43. 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.
44. Adresse NIBSC: Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Great Britain.
45. Blum WF, Juul A; Reference ranges of serum leptin,s.318-326. In:Leptin -the voice of adipose tissue, Blum WF et al, eds., Johann Ambrosius Verlag, Heidelberg, 1997.

KURZANLEITUNG – hLEPTIN-SENSITIV ELISA E077

Rekonstitution/ Verdünnung von Reagenzien		
Standards A-E	Rekonstitution in **Verdünnungspuffer VP** (anschließend lagern bei –20°C)	**1 ml**
Kontrollserum KS1&KS2	Rekonstitution in **Verdünnungspuffer VP** (anschließend lagern bei –20°C)	**250 µl**
Waschpuffer WP	verdünnen in **A. dest.** (z.B. die gesamte Menge von 50 ml im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen)	**1:20**
Probenverdünnung: je nach Probe verschieden, Serumproben i.a. z.B. 1:10, davon 100 µl pro Bestimmung einsetzen		
Vor der Testdurchführung alle **Reagenzien** auf **Raumtemperatur** bringen.		

Vorschlag zur Testdurchführung in Doppelbestimmung:

Pipettieren	Reagenzien	Position
100 µl	Verdünnungspuffer **VP** als Leerwert	A1 und A2
100 µl	Standard **A** (**0.05 ng/ml**)	B1 und B2
100 µl	Standard **B** (**0.5 ng/ml**)	C1 und C2
100 µl	Standard **C** (**1.5 ng/ml**)	D1 und D2
100 µl	Standard **D** (**3.5 ng/ml**)	E1 und E2
100 µl	Standard **E** (**5 ng/ml**)	F1 und F2
100 µl	Kontrollserum **KS1**	G1 und G2
100 µl	Kontrollserum **KS2**	H1 und H2
100 µl	Probe	in die restlichen Vertiefungen nach Bedarf pipettieren
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.		

Inkubation: 1 h bei RT (20-25°C), 350 rpm

3x 300 µl	Absaugen und die Platte **3x** mit je **300 µl** Waschpuffer **WP** / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µl	Antikörper-POD-Konjugat **AK**	In jede Vertiefung

Inkubation: 30 min bei RT (20-25°C), 350 rpm

3x 300 µl	Absaugen und die Platte **3x** mit je **300 µl** Waschpuffer **WP** / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µl	Substratlösung **S**	In jede Vertiefung

Inkubation: 15 min im Dunklen bei RT (20-25°C)

100 µl	Stopplösung **SL**	In jede Vertiefung
Ausmessung innerhalb von 30 min bei **450 nm** (Referenzfilter ≥ 590 nm).		

SUMMARY –hLEPTIN-SENSITIVE ELISA E077

Reconstitution/ Dilution of reagents		
Standards A-E	reconstitute in **Dlution Buffer VP** (after using, store at –20°C)	**1 ml**
Control Serum KS1&KS2	reconstitute in **Dilution Buffer VP** (after using, store at –20°C)	**250 µl**
Washing Buffer WP	dilute in **A. dest.** (e.g. add the complete contents of the flask (50 ml) into a graduated flask and fill with A.dest. to 1000 ml).	**1:20**
Sample dilution varies regarding the sample type, serum samples generally e.g. 1:10, use 100 µl per determination.		
Before assay procedure bring all **reagents** to the **room temperature**.		

Proposal of Assay Procedure for double determinations

Pipette	Reagents	Well positions
100 µl	Dilution Buffer **VP** as blank	A1 and A2
100 µl	Standard **A** (**0.05 ng/ml**)	B1 and B2
100 µl	Standard **B** (**0.5 ng/ml**)	C1 and C2
100 µl	Standard **C** (**1.5 ng/ml**)	D1 and D2
100 µl	Standard **D** (**3.5 ng/ml**)	E1 and E2
100 µl	Standard **E** (**5 ng/ml**)	F1 and F2
100 µl	Control Serum **KS1**	G1 and G2
100 µl	Control Serum **KS2**	H1 and H2
100 µl	Sample	Pipette sample in the rest of the wells according to requirements
Cover the wells with the sealing tape		

Incubation: 1 h at RT **(20-25°C)**, 350 rpm

3x 300 µl	Aspirate the contents of the wells and **wash** 3x with **300 µl** Wash Buffer **WP/well**	each well
100 µl	Antibody-HRP-Conjugate **AK**	each well

Incubation: 30 min at RT **(20-25°C)**, 350 rpm

3x 300 µl	Aspirate the contents of the wells and **wash** 3x with **300 µl** Wash Buffer **WP**	each well
100 µl	Substrate Solution **S**	each well

Incubation: 15 min in the **dark** at RT **(20-25°C)**

100 µl	Stop Solution **SL**	each well
Measure the absorbance within 30 min at **450 nm** (≥ 590 nm reference)		

STD **A-E**	**A -E**	**Rec in** 1ml **BUF** **VP**	
Control	**KS1 & KS2**	**Rec in** 250 µl **BUF** **VP**	**1:10** **DILU** **BUF** **VP**
WASHBUF **20x**	**WP**		**1:20** **DILU** **A. dest.**

SPE	**1:10** **DILU** **BUF** **VP**
°C **20-25 °C**	

100 µl	**BUF** **VP**	A1/2
100 µl	**STD** **A** **(0.05 ng/ml)**	B1/2
100 µl	**STD** **B** **(0.5 ng/ml)**	C1/2
100 µl	**STD** **C** **(1.5 ng/ml)**	D1/2
100 µl	**STD** **D** **(3.5 ng/ml)**	E1/2
100 µl	**STD** **E** **(5 ng/ml)**	F1/2
100 µl	**CONTROL** **KS1** **1:10** **DILU** **BUF** **VP**	G1/2
100 µl	**CONTROL** **KS2** **1:10** **DILU** **BUF** **VP**	H1/2
100 µl	**SPE** **1:10** **DILU** **BUF** **VP**	
	TAPE	

1 h **°C** **20-25** ↔ **350 rpm**

3x 300 µl	**3x** **WASHBUF** **WP**
100 µl	**AbCONJ** **AK**
	TAPE

0.5 h **°C** **20-25** ↔ **350 rpm**

3x 300 µl	**3x** **WASHBUF** **WP**
100 µl	**SUBST** **TMB** **S**

15 min **°C** **20-25**

100 µl	**H_2SO_4** **SL**
	MEASURE