

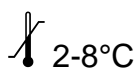
Rat Adiponectin

ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von
Ratten-Adiponektin
Deutsch

Enzyme Immunoassay for the Quantitative Determination of
Rat Adiponectin
English


für Forschungsanwendungen / for research use only
Not for use in diagnostic procedures.
zum Gebrauch durch Fachpersonal! / for professional use!



h **E091-R**


















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>

EN/ DE/ FR/ IT/ ES/ PT/ NL/ DK/ SE/ PL/ HU/ SK/ CZ/ BG/ EE/ GR/ RO/ SL/ FI

Symbols/ Symbole /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ Symbolen/ Symboler/ Symboler/ Symbole/ Szimbólumok/ Symboly/ Symboly/ Символи/ Sümbolid/ Σύμβολα/ Simboluri/ Simboli/ Symbolit

DIN EN ISO 15223-1

	Expiry date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Data di scadenza/ Fecha de caducidad/ Data de validade/ Uiterste gebruiksdatum/ Udløbsdato/ Bäst före-datum/ Termin ważności/ Lejárati idő/ Čas expirácie/ Doba expirace/ Срок на годност/ Aegumiskuupäev/ Ημερομηνία λήξης/ Data de expirare/ Rok uporabe/ Viimeinen käyttöpäivä
	Consider instructions for use/ Bitte Gebrauchsanweisung beachten/ Consultez la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las instrucciones de uso/ Respeitar as instruções de utilização/ A.u.b de gebruiksaanwijzing volgen/ Se brugsanvisningen/ Läs anvisningarna före användning/ Proszę przeczytać instrukcję obsługi/ Vegye figyelembe a használati utasításban foglaltakat/ Postupujte podľa pokynov na použitie/ Dodržujte návod k použití/ Моля, спазвайте инструкцията за употреба/ Palun järgige kasutusjuhendit/ Λάβετε υπόψη σας τις οδηγίες χρήσης/ Vá rugám szá respectați instrucțiunile de utilizare/ Upoštevajte navodila za uporabo!/ Lue käyttöohje huolellisesti!
	Lot-Batch Number/ Charge-Chargennummer/ Lot-Code du lot/ Lotto-Numero di lotto/ Lote-Código de lote/ Lote-Código do Lote/Lot-Partijnummer/ Lot-Batchkode/ 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/ Vyrobené/ Vyrobeno v/ Производител/ Тootja/ Κατασκευάζεται από/ Produs de/ Proizvajalec/ Valmistaja
	Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/ Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referência/ Referentienummer/ Referencenummer/ Bestellningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/ Katalógovné 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/ Armazenaar entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevares mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí/ Температурно ограничение/ Säilätada temperatuuridel/ Φύλαξη σε θερμοκρασία/ Depozitare între/ Skladiščenje 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 dostatočuje 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 slunečnímu světlu/ Да се предпазва от слънчева светлина/ Kaitsta otsese päikesekiirguse eest/ Κρατήστε το μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία/ Țineți 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
	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/ Csövecskék keverése örvénykeverővel/ Premiešat' pomocou prístroja Vortex/ Promícháť pomocí přístroje Vortex/ Разбъркване на епруветките с миксер Vortex/ Segada torukesi Vortexi mikseriga/ Αναμίξτε τους σωληνίσκους με αναδευτήρα Vortex/ Amestecați eprubetele cu ajutorul unui agitator vortex/ Mešanje cevčic z mešalnikom Vortex/ Sekoita putket Vortex sekoittajalla
	Mikrotiterplate/ Mikrotiterplatte/ plaque de microtitrage/ Piastra di microtitolazione/ Placa de microtitulación/ Placa de Microtitulação/ Mikrotiterplaat/ Mikrotiterplade/ mikrotiterplatta/ mikrotiterplaat/ Płytká microtiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiterplaat/ Τρυβλίο μικροτιτλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitrská plošča/ Mikrotitruslevy
	Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituier en/ Reconstituier em/ Reconstituieren in/ Rekonstituér i/ Rekonstituera/ Rekonstytuować w/ Helyreállítás/ Znovu připravit' za/ Znovu připravit za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti/ Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ Rekonstituoi
	Sample/ Probe/ Echantillon/ Campione/ Muestra/ Amostra/ Monster/ Prøve/ prov/ Próbka/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probă/ Vzorec/ Näyte
	Antibody and Enzyme Conjugate/ Antikörper und Enzym Konjugat/ Anticorps conjugué et conjugué enzymatique/ Coniugato di anticorpo ed enzima/ Conjugado de anticuerpos y enzimas/ Conjugado Anticorpo-Enzima/ Antilichaam- en enzymconjugaat/ Antistoffer og enzym-konjugat/ Antikropps- och enzymkonjugat (antikropp och enzym, konjugat)/

	Koniugat antyciał i enzymów/ Antitest és enzim páros/ Prtilátkový a enzymatický konjugát/ Prtilátkový a enzymatický konjugát/ Антитяло и ензим конюгат/ Antikehad ja ensüümi konjugaat/ Σύμπλοκο αντισώματος-ενζύμου/ Compuși din anticorpi și enzime/ Antitelesa in konjugat encima/ Vasta-aine ja entsymi konjugaatti
BUF	Buffer/ Puffer/ Tampon/ Tampone/ Tampón/ Tampão/ Buffer/ Buffer/ Buffert/ Bufor/ Puffer/ Pufer/ Pufr/ Буфер/ Puhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα/ Tampon/ Pufer/ Puskuri
DILU BUF X	Dilute in Buffer X/ Verdünnen in Puffer X/ Diluer dans le tampon X/ Diluire nel tampone X/ Diluir en tampón X/ Diluir no Tampão X/ Verdunnen in buffer X/ Fortyndes i buffer X/ Späd i buffert X/ Rozcieńczenie w buforze X/ Hígítás X pufferben/ Riedit' v pufrí X/ Ředit v pufru X/ Разреджәне 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/ Contôle 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 сeрyм X/ Kontrollseerum X/ Ορός ελέγχου X/ Ser de control X/ Kontrolni serum X/ Kontrolli seerumi X
WASHBUF 20x	Washing Buffer Concentrate/ Waschpufferkonzentrat/ Tampon de lavage conc./ Tampone di lavaggio concentrato/ Tampón de lavado concentrado/ Tampão de Lavagem Concentrado/ wasbuffer, geconcentreerd/ Vaskebufferkonzentrat/ Vaskebufferkonzentrat/ tvättbuffertkoncentrat/ Bufor plukania koncentrat/ Mosópuffer koncentrátum/ Koncentrát vymývacieho pufru/ Концентрат на промивен буфер/ Pesupuhvri kontsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spälare/ Koncentrat izpiralnega pufru/ Pesuliuositiiviste
WASHBUF	Washing Buffer/ Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón de lavado/ Tampão de Lavagem/ wasbuffer/ Vaskebuffer/ tvättbuffert/ Bufor plukania/ Mosópuffer/ Vymývací pufer/ Vymýváci pufr/ Промивен буфер/ Pesupuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spälare/ Izpiralni pufer/ Pesuliuos
SUBST TMB	Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ substraat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Szubsztrátum/ Substrát/ Substrát/ Субстрат Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraattiliuos
H₂SO₄	Stopping Solution/ Stopplösung/ Stop Solution/ Soluzione di stop/ Stop Solución/ Solução Stop/ stopoplossing/ Stopopløsning/ Stopplösning/ Stop roztwór/ Megállító oldat/ Roztok na ukončenie/ Roztok pro ukončení/ Стопираци 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/ Tányer leragasztása/ Oblepiti podložku lepiacou páskou/ Olepiti podložku lepící páskou/ Плака с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerkerleplindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Αορείτι placă cu o bandă adezivă/ Prelepiti ploščo/ Peitä 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 léspace de 30 min à 450 nm avec ≥590 nm longueur d'onde pour référence/ Misurazione entro 30 min. a 450 nm (filtro di riferimento ≥ 590 nm)/ Medición de la placa dentro de los siguientes 30 min a 450 nm (filtro de referencia ≥ 590nm)/ Medir a placa dentro de 30 min a 450 nm (Filtro de referência ≥ 590 nm)/ Binnen 30 minuten bij 450 nm meten (referentiefilter ≥ 590 nm)/ Mål plade i løbet af 30 min ved nm (referencefilter ≥590 nm)/ Mät inom 30 min vid 450 nm (referensfilter ≥ 590 nm)/ Pomiar w ciągu 30 min przy 450 nm (filtr odniesienia ≥ 590 nm)/ Ki mérés 30 percen belül 450 nm-nél (referenciaszűrő ≥ 590 nm)/ Merať 30 minút pri 450 nm (Referenčný filterov ≥590 nm)/ Měřit 30 minut při 450 nm (Referenční filtr ≥ 590 nm)/ Отчитане в рамките на 30 min при 450 nm (референтен филтър ≥ 590 nm)/ Mõõtmise 30 min jooksul 450 nm korral (võrdlusfilter ≥ 590 nm)/ Μέτρηση εντός 30 min στα 450 nm (φίλτρο αναφοράς ≥ 590 nm)/ Măsurare în decurs de 30 min la 450 nm (filtru de referință ≥ 590 nm)/ Izmerite ploščico v 30 min pri 450 nm (referenčni filter ≥590nm)/ Mittaa 30 minuutin aikana 450 nm:ssä (referenssi suodatin ≥ 590 nm)
Literatur	Literature/ Literatur/ Bibliographie/ Letterario/ Bibliografía/ Literatura documentação/ literatuur/ Litteratur/ litteratur/ Literatura/ Irodalom/ Literatura/ 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/ internazionale testbeskrivning/ international testbeskrivning/ Opis testu międzynarodowego/ nemzetközi teszt-útmutató/ Mezinárodní 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

Nicht für humane oder tierische, therapeutische oder diagnostische Zwecke.
Vor Gebrauch ist die gesamte Packungsbeilage zu lesen!

Not for human or animal therapeutic or diagnostic use.
Read entire protocol before use!

DEUTSCH Gebrauchsanweisung

1	ZWECKBESTIMMUNG	5
2	EINFÜHRUNG	5
3	TESTPRINZIP	6
4	WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	7
5	PROBEN	8
6	MATERIALIEN	9
7	TECHNISCHE HINWEISE	10
8	TESTDURCHFÜHRUNG	11
9	AUSWERTUNG	12
10	ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG	14
ENGLISH	Instructions for use	16
11	LITERATUR / LITERATURE	26
12	INTERNATIONALE ASSAY DESCRIPTION	27
13	THE ASSAY PROCEDURE E091-R	28

DEUTSCH Gebrauchsanweisung

Ratten-Adiponektin ELISA, E091-R	96 Bestimmungen
Regulatorischer Status	Für Forschungsanwendungen
Testprinzip	Enzymimmunoassay
Dauer (Inkubationszeit)	2,5 h
Antikörper	hochaffine monoklonale Antikörper
Verdünnungspuffer	gebrauchsfertig
Waschpuffer	20fach Konzentrat
Standards	6 Einzelstandards: 0,25 -10 ng/ml , lyophilisiert, native Rat Adiponectin
Assay Range	0,081 – 15 000 ng/mL
Kontrollen	2 Serumkontrollen, niedrige bzw. hohe Konzentration, lyophilisiert
Proben	Serum / Plasma
Erforderliches Probenvolumen	10 µL empfohlen, mindestens 5 µL
Probenverdünnung	1:1500
analytische Sensitivität	Ø 0,081 ng/mL
Intra- / Interassay Varianz	Ø < 10 %
Linearität	1:600 – 1:16000
Kalibration	Die Kalibration des Assays erfolgte mittels rekombinantem Ratten Adiponektin.

1 ZWECKBESTIMMUNG

Messung von Adiponektin in Rattenserum und –plasma für Forschungszwecke.

2 EINFÜHRUNG

Adiponektin wurde in den 90iger Jahren des letzten Jahrhunderts erstmalig als von Fettzellen produziertes Hormon beschrieben. Adiponektin ist in die Regulation des Energie- und Fettstoffwechsels involviert. So soll die Konzentration dieses Hormons in der Zirkulation das Risiko an Atherosklerose zu erkranken sowie den Grad der Insulin-Resistenz reflektieren. Aufgrund der besonderen Bedeutung dieser Erkrankungen in den industrialisierten Staaten wird der Wirkungsmechanismus dieses Adipokins sowie seine Bedeutung als Biomarker intensiv beforscht. Neben unterschiedlichen Zellkulturmodellen sowie Studien am Menschen stellen Maus und Ratte geeignete Modellorganismen für präklinische Studien dar.

Aus diesem Grund wurde der vorliegende Testkit entwickelt und technisch validiert, er soll als Werkzeug für die Messung von Adiponektin im Rattenmodell im Rahmen der Grundlagenforschung und präklinischer Studien dienen.

Im Folgenden wird, auch wenn ein Vergleich von Mensch und Ratte nur begrenzt möglich ist, für Sie als Hintergrundinformation die Adiponektin-Physiologie beim Menschen cursorisch dargestellt:

Adiponektin ist ein 30 kDa Protein dessen Anteil an Serumproteinen 0,01 % umfasst. Die Synthese des Proteins erfolgt hauptsächlich durch Adipocyten, aber auch Muskelzellen und Leberzellen sind in der Lage Adiponektin zu synthetisieren. Als einziger natürlicher Induktor der Synthese ist bisher IGF-I bekannt. Es besteht aus einer Kollagen-ähnlichen N-terminalen und einer globulären C-terminalen Domäne [1]. In vivo tritt Adiponektin in unterschiedlichen Oligomeren auf. Neben dem Trimer und dem Ditrimer existieren hochmolekulare Multimere

[1-3]. Zwei verschiedene Rezeptoren sind bisher bekannt, beide Rezeptoren werden ubiquitär exprimiert, die Verteilung in den Geweben differiert jedoch. So wird der Adiponektin Rezeptor 1 (AdipoR1) besonders im Muskel- und AdipoR2 besonders im Lebergewebe synthetisiert [4].

Die Bedeutung für den menschlichen Organismus ist noch nicht aufgeklärt. Erste Studien zeigen, dass Adiponektin negativ mit dem BMI korreliert und somit Bedeutung für den Energiestoffwechsel bspw. über die Regulation der Fettsäureoxidation besitzen könnte. Neben der Korrelation zum BMI besteht ein Zusammenhang zwischen der Adiponektin-Konzentration und der Insulin-Resistenz [5-7] und damit auch eine Verknüpfung zum Typ II Diabetes. Auch stellt Adiponektin eine Verbindung zwischen Glucose- und Fettstoffwechsel dar [8, 9].

Eine besondere Wertigkeit für die hochmolekularen Multimere, wie verschiedentlich beschrieben, konnte in einer vergleichenden Studie von drei kommerziellen Testsystemen nicht nachgewiesen werden [10]. Hier konnte auch eine hervorragende Sensitivität und Spezifität des Mediagnost E09 für den Nachweis von verminderter Glucose-Toleranz und Typ II Diabetes gezeigt werden [10].

Des Weiteren ist Adiponektin an inflammatorischen Prozessen beteiligt [11-15] und damit von Bedeutung für die Entstehung von Arteriosklerose [4, 5, 16] und koronaren Entzündungen [17, 18], so könnte die Bestimmung der Adiponektin Konzentration im Plasma dazu dienen, das Risiko von Koronarerkrankungen abzuschätzen [19, 20]. Daneben beeinflusst Adiponektin weitere physiologische Prozesse wie beispielsweise die Angiogenese [21, 22].

3 TESTPRINZIP

Der Mediagnost ELISA für Ratten-Adiponektin E091-R ist ein sogenannter Sandwich-Assay unter Verwendung zweier spezifischer und hochaffiner Antikörper. Der an die Mikrotiterplatte gekoppelte erste Antikörper bindet das Adiponektin aus der Probe. Im nachfolgenden Schritt bindet am derart immobilisierten Adiponektin der zweite spezifische anti-Adiponektin-Antikörper. Dieser ist biotinyliert und liegt als Mischung mit einem Streptavidin-Peroxidase-Enzymkonjugat vor. In der anschließenden Substratreaktion führt eine spezifische enzymatische Reaktion zu einem Farbumschlag. Die Intensität der daraus resultierenden Färbung ist proportional zum Adiponektin-Gehalt der Proben.

4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

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

Nur für Forschungsanwendungen

Der Mediagnost E091-R Kit ist nur zum In-vitro Gebrauch und nicht zur inneren Anwendung bei Menschen 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. Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.

VORSICHT: Dieser Kit enthält Material humanen und/oder 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.

Rattenserum:

in folgenden Komponenten enthalten: **KS1 und KS2, STD A-F**

Reagenzien

AK, VP, WP, A-F, 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 GIFT INFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

4.1 Erste-Hilfe Maßnahmen:

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

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

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

5 PROBEN

5.1 Probenmaterial

Geeignet sind Rattenserum- und -plasma.

Der Einfluß von Heparin (30 IE/mL), EDTA (6,8 mM) und NaCitrat (0,015 M) auf die Messung wurde bestimmt. PBS wurde mit entsprechenden Mengen der Substanzen sowie rekombinantem Ratten Adiponektin versetzt und die Wiederfindung bestimmt. Es konnten keine signifikanten Auswirkungen auf die Wiederfindung detektiert werden.

5.2 Probenentnahme

Hämolytische Reaktionen sind zu vermeiden. Das Blut koagulieren lassen und das Serum durch Zentrifugation abtrennen.

5.3 Erforderliches Probenvolumen:

10 µL empfohlen, (Mindestvolumen 5 µL)

5.4 Probenstabilität

In geeigneten fest verschließbaren Probengefäßen:

- Lagerung bei Raumtemperatur 20-25°C: max. 2 Tag
- Lagerung bei -20°C: 2 Jahre
- Gefrier-/Auftau-Zyklen: max. 5
- Proben sollten möglichst schnell mindestens bei +4°C gelagert werden. Für die Langzeitlagerung muss die Probe eingefroren und bei -20°C aufbewahrt werden.

Einfrieren und Auftauen der Proben sollte minimiert werden. 5 Frier-/Tauzyklen zeigten keinen Einfluss auf die gemessenen Adiponektin-Konzentrationen in den Proben.

5.5 Probenverdünnung

- Verdünnung: **1:1500** mit Verdünnungspuffer **VP**
- Wir empfehlen eine 2-stufige Verdünnung:
990 µL Verdünnungspuffer **VP** in PE-/PP-Gefäße vorlegen dazu 10 µL Serum- oder Plasma pipettieren (Proben sind 1:100 verdünnt), jeweils sofort mischen. 100 µL dieser Verdünnung in ein weiteres PE/PP-Gefäß mit 1400 µL vorgelegtem Verdünnungspuffer **VP** pipettieren und sofort mischen. Dies ergibt eine finale Verdünnung von 1:1500
- Alternative Probenverdünnung, wenn die **Probengröße limitierend ist**
5 µL werden mit 495 µL Verdünnungspuffer **VP** verdünnt (Verdünnung 1:100). Das Pipettieren von so kleinen Probenmengen erfordert jedoch höchste Genauigkeit.
100 µL dieser Verdünnung in ein weiteres PE/PP-Gefäß mit 1400 µL vorgelegtem Verdünnungspuffer **VP** pipettieren und sofort mischen.
Nach dem Mischen von dieser Lösung mit einer Endverdünnung von (1:1500), **100 µL** pro Bestimmung im Assay einsetzen.
- Gegebenenfalls kann, je nach individuell erwarteten Adiponektin-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, die Platte ist mit einem Antikörper gegen Ratten-Adiponektin beschichtet. Die Vertiefungen sind einzeln abbrechbar.	12x8 Vertiefungen
A-F	Standards (natives Ratten-Adiponektin) Konzentrationen sind auf den Etiketten und auf dem QC-Zertifikat angegeben.	6 x 1 mL
KS1	Kontrollserum 1 , lyophilisiert, (Rattenserum), die Konzentration ist auf dem QC-Zertifikat angegeben.	1 x 250 µL
KS2	Kontrollserum 2 , lyophilisiert, (Rattenserum), die Konzentration ist auf dem QC-Zertifikat angegeben.	1 x 250 µL
AK	Antikörper-POD-Konjugat gebrauchsfertig, Ziege-anti-rAdiponektin-Antikörper biotinyliert + Streptavidin Peroxidase-Konjugat	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 Tetramethylbenzidin.	1 x 12 mL
SL	Stopplösung SL , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure.	1 x 12 mL
-	Abdeckfolie für die Mikrotiterplatte	2 x
-	Packungsbeilage	1 x
-	Qualitätskontrollzertifikat (QC-Zertifikat)	1 x

6.2 Nicht mitgelieferte benötigte Materialien

- Entmineralisiertes Wasser oder destilliertes Wasser (Aqua destillata), 950 mL.
- Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen
- Einmalröhrchen aus Polyethylen PE/ Polypropylen PP Röhrchen zum Verdünnen der Proben
- Vortex-Mixer
- Mikrotiterplattenschüttler (350 Upm)
- 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 bis zum Verfallsdatum gelagert werden.

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 – F** und Kontrollseren **KS1 und KS2**) sollten bei -20°C aufbewahrt werden. Zur weiteren Verwendung schnell aber schonend Auftauen (keine Temperaturerhöhung über Raumtemperatur und kein übermäßiges Vortexen), **Achtung: Die Standards dürfen nur einmal aufgetaut werden** – gegebenenfalls bitte in geeigneten Volumina aliquotiert lagern! Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Der 1:20 gebrauchsfertig verdünnte Waschpuffer **WP** ist 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 – F** 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 (z.B. 1:1500) 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 Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich – Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

Testdurchführung

Die Messungen (Standards **A-F**, 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-F**, Kontrollseren **KS1 und KS2** und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden (z.B. in 15 Minuten). Das Antikörper-POD-Konjugat **AK** 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. Die Gefahr des Umgangs mit potenziell infektiösem Material ist zu berücksichtigen. **Manuelles Waschen wird empfohlen**. 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 fußelndem Zellstoff gründlich entfernt werden. Bei Gebrauch eines speziellen automatischen Mikrotiterplattenwashers ist unbedingt dessen Gebrauchsanweisung zu befolgen. Die Geräteeinstellungen müssen u.a. der Mikrotiterplattegeometrie und den Parametern der Waschspezifikation angepasst werden. Es ist zu beachten, dass die Dispensier- und Absaugkapillaren des Gerätes nicht die Oberfläche der Vertiefungen der Mikrotiterplatte beschädigen. Die verbleibende Restflüssigkeit nach jedem Absaugen muss minimiert werden. Nach Ende des gesamten Waschvorganges sollte die Menge der verbleibenden Restflüssigkeit überprüft und ggfs. verringert werden durch mehrmaliges Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fußelndem Zellstoff.

8 TESTDURCHFÜHRUNG

Vorbereitung der Reagenzien

Reagenzpräparation:		Rekonstitution:	Verdünnung:
A-F	Standards	In 1 mL Verdünnungspuffer VP	-
KS1	Kontrollserum 1	in 250 µL Verdünnungspuffer VP	1:1500 mit Verdünnungspuffer VP
KS2	Kontrollserum 2	in 250 µL Verdünnungspuffer VP	1:1500 mit Verdünnungspuffer VP
WP	Waschpuffer	-	1:20 mit Aqua dest.
Proben mit Verdünnungspuffer VP z.B. 1:1500 verdünnen. Proben nicht unverdünnt einsetzen.			
Testdurchführung in Doppelbestimmung:			
Pipettiere	Reagenzien		Position
100 µl	Verdünnungspuffer VP		A1/A2
100 µL	Standard A (0,25 ng/mL)		B1/B2
100 µL	Standard B (0,75 ng/mL)		C1/C2
100 µL	Standard C (1,5 ng/mL)		D1/D2
100 µL	Standard D (3,0 ng/mL)		E1/E2
100 µL	Standard E (6,5 ng/mL)		F1/F2
100 µL	Standard F (10 ng/mL)		G1/G2
100 µL	Kontrollserum KS 1	(1:1500 verdünnt)	H1/H2
100 µL	Kontrollserum KS 2	(1:1500 verdünnt)	A3/A4
100 µL	Probe	(1:1500 verdünnt)	in die restlichen Vertiefungen nach Bedarf pipettieren
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.			
Proben-Inkubation: 1 h bei 20-25°C, 350 Upm			
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
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.			
Inkubation: 1 h bei 20-25°C, 350 Upm			
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
Substrat S Inkubation: 30 Minuten im Dunklen bei 20-25°C			
100 µL	Stopplösung SL		In jede Vertiefung
Messung der Absorption innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm).			

9 AUSWERTUNG

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

9.1 Erstellung der Standardkurve

Die bereitgestellten Standards enthalten folgende rAdiponectin Konzentrationen:

Standard	A	B	C	D	E	F
ng/mL	0,25	0,75	1,5	3	6,5	10

- 1) Ermittlung des **Mittelwertes** der optischen Dichte des Leerwertes aus den Doppelbestimmungen (Vertiefung A1/A2).
- 2) Von den Mittelwerten der optischen Dichte der Standardkonzentrationen und der Proben wird die mittlere Extinktion des Leerwertes abgezogen.
- 3) Die Standardkonzentrationen (x-Achse) werden gegen die gemessene optische Dichte (y-Achse) aufgetragen.
- 4) Empfehlung: die Berechnung der Standardkurve sollte durch ein statistisches Programm erfolgen, da die Kurve i. Allg. nicht ideal durch eine lineare Regression beschrieben wird. **Ein höhergradiges Polynom, 4-Parameter-Anpassungen oder nicht-lineare Regression** sind zur Auswertung geeignet, in manchen Fällen kann eine Spline oder Punkt-zu-Punkt Anpassung angebracht sein.
- 5) Aus der Standardkurve erhält man derart die Adiponektin-Konzentration der verdünnten Kontrollen KS1 & KS2 bzw. der verdünnten Proben (mit der individuellen Verdünnung, allgemein für Serum- und Plasma empfohlen 1:1500). Die **Multiplikation** des jeweiligen berechneten Adiponektin-Gehaltes **mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor** ergibt dann die Adiponektin-Konzentration der unverdünnten Ausgangslösungen (je nach gewählter Einheit der Konzentration der Standards!).

9.2 Beispiel einer exemplarischen Standardkurve

Die exemplarischen Daten und die Standardkurve in der Abbildung 1 können **nicht** für die Berechnung der Testergebnisse genutzt werden! Für jeden Test muss eine eigene Standardkurve mitgeführt werden.

Tabelle 1 Messdaten einer typischen Standardkurve.

Standard	A	B	C	D	E	F
ng/mL	0,25	0,75	1,5	3	6,5	10
OD _{450-620 nm}	0,047	0,152	0,326	0,585	1,227	1,805

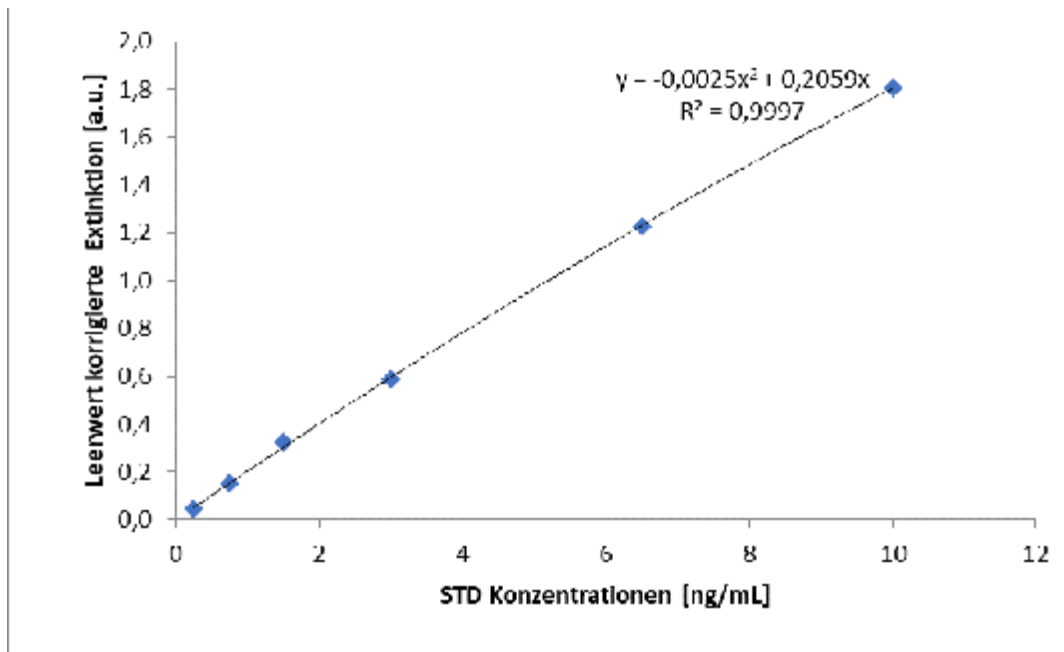


Abbildung 1 Typische Standardkurve einer E091-R Durchführung

9.3 Beispielhafte Berechnung der Adiponektin-Konzentration

Probenverdünnung: 1:1500

Gemessene Extinktion der Probe: 0,6075

Gemessene Extinktion Leerwert: 0,0227

Aus der Differenz der Proben-Extinktion und der Extinktion des Leerwertes **berechnet Ihr Auswertungsprogramm** mit der entsprechenden Kurvenanpassung die Adiponektin-Konzentration der verdünnten Probe.

In diesem Fall ergibt sich eine Adiponektin-Konzentration in der verdünnten Probe von

$$y = -0,0025x^2 + 0,2059x$$

$$R^2 = 0,9997$$

$$x = 2,65$$

und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (**1:1500**) somit eine Adiponektin-Konzentration in der unverdünnten Probe von

$$\begin{aligned} 2,65 \text{ ng/mL} \times 1500 &= 3975 \text{ ng/mL} \\ &= 3,975 \text{ } \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

10 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG

10.1 Standard

Die Standards des ELISA E091-R bestehen aus **nativem Adiponektin** in Konzentrationen von **0,25, 0,75, 1,5, 3, 6,5, bzw. 10 ng/ml**. Das native Adiponektin wurde mit rekombinatem Protein kalibriert (Hersteller: R&D Systems, Wiesbaden)

10.2 Sensitivität

Die analytische Sensitivität des ELISA E091-R beträgt **< 0,081 ng/ml** (entsprechend 0,0081 ng pro Vertiefung; zweifache Standardabweichung des Null-Standards in 16facher Bestimmung).

10.3 Präzision

Intra-Assay-Varianz

Intra-Assay-Varianz Die Inter- und Intra-Assay-Varianzkoeffizienten betragen im Mittel $\leq 10\%$. Beispielhafte Bestimmungen sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 2 Intra-Assay Varianz

	Probe 1	Probe 2
Mittelwert [$\mu\text{g/mL}$]	12,702	5,709
SA	0,197	0,191
VK %	1,55	3,34
n	20	20

Tabelle 3 Inter-Assay Varianz

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7
Mittelwert [$\mu\text{g/mL}$]	1,62	7,06	7,97	7,22	11,23	8,55	7,24
SA	0,03	0,40	0,27	0,28	1,25	0,42	0,35
VK%	2,16	5,70	3,39	3,82	11,16	4,93	4,85
n	6	6	6	6	6	6	6

10.4 Linearität

Tabelle 4 Verdünnungslinearität

(hier: typische Ergebnisse zweier verschiedener Seren)

Verdünnung	Probe 1	Verdünnung	Probe 2
	$\mu\text{g/mL}$		$\mu\text{g/mL}$
1:600	5,2	1:1000	7,703
1:1200	5,091	1:2000	7,455
1:2400	5,286	1:4000	7,657
1:4800	5,117	1:8000	7,598
1:9600	5,008	1:16000	7,066

Table of content

ENGLISH	Instructions for use.....	16
1	INTENDED USE	16
2	INTRODUCTION	16
3	ASSAY PRINCIPLE	17
4	WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	18
5	SAMPLES	19
6	MATERIALS.....	20
7	TECHNICAL NOTES.....	21
8	THE ASSAY PROCEDURE E091-R	22
9	EVALUATION OF RESULTS.....	23
10	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	25
11	LITERATUR / LITERATURE.....	26
12	INTERNATIONALE ASSAY DESCRIPTION	27
13	THE ASSAY PROCEDURE E091-R	28

ENGLISH

Instructions for use

Rat Adiponectin ELISA, E091-R	96 Determinations
Regulatory Status	For Research Use Only. Not for diagnostic purposes.
Principle of the test	Enzyme Immunoassay
Duration (Incubation time)	2,5 h
Antibodies	high-affinity antibodies
Dilution Buffer	Ready for use
Washing Buffer	20fold concentrate
Standard	6 single standards: 0.25 -10 ng/ml , native Rat Adiponectin lyophilized
Assay Range	0.081 – 15 000 ng/mL
Controls	2 serum controls, low and high level, respectively, lyophilized
Samples	Rat Serum or Plasma
Required sample volume	10 µL
Sample dilution	1:1500
analytical Sensitivity	Ø 0.081 ng/mL
Intra- / Inter-Assay Variance	Ø < 10 %
Linearity	1:600 – 1:16000
Calibration	The assay is calibrated against the recombinant Rat Adiponectin.

1 INTENDED USE

Measurement of Adiponectin in Rat serum and plasma samples for research use.

2 INTRODUCTION

Adiponectin was described for the first time in the early 90th of the last century as an endocrine factor produced by adipocytes. Adiponectin is involved in regulation of energy- and fat metabolism. So, its concentration in the circulation is said to reflect the risk of atherosclerosis and the degree of insulin resistance. Based on the high incidence of these diseases, adiponectin was and still is object of intensive research regarding the underlying biological mechanisms and regarding its value as biomarker. Beside different cell culture models and studies with human samples, mice and rats are suitable model organisms for basic research and pre-clinical studies.

Therefore, we developed and validated this test system as a tool for adiponectin measurements in rats usable in research and pre-clinical studies.

Even if the comparability of rats and humans is limited, we offer some background information on human adiponectin physiology in the following section:

Adiponectin is a 30 kDa protein which percentage in serum proteins is 0.01%. It is mainly synthesized by Adipocytes, but also muscle cells and hepatocytes have the ability to synthesize Adiponectin. Until now, IGF-I is the only known natural inductor of the synthesis. It consists of a Collagen-like N-terminal and a globular C-terminal domain [1]. In vivo Adiponectin appears with different oligomers. Beside the trimer and dimer also high molecular multimers exist [1-3]. Up to now two different receptors are known, both receptors are ubiquitarily expressed, though the distribution in the tissues varies. The Adiponectin Receptor 1 (AdipoR1) is especially in muscle- and AdipoR2 in liver tissue synthesized [4].

The significance for the organism is not clear until now. First studies show, that adiponectin correlates negatively with BMI and thus it could have relevance for the energy metabolism for example through the regulation of fatty acid oxidation. Beside the correlation with BMI, Adiponectin level is associated with the Insulin-Resistance [5-7] and so also linked with Type II Diabetes. Adiponectin is associated also with glucose- und lipometabolism [8, 9].

The formerly proposed value of the high molecular weight form of adiponectin was not verified using a commercially available test system for the determination of HMW adiponectin [10]. Blueher et al. clearly demonstrate that regarding the insulin resistance, measured by whole body glucose uptake below 40 $\mu\text{mol}/\text{kg}\cdot\text{min}$, total adiponectin as determined with the Mediagnost E09, is with an area of 0.92 under the receiver-operating curve, of greater value [10].

Furthermore it is involved in inflammatory processes [11-15] and therewith it is of importance for appearance of arteriosclerosis [4, 5, 16] and coronaritis [17, 18], thus the determination of Adiponectin level in plasma could serve to estimate the risk of coronary disease [19, 20]. Beside this Adiponectin influences further physiological processes as for example the angiogenesis [21, 22].

3 ASSAY PRINCIPLE

The Mediagnost ELISA for Adiponectin E091-R is a so-called Sandwich-Assay using two specific and high affinity antibodies. The Adiponectin in the samples binds to the first antibody coated on the microtiter plate. In the following step the second specific anti-Adiponectin-Antibody binds in turn to the immobilised Adiponectin. The second antibody is biotinylated and will be applied in a mixture with a Streptavidin-Peroxidase-Enzyme Conjugate. In the closing substrate reaction, the turn of the colour will be catalysed quantitatively depending on the Adiponectin-level of the samples.

4 WARNINGS AND PRECAUTIONS

For in-vitro use only. For professional use only. For Research Use Only.

The Mediagnost **Rat Adiponectin ELISA** kit is suitable only for in vitro use 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. Safety Data Sheet available on request.

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

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

Appropriate precautions and good laboratory practices must be used in the storage, handling and disposal of the kit reagents. The disposal of the kit components must be made according to the local regulations

Rat Serum contained in the following components: **KS1 and KS2, STD A-F**

Reagents

A -F, AK, VP, WP contain as preservatives **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+	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes.
P338	Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

Stopping Solution (SL)

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

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

4.1 General first aid procedures:

Skin contact: Wash affected area rinse immediately with plenty of water at least 15 minutes. Remove contaminated cloths and shoes.

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

Ingestion: After swallowing the product, if the affected person is conscious, rinse out the mouth with plenty of water: seek medical advice immediately.

5 SAMPLES

5.1 Sample Type

Serum and plasma samples of rats can be used in this assay.

Influence of Heparin (30 IE/mL), EDTA (6.8 mM) and NaCitrat (0.015 M) on the measurement of Adiponectin has been investigated by recovery experiments. PBS was enriched with recombinant Rat Adiponectin and the above-mentioned substances. No significant influence on the recovery of adiponectin was detected.

5.2 Specimen collections

Hemolytic reactions have to be avoided. The blood has to be allowed to clot and after complete clotting, serum is separated by centrifugation.

5.3 Required sample volume

10 µL recommended, minimum volume 5 µL

5.4 Sample stability

In firmly closable sample vials:

- Storage at Room Temperature 20-25°C: max. 2 days
- Storage at -20°C: 2 years
- Freeze/Thaw cycles: max. 5

Freeze-Thaw cycles should be minimized. Up to 5 cycles showed no effect on the measured Adiponectin concentration.

Samples should be stored as fast as possible at least at + 4 ° C. For long-term storage, the sample must be frozen and stored at -20 ° C.

5.5 Sample dilution

Samples **must be diluted** prior to measurement.

- Dilution: **1:1500** with Dilution Buffer **VP**

We recommend a dilution in 2 steps:

Pipette **990 µL** Dilution Buffer **VP** in PE-/PP-Tubes (application of a multi-stepper is recommended in larger series), add **10 µL** Serum- or Plasma (dilution 1:100) and mix each tube immediately. Pipette **100 µL** of this dilution into another PE/PP vessel with **1400 µL** of Dilution Buffer **VP** and mix immediately. This results in a final dilution of 1:1500. After mixing, use 100 µL per assay in the assay of this solution

- If sample size is **limiting**, a **minimum of 5 µL** sample might be used alternatively, dilution in 495 µL Dilution Buffer **VP** yields a dilution of **1:100**, Pipette **100 µL** of this dilution into another PE/PP vessel with **1400 µL** of Dilution Buffer **VP** and mix immediately. After Mixing use 100 µL per assay in the assay of this solution.
- Where required, depending on the expected Adiponectin 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 human anti-Rat Adiponectin antibody. Wells are separately breakable.	12x8 wells
A-F	Standards A-F , lyophilized, (native Rat-Adiponectin) concentrations are given on vial labels and on the QC-certificate.	6 x 1 mL
KS1	Control Serum 1 , lyophilized, (rat serum), concentration is given on the QC-certificate.	1 x 250 µL
KS2	Control Serum 2 , lyophilized, (rat serum), concentration is given on the QC-certificate.	1 x 250 µL
AK	Antibody-POD-Conjugate , ready for use, contains a mixture of biotinylated anti-Adiponectin antibody and HRP (Horseradish Peroxidase)-labelled Streptavidin.	1 x 12 mL
VP	Dilution Buffer , ready for use, Please shake before use!	1 x 125 mL
WP	Washing Buffer , 20-fold concentrated solution	1 x 50 mL
S	Substrate , ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP) substrate, stabilised Tetramethylbencidine.	1 x 12 mL
SL	Stopping Solution , ready for use, 0.2 M sulphuric acid.	1 x 12 mL
-	Sealing Tape , for covering the microtiter plate .	2 x
-	Instructions for use	1 x
--	Quality Control Certificate	1 x

6.2 Materials required, but not provided

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

7 TECHNICAL NOTES

Storage Conditions

Store the kit at 2-8°C after receipt until its expiry date.

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-F** and Control Sera **KS1** and **KS2** must be stored at -20°C (max. 4 weeks).

Attention: Standards should be thawed only once – where required please store aliquoted in adequate volumes. For further use, thaw quickly but gently (avoid temperature increase above room temperature and avoid excessive vortexing). Avoid repeated thawing and freezing.

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 – F** and Controls **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 (1:1500) as the sample.

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

Assay Procedure

When performing the assay, Standards **A-F**, Control Serum **KS1** and **KS2** and the samples should be pipette as fast as possible (e.g. <15 minutes). To avoid distortions due to differences in incubation times Antibody-POD-Conjugate **AK**, 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 (Standards **A-F**, Control Sera **KS1** and **KS2** and samples) should be assayed in duplicate. For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

Incubation

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

Shaking

The incubation steps should be performed at mean rotation frequency of a particularly suitable microtiter plate shaker. We are recommending 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 e.g. high value of blank, potentially leading to false results calculations of the examined samples. Effects like high background values or high variations may indicate washing problems.

All washing must be performed with the provided Washing Buffer **WP** diluted to usage concentration. Washing volume per washing cycle and well must be 300 µL at least.

The danger of handling with potentially infectious material must be taken into account.

Manual washing is recommended. 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.

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.

8 THE ASSAY PROCEDURE E091-R

Preparation of reagents		Reconstitution:	Dilution
A-F	Standards	in 1 mL Dilution Buffer VP	-
KS1	Control Serum 1	in 250 µL Dilution Buffer VP	1:1500 with Dilution Buffer VP
KS2	Control Serum 2	in 250 µL Dilution Buffer VP	1:1500 with Dilution Buffer VP
WP	Washing Buffer	-	1:20 with Aqua dest.
Sample dilution: with Dilution Buffer VP 1:1500. Don't use samples undiluted!			
Before assay procedure bring all reagents to room temperature 20-25°C.			
Assay Procedure in Double Determination:			
Pipette	Reagents	Position	
100 µL	Dilution Buffer VP	A1/A2	
100 µL	Standard A (0.25 ng/mL)	B1/B2	
100 µL	Standard B (0.75 ng/mL)	C1/C2	
100 µL	Standard C (1.5 ng/mL)	D1/D2	
100 µL	Standard D (3.0 ng/mL)	E1/E2	
100 µL	Standard E (6.5 ng/mL)	F1/F2	
100 µL	Standard F (10 ng/mL)	G1/G2	
100 µL	Control Serum KS 1 (1:1500 diluted)	H1/H2	
100 µL	Control Serum KS 2 (1:1500 diluted)	A3/A4	
100 µL	Sample (1:1500 diluted)	in the rest of the wells according the requirements	
Cover the wells with the sealing tape.			
Sample Incubation: 1 hour at 20-25°C, 350 rpm			
3 x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 3 x with 300 µL each Washing Buffer WP/ well.	In each well	
100 µL	Antibody-POD- Conjugate AK	In each well	
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation: 1 hour at 20-25°C, 350 rpm			
3 x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 3 x with 300 µL each Washing Buffer WP/ well.	In each well	
100 µL	Substrate Solution S	In each well	
Incubation: 30 minutes in the Dark at 20-25°C			
100 µL	Stopping Solution SL	In each well	
	Measure the absorbance within 30 min at 450 nm with ≥ 590 nm as reference wavelength.		

9 EVALUATION OF RESULTS

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

Samples which yield higher absorbance values than Standard F should be re-tested at a higher dilution.

9.1 Establishing the Standard Curve

The standards provided contain the following concentrations of rat Adiponectin:

Standard	A	B	C	D	E	F
ng/mL	0.25	0.75	1.5	3	6.5	10

- 1) Calculate the **mean absorbance** value for the blank from the duplicated determination (well A1/A2).
- 2) Subtract the mean absorbance of the blank from the mean absorbances of all other samples and standards.
- 3) Plot the standard concentrations on the x-axis versus the mean value of the absorbance of the standards on the y-axis.
- 4) 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 Rat Adiponectin concentration in ng/mL of the samples and controls can be calculated by **multiplication** with the respective **dilution factor**.

9.2 Example of a Typical Standard Curve

The exemplary data and the standard curve in Figure 1 cannot be used for the calculation of the test results. You have to establish a standard curve for each test you conduct.

Table 1 Data which describe a typical standard curve.

Standard	A	B	C	D	E	F
ng/mL	0.25	0.75	1.5	3	6,5	10
OD _{450-620 nm}	0.047	0.152	0.326	0.585	1.227	1.805

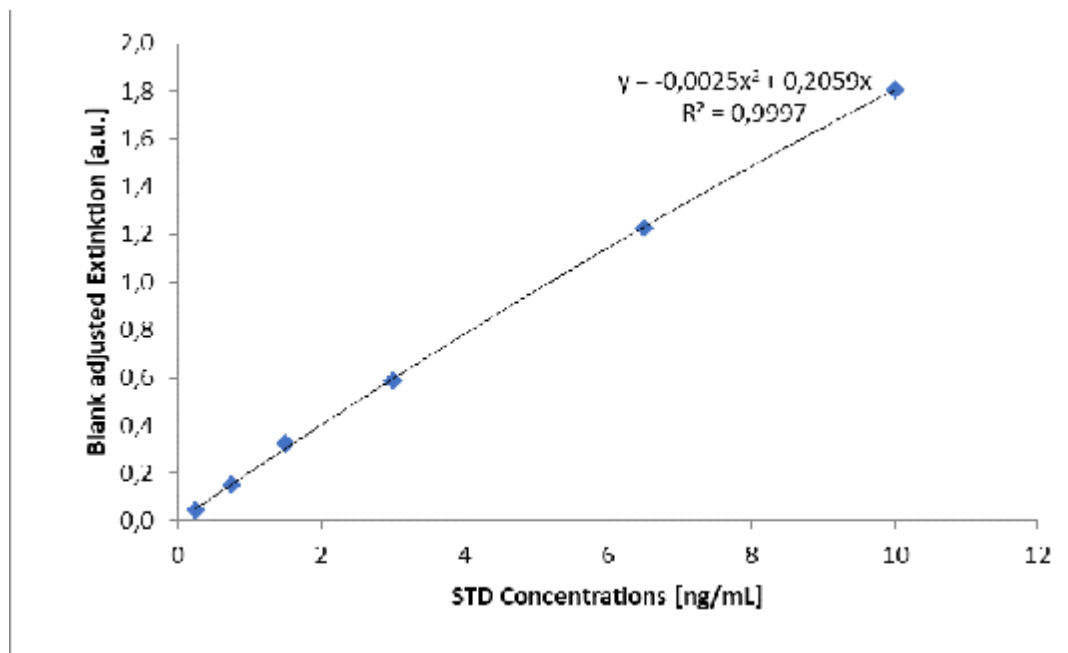


Figure 1 Exemplary Standard Curve

9.3 Exemplary evaluation of sample concentrations

Sample dilution: 1:1500

Measured extinction of your sample: 0.6075
 Measured extinction of the Blank: 0.0227

Your measurement program will calculate the Adiponectin concentration of the diluted sample automatically by using the difference of sample and Blank for the calculation. You only have to determine the most suitable curve fit. In this exemplary case the following equation is solved by the program to calculate the Adiponectin concentration in the sample:

$$y = -0.0025x^2 + 0.2059x$$

$$R^2 = 0.9997$$

$$x = 2.65$$

If the dilution factor (**1500**) is taken into account the Adiponectin concentration of the undiluted sample is:

$$2.65 \text{ ng/mL} \times 1500 = 3975 \text{ ng/mL}$$

$$= 3.975 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

10 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

10.1 Standards

The Standards of the ELISA E091-R are prepared from native Adiponectin in concentrations of 0.25, 0.75, 1.5, 3, 6.5 and 10 ng/ml. The native Adiponectin was calibrated against the recombinant Protein (Manufacturer: R&D Systems, Wiesbaden).

10.2 Sensitivity

The analytical sensitivity of the ELISA E091-R yields in mean $\emptyset < 0.081$ ng/ml (equal to 0.0081 ng per well; as 2xSD of zero standard in 16fold determination).

10.3 Precision

Intra-Assay-Variation

The **Inter-** and **Intra-Assay** variation coefficients were on average $\leq 10\%$. Exemplary determinations are shown in table 2 and table 3.

Table 2 Intra-Assay Variation

	Sample 1	Sample 2
Mean [$\mu\text{g/ml}$]	12.702	5.709
SD	0.197	0.191
CV %	1.55	3.34
n	20	20

Inter-Assay Variation

Table 3 Inter-Assay Variation

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7
Mean [$\mu\text{g/mL}$]	1.62	7.06	7.97	7.22	11.23	8.55	7.24
SD	0.03	0.40	0.27	0.28	1.25	0.42	0.35
CV%	2.16	5.70	3.39	3.82	11.16	4.93	4.85
n	6	6	6	6	6	6	6

10.4 Linearity

Table 4 Linearity of the Sample Dilution
(here: typical results of two different sera)

Dilution	Sample 1	Dilution	Sample 2
	$\mu\text{g/mL}$		$\mu\text{g/mL}$
1:600	5.2	1:1000	7.703
1:1200	5.091	1:2000	7.455
1:2400	5.286	1:4000	7.657
1:4800	5.117	1:8000	7.598
1:9600	5.008	1:16000	7.066

11 LITERATUR / LITERATURE

1. Nakano, Y., et al., *Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma*. J Biochem (Tokyo), 1996. **120**(4): p. 803-12.
2. Pajvani, U.B., et al., *Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9073-85.
3. Tsao, T.S., et al., *Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways*. J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 50810-7.
4. Shimada, K., T. Miyazaki, and H. Daida, *Adiponectin and atherosclerotic disease*. Clin Chim Acta, 2004. **344**(1-2): p. 1-12.
5. Higashiura, K., et al., *Correlations of adiponectin level with insulin resistance and atherosclerosis in Japanese male populations*. Clin Endocrinol (Oxf), 2004. **61**(6): p. 753-9.
6. Spranger, J., et al., *Adiponectin is independently associated with insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome*. Clin Endocrinol (Oxf), 2004. **61**(6): p. 738-46.
7. Zoico, E., et al., *Adipocytokines, fat distribution, and insulin resistance in elderly men and women*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2004. **59**(9): p. M935-9.
8. Ye, J.M., et al., *PPARalpha /gamma ragaglitazar eliminates fatty liver and enhances insulin action in fat-fed rats in the absence of hepatomegaly*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **284**(3): p. E531-40.
9. Yamauchi, T., et al., *Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1288-95.
10. Blüher (Blueher), M., et al., *Total and high-molecular weight adiponectin in relation to metabolic variables at baseline and in response to an exercise treatment program: comparative evaluation of three assays*. Diabetes Care, 2007. **30**(2): p. 280-5.
11. Delaigle, A.M., et al., *Induction of adiponectin in skeletal muscle by inflammatory cytokines: in vivo and in vitro studies*. Endocrinology, 2004. **145**(12): p. 5589-97.
12. Winzer, C., et al., *Plasma adiponectin, insulin sensitivity, and subclinical inflammation in women with prior gestational diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2004. **27**(7): p. 1721-7.
13. Xydakis, A.M., et al., *Adiponectin, inflammation, and the expression of the metabolic syndrome in obese individuals: the impact of rapid weight loss through caloric restriction*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(6): p. 2697-703.
14. Motoshima, H., et al., *Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **315**(2): p. 264-71.
15. Wolf, A.M., et al., *Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **323**(2): p. 630-5.
16. Okamoto, Y., et al., *Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Circulation, 2002. **106**(22): p. 2767-70.
17. Schlegel, A., *Adiponectin and risk of coronary heart disease*. Jama, 2004. **292**(1): p. 40; author reply 40.
18. Choi, K.M., et al., *Inflammation, Insulin Resistance, and Glucose Intolerance in Acute Myocardial Infarction Patients without a Previous Diagnosis of Diabetes Mellitus*. J Clin Endocrinol Metab, 2004.
19. Nakamura, Y., et al., *Implications of plasma concentrations of adiponectin in patients with coronary artery disease*. Heart, 2004. **90**(5): p. 528-33.
20. Pischon, T., et al., *Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men*. Jama, 2004. **291**(14): p. 1730-7.
21. Shibata, R., et al., *Adiponectin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of amp-activated protein kinase signaling*. J Biol Chem, 2004. **279**(27): p. 28670-4.
22. Fernandez-Real, J.M., et al., *Adiponectin is associated with vascular function independent of insulin sensitivity*. Diabetes Care, 2004. **27**(3): p. 739-45.

12 INTERNATIONALE ASSAY DESCRIPTION

A-F	STD	Rec in 1 mL BUF VP	-
KS1	Control	Rec in 250 µL BUF VP	1:1500 DILU BUF VP
KS2	Control	Rec in 250 µL BUF VP	1:1500 DILU BUF VP
WP	WASHBUF 20x	-	1:20 DILU A. dest.
-	SPE		1:1500 DILU BUF VP
-	°C 20-25 °C		
100 µL	BUF VP		A1/A2
100 µL	STD A (0.25 ng/mL)		B1/B2
100 µL	STD B (0.75 ng/mL)		C1/C2
100 µL	STD C (1.5 ng/mL)		D1/D2
100 µL	STD D (3.0 ng/mL)		E1/E2
100 µL	STD E (6.5 ng/mL)		F1/F2
100 µL	STD F (10 ng/mL)		G1/G2
100 µL	CONTROL KS1 1:1500 DILU BUF VP		H1/H2
100 µL	CONTROL KS2 1:1500 DILU BUF VP		A3/A4
100 µL	SPE 1:1500 DILU BUF VP		B3 -> End
TAPE			
⌚ 1 h °C 20-25 ⏪ 350 rpm			
3x 300 µL	3x WASHBUF WP		
100 µL	AbCONJ AK		
TAPE			
⌚ 1 h °C 20-25 ⏪ 350 rpm			
3x 300 µL	3x WASHBUF WP		
100 µL	SUBST TMB S		
⌚ 30 min °C 20-25 ☀			
H₂SO₄ SL			
MEASURE			

13 THE ASSAY PROCEDURE E091-R

Preparation of reagents		Reconstitution:	Dilution
A-F	Standards	in 1 mL Dilution Buffer VP	-
KS1	Control Serum 1	in 250 µL Dilution Buffer VP	1:1500 with Dilution Buffer VP
KS2	Control Serum 2	in 250 µL Dilution Buffer VP	1:1500 with Dilution Buffer VP
WP	Washing Buffer	-	1:20 with Aqua dest.
Sample dilution: with Dilution Buffer VP 1:1500. Don't use samples undiluted!			
Before assay procedure bring all reagents to room temperature 20-25°C .			
Assay Procedure in Double Determination:			
Pipette	Reagents	Position	
100 µL	Dilution Buffer VP	A1/A2	
100 µL	Standard A (0.25 ng/mL)	B1/B2	
100 µL	Standard B (0.75 ng/mL)	C1/C2	
100 µL	Standard C (1.5 ng/mL)	D1/D2	
100 µL	Standard D (3.0 ng/mL)	E1/E2	
100 µL	Standard E (6.5 ng/mL)	F1/F2	
100 µL	Standard F (10 ng/mL)	G1/G2	
100 µL	Control Serum KS 1 (1:1500 diluted)	H1/H2	
100 µL	Control Serum KS 2 (1:1500 diluted)	A3/A4	
100 µL	Sample (1:1500 diluted)	in the rest of the wells according the requirements	
Cover the wells with the sealing tape.			
Sample Incubation: 1 hour at 20-25°C, 350 rpm			
3 x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 3 x with 300 µL each Washing Buffer WP/ well .	In each well	
100 µL	Antibody-POD-Conjugate AK	In each well	
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation: 1 hour at 20-25°C, 350 rpm			
3 x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 3 x with 300 µL each Washing Buffer WP/ well .	In each well	
100 µL	Substrate Solution S	In each well	
Incubation: 30 minutes in the Dark at 20-25°C			
100 µL	Stopping Solution SL	In each well	
	Measure the absorbance within 30 min at 450 nm with ≥ 590 nm as reference wavelength.		