

m/rLeptin-ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative
Bestimmung von

Maus- und Ratten-Leptin (Obese Protein)

Produkt-Nr: E06
(96 Bestimmungen)

Nur zu Forschungszwecken!



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>

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	2
TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN	3
EINFÜHRUNG	3
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	5
TECHNISCHE HINWEISE	7
KALIBRIERUNG DES ASSAYS	9
ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG	9
MATERIALIEN	11
Inhalt der Testpackung	11
Zusätzlich benötigte Materialien und Reagenzien	12
PROBENVORBEREITUNG	12
Vorbereitung von Proben und Kitkomponenten	12
DURCHFÜHRUNG	14
AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	16
LITERATUR	17
KURZANLEITUNG – M/R LEPTIN ELISA E06	20

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!

TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN

- Hoch spezifischer, sensitiver und schneller Test für Maus- und Ratten-Leptin.
- Kalibriert am International Standard der WHO für Maus-Leptin: Code 97/626 (39,40).
- Keine Proben-Extraktion nötig, keine Beeinträchtigung durch Leptin-Bindungsproteine wegen hoher Affinität des Antiserums.
- 100% Wiederfindung vom Gesamt-Leptin in Serum und Plasma
- Die hohe Empfindlichkeit des Tests erlaubt präzise Messungen auch in schlanken Tieren: Nachweisgrenze bei 10 pg/ml.
- Auf Grund hoher Sensitivität sind nur kleine Probenvolumina nötig z.B. weniger als 5 µl / Vertiefung.

EINFÜHRUNG

Leptin, das Produkt des ob-Genes (1,2), ist ein vor kurzem identifiziertes Einzelstrang Proteohormon mit einem Molekulargewicht von 16 kD und man nimmt an, dass es eine Schlüsselrolle bei der Regulierung des Körpergewichts spielt. Seine Aminosäuresequenz weist keine größeren Homologien zu anderen Proteinen auf (1). Leptin wird fast ausschließlich von differenzierten Fettzellen produziert (3-5). Es wirkt auf das zentrale Nervensystem ein, vor allem auf den Hypothalamus, wobei es die Nahrungsaufnahme unterdrückt und den Energieverbrauch steigert (2,6-9). Es existieren unterschiedlich gespleißte Formen des Leptin-Rezeptors, die sich in ihrer Länge unterscheiden. Sie gehören zu der Cytokin-Klasse-1-Rezeptor-Familie (10-12) und kommen ubiquitär im Körper vor (10,11,13,14). Dies läßt auf eine umfassende Funktion von Leptin schließen, die bis jetzt aber noch nicht völlig verstanden wird.

Eines der vielen Leptin Bindungsproteine stellt eine zirkulierende Form eines Leptin-Rezeptors dar (15).

Neben seinem Einfluss auf den Stoffwechsel besitzt Leptin auch einen starken Einfluss auf eine weitere Anzahl endokriner Achsen. In männlichen Mäusen schwächte es die durch Hungern induzierte ausgeprägte Abnahme von LH, Testosteron und Thyroxin bzw. die Zunahme von ACTH und Corticosteron ab. In weiblichen Mäusen verhinderte Leptin die durch Hungern induzierte Verzögerung des Eisprungs (16). Ob/ob-Mäuse, die aufgrund einer ob-Genmutation einen Leptin-Mangel aufweisen, sind unfruchtbar. Dieser Defekt konnte durch Leptinapplikation korrigiert werden, jedoch nicht durch Gewichtsverlust infolge von Nahrungskarenz (17). Dies lässt darauf schließen, dass Leptin eine wichtige Rolle für die Reproduktion spielt.

Die Wirkung von Leptin kann wenigstens teilweise auf den supprimierenden Effekt von Leptin auf die Bildung und Sekretion von Neuropeptid Y (NPY) durch Neuronen des *Nucleus arcuatus* erklärt werden (6,18,19). NPY ist ein starker Stimulator für den Appetit (20,21) und ist bekanntermaßen an der Regulation verschiedener Hypophysen-Hormone beteiligt. Dazu gehören z.B. die Suppression von Wachstumshormon durch Stimulierung von Somatostatin (22,23), die Suppression von Gonadotropinen (23) und die Stimulierung der Hypophysen-Nebennieren-Achse (21).

Die wichtigste Variable, die die zirkulierende Leptinkonzentration bestimmt, ist die Körperfettmasse (24-26). Bei regelmäßiger Nahrungszufuhr reflektiert Leptin den Anteil von Fettgewebe (27). Die Leptinkonzentration steigt exponentiell mit der Fettmasse an (37). Die konstitutive Synthese von Leptin wird durch eine Vielzahl von nicht-hormonellen und hormonellen Faktoren moduliert. Stimulatoren bei Nagern und Menschen sind Überernährung (28,29), fettreiche Diäten (41), Insulin (3,5,30-33) und Glucocorticoide (5,34-36). Hemmfaktoren sind Fasten (27), cAMP und β 3-Adrenozeptor-Agonisten (35). Generell lässt sich sagen, dass Leptin einen wesentlichen Bestandteil einer Vielzahl von metabolischen und endokrinen Feedback-Schleifen darstellt (38).

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Mediagnost E06 Kit ist nur zum In-vitro-Gebrauch und nicht zur in vivo-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 Reagenzien **AK, EK, VP, WP, A-E** enthalten als Konservierungsmittel < 0,01% (w/w) 5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one und 2-methyl-2H-isothiazol-3-one

R36/38 Reizend für Augen und Haut

R43 Kann bei Hautkontakt zur Sensibilisierung führen

S26 Im Falle von Augenkontakt, sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen

S28.1 Im Falle von Hautkontakt sofort mit viel Wasser waschen

Die Reagenzien **AK, EK, VP** enthalten als Konservierungsmittel (0,01%) **2-Methyl-4-isothiazolin-3-one Solution**

R34 Verursacht Verätzungen

R43 Kann bei Hautkontakt zur Sensibilisierung führen

S26 Im Falle von Augenkontakt, sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen

S36/37 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung und –handschuhe tragen.

S45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen

Substratlösung (S)

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

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

Stopplösung (SL)

Die Stopplösung enthält 0,2 M Schwefelsäure (H₂SO₄)

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

Erste-Hilfe Maßnahmen:

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

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

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

TECHNISCHE HINWEISE

Die lyophilisierten Kit-Komponenten sollten bei 2-8°C aufbewahrt werden. Ihre Haltbarkeit ist auf jeweiligem Etikett angegeben.

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

Alle Komponenten des Kits müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

Für die Rekonstitution der lyophilisierten Komponenten sollte der im Kit erhaltene Verdünnungspuffer VP angewendet werden. Es empfiehlt sich die rekonstituierten Reagenzien eine halbe Stunde bei Raumtemperatur stehen zu lassen und sie anschließend kräftig mit einem Vortex-Mixer zu mischen. Schaumbildung sollte jedoch vermieden werden.

Nach der Rekonstitution können die Komponenten bis zu einer Woche bei 4 –8 °C aufbewahrt werden. Falls eine längere Lagerungszeit benötigt wird, sollten die Komponenten bei –20°C (oder kälter) aufbewahrt werden. Das Einfrieren ist jedoch nur einmal möglich! Wiederholtes Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden. Wenn mehrere unabhängige Leptin-Messungen über eine längere Periode mit einem Kit geplant sind, wird Aliquotierung der Komponenten in passende Volumina empfohlen.

Bei der Testdurchführung sollten Standards (A-G), Kontrolle (KS) und die Proben möglichst schnell pipettiert werden (z.B. in 15 Minuten).

Antikörperkonjugat (AK) sollte in der gleichen Reihenfolge und in dem gleichen Zeitintervall wie die Proben auf die Platte zugegeben werden. Ebenso sollte die Stopplösung in der gleichen Reihenfolge wie die Substratlösung auf die Testplatte zugegeben werden.

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

Die Inkubationen sollen geschüttelt bei mittlerer Umdrehungsfrequenz eines für Mikrotiterplatten geeigneten Schüttlers erfolgen. Wir empfehlen 350 rpm. Bauartbedingt können individuell Abweichungen von diesem Wert möglich sein, dann muss die Umdrehungsfrequenz angepaßt werden. Zu geringes Schütteln kann durch ungenügende

Vermischung der Lösungen zu verringerten optischen Dichten, hohen Streuungen und/oder falschen Werten führen, zu starkes Schütteln dagegen zu erhöhten optischen Dichten und/oder falschen Werten.

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

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

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

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

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

Waschzyklus sollte die verbleibende Restflüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fesselndem Zellstoff gründlich entfernt werden.

KALIBRIERUNG DES ASSAYS

Die Mediagnost Maus-/Ratten-Leptin ELISA E06 Assay ist am **Internationalen Referenz Standard für Maus-Leptin kalibriert**. Die Definition dieses internationalen Materials unter **Code 97/626**, wurde in einer internationalen Gemeinschaftsstudie mit Mediagnost Testkits und mit der Beteiligung von Mediagnost GmbH evaluiert (39). Der Standard der WHO wird unter Code 97/626 (39) vom NIBISC vertrieben (40).

Eine Ampulle der Präparation, in 1 ml Lösung rekonstituiert, wird durch diesen Test (E06) mit dem Nominalgehalt von 4000 ng Maus Leptin quantifiziert.

ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG

Die ELISA für Maus/Ratten Leptin (E06) verwendet zwei Polyklonale Antikörper mit hoher spezifischer Affinität für Leptin. Standards wurden aus rekombinantem Maus-Leptin hergestellt. Er ermöglicht die quantitative Bestimmung von Maus-Leptin.

Auf Grund der hohen Kreuzreaktivität der Antikörper mit Ratten-Leptin ist der quantitative Nachweis von Ratten-Leptin mit diesem Kit ebenfalls möglich.

Präparationen vom rekombinanten Maus- und Ratten-Leptin des gleichen Herstellers wurden im Hinblick auf die Quantifizierung durch diesen Test (E06) verglichen. Basierend auf der Mengen-Deklaration des Herstellers wurde im Rattenmaterial im Vergleich zur Maus-Probe mehr als 95% der deklarierten Menge nachgewiesen.

Wenn Sie mit Rattenproben arbeiten, empfehlen wir Ihnen eine individuelle Kalibrierung des Testes vorzunehmen. Der E06-Test ist am internationalen Maus-Leptin Standard der WHO kalibriert (NIBSC Code 97/626 (s. oben).

Die Kreuzreaktivität mit humanem Leptin beträgt 0,7%.

Die praktische Sensitivität des Testes beträgt 10 pg/ml, d.h., 1 pg/Vertiefung (Berechnet durch Extrapolation von der Standardkurve). Inter-Assay und Intra-Assay Variationkoeffizienten liegen unter 4,7% bzw. 4,4%. Die Verdünnungsreihen von Proben ergaben eine Übereinstimmung mit der Standardkurve.

Beispiele über die Bestimmungen sind in den Tabellen 1, 2 und 3 gezeigt.

Tabelle 1 : Inter-assay-Variation: Verschiedene Seren, unabhängig verdünnt, gemessen in Doppelbestimmungen.

Probe 1 (pg/ml)	867,9	802,8	874,1	822,5	904,5	821,8	901,9
Probe 2 (pg/ml)	1208,2	1169,6	1306,5	1275,6	1276,8	1212,0	1246,5
Probe 3 (pg/ml)	627,9	631,2	601,0	638,7	590,2	612,2	586,3

Tabelle 2: Intra-Assay-Variation: Verschiedene Seren 1:5 unabhängig verdünnt, gemessen je 6fach in Doppelbestimmung.

Probe 1 (pg/ml)	1262	1266	1197	1260	1218	1247
Probe 2 (pg/ml)	869	829	790	826	790	821
Probe 3 (pg/ml)	436	457	464	454	423	418

Tabelle 3: Linearität der Probenverdünnung: Unabhängige Tests, unabhängige Verdünnungen wie angegeben, Doppelbestimmungen.

Verdünnung	Serum 1 (pg/ml)	Serum 2 (pg/ml)	Serum 3 (pg/ml)	WHO NIBSC Code 97/626 (pg/ml)		
				nominal	1. Verdünnungs- resultate	2. Verdünnungs- resultate
1:2	1002	628	927	1500	1417,5	1609,3
1:4	1170	631	892	750	722,5	838,0
1:8	1212	601	855	375	343,6	397,3
1:16	1307	n.d.	n.d.	187,5	171,0	197,6
1:32	1424	n.d.	n.d.	93,75	88,4	98,2
1:64	1432	n.d.	n.d.	46,88	42,9	53,3
				23,44	21,0	n.d.

MATERIALIEN

Inhalt der Testpackung

- 1) **Mikrotiterplatte**, gebrauchsfertig: Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen, die in 12 abnehmbare Streifen à 8 Vertiefungen (einzeln abbrechbar) aufgeteilt ist. Die Platte ist mit Anti-Maus-/Ratten-Leptin Antikörpern beschichtet und in einem Aluminiumbeutel verpackt.
- 2) **Standards A-G**, lyophilisiert: Enthalten rekombinantes Maus-Leptin. Die Verdünnungen der Standardkurve decken einen Bereich von 25 – 1600 pg/ml ab und werden mit **1 ml** Verdünnungspuffer **VP** rekonstituiert. Die exakten Konzentrationen sind auf den einzelnen Fläschchen angegeben.
- 3) **Kontrolle KS**, lyophilisiert: Das Mausserum ist in **200 µl VP** zu rekonstituieren, die exakte Maus-Leptin Konzentration und die **akzeptable Abweichung ist auf dem Etikett angegeben**. Die Verdünnung des Kontrollserums sollte entsprechend der Probenverdünnung durchgeführt werden.

- 4) **Antikörperkonjugat AK**, 120 µl, 100fach konzentriert: biotinyliertes Anti-Maus-/Rat-Leptin Antiserum. Vor Gebrauch **1:100** mit Verdünnungspuffer **VP** verdünnen.
- 5) **Enzymkonjugat EK**, 120 µl, 100fach konzentriert: mit POD-markiertes Streptavidin. Vor Gebrauch **1:100** mit Verdünnungspuffer **VP 1:100** verdünnen.
- 6) **Verdünnungspuffer VP**, 120 ml, gebrauchsfertig
- 7) **Waschpuffer WP**, 50 ml, 20fach konzentriert: Vor dem Gebrauch 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnen. Der gebrauchsfertig **verdünnte Waschpuffer WP** ist nur 4 Wochen haltbar, bitte nur nach Bedarf ansetzen.
- 8) **TMB-Substrate Lösung S**, 12 ml, gebrauchsfertig
- 9) **Stopplösung SL**, 0,4 N Schwefelsäure, 12 ml, gebrauchsfertig
- 10) **Abdeckfolien** für die Mikrotiterplatte, 2 x Folien

Zusätzlich benötigte Materialien und Reagenzien

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

PROBENVORBEREITUNG

Vorbereitung von Proben und Kitkomponenten

Geeignet sind Serumproben sowie Heparin-, EDTA- und Citrat-Plasmaproben. Eine eventuelle Verdünnung der Probe durch das Antikoagulans muss berücksichtigt werden.

Vergewissern Sie sich, dass lyophilisierte Materialien nach Rekonstitution vollständig gelöst sind (siehe technische Empfehlungen).

Unverdünnte Serumproben können bei -20°C aufbewahrt werden, ohne dass die Maus/Ratten-Leptin Aktivität dabei beeinflusst wird. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren ist zu vermeiden, obwohl die Serumspiegel durch einige wenige Zyklen nicht beeinflusst werden.

Proben sollten vor der Messung mit Verdünnungspuffer VP je nach erwarteten Leptinwerten verdünnt werden.

Im Allgemeinen ist eine **Verdünnung von 1:5 bis 1:20** geeignet. Je nach Art, Stamm oder Aufzucht bzw. den individuellen experimentellen Bedingungen kann diese aber variieren.

Falls sehr niedrige Leptinkonzentrationen zu erwarten sind, können 1:2 verdünnte Proben oder sogar unverdünnte Proben eingesetzt werden. Wenn die Probenmenge beschränkt ist, sind höhere Verdünnungen möglich (vorausgesetzt, dass die Leptin Konzentration ausreichend ist).

Exemplarisches Protokoll für eine 1:5 Verdünnung

200 μl **Verdünnungspuffer VP** in PE-/PP-Gefäße vorlegen (bei größeren Serien empfiehlt sich hierfür die Verwendung eines Multi-Steppers), dazu 50 μl Serum- oder Plasma pipettieren (Proben sind 1:5 verdünnt). Nach dem Mischen werden von dieser Lösung **100 μl pro Bestimmung** im Assay eingesetzt.

Oder 80 μl Puffer werden in eine Vertiefung pipettiert und dazu werden 20 μl Serum zugesetzt (gut mischen).

DURCHFÜHRUNG

Um optimale Ergebnisse zu erhalten, ist auf die genaue Befolgung des Testprotokolls zu achten. Auf Grund der allgemeinen Erwägungen zur Durchführung der ELISA sollten Standards, Kontrollen und Proben stets in Doppelbestimmungen durchgeführt werden. Ein Pipetierplan als Beispiel:

- 1) In die Vertiefungen A1/A2 (Leerwert) werden **100 µl Verdünnungspuffer VP** pipettiert und
- 2) in die Position B1/B2 je **100 µl Standard A**,
in die Position C1/C2 je **100 µl Standard B**,
in die Position D1/D2 je **100 µl Standard C**,
in die Position E1/E2 je **100 µl Standard D**,
in die Position F1/F2 je **100 µl Standard E**,
in die Position G1/G2 je **100 µl Standard F**,
in die Position H1/H2 je **100 µl Standard G**.

Je **100 µl** des verdünnten **Kontrollserums (KS)** werden in die Vertiefungen A3/A4 gegeben. In die übrigen Vertiefungen können je **100 µl** der verdünnten **Proben** pipettiert werden, z.B. Probe 1 in die Vertiefung B3/B4 usw.

Um Abweichungen aufgrund von unterschiedlichen Inkubationszeiten zu vermeiden, sollten Standards, Proben und Kontrollen möglichst schnell pipettiert werden.

- 3) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie abgedeckt und **1 Stunde** bei **Raumtemperatur** unter Schütteln bei **350 rpm** inkubiert
- 4) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Inhalte der Vertiefungen in Desinfektionsmittel abgesaugt (potentiell infektiöses Material!) und die Platten **3 mal** mit jeweils **300 µl Waschpuffer WP**/Vertiefung gewaschen. Der Waschpuffer **WP** sollte mindestens 15 Sekunden/Zyklus wirken.
- 5) **100 µl** der gebrauchsfertig verdünnten **Antikörperkonjugat-Lösung AK** werden in jede Vertiefung pipettiert. Die Platte wird mit

- Klebefolie abgedeckt und **1 Stunde** bei **Raumtemperatur** unter Schütteln bei **350 rpm** inkubiert.
- 6) Nach Abschluss dieser Inkubation werden die Platten **3 mal** mit dem **Waschpuffer WP** wie oben beschrieben gewaschen.
 - 7) **100 µl** der gebrauchsfertig verdünnten **Enzymkonjugat-Lösung EK** werden in jede Vertiefung pipettiert, die Platte wird mit Klebefolie abgedeckt und **30 Minuten** bei **Raumtemperatur** unter Schütteln **bei 350 rpm** inkubiert.
 - 8) Nach der Inkubation wird die Platte **3 mal** mit **Waschpuffer WP** wie oben beschrieben gewaschen.
 - 9) Je **100 µl** von der **TMB-Substrat Lösung S** werden in jede Vertiefung pipettiert und die Platte **30 Minuten** im Dunkeln **bei Raumtemperatur** inkubiert.
 - 10) Die Reaktion wird durch Zugabe von **100 µl Stopplösung SL** in jede Vertiefung gestoppt.
 - 11) **Messung** der Farbreaktion erfolgt **innerhalb** von **15 Minuten** bei **450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)**.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die Absorption der Leerwerte sollte unter 0,25 und die des Standards G (1600 pg/ml) über 1 Einheiten optischer Dichte liegen.

Die bestimmte und berechnete Konzentration der Kontrolle KS sollte innerhalb des Bereichs der auf dem Etikett angegeben wird, liegen.

Die bereitgestellten Standards enthalten folgende Maus-Leptinkonzentrationen:

Standard:	A	B	C	D	E	F	G
mLEPTIN (pg/ml)	25	50	100	200	400	800	1600

- 1) Ermittlung des Mittelwerts (MW) 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 entsprechend bestimmte 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 Leptin-Gehaltes mit dem entsprechenden **Verdünnungsfaktor** der Proben ergibt die **Leptinkonzentration in pg/ml**.

LITERATUR

- 1) Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 372:425-432.
- 2) Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, et al. 1995 Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 269:543-546.
- 3) MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. 1995 Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:9034-9037.
- 4) Rentsch J, Chiesi M. 1996 Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes. *FEBS Lett*. 379:55-59.
- 5) Wabitsch M, Jensen PB, Blum WF, et al. 1996 Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes*. 45:1435-1438.
- 6) Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, et al. 1995 The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature*. 377:530-532.
- 7) Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. 1995 Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. 269:546-549.
- 8) Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, et al. 1995 Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*. 269:540-543.
- 9) Levin N, Nelson C, Gurney A, Vandlen R, de-Sauvage F. 1996 Decreased food intake does not completely account for adiposity reduction after ob protein infusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:1726-1730.
- 10) Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, et al. 1995 Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 83:1263-1271.
- 11) Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, et al. 1996 Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*. 84:491-495.
- 12) Lee GH, Proenca R, Montez JM, et al. 1996 Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*. 379:632-635.
- 13) Lynn RB, Cao GY, Considine RV, Hyde TM, Caro JF. 1996 Autoradiographic localization of leptin binding in the choroid plexus of ob/ob and db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 219:884-889.
- 14) Considine RV, Considine EL, Williams CJ, Hyde TM, Caro JF. 1996 The hypothalamic leptin receptor in humans: identification of incidental sequence polymorphisms and absence of the db/db mouse and fa/fa rat mutations. *Diabetes*. 45:992-994.
- 15) Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, et al. 1996 Evidence of free and bound leptin in human circulation. *J Clin Invest*. 98:1277-1282.
- 16) Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, et al. 1996 Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*. 382:250-252.
- 17) Chehab FF, Lim ME, Lu R. 1996 Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet*. 12:318-320.

- 18) Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, et al. 1996 Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes*. 45:531-535.
- 19) Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. 1996 Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest*. 98:1101-1106.
- 20) Campfield LA, Smith FJ, Burn P. 1996 The OB protein (leptin) pathway - a link between adipose tissue mass and central neural networks. *Horm Metab Res*. 28:619-632.
- 21) Rohner-Jeanrenaud F, Cusin I, Sainsbury A, Zakrzewska KE, Jeanrenaud B. 1996 The loop system between neuropeptide Y and leptin in normal and obese rodents. *Horm Metab Res*. 28:642-648.
- 22) Chan YY, Steiner RA, Clifton DK. 1996 Regulation of hypothalamic neuropeptide-Y neurons by growth hormone in the rat. *Endocrinol*. 137:1319-1325.
- 23) Pierroz DD, Catzeflis C, Aebi AC, Rivier JE, Aubert ML. 1996 Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle inhibits both the pituitary-testicular axis and growth hormone and insulin-like growth factor I secretion in intact adult male rats. *Endocrinol*. 137:3-12.
- 24) Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS. 1995 Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med*. 1:1311-1314.
- 25) Maffei M, Halaas J, Ravussin E, et al. 1995 Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*. 1:1155-1161.
- 26) Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, et al. 1996 Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 334:292-295.
- 27) Kolaczynski JW, Considine RV, Ohannesian J, et al. 1996 Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: A link with ketogenesis but not ketones themselves. *Diabetes*. 45:1511-1515.
- 28) Harris RB, Ramsay TG, Smith SR, Bruch RC. 1996 Early and late stimulation of ob mRNA expression in meal-fed and overfed rats. *J Clin Invest*. 97:2020-2026.
- 29) Kolaczynski JW, Ohannesian J, Considine RV, Marco C, Caro JF. 1996 Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 91:4162-4165.
- 30) Saladin R, De-Vos P, Guerre-Millo M, et al. 1995 Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature*. 377:527-529.
- 31) Cusin I, Sainsbury A, Doyle P, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. 1995 The ob gene and insulin. A relationship leading to clues to the understanding of obesity. *Diabetes*. 44:1467-1470.
- 32) Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV, et al. 1996 Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: studies in vivo and in vitro. *Diabetes*. 45:699-701.
- 33) Malström R, Taskinen M-R, Karonen S-L, Yki-Järvinen H. 1996 Insulin increases plasma leptin concentrations in normal subjects and patients with NIDDM. *Diabetologia*. 39:993-996.

- 34) De-Vos P, Saladin R, Auwerx J, Staels B. 1995 Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. J Biol Chem. 270:15958-15961.
- 35) Slieker LJ, Sloop KW, Surface PL, et al. 1996 Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. J Biol Chem. 271:5301-5304.
- 36) Miell JP, Englaro P, Blum WF. 1996 Dexamethasone induces an acute and sustained rise in circulating leptin levels in normal human subjects. Horm Metab Res. 28:704-707.
- 37) Blum WF, et al. 1997 Plasma Leptin Levels in Healthy Children and Adolescents: Dependence on Body Mass Index, Body Fat Mass, Gender, Pubertal Stage and Testosterone. J Clin Endocrinol Metab. 82:2904-2910.
- 38) Blum WF, 1997 Leptin: The Voice of the Adipose Tissue. Horm Res. 48:2-8.
- 39) Robinson CJ, Gaines-Das R, Woollacott D, et al. 2001 The first international standard for human leptin and the first international standard for mouse leptin: comparison of candidate preparations by in vitro bioassays and immunoassays. J Molecular Endocrinol. 27: 69-76.
- 40) Address NIBSC: National Institute for Biological Standards and Controls, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Great Britain.
- 41) 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

KURZANLEITUNG – m/r Leptin ELISA E06

Reagenzpräparation:	Rekonstitution:	Verdünnung:
Standards A-G	in 1 ml Verdünnungspuffer VP	
Antikörperkonjugat AK		1:100 mit Verdünnungspuffer VP
Enzymkonjugat EK		1:100 mit Verdünnungspuffer VP
Kontrollserum KS	in 200 µl Verdünnungspuffer VP	z.B. 1:5 mit Verdünnungspuffer VP
Waschpuffer WP		1:20 mit Aqua. dest. (z.B. den gesamten Flascheninhalt von (50 ml) im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen)
Probenverdünnung: z.B. 1:5 (50 µl Serum mit 200 µl Verdünnungspuffer VP) oder 1:10, 1:20 etc.		
Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.		

Testdurchführung in Doppelbestimmungen

Pipettieren	Reagenzien	Position
100 µl	Verdünnungspuffer VP	A1/2
100 µl	Standard A (25 pg/ml)	B1/2
100 µl	Standard B (50 pg/ml)	C1/2
100 µl	Standard C (100 pg/ml)	D1/2
100 µl	Standard D (200 pg/ml)	E1/2
100 µl	Standard E (400 pg/ml)	F1/2
100 µl	Standard F (800 pg/ml)	G1/2
100 µl	Standard G (1600 pg/ml)	H1/2
100 µl	Kontrollserum KS	A3/4
100 µl	Probenverdünnung	nachfolgende Vertiefungen
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.		
Inkubation: 1 h bei RT, 350 rpm		
3x 300 µl	Absaugen und die Platte 3x mit je 300 µl Waschpuffer WP / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µl	1:100 verdünnte Antikörperkonjugat AK	In jede Vertiefung
Inkubation: 1 h bei RT, 350 rpm		
3x 300 µl	Absaugen und die Platte mit 300 µl Waschpuffer WP / Vertiefung dreimal waschen.	In jede Vertiefung
100 µl	1:100 verdünnte Enzymkonjugat EK	In jede Vertiefung
Inkubation: 30 min bei RT, 350 rpm		
3x 300 µl	Absaugen und die Platte mit 300 µl Waschpuffer WP / Vertiefung dreimal 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 15 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥590 nm).		