

m/rIGFBP-3 ELISA


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

Deutsch

Enzyme Immunoassay for Quantitative Determination of
**Mouse- and Rat-
Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3 (IGFBP-3)**

English

Alle Länder / All countries:
für Forschungszwecke, nicht für diagnostische Anwendungen.
for Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

 2-8°C


 96 wells



REF E031

 **mediagnost**[®]

Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH

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

	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/ Αεγυμίσκουρπάεβ/ Ημερομηνία λήξης/ Data de expirare/ Rok uporabe/ Viimeinen käyttöpäivä
	Consider instructions for use/ Bitte Gebrauchsanweisung beachten/ Consultez la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las instrucciones de uso/ Respeitar as instruções de utilização/ A.u.b de gebruiksaanwijzing volgen/ Se brugsanvisningen/ Läs anvisningarna före användning/ Proszę przeczytać instrukcję obsługi/ Vegye figyelembe a használati utasításban foglaltakat/ Postupujte podľa pokynov na použitie/ Dodržujte návod k použití/ Моля, спазвайте инструкцията за употреба/ Palun järgige kasutusjuhendit/ Λάβετε υπόψη σας τις οδηγίες χρήσης/ Vá rugám sá respectați instrucțiunile de utilizare/ Upoštečajte navodila za uporabo/! Lue käyttöohje huolellisesti!
LOT	Lot-Batch Number/ Charge-Chargennummer/ Lot-Code du lot/ Lotto-Numero di lotto/ Lote-Código de lote/ Lote-Código do Lote/Lot-Partijnumme/ Lot-Batchkode/ Partisatskod/ Numer serii/ Tétel-sarzs szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/Partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-număr lot/ Številka serije/ Erä
	Manufactured by/ Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por/ Fabricado por/ Vervaardigd door/ Fabrikation af/ Tillverkad av/ Wyprodukowane przez/ Gyártotta/ Vyrobene/ Vyrobeno v/ Производител/ Τοοτή/ Κατασκευάζεται από/ Produs de/ Proizvajalec/ Valmistaja
REF	Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/ Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referência/ Referentienummer/ Referencenummer/ Bestellningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/ Katalógové 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/ Säilittä temperatuuridel/ Φύλαξη σε θερμοκρασία/ Depozitare între/ Skladičenje med/ Säilytys x-y Celsiusasteen lämpötilassa
	Contains sufficient for x tests/ Inhalt ausreichend für x Tests/ Contient suffisant pour x tests/ Contenuto sufficiente per x test/ Contenido suficiente para x pruebas/ Conteúdo suficiente para x testes/ Bevat voldoende voor x bepalingen/ Indeholder tilstrækkeligt til x prøver/ Innehållet räcker till x analyser/ Zawartość na x testów/ Tartalma x teszt elvégzésére elegendő/ Obsahuje materiál pre x testov/ Obsah dostahuje pro x testů/ Съдържание достатъчно за x тестове/ Sisust jätkub x katse jaoks/ Το περιεχόμενο επαρκεί για x δοκιμές/ Conținut suficient pentru x teste/ Vsebina zadostuje za x preizkusov/ Sisältö riittää x testille
	Keep away from sunlight/ Nicht dem Sonnenlicht aussetzen/ Conserver à l'abri de la lumière/ Conservare al riparo della luce solare/ No exponer a la luz solar/ Proteger da luz solar/ Niet aan zonlicht blootstellen/ Må ikke udsættes for sollys/ Utsätt inte för solljus/ Nie wystawiać na słońce/ Napfénytől távol tartandó/ Nevystavovat slnečnému svetlu/ Nevystavovat slunečnému světlu/ Да се предпазва от слънчева светлина/ Kaitsta otsese päikesekiirguse eest/ Κρατήστε το μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία/ Τηνετή departe de lumina soarelui/ Ne izpostavljajte sončni svetlobi/ suojaa auringonvalolta
	Incubation time/ Inkubationszeit/ Temps d'incubation/ Tempo d'incubazione/ Tiempo de incubación/ Tempo de incubação/ incubatietijd/ Inkubationstid/ inkubationstid/ Czas inkubacji/ Inkubációs idő/ Inkubačná lehota/ Inkubační doba/ Инкубационен период/ Inkubatsiooniaeg/ Χρόνος επώασης/ Timp de incubare/ Inkubacijska doba/ inkubaatioaika
°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/ Promíchat 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/ Microtiterplaat/ Mikrotiterplade/ mikrotiterplatta/ microtiterplaat/ Płytko microtiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiiterplaat/ Τρυβλίο μικροτιτλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitrská plošča/ Mikrotitruslevy
Rec in	Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituier en/ Reconstituier em/ Reconstituieren in/ Rekonstituér i/ Rekonstituera/ Rekonstituować w/ Helyreállítás/ Znovu pripravit za/ Znovu připravit za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti/ Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ Rekonstituoi
SPE	Sample/ Probe/ Echantillon/ Campione/ Muestra/ Amostra/ Monster/ Prøve/ prov/ Próbká/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probã/ 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/ Антицяло 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/ Buffer/ Bufor/ Puffer/ Pufer/ Pufr/ Буфер/ Puhver/ Пуθμιστικό 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/ Späd i buffert X/ Rozcieńczenie w buforze X/ Hígítás X pufferben/ Riedit' v pufrí X/ Ředit v pufru X/ Разреждане в буфер X/ Lahjendada puhvris X/ Αραιώστε σε ρυθμιστικό διάλυμα X/ Diluați în tamponul X/ Razredčiti 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/ Štandard X/ Standard X/ Стандарт X/ Standard X/ Πρότυπο X/ Standard X/ Standardni X/ Standardi X
Control	Control Serum X/ Kontrollserum X/ Contrôle sérique X/ Siero di controllo X/ Suero de control X/ Soro de Controlo X/ controleserum X/ Kontrolserum X/ Kontrollserum X/ Serum kontrolne X/ Ellenőrző szérum X/ Kontrolné serum X/ Kontrolní serum X/ Контролен серум 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 płukania koncentrat/ Mosópufer koncentrát/ Koncentrát vymývacieho pufru/ Концентрат на промивен буфер/ Pesurpuhvi kontsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralnege pufru/ Pesuliiositiiviste
WASHBUF	Washing Buffer/ Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón de lavado/Tampão de Lavagem/ wasbuffer/ Vaskebuffer/ tvättbuffert/ Bufor płukania/ Mosópufer/ Vymývací pufer/ Vymývací pufr/ Промивен буфер/ Pesurpuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare/ Izpiralni pufer/ Pesuliios
SUBST TMB	Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ substraat/ Substrát/ 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/ Stopoplossing/ Stopplösning/ Stop roztwór/ Megállító oldat/ Roztok na ukončenie/ Roztok pro ukončeni/ 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/ Oblepiť podložku lepiacou páskou/ Olepit podložku lepící páskou/ Плака с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerikleplindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperiți 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)/ Measure lábsorbance en l'éspace 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 referència ≥ 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 (Referenčných filtrov ≥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)/ Měřtmine 30 min jooksul 450 nm korral (võrdlusfilter ≥ 590 nm)/ Μέτρηση εντός 30 min στα 450 nm (φίλτρο αναφοράς ≥ 590 nm)/ Măsurare în decurs de 30 min la 450 nm (filtru de referință ≥ 590 nm)/ Izmerite ploščico v 30 min pri 450 nm (referenčni filter ≥590nm)/ Mittaa 30 minuutin aikana 450 nm:ssä (referenssi suodatin ≥ 590 nm)
Literatur	Literature/ Literatur/ Bibliographie/ Letterario/ Bibliografia/ Literatura documentaço/ 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 testbeskrivning/ internationell testbeskrivning/ Opis testu międzynarodowego/ nemzetközi teszt-útmutató/ Medzinárodný návod k testu/ Mezinárodní návod k testu/ rahvusvaheline katse kirjeldus/ Διεθνείς οδηγίες για εργαστηριακές δοκιμές/ instrucțiuni internaționale pentru testare/ mednarodna navodila za preizkus/ Kansainvälinen käyttöohje
End	in all required wells/ in allen benötigten Vertiefungen/ dans tous les godets requis/ in tutti i pozzetti richiesti/ en todos los pozos requeridos/ em todos os tubos necessários/ in alle nodige putjes/ i alle nødvendige brønde/ i alla nödvändiga brunnar/ we wszystkich potrzebnych wgłębieniach/ minden szükséges forrásban/ vo všetkých potrebných miestach/ ve všech potřebných místech/ във всички необходими ямки/ kõigis vajalikes süvendites/ σε όλες τις απαραίτητες κοιλότητες/ în toate cavitățile necesare/ v vseh zahtevanih vdolbinah/ kaikkiin tarvittaviin mikrotitrauslevyn syvennyksiin

INHALTSVERZEICHNIS / TABLE OF CONTENTS

1	EINFÜHRUNG	5
2	EINSATZMÖGLICHKEITEN	6
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	14
	ENGLISH INSTRUCTIONS FOR USE	15
11	LITERATURE / LITERATUR	26
12	INTERNATIONAL ASSAY DESCRIPTION	27
13	ASSAY PROCEDURE	28

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

PACKUNGSBEILAGE DEUTSCH

m/rIGFBP-3 ELISA E031	96 Bestimmungen
RUO	Nur für Forschungszwecke
Testprinzip	Enzyme-linked Immunoassay
Dauer (Inkubationszeit)	2.5 h
Antikörper	spezifische, Ziegen anti-mouse/rat IGFBP-3 Antikörper
Puffer	Gebrauchsfertig und 20fach Konzentrat
Standard	7 Einzelstandards: (0,39 - 25 ng/mL), natives Maus IGFBP-3
Assay Bereich	0,09 – 12625 ng/mL
Kontrolle	2 Kontrollseren, gefriergetrocknet
Probe	Maus- und Ratten-Serum / Plasma, Zellkulturmedium
Erforderliches Probenvolumen	10 µL
Proben Verdünnung	1:505
Analytische Sensitivität	Ø 0,09 µg/L
Intra- / Interassay Variation	Ø ≤10 %

1 EINFÜHRUNG

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

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

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

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

2 EINSATZMÖGLICHKEITEN

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

3 TESTPRINZIP

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

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

4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Mediagnost Kit ist nur für Forschungszwecken und nur 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 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 Kit enthält Material tierischen Ursprungs. Die Bestandteile des Kits 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.

Tierisches Serum: Maus / Ratte

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

Das humane Material, das für die Präparation dieses Produktes verwendet wird, wurde mit negativem Ergebnis auf Humanen Immundefizienz-Virus (HIV I und II), Hepatitis B-Oberflächenantigen und Hepatitis C Virus getestet. Da kein Test das Vorhandensein von infektiösen Erregern völlig ausschließen kann, sollten die Reagenzien wie potentiell infektiöses Material gehandhabt werden.

Reagenzien AK, EK, VP, WP

enthalten als Konservierungsmittel **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 GIFTINFORMATIONSZENTRUM 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

Maus-/Ratten-Serum und **EDTA- Proben. Heparin-Plasmaproben** werden mit etwa 15% tieferen Werten gefunden. Des Weiteren ist Zellkulturmedium als Probenmatrix einsetzbar.

5.2 Probenentnahme

Hämolytische Reaktionen sind zu vermeiden.

5.3 Erforderliches Probenvolumen: 10 µL

5.4 Probenstabilität

In fest verschließbaren, geeigneten Probengefäße

- Lagerung bei -20°C: min. 2 Jahre
- Gefrier/Auftau-Zyklen: max. 3

Proben sollten möglichst schnell mindestens bei +4°C gelagert werden. Für die Langzeitlagerung muss die Probe eingefroren und bei -20°C aufbewahrt werden.

5.5 Probenverdünnung


Die Serumproben müssen vor der Messung verdünnt werden. Ein Extraktionsschritt ist nicht erforderlich.

- Verdünnung: **1:505** mit Verdünnungspuffer **VP**
- Wir empfehlen eine 2-stufige Verdünnung:
1 mL Verdünnungspuffer VP 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 1:101 verdünnt), jeweils sofort mischen. 100 µL dieser Verdünnung in ein weiteres PE/PP-Gefäß mit 400 µL vorgelegtem Verdünnungspuffer VP pipettieren und sofort mischen. Dies ergibt eine finale Verdünnung von 1:505.
- Nach dem Mischen innerhalb von 1 Stunde von dieser Lösung mit einer Endverdünnung von (1:505), **100 µL** pro Bestimmung im Assay einsetzen.
- Gegebenenfalls kann, je nach individuell erwarteten m/rIGFBP-3-Werten, geringer oder stärker in Verdünnungspuffer VP verdünnt werden.

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 Ziege-anti-Maus-IGFBP-3-Antikörper Die Vertiefungen sind einzeln abbrechbar.	(8x12) Vertiefungen
A-G	Standards , lyophilisiert (natives Maus-IGFBP-3), Konzentrationen sind auf den Etiketten und auf dem QC-Zertifikat angegeben.	7 x 750 µL
KS1	Kontrollserum 1 , lyophilisiert, (Maus Serum), die Konzentration ist auf dem QC-Zertifikat angegeben.	1x 250 µL
KS2	Kontrollserum 2 , lyophilisiert, (Ratten Serum), die Konzentration ist auf dem QC-Zertifikat angegeben.	1x 250 µL
AK	Antikörperkonjugat , gebrauchsfertig, Ziege anti-mouse-IGFBP-3-Antikörper biotinyliert	1 x 12 mL
EK	Enzymkonjugat EK , enthält POD (Meerrettich-Peroxidase)-markiertes Streptavidin, gebrauchsfertig.	1 x 12 mL
VP	Verdünnungspuffer , gebrauchsfertig. Bitte vor Gebrauch Schütteln!	1 x 125 mL
WP	Waschpuffer WP , 20fach konzentrierte Lösung	1 x 50 mL
S	Substrat S , gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase (POD)-Substrat, stabilisiertes H ₂ O ₂ -Tetramethylbenzidin.	1 x 12 mL
SL	Stopplösung SL , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure.	1 x 12 mL
-	Abdeckfolie für die Mikrotiterplatte	3 x
	Packungsbeilage	1 x
-	Qualitätskontrollzertifikat (QC-Zertifikat)	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 ≥ 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

Die Haltbarkeit der Reagenzien **nach Öffnung** beträgt 4 Wochen. 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** (Standards **A – G** und Kontrollserum sollten bei -20°C aufbewahrt werden. Zur weiteren Verwendung schnell aber schonend Auftauen (keine Temperaturerhöhung über Raumtemperatur und kein übermäßiges Vortexen), bis zu 3 dieser Einfrier-Auftauzyklen zeigten keinen Einfluss auf den Test. 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 **A-G** und Kontrollseren **KS1** und **KS2** werden mit dem im Kit enthaltenen Verdünnungspuffer **VP** rekonstituiert. Es empfiehlt sich zum Rekonstituieren die Reagenzien 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen zu lassen und sie anschließend kräftig mit einem Vortex-Mixer zu mischen. Schaumbildung sollte jedoch vermieden werden.

Verdünnung

Nach der Rekonstitution werden die Kontrollseren **KS1** und **KS2** im gleichen Verhältnis (1:505) 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-G**, 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-G**, Kontrollseren **KS1** und **KS2** und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden z.B. in 15 Minuten). Das Antikörperkonjugat **AK** und Enzymkonjugat **EK** sowie nachfolgend die Substratlösung **S** 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 Mikrotiterplattengeometrie und den Parametern der Waschspezifikation angepasst werden. Es ist zu beachten, dass die Dispensier- und Absaugkapillaren des Gerätes nicht die Oberfläche der Vertiefungen der Mikrotiterplatte beschädigen. Die verbleibende Restflüssigkeit nach jedem Absaugen muss minimiert werden. Nach Ende des gesamten Waschvorganges sollte die Menge der verbleibenden Restflüssigkeit überprüft und ggfs. verringert werden durch mehrmaliges Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fesselndem Zellstoff.

Manuelles Waschen ist eine gute 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 fesselndem Zellstoff gründlich entfernt werden.

8 TESTDURCHFÜHRUNG

Reagenzpräparation		Rekonstitution	Verdünnung
A-G	Standards	in 750 µL Verdünnungspuffer VP	-
KS1	Kontrollserum 1	in 250 µL Verdünnungspuffer VP	1:505 mit Verdünnungspuffer VP
KS2	Kontrollserum 2	in 250 µL Verdünnungspuffer VP	1:505 mit Verdünnungspuffer VP
WP	Waschpuffer	-	1:20 mit Aqua dest.
Proben mit Verdünnungspuffer VP 1:505 verdünnen			
Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen.			
Testdurchführung in Doppelbestimmung:			
Pipettieren	Reagenzien		Position
100 µL	Verdünnungspuffer VP (Leerwert)		A1/A2
100 µL	Standard A (0,39 ng/mL)		B1/B2
100 µL	Standard B (0,78 ng/mL)		C1/C2
100 µL	Standard C (1,56 ng/mL)		D1/D2
100 µL	Standard D (3,13 ng/mL)		E1/E2
100 µL	Standard E (6,25 ng/mL)		F1/F2
100 µL	Standard F (12,5 ng/mL)		G1/G2
100 µL	Standard G (25 ng/mL)		H1/H2
100 µL	Kontrollserum KS1	(1:505 verdünnt)	A3/A4
100 µL	Kontrollserum KS2	(1:505 verdünnt)	B3/B4
100 µL	Probe	(1:505 verdünnt)	in die restlichen Vertiefungen nach Bedarf pipettieren
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.			
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	Antikörperkonjugat AK		In jede Vertiefung
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.			
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: 15 min 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: 15 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

9.1 Berechnung der Standardkurve

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

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

Standard	A	B	C	D	E	F	G
ng/mL	0,039	0,78	1,56	3,13	6,25	12,5	25

- 1) Ermittlung des **Mittelwerts** der optischen Dichte des Leerwertes aus den Doppelbestimmungen (Vertiefung A1/A2).
- 2) Von den Mittelwerten der optischen Dichte der Standardkonzentrationen und der Proben wird der mittlere Leerwert abgezogen.
- 3) Die Standardkonzentrationen (x-Achse) werden gegen die gemessene optische Dichte (y-Achse) aufgetragen.
- 4) Die Berechnung der Standardkurve sollte durch ein statistisches Programm erfolgen, da die Kurve i. Allg. nicht ideal durch eine lineare Regression beschrieben wird. **Ein höhergradiges Polynom, 4-Parameter-Anpassungen oder nicht-lineare Regression** sind zur Auswertung geeignet, in manchen Fällen kann eine Spline oder Punkt-zu-Punkt Anpassung angebracht sein.
- 5) Die **Multiplikation** des jeweiligen hiermit **für die Proben berechneten IGFBP-3-Gehaltes mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor der Proben** ergibt die IGFBP-3-Konzentration in ng/mL, Division durch 1000 liefert die Werte in µg/mL bzw. gleichwertig mg/Liter. (Beispiel: ein gemessener wird mit Wert 5,760 ng/mL gefunden, Probe war 1:505 verdünnt eingesetzt: $5,760 \times 505 = 2909$ ng/mL, oder 2,909 µg/mL bzw. 2,909 mg/L)

9.2 Beispiel für eine typische Standardkurve

Standard	Leerwert	A	B	C	D	E	F	G
ng/mL	0	0,39	0,78	1,56	3,13	6,25	12,5	25
OD (450-620 nm)	0,00	0,048	0,101	0,202	0,412	0,815	1,484	2,438

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

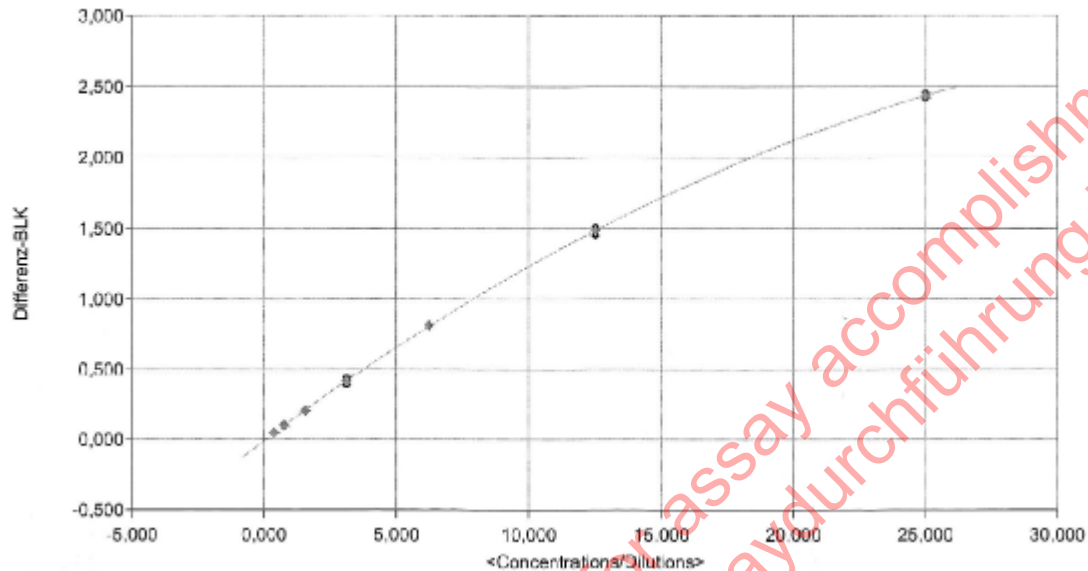


Abb. 1 Typische Standardkurve mit einem Polynom 3. Grades zur Berechnung der Standardkurve

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

Gemessene Extinktion (Mittelwert) der Probe: 0,749

Gemessene Extinktion (Mittelwert) des Leerwertes: 0,000

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

$$0,749 = 3,62^{-6} \times X^3 + -0,00188 \times X^2 + 0,143 \times X - 0,011$$

$$5,760 = X$$

Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor 1:505 ergibt für die Probe 2909 ng/mL IGFBP-3.

10 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG

10.1 Kalibration

Der Mediagnost E031 wurde an einer hochgereinigten rekombinanten eukaryotisch exprimierten Ratten IGFBP-3 Präparation neu kalibriert. Die bisherige Kalibration an einer rekombinanten Maus-IGFBP-3 Präparation mit geringerer Reinheit und mit teilweise abweichender Aminosäuresequenz ergab ca. um den **Faktor 10** niedrigere Messwerte. Wenn zu Vergleichszwecken gewünscht, kann eine **Umrechnung von oder zu Altwerten** mit dem **Faktor 10** durchgeführt werden. Messwerte mit **bisheriger Kalibrierung** z.B. 300 ng/mL entsprechen **mit neuer Kalibrierung** 3000 ng/mL. Ebenso kann auf die bisherige Kalibration durch Division durch 10 rückgerechnet werden.

10.2 Analytische Sensitivität

Die Sensitivität wurde durch 21fache Bestimmung des Leerwertes und der Berechnung des theoretischen Konzentration des Leerwertes + 2SD ermittelt. Die analytische Sensitivität dieses Testes beträgt 0,09 ng/mL.

10.3 Präzision

Die **Inter-** und **Intra-Assay** Variationskoeffizienten sind im Durchschnitt **≤10%** Beispielhafte Bestimmungen sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 1 Inter-Assay-Varianz (n=26 bzw. 15)

	Mittelwert (ng/mL)	Standardabweichung (ng/mL)	VK (%)
Probe 1	4836	384	7,94
Probe 2	2625	267	9,43

Tabelle 2 Intra-Assay-Varianz (n=13)

	Mittelwert (ng/mL)	Standardabweichung (ng/mL)	VK (%)
Probe 1	3286	124	3,76
Probe 2	1529	123	8,02

10.4 Linearität

Tabelle 3 Verdünnungslinearität (hier: typische Ergebnisse zweier verschiedener Seren)

Verdünnung:	Probe 1 (rekalkuliert, ng/mL)	Probe 2 (rekalkuliert, ng/mL)
1:100	3518	3676
1:200	3691	4145
1:400	3845	4234
1:800	3813	4110
1:1600	3792	4219
1:3200	3861	4557
MW/ SA/ VK%	3753/ 129/ 3,44	4157/ 284/ 6,83

MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient

10.5 Kreuzreaktivität mit anderen Spezies

Die Kreuzreaktivität mit rekombinanten humanen eukaryotisch exprimierten IGFBP-3 (1 µg/mL): 0,06%. Seren der unten genannten Spezies wurden verdünnt im Testsystem eingesetzt. Es konnte keine Kreuzreaktivität nachgewiesen werden mit: Kaninchen, Katze, Huhn, Meerschweinchen, Ziege, Schaf, Pferd, Esel, Schwein, Hund, Rind.

10.6 Wiederfindung in Zellkulturmedium

Die Wiederfindung von rekombinanten Maus IGFBP-3 wurde in **Zellkulturmedium, DMEM** mit 89,4%, in ZKM incl. 5% FCS mit 92,6% bestimmt. ZKM ist daher als Probenmatrix für den E031 geeignet.

TABLE OF CONTENTS

INSTRUCTIONS FOR USE

1	INTRODUCTION.....	16
2	INTENDED USE	17
3	ASSAY PRINCIPLE.....	17
4	WARNINGS AND PRECAUTIONS	18
5	SAMPLES.....	19
6	MATERIALS	20
7	TECHNICAL NOTES	21
8	ASSAY PROCEDURE.....	22
9	CALCULATION OF RESULTS.....	23
10	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	25
11	LITERATURE / LITERATUR	26
12	INTERNATIONAL ASSAY DESCRIPTION.....	27
13	ASSAY PROCEDURE.....	28

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

PACKAGE INSERT ENGLISH

m/rIGFBP-3 ELISA E031	96 Bestimmungen
RUO	For Research Use Only
Principle of the test	Enzyme-linked Immunoassay
Duration (Incubation period)	2.5 h
Antibodies	specific, goat anti-mouse/rat IGFBP-3 Antibody
Buffer	Ready for use and 20fold concentrate
Standard	7 Single standards: (0.39 - 25 ng/mL), native Mouse IGFBP-3
Assay Range	0.09 – 12625 ng/mL
Control	2 Control sera, lyophilized
Sample	Mouse- and Rat-Serum /Plasma Cell Culture Medium
Required sample volume	10 µL
Sample dilution	1:505
Analytical Sensitivity	Ø 0.09 ng/mL
Intra- / Interassay Variance	Ø ≤10 %

1 INTRODUCTION

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

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

Mouse / rat models for in vivo experiments are often used for studies of IGF-dependent and independent effects of IGFBP-3, particularly in the field of tumor research. For this purpose Mediagnost offers the E031 as a reliable and sensitive test system for the determination of IGFBP-3 in mouse and rat samples.

2 INTENDED USE

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

3 ASSAY PRINCIPLE

The Mediagnost m/rIGFBP-3 ELISA, E031 is a so-called sandwich-assay. It utilizes two different specific high affinity polyclonal antibodies for this protein. The IGFBP-3 in the samples binds quantitatively to the immobilized antibody. In the following step, the biotinylated antibody in turn binds IGFBP-3. After washing, a streptavidin-peroxidase-enzyme conjugate will be added, which will bind highly specific to the biotin of the antibody. Subsequently, the peroxidase catalyzes an enzymatic reaction resulting in a blue coloration. The intensity of the blue color depends on the IGFBP-3 content of the sample. The reaction is stopped by the addition of stop solution and color intensity is quantified by measuring the absorption.

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

4 WARNINGS AND PRECAUTIONS

For In Vitro Use only. For Professional use only.

The Mediagnost kit is suitable only for in vitro 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 obvious damaged or microbial contaminated or spilled material.

Caution: This kit contains material of human and/or animal origin. Therefore all components and patient's 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.

Animal serum: mouse / rat in the following components: KS1, KS2

Reagents AK, EK, VP, WP

Contain as preservative **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)

The 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+ P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. 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+ P331 IF SWALLOWED: rinse mouth. Do NOT induce vomiting.
- P305+P351+ P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. 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

Mouse and Rat Serum Plasma, In Heparin-Plasma samples the levels were found approx. 15% decreased. Further, cell culture medium was found to be suitable.

5.2 Specimen collection

Haemolytic reactions have to be avoided.

5.3 Requested sample volume: 10 µl serum.

5.4 Sample stability

- In firmly closable sample vials
- Storage at -20°C: min. 2 years
- Freeze/-thaw cycles: max. 3

It is recommended to store samples as soon as possible at least at 4°C. For any long time storage the sample has to be kept frozen at -20°C.

5.5 Sample dilution

Samples **must be diluted** prior to measurement. An extraction step is not required.

- Dilution: **1:505** with Dilution Buffer **VP**

We recommend a dilution in 2 steps:


Pipette **1 mL** Dilution Buffer **VP** in PE-/PP-Tubes (application of a multi-stepper is recommended in larger series), add **10 µL** Serum- or Plasma (dilution 1:101) and mix each tube immediately. Pipette **100 µL** of this dilution into another PE/PP vessel with **400 µL** of Dilution Buffer **VP** and mix immediately. This results in a final dilution of 1:505. After mixing, use 100 µL per assay in the assay within 1 hour of this solution

- After Mixing use 100 µL per assay in the assay within 1 hour of this solution.
- Where required, depending on the expected IGFBP-3-values, the dilution with **Dilution Buffer VP** can be higher or lower.

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 goat anti-mouse IGFBP-3 Antibody, wells are separately breakable.	(8x12) wells
A-G	Standards , lyophilised (native Mouse-IGFBP-3), Concentrations are given on the vial labels and quality certificate.	7 x 750 µL
KS1	Control Serum 1 , lyophilised, (Mouse Serum), Concentration is given on the quality certificate .	1x 250 µL
KS2	Kontrollserum 2 , lyophilisiert, (Ratten Serum), Concentration is given on the quality certificate .	1x 250 µL
AK	Antibody Conjugate , ready for use, Goat anti-mouse-IGFBP-3-Antibody, biotinylated .	1 x 12 mL
EK	Enzyme Conjugate EK , contains HRP (Horseradish-Peroxidase)-labeled Streptavidin.	1 x 12 mL
VP	Dilution Buffer , ready for use. Please shake before use.	1 x 125 mL
WP	Washing Buffer WP , 20fold concentrated solution	1 x 50 mL
S	Substrate S , ready for use, horseradish-peroxidase (HRP)-substrate, stabilised Tetramethylbencidine.	1 x 12 mL
SL	Stopping Solution SL , ready for use, 0.2 M sulphuric acid.	1 x 12 mL
-	Sealing Tape for covering the microtiter plate	3 x
	Instructions for use	1 x
-	Quality Control Certificate (QC-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.
- Graduated cylinder for diluting Washing Buffer (WP)
- 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 ≥ 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

The shelf life of the components **after initial opening** is warranted for **4 weeks**, 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-G** and Control Sera **KS1 and KS2** must be stored at -20°C (max. 4 weeks). For further use, thaw quickly but gently (avoid temperature increase above room temperature and avoid excessive vortexing). Up to 3 of the freeze-thaw cycles did not influence the assay. 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 - G** and Control **KS1 and KS2** are reconstituted with the Dilution Buffer **VP**. 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 Sera **KS1 and KS2** with the Dilution Buffer **VP** in the same ratio (1:505) 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.

Incubation

Incubation at room temperature means: Incubation at 20 - 25°C. The Substrate Solution **S**, stabilised H₂O₂-Tetramethylbenzidine, is photosensitive—store and incubation in the dark.

Assay Procedure

When performing the assay, Blank, Standards **A-G**, Control Serum **KS** 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**, 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-G**, Control Serum **KS** and samples) should be assayed in duplicate. For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

Shaking

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

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

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

8 ASSAY PROCEDURE

Reagent preparation		Reconstitution	Dilution
A-G	Standards	in 750 µL Dilution Buffer VP	-
KS1	Control Serum 1	in 250 µL Dilution Buffer VP	1:505 with Dilution Buffer VP
KS2	Control Serum 2	in 250 µL Dilution Buffer VP	1:505 with Dilution Buffer VP
WP	Waschpuffer	-	1:20 with Aqua dest.
Dilute Samples with Dilution Buffer VP 1:505			
Before assay procedure bring all reagents to room temperature (20°C- 25°C)			
Assay Procedure in Double Determination:			
Pipette	Reagents		Position
100 µL	Dilution Buffer VP (Blank)		A1/A2
100 µL	Standard A (0.39 ng/mL)		B1/B2
100 µL	Standard B (0.78 ng/mL)		C1/C2
100 µL	Standard C (1.56 ng/mL)		D1/D2
100 µL	Standard D (3.13 ng/mL)		E1/E2
100 µL	Standard E (6.25 ng/mL)		F1/F2
100 µL	Standard F (12.5 ng/mL)		G1/G2
100 µL	Standard G (25 ng/mL)		H1/H2
100 µL	Control Serum KS 1	(1:505 diluted)	A3/A4
100 µL	Control Serum KS 2	(1:505 diluted)	B3/B4
100 µL	Sample	(1:505 diluted)	In the rest of the wells according to the requirements.
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation: 1 h at 20-25°C, 350 rpm			
5x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 5x with 300 µL each WP/well		Each well
100 µL	Antibody Conjugat AK		Each well
Cover the wells with the sealing tape			
Incubation: 1 h bei 20-25°C, 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
Cover the wells with the sealing tape			
Incubation: 15 min at 20-25°C, 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
Substrat S Incubation: 15 Minutes in the dark at RT			
100 µL	Stop Solution SL		Each well
Measure the absorbance within 30 min at 450 nm (≥590 nm Reference)			

9 CALCULATION OF RESULTS

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

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

9.1 Establishing the standard curve

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

Standard	A	B	C	D	E	F	G
ng/mL	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25

- 1) Calculate the **mean absorbance** value for the blank from the duplicated determination (well A1/A2).
- 2) Subtract the mean absorbance of the blank from the mean absorbances of all other values.
- 3) Plot the standard concentrations on the x-axis versus the mean value of the absorbance of the standards on the y-axis.
- 4) Recommendation: Calculation of the standard curve should be done by using a computer program because the curve is in general (without respective transformation) not ideally described by linear regression. **A higher-grade polynomial, or four parametric logistic (4-PL) curve fit or non-linear regression** are usually suitable for the evaluation (as might be spline or point-to-point alignment in individual cases).
- 5) The **IGFBP-3 concentration in ng/mL** of the samples can be **calculated by multiplication with the respective dilution factor**, division by 1000 converts the values in $\mu\text{g/mL}$ or equal mg/Litre (Example: a measured value was 5.760 ng/mL, Sample was 1:505 diluted: $5.760 \times 505 = 2909$ ng/mL, or 2.909 $\mu\text{g/mL}$ equal to 2.909 mg/L)

9.2 Example of a typical standard curve

Standard	Blank	A	B	C	D	E	F	G
ng/mL	0	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
OD _(450-620 nm)	0.00	0.048	0.101	0.202	0.412	0.815	1.484	2.438

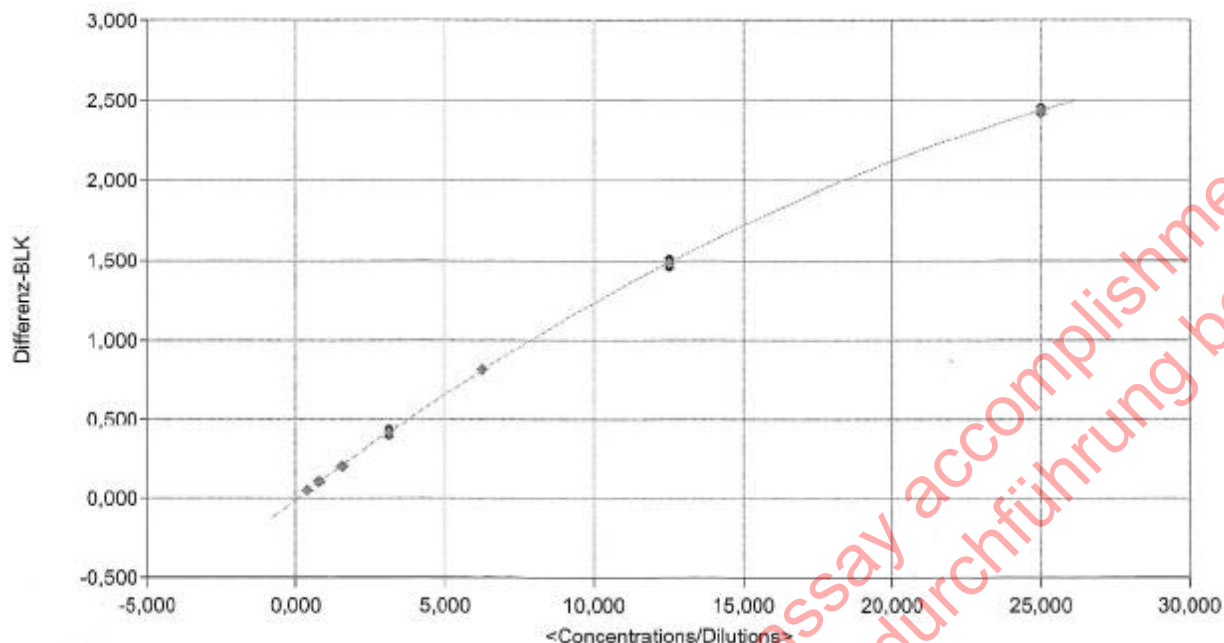


Fig. 1: Exemplary Standard Curve with a polynomial 3rd degree as curve fit.

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

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

OD 450 nm

Measured extinction (mean value) of your sample 0.749

Measured extinction of the blank (mean value) 0.000

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

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

$$0.749 = 3,62^{-6} \times X^3 + -0.00188 \times X^2 + 0.143 \times X - 0.011$$

$$5.760 = X$$

Multiplication by dilution factor (1:505) gives the IGFBP-3 concentration of the sample with

2909 ng/mL

10 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

10.1 Calibration

The Mediagnost E031 was recalibrated on a highly purified eukaryotic expressed recombinant rat IGFBP-3 preparation. The previous calibration on a recombinant mouse IGFBP-3 preparation of lower purity and with a partly different amino acid sequence resulted approx. by a factor of 10 lower values. If desired for comparison purposes, a conversion from or to old values can be carried out by a factor of 10. Measured values with **previous calibration**, e.g. 300 ng/mL correspond to a **new calibration** of 3000 ng/mL. It is also possible to calculate the previous calibration by dividing by 10.

10.2 Analytical Sensitivity

The **analytical Sensitivity** was assessed by 21-fold determination of the blank and calculating the theoretical concentration of the blank +2SD. The analytical sensitivity of the E031 is **0.09 ng/mL**.

10.3 Precision

The **Inter-** and **Intra-Assay** variation coefficients were on average **≤10%**. Exemplary determinations are shown in table 1 and table 2.

Tabelle 1 Inter-Assay-Variation (n=26 or 15)

	Mean Value (ng/mL)	Standard Deviation (ng/mL)	VC(%)
Sample 1	4836	384	7,94
Sample 2	2625	269	9,43

Tabelle 2 Intra-Assay-Variation (n=13)

	Mean Value (ng/mL)	Standard Deviation (ng/mL)	VC (%)
Sample 1	3286	124	3,76
Sample 2	1529	123	8,02

10.4 Linearity

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

Dilution:	Sample 1 (recalculated, ng/mL)	Sample 2 (recalculated, ng/mL)
1:100	3518	3676
1:200	3691	4145
1:400	3845	4234
1:800	3813	4110
1:1600	3792	4219
1:3200	3861	4557
AV/ SD/ VC%	3753/ 129/ 3.46	4157/ 284/ 6.83

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

10.5 Species Cross-Reactivity

Serum of the cited species were used as diluted samples in this assay system.

No cross reactivity was detected for:

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

Cross reactivity with recombinant human eukaryotic expressed IGFBP-3 (1 µg/mL): 0.06%

10.6 Recovery in Cell Culture Medium

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

11 LITERATURE / LITERATUR

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

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

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

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

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

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

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

12 INTERNATIONAL ASSAY DESCRIPTION

A-G	STD	Rec in 750 µL	BUF VP	100 µL
KS1	Control	Rec in 250 µL	BUF VP	100 µL
KS2	Control	Rec in 250 µL	BUF VP	100 µL
WP	WASHBUF 20x	-		1:20 DILU A. dest.
SPE + Control 1:505 DILU BUF VP ↔ ⌚ max. 1 h				100 µL
°C 20-25°C				
100 µL	BUF VP			A1/2
100 µL	STD A	(0.39 ng/mL)		B1/2
100 µL	STD B	(0.78 ng/mL)		C1/2
100 µL	STD C	(1.56 ng/mL)		D1/2
100 µL	STD D	(3.13 ng/mL)		E1/2
100 µL	STD E	(6.25 ng/mL)		F1/2
100 µL	STD F	(12.5 ng/mL)		G1/2
100 µL	STD G	(25 ng/mL)		H1/2
100 µL	CONTROL KS1	1:505 DILU BUF VP		A3/4
100 µL	CONTROL KS2	1:505 DILU BUF VP		B3/4
100 µL	SPE 1:505	DILU BUF VP		
TAPE				
⌚ 1 h °C 20-25 ↔ 350 rpm				
5x 300 µL	5x WASHBUF WP			
100 µL	Ab AK			
TAPE				
⌚ 1 h °C 20-25 ↔ 350 rpm				
5x 300 µL	5x WASHBUF WP			
100 µL	CONJ EK			
TAPE				
⌚ 15 min °C 20-25 ↔ 350 rpm				
5x 300 µL	5x WASHBUF WP			
100 µL	SUBST TMB S			
⌚ 15 min °C 20-25 ☀				
100 µL	H ₂ SO ₄ SL			
MEASURE				

13 ASSAY PROCEDURE

Reagent preparation		Reconstitution	Dilution
A-G	Standards	in 750 µL Dilution Buffer VP	-
KS1	Control Serum 1	in 250 µL Dilution Buffer VP	1:505 with Dilution Buffer VP
KS2	Control Serum 2	in 250 µL Dilution Buffer VP	1:505 with Dilution Buffer VP
WP	Waschpuffer	-	1:20 with Aqua dest.
Dilute Samples with Dilution Buffer VP 1:505			
Before assay procedure bring all reagents to room temperature (20°C- 25°C)			
Assay Procedure in Double Determination:			
Pipette	Reagents		Position
100 µL	Dilution Buffer VP (Blank)		A1/A2
100 µL	Standard A (0.39 ng/mL)		B1/B2
100 µL	Standard B (0.78 ng/mL)		C1/C2
100 µL	Standard C (1.56 ng/mL)		D1/D2
100 µL	Standard D (3.13 ng/mL)		E1/E2
100 µL	Standard E (6.25 ng/mL)		F1/F2
100 µL	Standard F (12.5 ng/mL)		G1/G2
100 µL	Standard G (25 ng/mL)		H1/H2
100 µL	Control Serum KS 1	(1:505 diluted)	A3/A4
100 µL	Control Serum KS 2	(1:505 diluted)	B3/B4
100 µL	Sample	(1:505 diluted)	In the rest of the wells according to the requirements.
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation: 1 h at 20-25°C, 350 rpm			
5x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 5x with 300 µL each WP/well		Each well
100 µL	Antibody Conjugat AK		Each well
Cover the wells with the sealing tape			
Incubation: 1 h bei 20-25°C, 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
Cover the wells with the sealing tape			
Incubation: 15 min at 20-25°C, 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
Substrat S Incubation: 15 Minutes in the dark at RT			
100 µL	Stop Solution SL		Each well
Measure the absorbance within 30 min at 450 nm (≥590 nm Reference)			