

ALS - ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung der
humanen säure-labilen Untereinheit

Deutsch

Enzyme Immunoassay for quantitative Determination of
human Acid Labile Subunit

English

Nur zu Forschungszwecken!
Nicht zur diagnostischen Anwendung geeignet.

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



REF

E35




























Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH

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

Symbols / Symbole

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 / Utgångsdatum / Termin Wažności / Lejárati idő / Doba expirácie / Doba expirace
	Consider instructions for use / Bitte Gebrauchsanweisung beachten / Consultez la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las instrucciones de utilización / Consulte as instruções de utilização / Raadpleeg de gebruiksaanwijzing / Se brugsanvisningen / Läs anvisningarna före användning / Proszę przeczytać instrukcję wykonania / Vegyük figyelembe a használati utasításban foglaltakat / Postupujte podľa pokynov na použitie / Postupujte dle návodu k použití
	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 / Lot-Satskod / Numer serii / Lot-Batch szám / Číslo šarže / Číslo šarže
	Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por / Vervaardigd door / Fabrikation af / Tillverkad av / Wyprodukowane pr / Gyártotta / Vyrobéné / Vyrobeno
	Catalogue Number / Bestellnummer / Numéro de référence / Numero di riferimento / Número de referencia / Número de referência / Referentienummer / Referencenummer / Katalognummer / Numer katalogowy / Katalógusszám / Katalógové číslo / Katalogové číslo
	Store at between / Lagerung bei zwischen / Conserver à entre / Conservare a tra / Conservar a temp. entre / Armazene a entre / Bewaar bij tussen / Opbevares mellem / Förvaras vid / Przechowywać w / Tároljuk ő ő között / Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí
	Contains sufficient for x tests / Inhalt ausreichend für x Tests / Contient suffisant pour x tests / Contenido suficiente per x test / Contiene suficiente para x pruebas / Contém 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 / Obsahuje materiál pro x testů
	Keep away from sunlight / Nicht dem Sonnenlicht aussetzen
	Incubation time / Inkubationszeit
	Incubate at / Inkubation bei
	Shaking / schütteln
	Mikrotiterplate/Mikrotiterplatte
	Reconstitute in / Rekonstituieren in
	Sample / Probe
	AK Antibody Conjugate / Antikörperkonjugat
	EK Enzyme Conjugate/ Enzymkonjugat
	PP/ VP Dilute in Buffer X / Verdünnen in Puffer X
	A-F Standard X / Standard X
	KS1, KS2 Control Serum / Kontrollserum
	Washing Buffer Concentrate / Waschpufferkonzentrat
	WP Washing Buffer / Waschpuffer
	S Substrate
	SL Stopp Solution / Stopp Lösung
	Cover Plate with sealing tape / Platte abkleben
	Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590nm) / Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm).

Symbols / Symbole	2
-------------------	---

PACKUNGSBEILAGE DEUTSCH

Inhaltsverzeichnis	
TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN + EINSATZMÖGLICHKEITEN	4
EINFÜHRUNG	4
Einsatzmöglichkeiten	4
Assay Eigenschaften und Validierung	5
Proben: Eignung, Vorbereitung und Lagerung	6
MATERIALIEN	6
Inhalt der Testpackung	6
Zusätzlich benötigte Materialien	7
TECHNISCHE HINWEISE	7
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	9
TESTDURCHFÜHRUNG	10
AUSWERTUNG	11
Berechnung der Standardkurve	11
ERWARTUNGSWERTE	11
TECHNICAL FEATURES+APPLICATIONS	13

PACKAGE INSERT ENGLISH

Table of Content	
INTRODUCTION	13
INTENDED USE	13
PERFORMANCE CHARACTERISTICS AND VALIDATION	14
SPECIMEN COLLECTION, PREPARATION AND STORAGE	15
REAGENTS PROVIDED	15
MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	16
TECHNICAL RECOMMENDATIONS	16
WARNINGS AND PRECAUTIONS	18
ASSAY PROCEDURE	19
CALCULATION OF RESULTS	19
Establishing the Standard Curve	20
EXPECTATIONS VALUES	20
LITREATURE / LITERATUR	21
KURZANLEITUNG – MEDIAGNOST ALS-ELISA E35	22
SUMMARY – Mediagnost ALS ELISA E35	23
REF E35 International Test Description	24

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!

PACKUNGSBEILAGE DEUTSCH

TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN + EINSATZMÖGLICHKEITEN

- ◆ Quantitativer Nachweis von ALS (Acid Labile Subunit)
- ◆ Inter-Assay Varianz von $\leq 8\%$ und Intra-Assay Varianz von $\leq 6,8\%$
- ◆ Sensitivität von 0,23 Mediagnost mU/mL
- ◆ Kalibration gegen rekombinantes ALS: 17,8 mU/ μg (entsprechend 0,0561 $\mu\text{g}/\text{mU}$)
- ◆ Besonders geeignet für die Diagnose von WH-Mangel oder WH Überproduktion

EINFÜHRUNG

Die Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren (IGF)-I und -II sind im Blutkreislauf an spezielle Bindungsproteine (IGFBPs) gebunden. Bisher wurden sieben verschiedene Bindungsproteine anhand ihrer Aminosäuresequenz identifiziert und als IGFBP-1 bis IGFBP-7 klassifiziert [1, 2]). Im Blut überwiegt IGFBP-3, das hauptsächlich zur Regulierung der IGF-I und -II Konzentrationen dient. Im Gegensatz zu den anderen Bindungsproteinen haben IGFBP-3 und IGFBP-5 die Eigenschaft, neben IGF-I bzw. -II noch eine säurelabile Untereinheit (acid-labile subunit, ALS) zu binden [3-5]. Somit liegt IGFBP-3 fast vollständig in Form dieses hochmolekularen ternären Komplexes vor, es finden sich aber auch geringe Mengen freies IGFBP-3 im Blut [6, 7].

Die Säure-labile Untereinheit im Folgenden als acid-labile subunit (ALS) bezeichnet wird als Propeptid mit 605 Aminosäuren synthetisiert. Das für die Sekretion notwendige Signalpeptid (Aminosäuren 1-27) wird beim Transport abgespalten (Swiss-Prot P35858 Version 82). Das reife Protein besteht somit aus 578 Aminosäuren. Charakteristisch für das ALS Protein sind die Leucin-reichen Sequenzen. Neben diesen 20 Leucin-reichen Sequenzabschnitten gibt es zahlreiche Glykosylierungsstellen für N-verknüpfte Zuckerketten. Miller BS et al konnten in ihrer Studie zeigen, dass die unvollständige Glykosylierung von IGF-I, IGF-II, ALS und IGFBP-3 zu einer Reduktion der Konzentration dieser Proteine im Serum führt. Mittels einer oralen Mannose Therapie konnten die Glykosylierungen teilweise normalisiert werden, was mit einer Wachstumsverbesserung einherging [8]. Mutationen im ALS Gen führen zu IGF-I / IGFBP-3 Mangel durch den Wachstumsstörungen entstehen können [9]. So führt der totale Verlust des ALS zu moderaten Wachstumsstörungen [10]. Neben Wachstumsstörungen wird aber auch der Energiestoffwechsel von IGF-I bzw. dem ternären Komplex beeinflusst, so trat in drei Fällen bei primärem ALS Mangel eine Hyperinsulinämie auf [11, 12]. Des Weiteren scheint das ALS-IGF-IGFBP-System auch im Hinblick auf koronare Erkrankungen von Bedeutung zu sein [13].

Baxter RC entwickelte 1990 einen in-house Radioimmunoassay zur Messung der ALS [6] und konnte zeigen, dass die ALS in hohen Konzentrationen (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) im Serum gesunder Menschen auftritt. In Amnionflüssigkeit, Cerebrospinalflüssigkeit oder Seminalplasma konnte jedoch kein ALS nachgewiesen werden, obwohl auch diese Körperflüssigkeiten IGFBP-3 in hohen Konzentrationen enthalten.

EINSATZMÖGLICHKEITEN

Dieser Enzymimmunoassay-Kit ist für die wissenschaftliche Bestimmung der Säure-labilen Untereinheit (ALS) in humanem Serum oder Heparin-Plasma geeignet.

Das Ergebnis dieses Tests kann zur Ergänzung der Ergebnisse aus den IGF-I, IGFBP-3 Messungen herangezogen werden und damit zur Beurteilung von Wachstumshormonmangel und -überschuss dienen [14, 15].

Assay Eigenschaften und Validierung

Der Mediagnost ELISA für ALS E35 ist ein so genannter Sandwich-Assay unter Verwendung zweier spezifischer und hochaffiner Antikörper. Die Antikörper wurden gewonnen durch Immunisierung von Kaninchen mit spezifischen Peptiden wie bereits erfolgreich zuvor beschrieben [16, 17].

Der an die Mikrotiterplatte gekoppelte erste Antikörper bindet das ALS aus der Probe. Im nachfolgenden Schritt bindet am derart immobilisierten ALS der zweite spezifische anti-ALS Antikörper, biotinyliert und daran gebunden ein Streptavidin-Peroxidase-Enzymkonjugat. In der abschließenden Substratreaktion wird hochspezifisch der Farbumschlag katalysiert, quantitativ abhängig vom ALS Gehalt der Proben.

Der Assay wurde gegen ein Serum das arbiträr 480 mU/mL **humanes ALS** enthält kalibriert. Dieses Serum wird als Standard in den folgenden Konzentrationen (Mediagnost Units): **0; 1,5; 6,25; 12,5; 25 und 40 mU/mL** in diesem Kit verwendet.

Die **Kalibration** mit **rekombinantem ALS** (prokaryotisch exprimiert, nicht glykosiliert, Prod. Nr. H3483-P01, Firma Abnova, Taiwan) ergab **17,8 mU/µg (entsprechend 0,0561 µg/mU)**.

Die **analytische Sensitivität** des ELISA E35 beträgt **0,23 mU/mL** (zweifache Standardabweichung des Null-Standards in 18facher Bestimmung).

Tabelle 1: Verdünnungslinearität (hier: typische Ergebnisse drei verschiedener Seren)

mU/mL	Probe 1	Probe 2	Probe 3
1:50	2106	1234	810
1:100	1997	1117	790
1:200	1667	1065	774
1:400	1572	985	696
1:500	1782	1180	812

Tabelle 2: Interferenzen, Serumproben wurden mit den angegebenen Mengen potentiell interferierender Substanzen versetzt und im Vergleich zur Kontrolle welche nur mit PBS versetzt wurde gemessen.

	% der Kontrolle
Triglycerides 100 [mg/mL]	100
Hämoglobin [1mg/mL]	105
Bilirubin [200µg/mL]	94

Die **Inter-** und **Intra-Assay** Variationskoeffizienten sind **kleiner als 8% bzw. 6,8%**. Beispielhafte Bestimmungen sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 3 : Inter-Assay-Varianz (n=10)

	Mittelwert (mU/mL)	Standardabweichung (mU/mL)	VK (%)
Probe 1	931,35	80,97	9
Probe 2	1061,38	80,97	8
Probe 3	1926,1	157,96	8

Tabelle 4: Intra-Assay-Varianz (n=16)

	Mittelwert (mU/mL)	Standardabweichung (mU/mL)	VK (%)
Probe 1	911,28	59,66	6,55
Probe 2	1338	91,59	6,84

Spezifität

250 ng/mL IGF-I oder 3000 ng/mL beeinflussten die Messung der ALS nicht!

Proben: Eignung, Vorbereitung und Lagerung

Uneingeschränkt geeignet sind Serumproben. Des Weiteren zeigten 30IE/mL Heparin, 6,8mM EDTA, sowie 0,015M NaCitrat keinen Einfluss auf die ALS Messung.

Die Proben können bei Raumtemperatur für max. 3 Tage gelagert werden. 3 Gefrier/Tauzyklen beeinflussen die ALS Bestimmung nicht.

Generell sollten Proben so schnell wie möglich nach der Abnahme gekühlt werden. Falls zwischen Abnahme und Bestimmung ein längerer Zeitraum liegt, sollten die unverdünnten Proben bei -20°C oder kälter in fest verschließbaren Plastikgefäßen aufbewahrt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Serum/Plasma sollte prinzipiell vermieden werden (gegebenenfalls subaliquotieren).

Für die meisten Untersuchungen (z.B. Serum- oder Plasmaproben und keine Extremwerte zu erwarten sind) sollten **Verdünnungen von 1:150 in Probenpuffer PP** geeignet sein, damit ergibt sich ein Assay-Bereich von 0 – 6000 mU Mediagnost /mL. Gegebenenfalls kann geringer oder stärker in Probenpuffer PP verdünnt werden.

Vorschlag Verdünnungsprotokoll:

1490 µL µL Probenpuffer PP (rot gefärbt) in PE-/PP-Gefäße vorlegen (bei größeren Serien empfiehlt sich hierfür die Verwendung eines Multi-Steppers), dazu **10 µL Serum- oder Plasma** pipettieren (Proben sind 1:150 verdünnt) und **jeweils sofort mischen**. Nach dem Mischen bitte innerhalb von 1 Stunde von dieser Lösung **50 µL pro Bestimmung** im Assay einsetzen (Pipettierkontrolle = Rotfärbung der Lösung in der Mikrotiterplattenvertiefung).

MATERIALIEN

Inhalt der Testpackung

1)	MTP	Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen, die in 12 abnehmbare Streifen à 8 Vertiefungen (einzeln abbrechbar) aufgeteilt ist. Die Platte ist mit einem Antikörper gegen humanes ALS beschichtet.
2)	CAL	Standards A-F, 1 mL , lyophilisiert, enthalten humanes ALS. Die Standardkurve deckt einen Bereich von 0 bis 40 mU/mL (0; 1,5; 6,25; 12,5; 25; 40 mU/mL) ALS ab, die einzelnen Standards werden mit je 1 mL Probenpuffer PP rekonstituiert. Für den Assay werden jeweils 50 µl pro Vertiefung eingesetzt. Der Standard kann übernacht bei 4°C und für 3 Monate bei -20°C gelagert werden. Wiederholte Gefrier/Tauzyklen sind zu vermeiden!
3)	DILU PP	Probenpuffer PP, 125 mL , gebrauchsfertig, rot gefärbt, bitte für die Rekonstitution von Standards A-F und Kontrollen KS1/KS2 und für die Verdünnung von Kontrollen KS1/KS2 und Proben verwenden.
4)	DILU VP	Verdünnungspuffer VP, 7 mL , gebrauchsfertig, bitte für die Verdünnung von Antikörperkonjugat AK verwenden.
5)	Control	Kontrollserum KS1 und KS2, 250 µL , lyophilisiert, enthalten humanes Serum und müssen in je 250 µL Probenpuffer PP rekonstituiert werden. Die ALS Soll-Konzentrationen und die Schwankungsbereiche sind auf den Etiketten angegeben. Sie sollten im Assay in den gleichen Verdünnungen wie die jeweiligen Proben eingesetzt werden.
6)	Ab	Antikörperkonjugat AK, 140 µL, 50fach konzentrierte Lösung, bitte vor Gebrauch 1:50 mit Verdünnungspuffer VP verdünnen. Enthält biotinylierten anti-human ALS Antikörper. Von der verdünnten AK-Lösung bitte 50 µl pro Vertiefung einsetzen. Achtung: Antikörperkonjugat AK bitte nur nach Bedarf frisch ansetzen.
7)	CONJ	Enzymkonjugat EK, 12 mL , gebrauchsfertig, enthält POD (Meerettich-Peroxidase)-markiertes Streptavidin.
8)	WASHBUF 20x	Waschpuffer WP, 50 mL, 20fach 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). Waschpuffer WP bitte nach Bedarf ansetzen, max. 4 Wochen verwenden.
9)	SUBST	Substrat S, 12 mL , gebrauchsfertig, Meerettich-Peroxidase-(POD)-Substrat, stabilisiertes H ₂ O ₂ -Tetramethylbenzidin
10)	H ₂ SO ₄	Stopplösung SL, 12 mL , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure
11)		Abdeckfolie für Mikrotiterplatten, 2 Stück, selbstklebend

Zusätzlich benötigte Materialien

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

TECHNISCHE HINWEISE

Reagenzien mit unterschiedlichen Lot-Nummern sollten nicht vermischt werden. 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 μ l 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 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.

Standards und Kontrollen

Die Standards **A – F** und Kontrollseren **KS1 und KS2** 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.

Rekonstituierte Komponenten sollten bei -20°C (oder kälter) aufbewahrt werden, dies verlängert die Haltbarkeit auf mind. 3 Monate. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden. Wenn mehrere ALS-Messungen über eine längere Periode mit einem Kit geplant sind, wird vorherige Aliquotierung der Komponenten in passende Volumina empfohlen.

Waschpuffer WP

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

Antikörperkonjugat AK

Das benötigte Volumen des Antikörperkonjugats wird vorbereitet, indem das **50fach** Konzentrat im Verhältnis **1:50** mit **Verdünnungspuffer VP** verdünnt wird. Das Antikörperkonjugat bitte nur nach Bedarf frisch ansetzen.

Testplatte

Nicht verwendete Streifen der Testplatten sind zusammen mit dem Trockenkissen luftdicht in dem wiederverschließbaren Klipbeutel 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.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Mediagnost Kit ist nur zur 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.

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.

Die gemessenen Extinktionen sind u.a. stark abhängig von der Temperatur, aber die berechneten Werte werden durch die Temperatur nicht beeinflusst.

Bitte benutzen Sie separate Pipettenspitzen für jede Probe, Kontrolle und Reagenz um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Bitte verwenden Sie Behältnisse nur für jeweils einzelne Reagenzien. Gießen Sie die Reagenzien nicht zurück in die Originalgefäße. Mischen Sie den Inhalt der jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatten gründlich. Verwenden Sie die Mikrotiterplattenvertiefungen nur jeweils einmal. Lassen Sie keine Vertiefung während des Assay-Vorgangs völlig austrocknen, sondern fügen Sie die jeweils folgenden Reagenzien sofort nach dem Abschluss des Waschvorganges dazu.

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

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.

Menschliches Serum:

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

Das humane Material, das für die Präparation dieses Produktes verwendet wird, ist durch von der US-amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde FDA empfohlene Nachweisverfahren auf die Präsenz von Antikörpern gegen Humanes Immundefizienz-Virus (HIV I und II), gegen Hepatitis B-Oberflächenantigen und gegen Hepatitis C Virus geprüft und für negativ befunden worden. Da kein Test das Vorhandensein von infektiösen Erregern völlig ausschließen kann, sollten die Reagenzien gemäß den Vorgaben der Biosicherheitsstufe 2 gehandhabt werden.

2-Methyl-4-Isothiazolin-3-one

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

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

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

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

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

Substratlösung (S)

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

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

Stopplösung (SL)

Die Stopplösung enthält 0,2 M Schwefelsäure (H₂SO₄)

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

Erste-Hilfe Maßnahmen:

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

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

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

TESTDURCHFÜHRUNG

Bei der **Testdurchführung** sollten Standards **A-F**, Kontrollseren **KS1 & KS2** und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden (z.B. in 15 Minuten). Das Enzymkonjugat **EK**, die Substratlösung **S** sowie die Stopplösung **SL** sollten jeweils in der selben Reihenfolge und in dem selben Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

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.

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

- 1) In alle benötigten Positionen wird das **1:50 verdünnte Antikörperkonjugat** pipettiert: **50 µL**
- 2) in die Positionen A1/2 je **50 µL Standard A (0 mU/mL)**,
in die Positionen B1/2 je **50 µL Standard B (1.5 mU/mL)**,
in die Positionen C1/2 je **50 µL Standard C (6.25 mU/mL)**,
in die Positionen D1/2 je **50 µL Standard D (12.5 mU/mL)**,
in die Positionen E1/2 je **50 µL Standard E (25 mU/mL)**,
in die Positionen F1/2 je **50 µL Standard F (40 mU/mL)**.

Zur Kontrolle der korrekten Durchführung des Tests können je **50 µL** der 1:150 in Probenpuffer **PP** (oder entsprechend der jeweiligen Verdünnung der Proben) verdünnten **Kontrolle KS1** in die Positionen G1/2 und **KS2** in die Positionen H1/2 gegeben werden.

In die restlichen Vertiefungen können je **50 µL der verdünnten Proben** (i.Allg. 1:150 in Probenpuffer **PP** verdünnt) pipettiert werden.

- 3) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **2 Stunden** bei **Raumtemperatur** schüttelnd inkubiert (350 rpm).
- 4) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Lösungen abgesaugt und die Platte mit **300 µL Waschpuffer WP** / Vertiefung **fünfmal** gewaschen.
- 5) Nach dem letzten Waschschrift werden **100 µL Enzymkonjugat EK** in jede Vertiefung pipettiert.
- 6) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **0,5 Stunden** bei **Raumtemperatur** schüttelnd inkubiert (350 rpm).
- 7) Nach Abschluss dieser Inkubation wird die Platte wie in Schritt 4) beschrieben gewaschen
- 8) In jede Vertiefung werden **100 µL der Substratlösung S** pipettiert.
- 9) Die Platte wird **30 Minuten im Dunkeln** bei **Raumtemperatur** inkubiert.
- 10) Nach Ablauf der Inkubationszeit wird in jede Vertiefung **100 µL Stopplösung SL** pipettiert.
- 11) Die Ausmessung der Farbreaktion erfolgt **innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm (Referenzfilter ≥590 nm)**.

AUSWERTUNG

Berechnung der Standardkurve

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

Die bereitgestellten Standards enthalten folgende ALS-Konzentrationen:

Standard	A	B	C	D	E	F
mU/mL	0	1,5	6,25	12,5	25	40

- 1) Ermittlung des **Mittelwerts** der optischen Dichte des Leerwertes aus den Doppelbestimmungen (Vertiefung A1/A2).
- 2) Von den Mittelwerten der optischen Dichte der Standardkonzentrationen und der Proben wird der mittlere Leerwert abgezogen.
- 3) Die Standardkonzentrationen (x-Achse) werden gegen die gemessene optische Dichte (y-Achse) aufgetragen.
- 4) Die Berechnung der Standardkurve sollte durch ein statistisches Programm erfolgen, da die Kurve i. Allg. nicht ideal durch eine lineare Regression beschrieben wird. **Ein höhergradiges Polynom, 4-Parameter-Anpassungen** oder **nicht-lineare Regression** sind zur Auswertung geeignet, in manchen Fällen kann eine Spline oder Punkt-zu-Punkt Anpassung angebracht sein.
- 5) Die **Multiplikation** des jeweiligen hiermit für die Proben berechneten ALS-Gehaltes mit dem entsprechenden **Verdünnungsfaktor** der Proben ergibt die **ALS-Konzentration in mU/mL**.

ERWARTUNGSWERTE

Die ALS Konzentration in humanen Serumproben von 74 gesunden Probanden wurde gemessen (s. Tabelle 5).

Tabelle 5: Erwartungswerte in Serum gesunder Erwachsener.

Geschlecht	Anzahl der Proben	Median [mU/mL]	Mittelwert [mU/mL]	Standardabweichung [mU/mL]	Min. – Max.: [mU/mL]
weiblich	35	1647,1	1682,5	391,2	1066,4 -2396,3
männlich	39	1432,3	1419,1	250,3	905,0-2006,2
gesamt	74	1491,6	1543,7	348,5	905,0-2396,3

Exemplary version - do not use for assay accomplishment!
Exemplarische Version - nicht zur Assaydurchführung benutzen!

PACKAGE INSERT ENGLISH

TECHNICAL FEATURES+APPLICATIONS

- ◆ Quantitative determination of the acid labile subunit (ALS) of the ALS/IGF/IGFBP-3 complex
- ◆ Inter-Assay variation of $\leq 8\%$ and Intra-Assay variation of $\leq 6.8\%$
- ◆ Sensitivity of 0.23 Mediagnost mU/mL
- ◆ Calibration against recombinant ALS: 17.8 mU/ μg (according to 0.0561 $\mu\text{g}/\text{mU}$)
- ◆ A single measurement is informative for diagnosis of GH deficiency or GH excess

INTRODUCTION

The Insulin-like Growth Factors (IGF) – I and II are bound to specific binding proteins in circulation (IGFBP). Until today seven different proteins have been identified IGFBP-1 to 7 [1, 2]. IGF bioavailability, transport and storage is regulated or facilitated by these binding proteins which are expressed differentially according physiological and developmental requirements. The most abundant IGFBP in circulation is IGFBP-3. Together with IGFBP-5 it is able to form the so called ternary complex with IGF and the acid-labile subunit (ALS) [3-5]. In the circulation nearly all IGF is bound in this ternary complex and thus not able to cross the endothelial barrier. Only very small amounts of IGF or IGFBP-3 exist outside this complex [6, 7]. The acid-labile subunit is an important part of the IGF-storage mechanism in circulation. In ALS deficiency or in ALS knock-out mice the concentration of IGF and IGFBP-3 in the circulation is significantly decreased resulting in impaired growth [10].

The acid-labile Subunit, is a synthesized as propeptide of 605 amino acids. The signal peptide, necessary for ALS secretion (AA 1-27) cleaved off enduring the transport process (Swiss-Prot P35858 Version 82). The mature protein consists of 578 amino acids and contains about 20 leucin rich sequence repeats. Beside the leucin-rich repeats several potential N-linked glycosylation sites have been described. Miller BS et al. were able to demonstrate that incomplete glycosylation of IGFs, ALS and IGFBP-3 results in a decreased serum concentration of these proteins. Oral mannose therapy resulted in a partial normalization of the glycosylation pattern and went along with improved growth [8]. Mutations in or the complete knock out of the ALS gene result in IGF / IGFBP-3 deficiency and therewith in disturbance of growth [9,10]. Beside growth also other endocrine axes may be involved. In primary ALS deficiency hyperinsulinemia could be observed [11, 12]. Further, the ALS-IGF-IGFBP-system seems to be of relevance in coronary disease [13].

The first ALS immunoassay was described by Baxter RC in 1990 [6]. By this in-house radioimmunoassay it was shown that ALS is present in high concentrations in serum (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of healthy humans. But not detectable in other body fluids like amniotic fluid, cerebrospinal fluid or seminal plasma – in spite of the fact that these body fluids contain high level IGFBP-3.

INTENDED USE

This enzyme immunoassay kit is suited for measuring ALS in human serum or EDTA-/heparin-/citrate plasma for scientific purposes.

The results of this test system can be used as supplementary information in GH-diagnostics together with IGF-I and IGFBP-3 measurements. Thus, it is of use in evaluation of GH-deficiency and excess [14, 15].

PERFORMANCE CHARACTERISTICS AND VALIDATION

The Mediagnost ELISA for ALS E35 is a so-called Sandwich-Assay. It utilizes two specific and high affinity antibodies for this protein. These antibodies were created by immunization of rabbits with specific peptides as previously described by Khosravi and Stadler [16, 17].

The ALS in the sample binds to the immobilized first antibody on the microtiter plate. In the following step, the biotinylated and Streptavidin-Peroxidase conjugated second specific anti-ALS-Antibody binds in turn to the immobilized ALS. In the closing substrate reaction the turn of the colour will be high specific catalysed, quantitatively depending on the ALS-level of the samples.

This Assay was calibrated against a serum containing arbitrary 480 mU/mL **human ALS**. This serum is used as Standard in the following concentrations (Mediagnost Units): **0; 1.5; 6.25; 12.5; 25 and 40 mU/mL** in this Kit.

Calibration with recombinant ALS (procaryotic expressed, not glycosylated, Prod. Code: H3483-P01, Abnova (Taiwan) Corporation) resulted in **17.8 mU/µg (according to 0.0561 µg/mU)**.

The **analytical sensitivity** of the ELISA E35 yields **0.23 mU/mL** (2 SD of zero standard in 18fold determination).

Table 1: Linearity

mU/mL	Sample 1	Sample 2	Sample 3
1:50	2106	1234	810
1:100	1997	1117	790
1:200	1667	1065	774
1:400	1572	985	696
1:500	1782	1180	812

Table 2: Interference:

Serum samples were enriched with the indicated amount of potentially interfering substances and measured. Results are shown as % of control.

	% of control
Triglycerides [100 mg/mL]	100
Hemoglobin [1mg/mL]	105
Bilirubin [200µg/mL]	94

The **Inter-** and **Intra-Assay** variation coefficients were found less than 8% and 6.8%. Exemplary determinations are shown in table 3 and table 4.

Table 3: Inter-Assay-Variation (n=10)

	Mean Value (mU/mL)	Standard Deviation (mU/mL)	VC (%)
Sample 1	931.35	80.97	9
Sample 2	1061.38	80.97	8
Sample 3	1926.1	157.96	8

Table 4: Intra-Assay-Variation (n=16)

	Mean Value (mU/mL)	Standard Deviation (mU/mL)	VC (%)
Sample 1	911.28	59.66	6.55
Sample 2	1338	91.59	6.84

Specificity

250 ng/mL IGF-I or 3000 ng/mL IGFBP-3 do not exert any influence on ALS measurement.

SPECIMEN COLLECTION, PREPARATION AND STORAGE

Serum samples are suitable. Further, 30 IU/mL Heparin, 6.8 mM EDTA or 0.015M Sodium Citrate did not interfere with ALS measurement.

Serum Samples can be stored and transported at room temperature (20-25°C) for up to 3 days. 3 freeze/thaw cycles do not influence the ALS determination.

Samples should be handled as recommended in general: chilled as soon as possible. In case there will be a longer period between the sample withdrawal and determination store the undiluted samples frozen -20°C or below in tightly closable plastic tubes. Avoid on principal repeated freeze-thaw cycles of serum/plasma (if required, please subaliquote).

In most determinations (e.g. Serum- or Plasma samples and no extreme values expected) the dilution of **1:150 with Sample Buffer PP is suitable**, respectively the assay covers the range from 0 - 6000 mU Mediagnost/mL. If required, the dilution with **Sample Buffer PP** could be performed higher or lower.

Suggestion for dilution protocol:

Pipette **1490 µL Sample Buffer PP** (red colored) in PE-/PP-Tubes (application of a multi-stepper is recommended in larger series), add **10 µL Serum- or Plasma** (dilution 1:150) and mix each tube **immediately**. After mixing use **50 µL** of this solution within 1 hour **per determination** in the assay (pipetting control = red coloring of the solution in the wells).

REAGENTS PROVIDED

1)	MTP	Microtiter plate , ready for use, Microtiter plate with 96 wells. Divided up in 12 strips with 8 wells separately breakable. Coated with anti-human ALS Antibody. Packed in a laminate bag.
2)	CAL	Standards A-F, 1 mL , lyophilised, contain human ALS. Standard values are 0; 1.5; 6.25; 12.5; 25 and 40 mU/mL ALS. Standards are reconstituted with 1000 µL Sample Buffer PP each . Use 50 µL pro well in the assay. Standards can be stored at 4°C overnight or at -20°C for up to three months after reconstitution. Avoid repeated freeze thaw cycles.
3)	BUF PP	Sample Buffer PP, 125 mL , ready for use, red colored, please use for the reconstitution of Standards A-F and Controls KS1/KS2 and for the dilution of Samples and Controls KS1/KS2 .
4)	BUF VP	Dilution Buffer VP, 7 mL , ready for use, please use for the dilution of Antibody Conjugate AK .
5)	Control	Control Sera KS1 and KS2, 250 µL , lyophilized, contains human Serum and should be reconstituted in 250 µL Sample Buffer PP each . The ALS target values and the respective ranges are given on the vial labels. The dilutions should be according to the dilution of the respected samples. Use 50 µL pro well in the assay.
6)	Ab	Antibody Conjugate AK, 140 µL, 50-fold concentrate , contains the biotinylated anti-human ALS Antibody. Dilute before use 1:50 in Dilution Buffer VP and use 50 µl for each well in the assay. Attention: Please dilute Antibody Conjugate AK freshly according to daily requirements.
7)	CONJ	Enzyme Conjugate EK, 12 mL , ready-to-use, contains HRP (Horseradish-Peroxidase)-labelled Streptavidin. Use 100 µl for each well in the assay.
8)	WASHBUF 20x	Washing Buffer (WP), 50 mL, 20-fold concentrated solution dilute in A. dest. (e.g. add the complete contents of the flask 50 mL into a graduated flask and fill with A.dest. to 1000 mL). Please dilute only according to requirements. Please dilute Washing Buffer WP according to your requirements, use max. 4 weeks.
9)	SUBST	Substrate (S), 12 mL , ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP)-substrate stabilised H ₂ O ₂ Tetramethylbencidine.
10)	H ₂ SO ₄	Stopping Solution (SL), 12 mL , ready for use, 0.2 M sulphuric acid. Caution acid!
11)		Sealing tape for covering of the microtiter plate, 2 x, adhesive.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

TECHNICAL NOTES

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: 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 μ l 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

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

Reconstituted Components (**Standards A – F** and **Control Sera KS1/KS2**) should be stored at -20°C (or below) for not longer than 3 months. When using the standards anew, please thaw them rapidly but gently (no temperature rise over the room temperature and no powerful vortexing). Avoid repeated freeze-thaw cycles. In case you plan to perform multiple determinations over a longer period with one kit, you should aliquot the components prior to freezing into suitable smaller volumes.

Antibody Conjugate

The required volume of **Antibody Conjugate** is prepared by 1:50 dilution of the provided 50-fold concentrate with **Dilution Buffer VP**. Please dilute **Antibody Conjugate** freshly according to daily requirements.

Washing Buffer

The required volume of washing buffer is prepared by 1:20 dilution of the provided 20-fold concentrate with deionised water. The diluted Washing Buffer is stable for max. 4 weeks at 2-8°C.

Substrate Solution

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

Microtiter plate

Store the once unused microtiter strips and wells together with the desiccant in the tightly closed clip lock bag at 2-8°C use in the frame provided. The labelled expiry is not influenced in case of proper storage.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

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

Temperature WILL affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.

Do not use expired reagents.

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

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

Human Serum

Contained in following components: **Control Serum KS1, KS2 and Standards**

The sources of human sera were tested by FDA recommended methods and found non-reactive for Hepatitis-B surface antigen (HBsAg), Hepatitis C virus (HCV), and Human Immunodeficiency Virus 1 and 2 (HIV) antibodies. No known test methods can offer total assurance of the absence of infectious agents; therefore all components and patient's specimens should be treated as potentially infectious.

Stop solution contains 0.2 M Sulfuric Acid (H₂SO₄)

R36/38 Irritating to eyes and skin

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

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

S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves

2-Methyl-4-Isothiazolin-3-one

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

< 0.01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one Solution

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

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

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

< 0.01% (w/w) 5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-Isothiazol-3-one Solution

R36/38 Irritating to eyes and skin

R43 Sensibilisation through skin contact possible

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

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

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

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

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

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

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

S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves

General first aid procedures:

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

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

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

Do not eat, drink or smoke in these areas.

Never pipette the materials with the mouth.

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

ASSAY PROCEDURE

NOTES: All determinations (Standards, Control Sera 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, the Control Sera and the samples should be pipetted as fast as possible (e.g. within <15 minutes). To avoid distortions due to differences in incubation times the **Enzyme Conjugate EK**, **Substrate Solution S** and as well the **Stop Solution SL** should be added to the plate in the same order and in the same time interval each, respectively.

- 1) Please pipette on before in **all needed wells 50 µL 1:50 diluted Antibody Conjugate (AK)**.
- 2) Pipette in positions A1/2 **50µL each Standard A (0 mU/mL)**,
pipette in positions B1/2 **50µL each Standard B (1.5 mU/mL)**,
pipette in positions C1/2 **50µL each Standard C (6.25 mU/mL)**,
pipette in positions D1/2 **50µL each Standard D (12.5 mU/mL)**,
pipette in positions E1/2 **50µL each Standard E (25 mU/mL)**,
pipette in positions F1/2 **50µL each Standard F (40 mU/mL)**.
To control the correct accomplishment **50 µL each** of the 1:150 (or in respective dilution rate of the sample) in Sample Buffer **PP** diluted **Control Sera KS1 and KS2** can be pipetted in positions G1/2 and H1/2.
Pipette **50 µL each** of the **diluted sample** (generally 1:150 diluted in Sample Buffer **PP**) in the rest of the wells according to requirements. Please mix the dilutions immediately after sample addition and use within 60 minutes.
- 3) Cover the wells with the sealing tape and incubate the plate for **2 hours at room temperature** (shake at 350 rpm).
- 4) After incubation aspirate the contents of the wells and wash the wells **5 times with 300 µL Washing Buffer WP**.
- 5) Following the last washing step pipette **100 µL** of the **Enzyme Conjugate EK** in each well.
- 6) Cover the wells with the sealing tape and incubate **0.5 hours at room temperature** (shake at 350 rpm).
- 7) After incubation wash the wells **5 times with Washing Buffer WP** as described in step 4)
- 8) Pipette **100 µL of the Substrate Solution S** in each well.
- 9) Incubate the plate for **30 minutes in the dark at room temperature**.
- 10) After incubation pipette **100 µL Stop Solution SL** in each well.
- 11) Measure the absorbance **within 30 minutes at 450 nm (Reference filter ≥590 nm)**

CALCULATION OF RESULTS

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

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

Establishing the Standard Curve

The standards provided contain the following concentration of ALS

Standard	A	B	C	D	E	F
mU/mL	0	1.5	6.25	12.5	25	40

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

EXPECTATION VALUES

Concentration of ALS in human sera of 74 healthy adult donors was determined (see table 5).

Table 5: Expectation values for adults in serum.

Gender	Number of samples	Median [mU/ml]	Average value [mU/ml]	Standard Deviation [mU/ml]	Min. – Max.: [mU/ml]
female	35	1647.1	1682.5	391.2	1066.4 -2396.3
male	39	1432.3	1419.1	250.3	905.0-2006.2
total	74	1491.6	1543.7	348.5	905.0-2396.3

LITREATURE / LITERATUR

1. Ballard. J.. et al.. *On the nomenclature of the IGF binding proteins*. Acta Endocrinol (Copenh). 1989. **121**(5): p. 751-2.
2. Wilson. E.M.. Y. Oh. and R.G. Rosenfeld. *Generation and characterization of an IGFBP-7 antibody: identification of 31kD IGFBP-7 in human biological fluids and Hs578T human breast cancer conditioned media*. J Clin Endocrinol Metab. 1997. **82**(4): p. 1301-3.
3. Baxter. R.C.. *Characterization of the acid-labile subunit of the growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein complex*. J Clin Endocrinol Metab. 1988. **67**(2): p. 265-72.
4. Baxter. R.C. and J.L. Martin. *Structure of the Mr 140.000 growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein complex: determination by reconstitution and affinity-labeling*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989. **86**(18): p. 6898-902.
5. Holman. S.R. and R.C. Baxter. *Insulin-like growth factor binding protein-3: factors affecting binary and ternary complex formation*. Growth Regul. 1996. **6**(1): p. 42-7.
6. Baxter. R.C.. *Radioimmunoassay for insulin-like growth factor (IGF) II: interference by pure IGF-binding proteins*. J Immunoassay. 1990. **11**(4): p. 445-58.
7. Blum. W.F. and M.B. Ranke. *Use of insulin-like growth factor-binding protein 3 for the evaluation of growth disorders*. Horm Res. 1990. **33 Suppl 4**: p. 31-7.
8. Miller. B.S.. et al.. *The insulin-like growth factor system in children with congenital disorders of glycosylation*. Clin Endocrinol (Oxf). 2009.
9. Fofanova-Gambetti. O.V.. et al.. *Three novel IGFBP3 gene mutations resulting in total ALS and severe circulating IGF-I/IGFBP-3 deficiency in children of different ethnic origins*. Horm Res. 2009. **71**(2): p. 100-10.
10. Hwa. V.. et al.. *Total absence of functional acid labile subunit. resulting in severe insulin-like growth factor deficiency and moderate growth failure*. J Clin Endocrinol Metab. 2006. **91**(5): p. 1826-31.
11. Heath. K.E.. et al.. *Primary acid-labile subunit deficiency due to recessive IGFBP3 mutations results in postnatal growth deficit associated with low circulating insulin growth factor (IGF)-I. IGF binding protein-3 levels. and hyperinsulinemia*. J Clin Endocrinol Metab. 2008. **93**(5): p. 1616-24.
12. Domene. H.M.. et al.. *Acid-labile subunit deficiency: phenotypic similarities and differences between human and mouse*. J Endocrinol Invest. 2005. **28**(5 Suppl): p. 43-6.
13. Fischer. F.. et al.. *Associations of insulin-like growth factors. insulin-like growth factor binding proteins and acid-labile subunit with coronary heart disease*. Clin Endocrinol (Oxf). 2004. **61**(5): p. 595-602.
14. Morrison. K.M.. et al.. *Sample pre-treatment determines the clinical usefulness of acid-labile subunit immunoassays in the diagnosis of growth hormone deficiency and acromegaly*. Eur J Endocrinol. 2007. **156**(3): p. 331-9.
15. Tzanela. M.. et al.. *Growth hormone binding protein and acid labile subunit levels in the assessment of acromegaly treatment*. Hormones (Athens). 2005. **4**(3): p. 148-54.
16. Stadler. S.. et al.. *Monoclonal anti-acid-labile subunit oligopeptide antibodies and their use in a two-site immunoassay for ALS measurement in humans*. J Immunol Methods. 2001. **252**(1-2): p. 73-82.
17. Khosravi. M.J.. et al.. *Acid-labile subunit of human insulin-like growth factor-binding protein complex: measurement. molecular. and clinical evaluation*. J Clin Endocrinol Metab. 1997. **82**(12): p. 3944-51.

KURZANLEITUNG – MEDIAGNOST ALS-ELISA E35

Rekonstitution/ Verdünnung von Reagenzien		
Standards A-F	Rekonstitution in Probenpuffer PP (rot)	je 1000 µL
Kontrollserum KS1	Rekonstitution in Probenpuffer PP (rot)	je 250 µL
Kontrollserum KS2	Rekonstitution in Probenpuffer PP (rot)	je 250 µL
Antikörperkonjugat AK	bitte vor Gebrauch 1:50 verdünnen in Verdünnungspuffer VP	1:50
Waschpuffer WP	verdünnen in A. dest. (z.B. die gesamte Menge von 50 ml im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen)	1:20
Probenverdünnung bzw. Kontrollserenverdünnungen KS1/KS2: 1:150 in Probenpuffer PP (rot gefärbt; z.B. 10 µL in 1490 µL PP). Sofort mischen und in max. 60 min. verwenden. Davon 50 µL pro Bestimmung einsetzen (Pipettierkontrolle = Rotfärbung)		
Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.		

Testdurchführung Doppelbestimmung (Vorschlag):

Pipettieren	Reagenzien	Position
50 µL	1:50 verdünntes Antikörperkonjugat (AK)	in alle benötigten Vertiefungen pipettieren
50 µL	Standard A (0 mU /mL)	A1 und A2
50 µL	Standard B (1,5 mU /mL)	B1 und B2
50 µL	Standard C (6,25 mU/mL)	C1 und C2
50 µL	Standard D (12,5 mU/mL)	D1 und D2
50 µL	Standard E (25 mU/mL)	E1 und E2
50 µL	Standard F (40 mU/mL)	F1 und F2
50 µL	Vedünntes Kontrollserum KS1	G1 und G2
50 µL	Vedünntes Kontrollserum KS2	H1 und H2
50 µL	Verdünnte Probe	in die Vertiefungen nach Bedarf
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.		

Inkubation: 2 h bei RT, 350 rpm

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

Inkubation: 0.5 h bei RT, 350 rpm

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

Inkubation: 30 min im Dunklen bei RT

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

SUMMARY – MEDIAGNOST ALS ELISA E35

Reconstitution/ Dilution of Reagents		
Standards A-F	Reconstitution in Sample Buffer PP (red)	1000 µL each
Control Serum KS1	Reconstitution in Sample Buffer PP (red)	250 µL each
Control Serum KS2	Reconstitution in Sample Buffer PP (red)	250 µL each
Antibody Conjugate AK	dilute before use: 1:50 in Dilution Buffer VP	1:50
Washing Buffer WP	dilute in A. dest. (e.g. add the complete contents of the flask 50 mL into a graduated flask and fill with A.dest. to 1000 mL)	1:20
Sample and Control Sera KS1 &KS2 Dilution: 1:150 in Sample Buffer PP (red colored; e.g. 10 µL in 1490 µL PP). mix directly and use within max. 60 min. Use 50 µL per determination (pipetting control= red coloration)		
Before assay procedure bring all reagents to room temperature		

Proposal of Assay Procedure for Double Determination:

Pipette	Reagents	Well Positions
50 µL	1:50 diluted Antibody Conjugate (AK)	Pipette in all required number of wells
50 µL	Standard A (0 mU /mL)	A1 and A2
50 µL	Standard B (1.5 mU /mL)	B1 and B2
50 µL	Standard C (6.25 mU/mL)	C1 and C2
50 µL	Standard D (12.5 mU/mL)	D1 and D2
50 µL	Standard E (25 mU/mL)	E1 and E2
50 µL	Standard F (40 mU/mL)	F1 and F2
50 µL	Diluted Control Serum KS1	G1 and G2
50 µL	Diluted Control Serum KS2	H1 and H2
50 µL	Diluted Sample	Pipette sample in the rest of the wells according to requirements
Cover the wells with the sealing tape		

Incubation: 2 h at RT, 350 rpm

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

Incubation: 0.5 h at RT, 350 rpm

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

Incubation: 30 min in the dark at RT

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



CAL A-F	A -F	Rec in 1000 µL PP	
Control	KS1 / KS2	Rec in 250 µL PP	
Ab	AK		1:50 DILU BUF VP
WASHBUF 20x	WP		1:20 DILU A. dest.

Control	1:150 DILU PP
SPE	1:150 DILU PP
°C 20-25 °C	

50 µL	Ab AK 1:50 DILU VP	A1 - End
50 µL	CAL A (0 mU/mL)	A1/2
50 µL	CAL B (1.5 mU/mL)	B1/2
50 µL	CAL C (6.25 mU/mL)	C1/2
50 µL	CAL D (12.5 mU/mL)	D1/2
50 µL	CAL E (25 mU/mL)	E1/2
50 µL	CAL F (40 mU/mL)	F1/2
50 µL	CONTROL KS1 1:150 DILU PP	G1/2
50 µL	CONTROL KS2 1:150 DILU PP	H1/2
50 µL	SPE 1:150 DILU PP	
TAPE		

2 h **°C** 20-25 350 rpm

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

0.5h **°C** 20-25 350 rpm

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

0.5 h **°C** 20-25

100 µL	H₂SO₄ SL
MEASURE	