I E25 is a so-called Sandwich-Assay. It utilizes two specific

and high affinity antibodies for this protein. The IGF-I in the sample binds to the immobilized first antibody on the microtiter plate, the biotinylated and Streptavidin-Peroxidase conjugated second specific anti-IGF-I-Antibody binds in turn to the immobilized IGF-I. In the closing substrate reaction, the turn of the colour will be high specific catalysed, quantitatively depending on the IGF-I-level of the samples.

In order to dissociate IGF-I from the IGFBPs, the samples must be diluted in an acidic buffer (Figure 2). The diluted samples are then pipetted into the wells, by this the pH-value will be neutralized. After neutralization of the samples, the excess IGF-II occupies the IGF-binding sites of the binding proteins, thus allowing the measurement of resulting free IGF-I. With this method, the IGFBPs are not removed, but their function and therefore their interference in the assay is neutralized. Due to the extremely low cross-reactivity of the IGF-I antibody with IGF-II, the excess of IGF-II does not disturb the interaction with IGF-I. The test runs like a conventional ELISA using a Streptavidin-Peroxidase-Enzyme Conjugate.

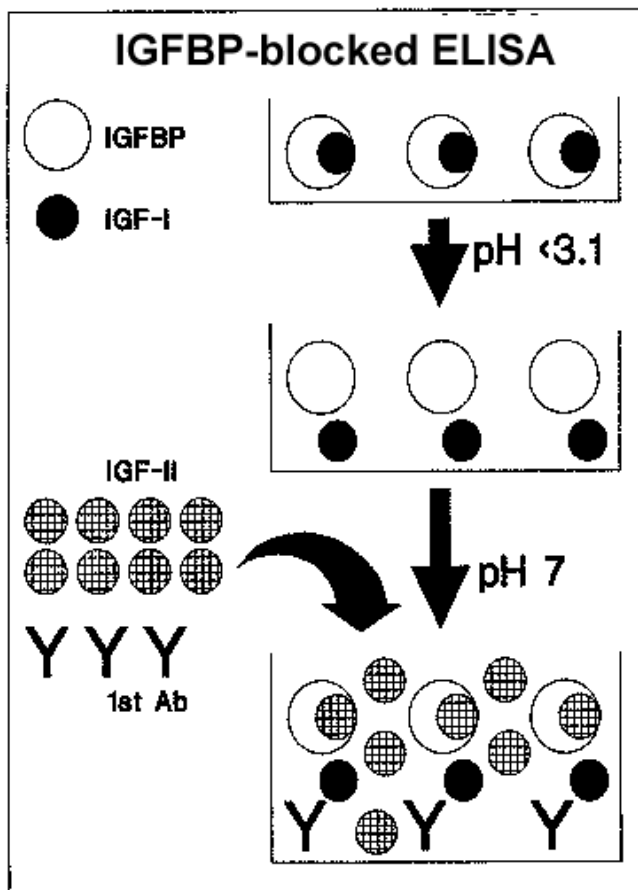


Figure 2 Principle of the IGFBP blocked IGF-I ELISA

4 WARNINGS AND PRECAUTIONS

For In Vitro Use only. For Professional use only. For Research Use Only.

The Mediagnost kit is suitable only for research use only and not for internal use in humans and animals. Follow strictly the test protocol. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything has been understood. Mediagnost will not be held responsible for any loss or damage (except as required by statute) howsoever caused, arising out of noncompliance with the instructions provided.

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

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

Appropriate precautions and good laboratory practices must be used in the storage, handling and disposal of the kit reagents. The disposal of the kit components must be made according to the local regulations. Material Safety Data Sheet is available on request.

Mouse / Rat Serum

Following components contain Mouse or Rat serum: Control Serum KS1 and KS2

Reagents A-E, AK, EK, VP, WP

Contain as preservative a mixture of **5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one** (<0.015%)

H317	May cause an allergic skin reaction.
P280	Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection.
P272	Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace.
P261	Avoid breathing dust/ fume/ gas/ mist/ vapours/ spray.
P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/ attention.
P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P501	Dispose of contents/ container in accordance with local/ regional/ national/ international regulations.

Substrate Solution (S)

TMB-Substrate (S) contains 3,3',5,5' Tetramethylbencidine (<0.05%)

H315	Causes skin irritation.
H319	Causes serious eye irritation.
H335	May cause respiratory irritation.
P261	Avoid breathing dust/ fume/ gas/ mist/ vapours/ spray.
P305+P351+	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes.
P338	Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

Stopping Solution (SL)

The Stopping solution contains 0.2 M acid sulphur acid (H₂SO₄)

H290	May be corrosive to metals.
H314	Causes severe skin burns and eye damage.
P280	Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection.
P301+P330+	IF SWALLOWED: rinse mouth.
P331	Do NOT induce vomiting.
P305+P351+	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes.
P338	Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P309+P310	IF exposed or if you feel unwell: Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician.

4.1 General first aid procedures:

Skin contact: Wash affected area rinse immediately with plenty of water at least 15 minutes. Remove 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: After swallowing the product, if the affected person is conscious, rinse out the mouth with plenty of water: seek medical advice immediately.

5 SAMPLES

5.1 Sample type

Serum samples as well as Heparin-, EDTA- and Citrat-Plasma samples are suited. Possible dilution of the sample by the anticoagulant must be considered.

Influence of Heparin (30IE/mL), EDTA (6,8mM) and NaCitrat (0,015M) on the measurement of IGF-I has been investigated in recovery experiments. Buffer solution was enriched with recombinant IGF-I and the above-mentioned substances. No significant influence on the recovery of IGF-I was detected, on average the recovery of recombinant material in comparison to enriched PBS was 108%.

Cell culture medium is suitable as sample matrix after predilution of 1:2 with **Sample Buffer PP**.

5.2 Specimen collection

Use standard venipuncture for the blood sampling. Haemolytic reactions are to be avoided.

Required sample volume: recommended 10 µL, min. 5 µL

5.3 Sample stability

In firmly closed sample vials:

- Storage at 20-25°C: max. 2 days
- Storage at -20° C: max. 2 years
- Freeze-thaw cycles max. 2

The storage of samples over a period of 2 years at -20°C, showed no influence on the reading.

Therefore, it is recommended to keep sample refrigerated or frozen as soon as possible after separation of coagulated and corpuscular blood components and to avoid more than 2 freeze-thaw cycles.

5.4 Sample dilution

- Dilution: **1:100** with **Sample Buffer PP**
- Pipette **990 µL Sample Buffer PP** in PE-/PP-Tube (application of a multi-stepper is recommended in larger series); add **10 µL sample** (dilution 1:100). After mixing use 50 µL of this dilution in the assay.
- Attention: serum and plasma samples must be diluted at least 1:10 in **Sample Buffer PP** in order to achieve sufficient acidification of the samples.
- Depending on the expected IGF-I values the samples can be diluted higher or lower in **Sample Buffer PP**.

6 MATERIALS

6.1 Materials provided

The reagents listed below are sufficient for 96 wells including the standard curve.

MTP	Microtiter plate , ready for use, coated with hamster-anti-m/r-IGF-I-antibody. Wells are	(8x12) wells
A-E	Standards , lyophilized, (recombinant IGF-I), concentrations are given on vial labels and on quality certificate.	5 x 1 mL
KS1	Control Serum 1 , lyophilised, (Mouse/ Rat Serum), concentration is given on quality certificate in ng/mL.	1 x 500 µL
KS2	Control Serum 2 , lyophilised, (Mouse/ Rat Serum), concentration is given on quality certificate in ng/mL.	1 x 500 µL
AK	Antibody Conjugate , ready for use, contains goat biotinylated anti-m/rIGF-I antibody.	1 x 7 mL
EK	Enzyme Conjugate , ready for use, contains HRP (Horseradish-Peroxidase)-labelled Streptavidin.	1 x 12 mL
PP	Sample Buffer , ready for use	1 x 125 mL
WP	Washing Buffer , 20-fold concentrated solution	1 x 50 mL
S	Substrate , ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP) substrate, stabilised Tetramethylbencidine.	1 x 12 mL
SL	Stopping Solution , ready for use, 0.2 M sulphuric acid.	1 x 12 mL
-	Sealing Tape , for covering the microtiter plate .	2 x
	Instructions for use	1 x
--	Quality Certificate	1 x

6.2 Materials required, but not provided

- Distilled (Aqua destillata) or deionized water for dilution of the Washing Buffer **WP (A. dest.)**, **950 mL**.
- Precision pipettes and multichannel pipettes with disposable plastic tips
- Polyethylene PE/Polypropylene PP tubes for dilution of samples
- Vortex-mixer
- Microtiter plate shaker (350 rpm)
- Microtiter plate washer (recommended)
- Micro plate reader ("ELISA-Reader") with filter for 450 and ³ 590 nm

7 TECHNICAL NOTES

Storage Conditions

Store the kit at 2-8°C after receipt until its expiry date. The lyophilized reagents should be stored at –20 °C after reconstitution. Avoid repeated thawing and freezing.

Storage Life

Store the unused strips and microtiter wells **airtight** together with the desiccant at 2-8°C in the clip-lock bag, use in the frame provided. The **reconstituted components** standards **A-E** and Control Sera **KS1** and **KS2** must be stored at –20°C (max. 2 Months). **Attention:** Standards should be thawed only once- where required please store aliquoted in adequate volumens. For further use, thaw quickly but gently (avoid temperature increase above room temperature and avoid excessive vortexing). One of these freeze-thaw cycles showed no significant effect on the test

The 1:20 diluted Washing Buffer **WP** is 4 weeks stable at 2-8°C

Preparation of reagents

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. Reagents with different lot numbers cannot be mixed.

Reconstitution

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

Dilution

After reconstitution dilute the Control **KS1** and **KS2** with the Sample Buffer **PP** in the same ratio as the sample.

The required volume of Washing Buffer **WP** is prepared by 1:20 dilution of the provided 20 fold concentrate with Aqua dest.

Assay Procedure

When performing the assay, Blank, Standards **A-E**, Controls **KS1** and **KS2** 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 the Enzyme Conjugate **EK** as well as the succeeding Substrate Solution **S** should be added to the plate in the same order and in the same time interval as the samples. Stopping Solution **SL** should be added to the plate in the same order as Substrate Solution **S**. All determinations (Blank, Standards **A-E**, Control **KS1** and **KS2** and samples) should be assayed in duplicate. For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

Incubation

Incubation at room temperature means: Incubation at 20 - 25°C. The Substrate Solution **S**, stabilised Tetramethylbencidine, is photosensitive–store and incubation in the dark.

Shaking

The incubation steps should be performed at mean rotation frequency of a particularly suitable microtiter plate shaker. We are recommending approx. 350 rpm. Due to certain technical differences deviations may occur, in case the rotation frequency must be 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.

Washing

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 **WP** 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.

Manual washing should be used. Washing Buffer may be dispensed via a multistepper device, a multichannel pipette, or a squirt bottle. Decant contents into a biohazard bin, then blot plate on absorbent tissue. Wash the plate by adding 300 µL Washing Buffer **WP**/well, then decant and blot on absorbent tissue. Repeat this step 4 more times for total of 5 washes.

8 ASSAY PROCEDURE

Preparation of reagents		Reconstitution:	Dilution
A-E	Standards	in 1 mL Sample Buffer PP	-
KS1	Control Serum 1	in 500 µL Sample Buffer PP	1:100 with Sample Buffer PP
KS2	Control Serum 2	in 500 µL Sample Buffer PP	1:100 with Sample Buffer PP
WP	Washing Buffer	-	1:20 with Aqua dest.
Dilute samples 1:100 in Sample Buffer PP, mix immediately, incubate at least 15 min, max 2 h, incubate max. 2h. Use 50 µl for each well in the assay.			
Before assay procedure bring all reagents to room temperature 20-25°C.			
Assay procedure in double determination			
Pipette	Reagents		Position
50 µL	Antibody Conjugate AK		in <u>all</u> wells used
50 µL	Sample Buffer PP (Blank)		A1/A2
50 µL	Standard A (0.5 ng/mL)		B1/B2
50 µL	Standard B (2.5 ng/mL)		C1/C2
50 µL	Standard C (6 ng/mL)		D1/D2
50 µL	Standard D (12 ng/mL)		E1/E2
50 µL	Standard E (18 ng/mL)		F1/F2
50 µL	Control Serum KS1	(1:100 diluted)	G1/G2
50 µL	Control Serum KS2	(1:100 diluted)	H1/H2
50 µL	Sample	(1:100 diluted)	in the rest of the wells according the requirements
Cover the wells with the sealing tape.			
Sample-Incubation: 1 h at 20-25°C, 350 rpm			
5x 300 µL	Decant the contents of the wells and wash 5 x with 300 µL each Washing Buffer WP/ well		In each well
100 µL	Enzyme Conjugate EK		In each well
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation: 30 Minutes at 20-25°C, 350 rpm			
5x 300 µL	Decant the contents of the wells and wash 5 x with 300 µL each Washing Buffer WP/ well		In each well
100 µL	Substrate Solution S		In each well
Incubation: 30 Minutes in the Dark at 20-25°C			
100 µL	Stopping Solution SL		In each well
Measure the absorbance within 30 min at 450 nm with ≥ 590 nm as reference wavelength.			

9 EVALUATION OF RESULTS

For the evaluation of the assay it is required that the absorbance values of the should be below 0.25, and the absorbance of standard E should be above 1.00. Samples, which yield higher absorbance values than **Standard E**, should be re-tested with a higher dilution.

9.1 Establishing of the standard curve

Standards are provided in the following concentrations:

Standard	A	B	C	D	E
ng/mL	0.5	2.5	6	12	18

- 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 samples and standards
- 3) Plot the standard concentrations on the x-axis versus the mean value of the absorbance of the standards on the y-axis.
- 4) 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 four parametric logistic (4-PL) curve fit should be used for recalculation of IGF-I concentrations.
- 5) The IGF-I 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 IGF-I concentration of the **undiluted sample** and of KS1 & KS2 is calculated **by multiplication** with the respective dilution factor.

9.2 Example of a typical standard curve

The following data is for demonstration only and cannot be used in place of data generation at the time of assay.

	Blank	A	B	C	D	E
ng/mL	0	0.5	2.5	6	12	18
OD (450-620 nm)	0.07	0.114	0.614	1.283	1.690	1.923

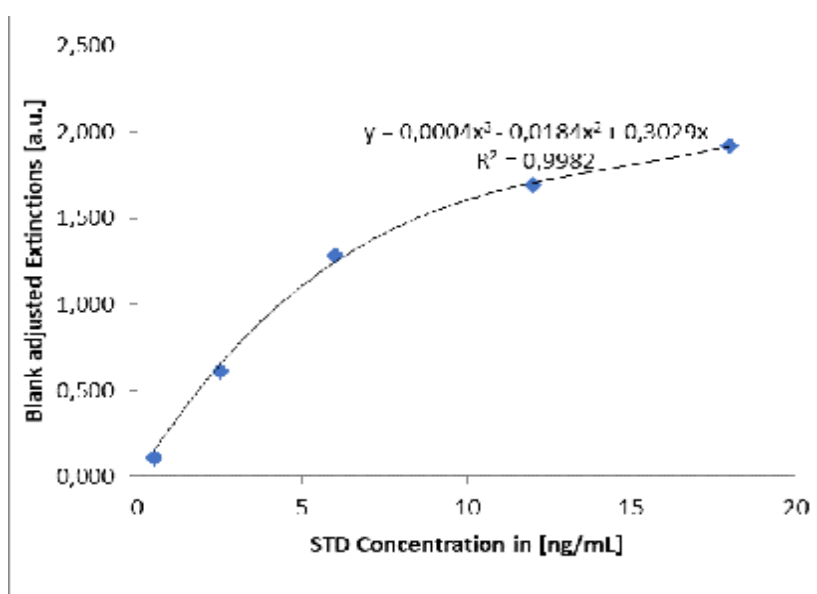


Figure 3 Exemplary standard curve

The exemplary shown standard curve in Figure 3 **cannot** be used for calculation of your test results. You have to establish a standard curve for each test you conduct!

9.3 Exemplary calculation of IGF-I concentrations

Sample dilution: 1:100

Measured extinction of your sample: 1.3525

Measured extinction of the blank 0.07

Your measurement program will calculate the IGF-I concentration of the diluted sample automatically by using the difference of sample and blank for the calculation. You only have to determine the most suitable curve fit.

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

$$1.283 = 0.0004x^3 - 0.0184x^2 + 0.3029x \quad 6.107 = x$$

If the dilution factor (**1:100**) is taken into account the IGF-I concentration of the undiluted sample is $6.107 \times 100 = 610.7 \text{ ng/mL}$

10 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

10.1 Sensitivity

The sensitivity was determined by measuring the blank value and calculating the theoretical concentration of the blank value +2 SA. The analytical sensitivity of the Mediagnost E25 is as an average $\emptyset 0.315 \text{ ng/mL}$ (range 0,262-0,405).

10.2 Precision

Intra-Assay Variance

Several samples were measured 16 in the same assay. Exemplary results are shown in Table 1. On average, the variation coefficient was $\emptyset < 10\%$.

Table 1 The Intra-assay variability. The IGF-I concentrations were determined in a duplicate assay and variability was calculated as the coefficient of variation (CV).

	Number of Determinations	Mean Value (µg/L)	Standard Deviation (µg/L)	VC (%)
Sample 1	16	246	13.09	5.32
Sample 2	16	684	52.27	7.64
Sample 3	16	679	93.61	13.79

Inter-Assay-Variability

Serum samples were measured in independent assays. On average, the coefficient of variation was $\emptyset < 10\%$. Exemplary results are detailed in Table 2.

Table 2 Inter-Assay Variability IGF-I concentrations were determined in duplicate in independent assays and variability was calculated as the coefficient of variation (CV).

	Number of Determinations	Mean Value (µg/L)	Standard Deviation (µg/L)	VC (%)
Sample 1	24	291	20	7
Sample 2	26	695	51	7
Sample 3	23	773	76	10
Sample 4	23	256	15	6
Sample 5	26	151	21	14
Sample 6	26	444	37	8
Sample 7	26	127	12	9
Sample 8	26	686	59	9
Sample 9	26	581	50	9
Sample 10	26	178	12	7

10.3 The Comparison of Methodes

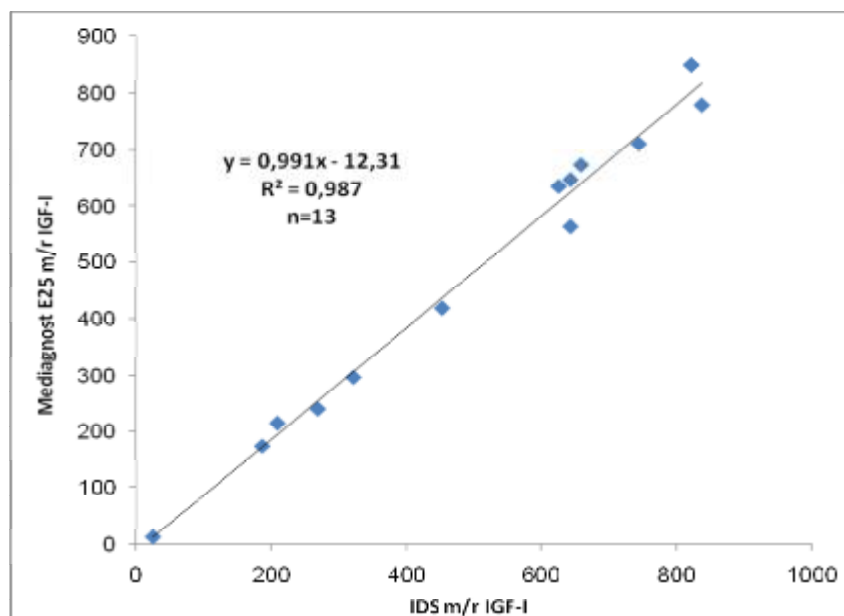


Figure 4 Method comparison of the Mediagnost E25 m/r IGF-I ELISA and the IDS m/r IGF-I ELISA.

10.4 Linearity

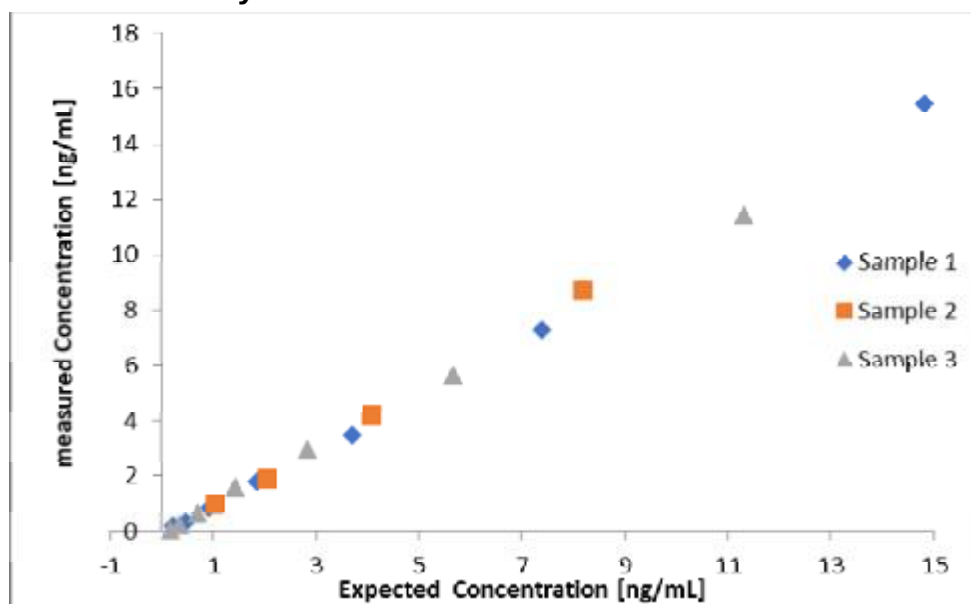


Figure 5 Linearity. Comparison of the theoretically expected and the measured IGF-I concentration in the respective dilutions. From a 1:10 dilution to a concentration of 0.5 ng/mL, the linearity of the sample dilution is given

11 LITREATURE / LITERATUR

- 1) Baxter RC. 1986 The somatomedins: insulin-like growth factors. *Adv Clin Chem.*25:49-115
- 2) Daughaday WH, Rotwein P. 1989 Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Rev.* 10:68-91
- 3) Spencer EM (Ed.) 1991 *Modern Concepts of Insulin-Like Growth Factors*. New York: Elsevier.
- 4) Klapper DG, Svoboda ME, Van Wyk JJ. 1983 Sequence analysis of somatomedin-C: confirmation of identity with insulin-like growth factor-I. *Endocrinology.* 112:2215-2217.
- 5) Rinderknecht E, Humbel RE. 1978 The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem.* 253:2769-2276.
- 6) Clemmons DR, Van Wyk JJ. 1984 Factors controlling blood concentration of somatomedin C. *Clin Endocrinol Metab.* 13:113-143.
- 7) Ballard J, Baxter R, Binoux M, et al. 1989 On the nomenclature of the IGF binding proteins. *Acta Endocrinol (Copenh).* 121:751-752.
- 8) Drop SLS. 1992 Report on the nomenclature of the IGF binding pro-teins. *J. Clin Endocrinol Metab.* 74:1215-1216.
- 9) Martin JL, Baxter RC. 1986 Insulin-like growth factor binding protein from human plasma. Purification and characterization. *J Biol Chem.* 261:8754-8760.
- 10) Binkert C, Landwehr J, Mary JL, Schwander J, Heinrich G. 1989 Cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding a novel insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-2). *EMBO J.* 8:2497-2502.
- 11) Furlanetto RW, Underwood LE, Van Wyk JJ, D'Ercole AJ. 1977 Estimation of somatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay. *J. Clin Invest.* 60:648-657.
- 12) Daughaday WH, Kapadia M, Mariz I. 1987 Serum somatomedin binding proteins: physiologic significance and interference in radioligand assay. *J Lab Clin Med.* 109:355-363.
- 13) Breier BH, Gallaher BW, Gluckman PD. 1991 Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I: solutions to some potential problems and pitfalls. *J Endocrinol.* 128:347-357.
- 14) Daughaday WH, Mariz IK, Blethen SL. 1980 Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites: a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol-extracted serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 51:781-788.
- 15) Blum WF, Gallaher B, Ranke MB. 1992 An IGFBP-blocked IGF-I RIA that measures what it pretends to measure: IGF-I. 74th Annual Meeting of the American Endocrine Society. 293.
- 16) Rosenfeld RG, Wilson DM, Lee PDK, Hintz RL. 1986 Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation. *J Pediatr.* 109:428-433.
- 17) Clemmons DR, Van-Wyk JJ, Ridgway EC, Kliman B, Kjellberg RN, Underwood LE. 1979 Evaluation of acromegaly by radioimmunoassay of somatomedin-C. *N.Engl J Med.* 301:1138-1142
- 18) Zapf J, Walter H, Froesch ER. 1981 Radioimmunological determination of insulin-like growth factors I and II in normal subjects and in patients with growth disorders and extrapancreatic tumor hypoglycemia. *J Clin Invest.* 68:1321-1330.
- 19) Blum WF. 1992 Insulin-like growth factors and their binding proteins. In: Ranke MB, ed. *Functional Endocrinologic Diagnostics in Children and Adolescence*. Mannheim: J + J Verlag; 102-117.
- 20) Rieu M, Girard F, Bricaire H, Binoux M. 1982 The importance of insulin-like growth factor (somatomedin) measurements in the diagnosis and surveillance of acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 55:147-153.
- 21) Blum WF, Ranke MB, Bierich JR. 1988 A specific radioimmunoassay for insulin-like growth factor II: the interference of IGF binding proteins can be blocked by excess IGF-I. *Acta Endocrinol (Copenh).*118:374-380.
- 22) Wilson EM, Oh Y, Rosenfeld RG (1997) Generation and characterization of an IGFBP-7 antibody: Identification of 31 kD IGFBP-7 in human biological fluids and Hs578T human breast cancer conditioned media. *J Clin Endocrinol Metab* Vol 82, 4:1301-1303
- 23) Ranke MB, Schweizer R, Elmlinger MW, Weber K, Binder G, Schwarze CP, Wollmann HA (2000) Significance of basal IGF-I, IGFBP-3 and IGFBP-2 measurements in the diagnostics of short stature in children. *Horm Res* 54:60-68
- 24) Ranke MB, Schweizer R, Elmlinger MW, Weber K, Binder G, Schwarze CP, Wollmann HA (2001) Relevance of IGF-I, IGFBP-3 and IGFBP-2 measurements during GH treatment of GH-deficient and non-GH-deficient children and adolescents. *Horm Res* 55:155-124

12 INTERNATIONAL ASSAY DESCRIPTION

A-E	STD	Rec in 1 mL BUF PP	-
KS1	Control	Rec in 500 µL BUF PP	1:100 DILU BUF PP
KS2	Control	Rec in 500 µL BUF PP	1:100 DILU BUF PP
WP	WASHBUF 20x	-	1:20 DILU A. dest.
-	SPE	1:100 DILU BUF PP	
-	°C 20-25 °C ; Å 0.25 h; « max 350 rpm		
50 µL	Ab AK	A1 - End	
50 µL	BUF PP	A1/A2	
50 µL	STD A (0.5 ng/ml)	B1/B2	
50 µL	STD B (2.5 ng/ml)	C1/C2	
50 µL	STD C (6 ng/ml)	D1/D2	
50 µL	STD D (12 ng/ml)	E1/E2	
50 µL	STD E (18 ng/ml)	F1/F2	
50 µL	CONTROL KS 1 1:100 DILU BUF PP	G1/G2	
50 µL	CONTROL KS 2 1:100 DILU BUF PP	H1/H2	
50 µL	SPE 1:100 DILU BUF PP		
TAPE			
Å 1 h °C 20-25 « 350 rpm			
5x 300 µL	5x WASHBUF WP		
100 µL	CONJ EK		
TAPE			
Å 30 min °C 20-25 « 350 rpm			
5x 300 µL	5x WASHBUF WP		
100 µL	SUBST TMB S		
Å 30 min °C 20-25 			
H2SO4 SL			
MEASURE			