

# Progranulin

# ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von  
**humanem Progranulin**  
Deutsch

Enzymeimmunoassay for quantitative Determination of  
**human Progranulin**  
English

Nur zu Forschungszwecken! /  
For research use only!



REF **E103**



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](mailto:contact@mediagnost.de) • <http://www.mediagnost.de>

Symbols / Symbole

**Symbols/ Symbole /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ Symbolen/ Symboler/ Symboler/ Symbole/ Szimbólumok/ Symboly/ Symboly/ Символи/ Sùmbolid/ 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/ Αεγυμίσκυυρπäv/ 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/ Vå rugåm så respectați instrucțiunile de utilizare/ Upoštevajite 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-Partijnomme/ Lot-Batchkode/ Partisatskod/ Numer serii/ Tétel-sarzs szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/Partii-partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-număr lot/ Številka serije/ erä



Manufactured by/ Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/Fabricado por/ Fabricado por/ Vervaardigd doo/Fabrikation af /Tilberkad av/ Wyprodukowane przez/ Gyártotta / Vyrobené/ Vyrobeno v/ Производител/ Tootja/ Κατασκευάζεται από/ Produs de/ Proizvajalec/ Valmistaja



Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referència/ Referentienummer/ Referencennummer /Beställningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/Katalógové číslo/ Objednací číslo/Каталожен номер/Tellimisnumber/ Αρ. παραγγελίας/Număr comandă/ Številka naročila/ viite tai tilausnumero



Store at between/ Lagerung bei zwischen/ Conserver à entre/ Conservare a tra/ Conservar a temp. Entre/ Armazena entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevares mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí/ Температурно ограничение/ Säilitada temperatuuriel/ Φύλαξη σε θερμοκρασία/ Depozitare între/ Skladičenje med/ Säilytys x-y Celsiusasteen lämpötilassa



Contains sufficient for x tests/ Inhalt ausreichend für x Tests/ Contient suffisant pour x tests/ Contenido suficiente per x test/ Contenido suficiente para x pruebas/ Conteúdo suficiente para x testes/ Bevat voldoende voor x bepalingen/ Ineholder tilstrækkeligt til x prøver/ Innehållet räcker till x analyser/ Zawartość na x testów/ Tartalma a teszt elvégzésére elegendő/ Obsahuje materiál pre x testov / Obsah dostačuje 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' slnečnému svetlu/ Да се предпазва от слънчева светлина/ Kaitsta otsese päikesekiirguse eest/ Κρατήστε το μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία/ Τηνεți 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



Shaking/ Schütteln/ Mélanger/ Agitare/ Agitar/ Agitação/ Schudden/ Ryster/ Skaka/ Wstrząsanie/ Rázás/ Pretrepat/ Protřepat/ Разклащане/ Raputada/ Ανακινήστε/ Vibrare/ Stresite/ Sekoita



Microtiterplate/ Mikrotiterplatte/ plaque de microtitrage/ Piastra di microtitolazione/ Placa de microtitulaci6n/ Placa de Microtitulaç6o/ microtiterplaat/ Mikrotiterplade/ mikrotiterplatta/ microtiterplaat/ Płytká microtiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiterplaat/ Τρυβλίο μικροτιτλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitrska plošča/ Mikrotitraslevy



Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituier en/ Reconstituier em/ reconstituieren in/ Rekonstituér i/ rekonstituera/ Rekonstytuować w/ Helyreállítás/ Znovu pripravit' za/ Znovu připravit za/ Разтваряне в/ Moodustada uesti / Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ rekonstituoi



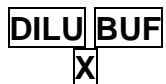
Sample/ Probe /Echantillon/ campione/ Muestra/ Amostra/ monster/ Prøve/ prov/ Próbka/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probă/ Vzorec/ Näyte



Antibody and Enzyme Conjugate/ Antikörper und Enzym Konjugat/ anticorps conjuguée et conjugué enzymatique/ Coniugato di anticorpo ed enzima/ Conjugado de anticuerpos y enzimas/ Conjugado Anticorpo-



Enzima/ antilichaam- en enzymconjugaat/ Antistoffer og enzym-konjugat/ antikropp- och enzymkonjugat (antikropp och enzym, konjugat) Koniugat antyciał i enzymów/ Antitest és enzim páros/ Protílátkový a enzymatický konjugát/ Protílátkový a enzymatický konjugát/ Антицяло и ензим конюгат/ Antikehad ja ensüümi konjugaat/ Σύμπλοκο αντι σώματος-ενζύμου/ Compuși din anticorpi și enzime/ Antitelesa in konjugat encima/ Vasta-aine ja entsymi konjugaatti



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/ spädi i buffert X/ Rozcieńczenie w buforze X/ Hígítás X pufferben/ Riedit' v pufrí X/ Redit v pufru X/ Разреждане в буфер X/ Lahjendada puhvrís X/ Αραιώστε σε ρυθμιστικό διάλυμα X/ Diluați în tamponul X/ Razredčiti v pufru X/ laimennetaan x puskuriin



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/ Kalibraattori X

<b>Control</b>	KS1 KS2	Control Serum / Kontrollserum/ Contôle sérique/ Siero di controllo/ Suero de control/ Soro de Control/ controleserum/ Kontrollserum/ Kontrollserum/ Serum kontrolne/ Ellenőrző szérum/ Kontrollné sérum/ Kontrollni sérum/ Контролен серум/ Kontrollseerum/ Ορός ελέγχου/Ser de control/ Kontrolni serum/ Kontrolli seerumi
<b>WASHBUF</b> <b>20x</b>	WP	Washing Buffer Concentrate/ Waschpufferkonzentrat/ Tampon de lavage conc./ Tampone di lavaggio concentrato/ Tampón de lavado concentrado/ Tampão de Lavagem Concentrado/ wasbuffer, geconcentreerd/ Vaskebufferkonzentrat/ Vaskebufferkonzentrat/ tvättbuffertkoncentrat/ Bufor płukania koncentrat/ Mosópufer koncentrátum/ Koncentrát vymývacieho pufru/ Концентрат на промивен буфер/ Pesupuhvri kontsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralne pufru/ Pesuliuositiiviste
<b>WASHBUF</b>		Washing Buffer / Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón de lavado/Tampão de Lavagem/ wasbuffer/ Vaskebuffer/ tvättbuffert/ Bufor płukania/ Mosópufer/ Vymývací pufer/ Vymývací pufr/ Промивен буфер/ Pesupuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare /Izpiralni pufer/ Pesuliuos
<b>SUBST</b> <b>TMB</b>	S	Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ substraat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Szubsztrátum/ Substrát/ Substrát/ Κυβστρατ Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraattiliuos
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	SL	Stop Solution/ Stopp Lösung/ Stop Solution/ Soluzione di stop/ Stop Solución/ Solução Stop/ stopoplossing/ Stopopløsning/ Stopplösning/ Stop roztwór/ Megállító oldat/ Roztok na ukončenie/ Roztok pro ukončení/ Стопирач разтвор/ Stopp-lahus/ Διάλυμα διακοπής/ Soluție de oprire/ Stop raztopina/ Pysäytysliuos
<b>TAPE</b>		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 płytke/ Tányér leragasztása/ Oblepit podložku lepiacou páskou/ Olepit podložku lepící páskou/ Плака с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerkleepindiga/ Κολληήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperiți placa cu o bandă adezivă/ Prelepiti ploščo/ Peitä mikrotitrauslevy oheisella teipillä
<b>MEASURE</b>		Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590nm)/Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)./ Measure lábsorbance en l'espacce de 30 min à 450 nm avec ≥590nm 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 ≥590nm)/ Binnen 30 minuten bij 450 nm meten (referentiefilter ≥ 590 nm)./ Mål plade i løbet af 30 min ved nm (referencefilter ≥590nm)/ 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/Měřit 30 minut při 450 nm/ Отчитане в рамките на 30 min при 450 nm (референтен филтър ≥ 590 nm)./ Měřitme 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)
<b>Literatur</b>		Literature/ Literatur/ Bibliographie/ Letterario/ Bibliografía/ Literatura documentação/ literatuur/ Litteratur/ litteratur/ Literatura/ Irodalom/ Literatúra/ Literatura/ Литература// Kirjandus/ Βιβλιογραφία/ Bibliografie/ literatura/ Lähdeluettelo
<b>International</b> <b>Test</b> <b>description</b>		International test description/ internationale Testanleitung/ description internationale de test/ Istruzioni per il test internazionali/ Descripción de ensayo internacional/ Descrição internacional do teste/ internationale testbeskrivning/ internationell testbeskrivning/ Opis testu międzynarodowego/ nemzetközi teszt-útmutató/ Medzinárodný návod k testu/ Mezinárodní návod k testu/ rahvusvaheline katse kirjeldus/ Διεθνείς οδηγίες για εργαστηριακές δοκιμές/ instrucțiuni internaționale pentru testare/ mednarodna navodila za preizkus/ Kansainvälinen käyttöohje
<b>End</b>		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

**Nur zum In-vitro-Gebrauch.**

**Nur zum Gebrauch durch Fachpersonal.**

**Nur zu Forschungszwecken.**

**Nicht für humane oder tierische, therapeutische oder diagnostische Zwecke.**

**Vor Gebrauch ist die gesamte Packungsbeilage zu lesen!**

**For in vitro use only!**

**For Research Use Only!**

**For professional use only!**

**CAUTION: Not for human or animal therapeutic or diagnostic use.**

**Read entire protocol before use!**

Symbols/ Symbole /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ Symbolen/ Symboler/ Symboler/  
 Symbole/ Szimbólumok/ Symboly/ Symboly/ Символи/ Sümbolid/ Σύμβολα/ Simboluri/ Simboli/  
 Symbolit 2

ZUGELASSENER VERWENDUNGSZWECK	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
EINFÜHRUNG	5
MATERIALIEN	7
Inhalt der Testpackung	7
Zusätzlich benötigte Materialien	7
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	8
.METHODE	8
GEEIGNETE PROBEN	9
Lagerung der Proben	9
Proben Vorbereitung	9
TECHNISCHE HINWEISE	10
TESTDURCHFÜHRUNG	12
AUSWERTUNG	13
Berechnung der Standardkurve	13
LEISTUNGSMERKMALE	14
ERWARTUNGSWERTE	16
INTENDED USE	17
INTRODUCTION	17
REAGENTS PROVIDED	19
MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	19
WARNINGS AND PRECAUTIONS	20
METHOD	21
SPECIMEN	21
TECHNICAL NOTES	21
ASSAY PROCEDURE	23
ESTABLISHING THE STANDARD CURVE	24
PERFORMANCE CHARACTERISTICS	25
EXPECTATION VALUES	27
LITERATUR / LITERATURE	28
KURZANLEITUNG MEDIAGNOST PROGRANULIN ELISA E103	29
SUMMARY – MEDIAGNOST PROGRANULIN ELISA E103	31
<b>REF</b> E103 International Test Description	32

# PACKUNGSBEILAGE DEUTSCH

## MEDIAGNOST PROGRANULIN ELISA E103

- ist geeignet für Progranulin Bestimmungen in **Serum-** und **Plasmaproben**
- ist durch die hohe **Sensitivität** (18 pg/ml) ebenfalls sehr geeignet für Messungen in Zellkultur-überständen und in Nicht-Serum-/ Plasmaproben (z.B. in Speichel, Urin, Muttermilch, Liquor, Amnionflüssigkeit)
- ist **schnell**: Inkubationszeit insgesamt nur **2 Stunden**
- ist kalibriert mit rekombinantem Progranulin:  
Einzel-Standards mit **75, 250, 750, 1500** bzw. **2500 pg/ml** Progranulin sind im Kit enthalten
- Kontrollserum zur RiliBÄK-konformen **Qualitätssicherung**
- Testplatten enthalten **einzel** **abrechenbare Vertiefungen**, die Teste können genau an den individuellen Bedarf angepasst werden

## ZWECKBESTIMMUNG

Messung von humanem Progranulin in menschlichem Serum und Plasma zu Forschungszwecken.

## EINFÜHRUNG

### Progranulin

Progranulin ist auch unter den Namen Granulin-Epithelin Vorläufer, Proepithelin oder Acrogranin bekannt. Es handelt sich um ein 68.5 kDa großes, 593 Aminosäuren (incl. Signalpeptid) umfassendes Protein, das stark glycosyliert vorliegt und daher in vivo eine Größe von ungefähr 90 kDa aufweist (1). Progranulin besitzt sieben konservierte Domänen, die durch Linker-Sequenzen getrennt werden. Mittels proteolytischer Spaltung, katalysiert durch Serine-Proteasen wie z.B. Elastase, entstehen 6-25 kDa große Fragmente, die als Granuline oder Epitheline bezeichnet werden. Progranulin wird in besonderem Maße in stark proliferierenden Geweben wie Lymphgewebe, Milz, Hautepithel, Magen-Darm-Schleimhaut aber auch hämatopoetischen Zellen oder Tumorzellen exprimiert und sekretiert. Rezeptoren, die die Wirkung von Progranulin oder den Granulinen vermitteln, sind bisher nicht bekannt (2, 3).

Progranulin scheint ein Faktor zu sein, der die Wundheilung positiv beeinflusst. Die Expression wird in Keratinozyten sowie Makrophagen und neutrophilen Zellen im Falle einer Verwundung gesteigert. Dabei beeinflusst Progranulin die Wundheilung indirekt über die Aktivierung von Makrophagen und Stimulation der Gefäßbildung im geschädigten Gewebe (4). Die physiologische Bedeutung von Progranulin und den Granulinen ist gegensätzlich. So kann Progranulin TNF- $\alpha$  vermittelte pro-inflammatorische Prozesse hemmen. Dagegen scheinen die Granuline die Sekretion pro-inflammatorischer Cytokine zu stimulieren. Der Einfluss von Progranulin auf entzündliche Prozesse konnte auch in arteriosklerotischen Plaques nachgewiesen werden. Hier wird Progranulin von glatten Muskelzellen exprimiert und beeinflusst die Migration von Monozyten und glatten Muskelzellen (5).

Im zentralen Nervensystem wird Progranulin von Mikroglia und Neuronen (neokortikale und hippocampale Pyramidenzellen sowie Purkinje-Zellen im Cerebellum) exprimiert. Auf mRNA Ebene konnte eine deutliche Steigerung der Expression bei Infektionen oder Verletzungen des ZNS gezeigt werden, beispielsweise in Mucopolysaccharidose Typ I und IIIB, bei viralen ZNS Entzündungen, im Falle von amyotropher lateraler Sklerose aber auch bei der Alzheimer Erkrankung. Darüber hinaus scheint Progranulin eine Bedeutung bei der Entwicklung geschlechtsspezifischer Unterschiede im Laufe der prä- und postnatalen Entwicklung zu besitzen und auch für die neuronale Plastizität im Erwachsenenalter von Bedeutung zu sein (6).



### **Progranulin und Frontotemporale Demenz (FTD)**

Der Anteil der frontotemporalen Form der Demenz an der Gesamtheit aller Demenzerkrankungen liegt bei 5-10 %. Eine Mutation im Gen für Progranulin (PGRN) konnte bei 5-10 % der an FTD erkrankten Patienten nachgewiesen werden (2). Fast alle pathologischen Mutationen führen zu einem vorzeitigen Transkriptionsabbruch und dem schnellen Abbau der mutierten mRNA. Dies resultiert in einer PGRN Haploinsuffizienz mit deutlich erniedrigten Progranulinkonzentrationen im Serum. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Reihe von Studien durchgeführt, um die Eignung von Progranulin als Marker für die PRGN abhängige frontotemporale Demenz abzuklären (7, 8).

Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass Progranulin schon prä-symptomatisch eine FTD detektieren kann. Aufgrund der fehlenden Standardisierung und die Nutzung unterschiedlicher Antikörper in den kommerziell verfügbaren Testsystemen, ist für jedes Testsystem ein eigener cut-off Wert zu definieren.

### **Progranulin und Adipositas**

Im Falle von Adipositas und Typ 2 Diabetes laufen verstärkt Entzündungsprozesse ab, worauf der Anstieg an pro-inflammatorischen Cytokinen z.B. IL-6 oder der Konzentration des C-reaktiven Proteins hinweist. Youn et al. haben auf dieser Basis verschiedene Patientengruppen miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass bei Typ 2 Diabetikern die Plasmakonzentration von Progranulin im Vergleich zur Glukose-toleranten Gruppe signifikant (1.4fach) erhöht ist. Die Autoren weisen insbesondere auf die positive Korrelation der Progranulinkonzentration mit dem Volumen des viszeralen Fettgewebes hin. Dagegen konnte in dieser Studie kein Unterschied zwischen schlanken und subkutan adipösen Patienten gezeigt werden. Aus diesem Grund könnte eine Erhöhung der Progranulinkonzentration Rückschlüsse auf die Verteilung des Fettgewebes zulassen und damit ein Biomarker für viszerale Fettgewebe darstellen (9).

Der hier verfügbare Test basiert auf monoklonalen Antikörpern, die hochspezifisch nur Progranulin und nicht die einzelnen Granuline detektieren. Damit steht ein Werkzeug zur Verfügung, mit dem die Bedeutung von Progranulin als Biomarker für das viszerale Fettgewebe weiter untersucht und validiert werden kann. Das Testsystem wurde mit rekombinantem Progranulin (NS0-expressed) kalibriert. Test-spezifische Referenzwerte sind nicht verfügbar.

## MATERIALIEN

### Inhalt der Testpackung

1)	MTP	<b>Mikrotiterplatte</b> , gebrauchsfertig, mit <b>96 Vertiefungen</b> , die in 12 abnehmbare Streifen á 8 Vertiefungen ( <b>einzel</b> n abbrechbar) aufgeteilt ist. Die Platte ist mit einem Antikörper gegen humanes Progranulin beschichtet.
2)	STD	<b>Standards A-E</b> , lyophilisiert, enthalten rekombinantes Progranulin. Die Verdünnungen der Standardkurve decken einen Bereich von <b>0,075 bis 2,5 ng/ml (75, 250, 750, 1500 und 2500 pg/ml)</b> Progranulin ab und werden <b>in je 1 ml Verdünnungspuffer VP</b> rekonstituiert.
3)	DILU	<b>Verdünnungspuffer VP, 50 ml</b> , gebrauchsfertig, bitte zur <b>Rekonstitution</b> der <b>Standards</b> und <b>Kontrollseren</b> und zur <b>Verdünnung</b> der <b>Proben</b> und <b>Kontrollseren</b> verwenden.
4)	Control	<b>Kontrollseren KS1 und KS2</b> lyophilisiert, enthalten humanes Serum und müssen in <b>je 250 µl Verdünnungspuffer VP</b> rekonstituiert werden. Die Progranulin Soll-Konzentration und Schwankungsbereiche sind auf den Etiketten angegeben. Sie sollten im Assay in den gleichen Verdünnungen ( <b>in Verdünnungspuffer VP</b> ) wie die jeweiligen Proben bestimmt werden.
5)	Ab	<b>Antikörper-Konjugat AK, 6 ml</b> , gebrauchsfertig, enthält biotinylierten anti-human Progranulin Antikörper. Für den Assay wird jeweils 50 µl pro Vertiefung eingesetzt.
6)	CONJ	<b>Enzymkonjugat EK, 12 ml</b> , gebrauchsfertig, enthält POD (Meerrettich-Peroxidase)-markiertes Streptavidin. Bitte 100 µl pro Vertiefung einsetzen.
6)	WASHBUF 20x	<b>Waschpuffer WP, 50 ml, 20fach konzentrierte</b> , Lösung, bitte <b>vor Gebrauch 1:20 mit A. dest.</b> oder entmineralisiertem Wasser verdünnen (z.B. den gesamten Flascheninhalt von 50 ml im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen). Achtung: endverdünnt ist der Waschpuffer nur 4 Wochen haltbar, bitte nur nach Bedarf ansetzen.
7)	SUBST	<b>Substrat S, 12 ml</b> , gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase-(POD)-Substrat
8)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	<b>Stopplösung SL, 12 ml</b> , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure
9)		<b>Abdeckfolie</b> für Mikrotiterplatten, 2 Stück, selbstklebend

### Zusätzlich benötigte Materialien

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

## WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Mediagnost Kit ist nur zum In-vitro-Gebrauch und nicht zur inneren Anwendung bei Mensch und Tier geeignet. Dieses Produkt darf nur exakt wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben eingesetzt werden. Mediagnost kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht, soweit keine gesetzliche Regelung anderes besagt.

**VORSICHT: Dieser Kit enthält Material 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.

### Menschliches Serum:

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

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

### Reagenzien AK, EK, VP, WP, A-E

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 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
H314	Verursacht schwere Verätzung der Haut und schwere Augenschäden.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
P301+P330+	BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen.
P331	KEIN Erbrechen herbeiführen.
P305+P351+	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen.
P338	Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
P309+P310	BEI Exposition oder Unwohlsein: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

### 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.



## METHODE

Der Enzymimmunoassay für Progranulin E103 ist ein sogenannter Sandwich-Assay. Er verwendet spezifische, hochaffine monoklonale Antikörper. Der an die Mikrotiterplatte gekoppelte Antikörper bindet quantitativ das Progranulin aus der Probe, im nachfolgenden Schritt bindet ein Biotin-gekoppelte Antikörper am Progranulin. Danach kann das Streptavidin-Peroxidase-Enzymkonjugat hochspezifisch am Biotin des Antikörpers binden und in der anschließenden Substratreaktion den Farbumschlag quantitativ, abhängig vom Progranulingehalt der Proben, katalysieren.

## GEEIGNETE PROBEN

Uneingeschränkt geeignet sind Serumproben. Des Weiteren zeigten 3.8 g/l Citrat, 5.4 mmol/l EDTA und 30 IE/ml Heparin keinen Einfluss auf die Progranulinmessung.

## Lagerung der Proben

Lagerung bei RT	max. 3 Tage
Lagerung bei +4°C	max. 3 Tage
Lagerung bei -20°C	max. 2 Jahre

in fest verschließbaren Plastikgefäßen

Die Messwerte einer Serum- und einer Plasmaprobe zeigten bis zu 10 Auftau-/ Einfrierzyklen keine signifikanten Abweichungen, es wurden Werte im Bereich von 95 bis 101% des Sollwertes gefunden

## Proben Vorbereitung

Die Proben müssen in **Verdünnungspuffer VP** verdünnt werden. Für die meisten Untersuchungen (Serum- oder Plasmaproben bei denen keine Extremwerte zu erwarten sind) sollten Serum- oder Plasmaverdünnungen von **1:41** in Verdünnungspuffer VP geeignet sein. Gegebenenfalls kann, je nach erwarteten Progranulinwerten, geringer oder stärker in Verdünnungspuffer VP verdünnt werden. Die gute Linearität des Testsystems (vgl. Tab. 6) ermöglicht eine Probenverdünnung von 1:20-1:320.

Die Progranulinkonzentration in anderen humanen Körperflüssigkeiten und in Kulturüberständen kann stark von den Serumwerten abweichen (s. Tab. 1).

## Verdünnungsprotokoll:

400 µl Verdünnungspuffer VP in PE-/PP-Gefäße vorlegen (bei größeren Serien empfiehlt sich hierfür die Verwendung eines Multi-Steppers), dazu 10 µl Serum oder Plasma pipettieren (Verdünnung 1:41). Nach dem Mischen werden von dieser Lösung 50 µl pro Bestimmung im Assay eingesetzt.

## TECHNISCHE HINWEISE

Reagenzien mit unterschiedlichen Lot-Nummern sollten nicht vermischt werden. Alle Reagenzien sind ungeöffnet, lichtgeschützt und bei 2° - 8°C gelagert mindestens haltbar bis zum Verfallsdatum (s. Etikett).

Bei sachgemäßer Handhabung ist die **Haltbarkeit der Reagenzien nach Öffnung** nicht beeinträchtigt. **Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.** Wenn mehrere unabhängige Messungen über eine längere Periode mit einem Kit geplant sind, wird vorherige Aliquotierung der Komponenten in passende Volumina empfohlen.

Alle Komponenten des Kits müssen **vor Gebrauch auf Raumtemperatur** gebracht werden, die eventuell in manchen Puffern vorhandenen Präzipitate müssen vor Gebrauch durch Mischen und Erwärmen wieder gelöst werden.

### **Inkubation bei Raumtemperatur bedeutet: Inkubation bei 20 - 25°C.**

Die Inkubationen sollen geschüttelt bei mittlerer Umdrehungsfrequenz eines für Mikrotiterplatten geeigneten Schüttlers erfolgen. Wir empfehlen 350 rpm. Bauartbedingt können individuell Abweichungen von diesem Wert möglich sein, dann muss die Umdrehungsfrequenz angepasst werden. Zu geringes Schütteln kann durch ungenügende Vermischung der Lösungen zu verringerten optischen Dichten, hohen Streuungen und/oder falschen Werten führen, zu starkes Schütteln dagegen zu erhöhten optischen Dichten und/oder falschen Werten.

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

Zum Waschen muss der mitgelieferte und auf Gebrauchskonzentration verdünnte Waschpuffer verwendet werden. Das Waschvolumen pro Waschzyklus und Vertiefung muss mindestens 300 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 schwingvolles Ausschwenken der Mikrotiterplatte über einem Becken entfernt werden. Falls Absaugvorrichtungen eingesetzt werden, ist darauf zu achten, dass die Oberflächen der Vertiefungen der Mikrotiterplatte nicht beschädigt werden. Nach jedem einzelnen Waschzyklus sollte die verbleibende Restflüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fuselndem Zellstoff gründlich entfernt werden.

## Standards und Kontrollen

Für die **Rekonstitution** der lyophilisierten **Standards A-E** muss der im Kit erhaltene **Verdünnungspuffer VP** verwendet werden.

Für die **Rekonstitution** der lyophilisierten **Kontrollen KS1 und KS2** muss der **Verdünnungspuffer VP** verwendet werden. Sie sollten im Assay in der gleichen Verdünnung **in Verdünnungspuffer VP** wie die jeweiligen Proben bestimmt werden.

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 muss vermieden werden.

Die rekonstituierten Standards und Kontrollen können bei -20°C für 2 Monate gelagert werden.

## Waschpuffer

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

## Testplatte

Nicht verwendete Streifen der Testplatte sind zusammen mit dem Trockenkissen luftdicht in dem wiederverschließbaren Klippbeutel bei 2° - 8°C zu lagern. Die Haltbarkeit ist bei sachgerechter Lagerung nicht eingeschränkt.

## Substrat

Die Substratlösung S, stabilisiertes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich – Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

## TESTDURCHFÜHRUNG

Bei der Testdurchführung sollten Standards A-E, Kontrollseren KS1&KS2 und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden (z.B. in 15 Minuten). Das Enzymkonjugat EK sowie nachfolgend die Substratlösung S sollten in der gleichen Reihenfolge und in dem gleichen Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Ebenso sollte die Stopplösung SL in der gleichen Reihenfolge und im gleichen Zeitintervall wie die Substratlösung auf die Testplatte gegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

Die Messungen (Standards, Kontrollen und Proben) sollten stets in Doppelbestimmung durchgeführt werden. Um optimale Ergebnisse zu erhalten, ist auf genaues Pipettieren und strikte Befolgung des Testprotokolls zu achten.

- 1) In **alle** Vertiefungen, die benutzt werden, bitte **50 µl Antikörperkonjugat AK** pipettieren.
- 2) In die Positionen A1/2 werden je **50 µl Verdünnungspuffer VP** gegeben, sowie in die Positionen B1/2 werden je **50 µl Standard A (75 pg/ml)**, in die Positionen C1/2 je **50 µl Standard B (250 pg/ml)**, in die Positionen D1/2 je **50 µl Standard C (750 pg/ml)**, in die Positionen E1/2 je **50 µl Standard D (1500 pg/ml)**, in die Positionen F1/2 je **50 µl Standard E (2500 pg/ml)**.  
Zur Kontrolle der korrekten Durchführung des Tests können je **50 µl** der 1:41 in Verdünnungspuffer VP (oder im jeweiligen Verdünnungsverhältnis der Proben) verdünnte **Kontrollen KS1 und KS2** in die Positionen G1/2 bzw. H1/2 gegeben werden.  
In die restlichen Vertiefungen können je **50 µl der verdünnten Proben** (i.Allg. 1:41 in Verdünnungspuffer VP verdünnt) pipettiert werden.
- 3) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **1 Stunde** bei **Raumtemperatur** inkubiert (unter Schütteln 350 rpm).
- 4) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Lösungen abgesaugt und die Platte mit **300 µl Waschpuffer WP** / Vertiefung **fünfmal** gewaschen.
- 5) Nach dem letzten Waschschrift werden **100 µl Enzymkonjugat EK** in jede Vertiefung pipettiert.
- 6) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **30 Minuten** bei **Raumtemperatur** inkubiert (unter Schütteln 350 rpm).
- 7) Nach Abschluss dieser Inkubation wird die Platte wie in Schritt 4) beschrieben gewaschen.
- 8) In jede Vertiefung werden **100 µl der Substratlösung S** pipettiert.
- 9) Die Platte wird **30 Minuten im Dunkeln** bei **Raumtemperatur** inkubiert.
- 10) Nach Ablauf der Inkubationszeit wird in jede Vertiefung **100 µl Stopplösung SL** pipettiert.
- 11) Die Ausmessung der Farbreaktion erfolgt **innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm (Referenzfilter  $\geq 590$  nm)**.

## AUSWERTUNG

### Berechnung der Standardkurve

Zur Auswertung des Testes sollte gewährleistet sein, dass die Extinktionen des Leerwertes 0,3 Einheiten nicht überschreiten, Standard E sollte dagegen Extinktionen über 0,8 Einheiten erreichen. Proben, die höhere Extinktionen als der Standard E erzielen, liegen außerhalb der Standardkurve, zur sicheren Bestimmung sollten diese Proben in einer zweiten Testdurchführung bei höherer Verdünnung nochmals bestimmt werden.

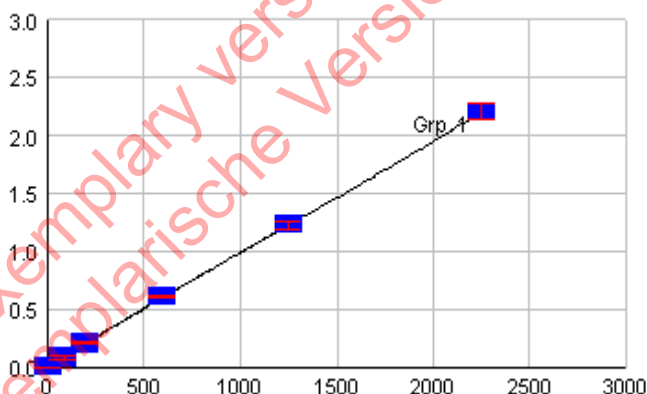
Die bereitgestellten Standards enthalten folgende Progranulinkonzentrationen:

Standard	A	B	C	D	E
ng/ml	0,075	0,25	0,75	1,5	2,5
pg/ml	75	250	750	1500	2500

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

Die beispielhafte Standardkurve

Grp. 1:  $y = -0.0033673 + 0.0010631 * x - 1.0125e-007 * x^2 + 2.8552e-011 * x^3$  d=0.00220



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



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

Beispielhafte Berechnung der Progranulinkonzentration einer 1:41 verdünnten Probe:

Gemessene Extinktion der Probe: 0,56  
 Gemessene Extinktion des Nullwertes: 0,03

Aus der Differenz der Probenextinktion und der Extinktion des Leerwertes (0,03) berechnet Ihr Auswertungsprogramm mit der entsprechenden Kurvenanpassung (hier: Polynom 3. Grades) die Progranulinkonzentration der verdünnten Probe durch Auflösen der Gleichung aus Abb. 1 nach x. In diesem Fall ergibt sich eine Progranulinkonzentration in der verdünnten Probe von

$$0,53 = -0,0033673 + 0,0010631x - 1,0125 \times 10^{-7} x^2 + 2,8552 \times 10^{-11} x^3$$

$$0,5146 = x$$

und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (**1:41**) somit eine Progranulinkonzentration in der unverdünnten Probe von

$$0,5146 \times 41 = 21,10 \text{ ng/ml}$$

## LEISTUNGSMERKMALE

### Standard

Die Standards des ELISA E103 bestehen aus **rekombinantem humanem** Progranulin in Konzentrationen von **75, 250, 750, 1500 bis 2500** pg/ml (pico Gramm/ml, entspricht 0,075 bis 2,5 nano Gramm/ml).

### Sensitivität

Die analytische Sensitivität des Assays beträgt **0,018 ng/ml** (18 pg/ml; zweifache Standardabweichung des Null-Standards in 19facher Bestimmung).

### Spezifität

Handelsübliche Seren von Rind, Katze, Huhn, Hund, Esel, Ziege, Meerschweinchen, Pferd, Maus, Schwein, Kaninchen, Ratte und Schaf wurden 1:5 und 1:41 verdünnt im Test eingesetzt und die Signalintensität wurde gemessen. Es konnte keine Kreuzreaktivität nachgewiesen werden.

### Wiederfindung

Die Wiederfindung von rekombinantem Progranulin in Serum und Plasmaproben variierte zwischen 91% und 101%.

### Matrixeffekte

**Tabelle 1:** Matrixeffekte: % Wiederfindung von rekombinantem Progranulin in verschiedenen Körperflüssigkeiten.

Matrixeffekte						
Verdünnung [1:x]	2	5	10	20	40	100
Speichel	> max.	> max.	102 %	-	-	-
Urin	106 %	102 %	107 %	-	-	-
Muttermilch	> max.	> max.	> max.	> max.	> max.	108 %
Zellkulturmedium	69 %	81 %	91 %	104 %	-	-
Liquor	73 %	88 %	93 %	-	-	-
Amnionflüssigkeit	> max.	> max.	> max.	> max.	100 %	100 %

- = nicht bestimmt

## Interferenz

Die Interferenz physiologisch auftretender Substanzen wurde durch Zugabe unterschiedlicher Mengen dieser Substanzen zu Serumproben getestet. In Tabelle 2 ist die relative Wiederfindung im Vergleich zum Serum ohne Zusätze für die maximal zugegebene Menge der potentiell interferierenden Substanz dargestellt.

**Tabelle 2:** %-Wiederfindung von Progranulin im Vergleich zum Normalserum

	<b>Triglyceride</b> [100 mg/ml]	<b>Bilirubin</b> [200 µg/ml]	<b>Hämoglobin</b> [1 mg/ml]
%	104	104	117

Keine der untersuchten Substanzen beeinflussten das Ergebnis des Testes signifikant.

Die Einflüsse der Koagulationshemmstoffe wurden durch Zugabe der angegebenen Konzentrationen der jeweiligen Hemmstoffe in Verdünnungspuffer VP bzw. in PBS, die mit 1250 pg/ml Progranulin angereichert wurden, untersucht. Die relativen Werte von Progranulin gemessen im Koagulationshemmstoff angereicherten Proben im Vergleich zu Proben ohne Koagulationshemmstoffe werden gezeigt.

**Tabelle 3:** Die Einflüsse der Koagulationshemmstoffe.

		<b>Wiederfindung in %</b>
[3,8 g/l]	Citrat	95
[5,4 mmol/l]	EDTA	93
[30 IE/ml]	Heparin	98

Keine der untersuchten Substanzen beeinflussten das Ergebnis des Testes signifikant.

## Reproduzierbarkeit und Präzision

Die **Inter-** und **Intra-Assay** Variationskoeffizienten sind **kleiner als 8,0 bzw. 4,4 %**. Beispielhafte Bestimmungen sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 4:** Inter-Assay-Varianz (angegeben sind Werte aus je 14 unabhängigen Durchführungen)

	<b>Mittelwert (ng/ml)</b>	<b>Standardabweichung (ng/ml)</b>	<b>VK (%)</b>
<b>Probe 1</b>	36,78	2,49	6,76
<b>Probe 2</b>	23,40	1,87	7,99
<b>Probe 3</b>	21,52	1,37	6,36

**Tabelle 5:** Intra-Assay-Varianz

	<b>Anzahl der Bestimmungen</b>	<b>Mittelwert (ng/ml)</b>	<b>Standardabweichung (ng/ml)</b>	<b>VK (%)</b>
<b>Probe 1</b>	19	25,61	0,87	3,38
<b>Probe 2</b>	19	49,74	2,17	4,35

## Verdünnungslinearität

Die Linearität der Probenverdünnungen ist gegeben bei Verdünnungen von 1:20 bis 1:320.

**Tabelle 6:** Verdünnungslinearität (hier: typische Ergebnisse dreier verschiedener Seren).

Verdünnung:	Probe 1 [ng/ml]	Probe 2 [ng/ml]	Probe 3 [ng/ml]
1:20	21,12	14,34	40,56
1:40	23,58	14,08	45,95
1:80	22,17	15,14	46,17
1:160	20,64	16,08	46,89
1:320	19,53	15,59	47,65
<b>MW / 1SA /</b>	<b>21,41 / 1,54 / 7,20</b>	<b>15,05 / 0,84 / 5,57</b>	<b>45,44 / 2,81 / 6,18</b>

MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient

## ERWARTUNGSWERTE

Die Progranulin Konzentrationen in humanen Serumproben von gesunden Probanden im Alter zwischen 20 und 65 wurden mit dem Mediagnost E103 Kit gemessen. Die Konzentration aller Proben lagen im Bereich von 21,85 ng/ml bis 53,22 ng/ml (s. Tabelle 7).

**Tabelle 7:** Erwartungswerte in Serum gesunder Erwachsener.

Geschlecht	Anzahl der Proben	Median [ng/ml]	Mittelwert [ng/ml]	Standardabweichung [ng/ml]	Min. – Max.: [ng/ml]
weiblich	20	32,22	31,60	5,62	21,85-40,57
männlich	20	30,71	33,06	8,11	22,27-53,22
gesamt	40	31,32	32,33	17,35	21,85-53,22

## PACKAGE INSERT ENGLISH

### Mediagnost Progranulin ELISA E103

- is suited for Progranulin determination in **Serum** and **Plasma** samples
- is extremely **sensitive (18 pg/ml)** and, thus allows measurements in cell culture media too and in specimens others than serum e.g. in Cerebrospinal fluid, Amnion fluid, Saliva, Urine, Breast milk
- is **fast**: incubation time a total of 2 hours
- Single Standards with **75, 250, 750, 1500, 2500 pg/ml** human Progranulin are provided in the Kit
- 2 Control Sera are provided for quality control purposes according GLP
- is calibrated with **recombinant Progranulin**
- Microtiter plates are separately breakapart, tests can be adapted to individual requirements

### INTENDED USE

Measurement of human Progranulin in human Serum and Plasma Samples for research use.

### INTRODUCTION

Progranulin is also known as Granulin Epithelin Precursor, Proepithelin or Acrogranin. It is a 68.5 kDa protein, consisting of 593 amino acids (inclusive Signalpeptid), which appears in vivo in strongly glycosylated form and therefore has a size of approximately 90 kDa (1).

Progranulin has seven conserved domains, which are separated by linker sequences. By means of proteolytic cleavage, catalyzed by serine proteases like e.g. elastase, 6-25 kDa large fragments result, that are called Granulines or Epithelines. Progranulin is expressed and secreted in particular in strongly proliferating tissues such as adenoid tissue, spleen, skin epithelium, gastrointestinal mucous membranes, haematopoietic cells and in tumor cells. Until now no specific receptors, which would obtain the effect of Progranulin or the Granulines are known (2, 3).

Progranulin seems to be a factor, which affects the wound healing positively. In case of skin lesions the expression is increased in ceratinocytes, in macrophages and in neutrophile cells. Progranulin affects the wound healing indirectly by activation of macrophages and stimulation of angiogenesis in the damaged tissue (4). The physiological effects of Progranulin and Granulines are oppositional. Progranulin can restrain TNF $\alpha$  mediated pro-inflammatory processes. On the other hand the Granulines seem to stimulate the secretion of pro-inflammatory cytokines. The influence of Progranulin on inflammatory processes could be shown also in arteriosclerotic plaques. Here Progranulin is expressed by smooth muscle cells and affects the migration of monocytes and smooth muscle cells (5). In the central nervous system Progranulin is expressed in microglia and neurons (in neocortical and hippocampal pyramid cells as well as in purkinje cells in the cerebellum).

On mRNA level a clear increase of Progranulin expression could be shown during infections or injuries of the CNS, for example in mucopolysaccharidosis type I and IIIB, in viral inflammations of CNS, in amyotrophic lateral sclerosis and in Alzheimer's disease. Beyond that Progranulin seems to be of relevance in the development of sex specific differences during pre- and postnatal development and also for the neural plasticity in adults (6).

### **Progranulin and Frontotemporal Dementia (FTD)**

5-10 % of all dementias are of the frontotemporal form. A mutation in the gene for Progranulin (PGRN) could be shown in 5-10 % of the patients suffering FTD (2). Nearly all pathological mutations lead to a premature transcription interruption and to rapid degradation of the mutated mRNA. This results in a PGRN haploinsufficiency with clearly decreased Progranulin concentrations in serum. Due to these results several studies were accomplished, in order to clarify the suitability of Progranulin as marker for the PGRN dependent frontotemporal dementia (7, 8).

The results of these studies show that Progranulin can detect already presymptomatically a FTD. Due to the missing standardisation and the use of different antibodies in the commercially available test systems cut off value must be evaluated for each assay separately.

### **Progranulin and Adiposity**

Inflammatory processes are often increased in case of adiposity and type 2 diabetes, which is reflected by e.g. in the increase of the C-reactive Protein and pro-inflammatory cytokines e.g. IL-6. Youn et al. compared different groups of patients and have shown that the plasma concentration of Progranulin is significantly (1.4-fold) increased in type 2 diabetics compared to glucose-tolerant patients. The authors refer in particular to the positive correlation of the Progranulin concentration to the volume of the visceral adipose tissue. On the other hand no difference between slim and subcutaneous adipose patients has been detected in this study. For this reason the increase of the Progranulin concentration may reflect the body distribution of adipose tissue and thus represent a biomarker for visceral adipose tissue (9).

The Mediagnost Progranulin ELISA E103 is based on monoclonal antibodies, which detect with high specificity only Progranulin and not the single Granulines. Thus, a tool is available for the further investigation and validation of Progranulin as a biomarker for the visceral adipose tissue.



## REAGENTS PROVIDED

1)	MTP	<b>Microtiter plate</b> , ready for use, with 96 wells, dived up in 12 stripes à 8 wells (separately breakapart), coated with human Progranulin antibody.
2)	STD	<b>Standards A-E, lyophilised</b> , contain recombinant <b>Progranulin</b> . <b>Standard values are between 0.075 – 2.5 ng/ml</b> (75, 250, 750, 1500 und 2500 pg/ml) <b>Progranulin</b> and have to be reconstituted with <b>1 ml (each) Dilution Buffer VP</b> . Use 50 µl pro well in the assay.
3)	BUF	<b>Dilution buffer VP, 50 ml</b> , ready for use, after shaking. Please use this for the <b>reconstitution of Standards and Control Sera</b> and for the <b>dilution of Control Sera and Samples</b> .
4)	Control	<b>Control Sera KS1 and KS2, 250 µl</b> , lyophilised, contain human Serum and should be <b>reconstituted in each 250 µl Dilution Buffer VP</b> . The Progranulin target values and the respective ranges are given on the vial labels. The dilution should be according to the dilution of the respected samples. Use <b>50 µl</b> pro well in the assay.
5)	Ab	<b>Antibody Conjugate AK, 6 ml</b> , ready for use, contains the biotinylated anti-Progranulin antibody. Use 50 µl for each well in the assay.
6)	CONJ	<b>Enzyme Conjugate EK, 12 ml</b> , ready for use, contains horseradisch-peroxidase conjugate to streptavidin, Use 100 µl for each well in the assay.
7)	WASHBUF 20x	<b>Washing Buffer (WP), 50 ml, 20-fold concentrated solution</b> . <b>Washing Buffer (WP)</b> has to be diluted 1:20 with distilled or demineralised water before use (e.g. add the complete contents of the flask (50 ml) into a graduated flask and fill up with A. dest. to 1000 ml). Attention: After dilution the Washing Buffer is only 4 weeks stable, dilute only according to requirements.
8)	SUBST	<b>Substrate (S), 12 ml</b> , ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP)-substrate
9)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	<b>Stopping Solution (SL), 12 ml</b> , ready for use, 0.2 M sulphuric acid, Caution acid!
10)		Sealing tape for covering of the microtiter plate, 2 x, adhesive.

## MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

## WARNINGS AND PRECAUTIONS

### For research and professional use only.

The Mediagnost 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.

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

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

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

### Human Serum

Following components contain human serum: **Control Sera KS1, KS2**

Source human serum for the control sera provided in this kit was tested and found non-reactive for Hepatitis-B surface antigen (HBsAg), Hepatitis C virus (HCV), and Human Immunodeficiency Virus 1 and 2 (HIV). No known methods can offer total security of the absence of infectious agents; therefore all components and patient's specimens should be treated as potentially infectious.

### Reagents AK, EK, VP, WP, A-E

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 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

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.

### 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.

## METHOD

The enzyme immunoassay for Progranulin E103 is a so-called Sandwich-Assay. It utilizes specific and high affinity monoclonal antibodies for this protein. The Progranulin in the samples binds to the immobilized first antibody on the microtiter plate. In the following step, the biotinylated antibody binds in turn to Progranulin. After washing, Streptavidin-Peroxidase-Enzyme conjugate will be added, which will bind highly specific to the biotin and will catalyse the enzymatic reaction, which turns the colour of the substrate, quantitatively depending on the Progranulin level of the samples.

## SPECIMEN

Serum and plasma samples can be used in this assay. No influence of 3.8 g/l Citrate, 5.4 mmol/l EDTA nor 30 IE/ml Heparin were shown on the measurement of Progranulin by the recovery experiments.

### Storage of the samples

Storage at RT max. 3 days

Storage at +4°C max. 3 days

Storage at -20°C max. 2 years

in tightly closable plastic tubes.

The measured values of serum and plasma samples did not show significant deviations up to 10 thaw/freezing cycles, values within the range of 95 to 101% of the target value were found.

### Sample Preparation

Samples have to be diluted in Dilution Buffer (VP). For most of the determinations (serum or plasma samples, and no extreme values are expected) a serum or plasma dilution **of 1:41 with Dilution Buffer VP** should be suitable. According to expected Progranulin levels the dilution with VP can be higher or lower. The excellent linearity of this test system allows sample dilution of 1:20 to 1:320 (see table 6).

Progranulin concentrations may be completely different in body fluids of human origin other than serum or cell culture supernatants (see table 1).

### Suggestion for dilution protocol:

Pipette **400 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 1:41). After mixing use 50 µl per determination of this dilution in the assay.

## TECHNICAL NOTES

Reagents with different lot numbers cannot be mixed. All reagents are stable until the indicated expiry, if stored unopened and protected from sunlight at 2 – 8°C.

The shelf life of the components after opening is not affected, if used appropriately.

**Bring all reagents to room temperature (20 - 25°C) before use.** Possible precipitations in the buffers have to be resolved before usage by mixing and / or warming.

### **Incubation at room temperature means: Incubation at 20-25°C**

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 become adjusted. Insufficient shaking may lead to inadequate mixing of the solutions and thereby to low optical densities, high variations and/or false values, excessive shaking may result in high optical densities and/or false values.

Proper washing is of basic importance for a secure, reliable and precise performance of the test. Incomplete washing is common and will adversely affect the test outcome. Possible consequences may be uncontrolled unspecific variations of measured optical densities, potentially leading to false results calculations of the examined samples. Effects like high background values or high variations may indicate washing problems.

All washing must be performed with the provided washing buffer diluted to usage concentration. Washing volume per washing cycle and well must be 300 µl at least.

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

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

Manual washing is an adequate alternative option. Washing Buffer may be dispensed via a multistepper device, a multichannel pipette, or a squirt bottle. The fluid may be removed by dynamically 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.

### **Standards and Controls**

For the reconstitution of the lyophilised **Standards A - E Dilution Buffer VP** has to be used.

The lyophilised **Control Sera KS1 and KS2** must be **reconstituted** with the **Dilution Buffer VP**. The dilution should be according to the dilution of the respected samples. It is recommended to keep reconstituted reagents at room temperature for 15 minutes and then to mix them thoroughly but gently (no foam!) with a Vortex mixer.

The reconstituted standards and controls can be stored for 2 months at -20°C. Repeated freeze/thaw cycles have to be avoided.

### **Washing Buffer**

The required volume of Washing Buffer is prepared by 1:20 dilution of the provided 20-fold concentrate with deionised water. The diluted Washing Buffer is stable for 4 weeks at 2-8°C. It has to be at room temperature for usage!

### **Microtiter plate**

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

### **Substrate Solution**

The Substrate Solution (S), stabilised H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Tetramethylbencidine, is photosensitive – store and incubate in the dark.

## ASSAY PROCEDURE

When performing the assay, the Standards **A-E**, Control Sera **KS1& KS2** and the samples should be pipetted as fast as possible (e.g., 15 minutes). To avoid distortions due to differences in incubation times, the Enzyme Conjugate **EK** as well as the succeeding **Substrate Solution S** should be added to the plate in the same order and in the same time interval as the samples. **Stop Solution SL** should be added to the plate in the same order as the Substrate Solution **S**

All determinations (Standards, Control Sera and samples) should be assayed in duplicate.

For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

- 1) Add **50 µl Antibody Conjugate AK** in **all** wells used.
- 2) Pipette in positions A1/2 **50 µl Dilution Buffer VP**
- 3) Pipette in positions B1/2 **50 µl of the Standard A (75 pg/ml)**,  
pipette in positions C1/2 **50 µl of the Standard B (250 pg/ml)**,  
pipette in positions D1/2 **50 µl of the Standard C (750 pg/ml)**,  
pipette in positions E1/2 **50 µl of the Standard D (1500 pg/ml)**,  
pipette in positions F1/2 **50 µl of the Standard E (2500 pg/ml)**.  
To control the correct accomplishment of the assay **50 µl** of the 1:41 (or in respective dilution ratio of the samples) in Dilution Buffer VP diluted **Control Sera KS1/KS2** can be pipetted in positions G1/2 and H1/2.  
Pipette **50 µl** each of the diluted samples (e.g. dilute 1:41 with **Dilution Buffer VP**) in the rest of wells, according to your requirements.
- 4) Cover the wells with sealing tape and incubate the plate for **1 hour at room temperature** (shake at  $\geq 350$  rpm)
- 5) After incubation aspirate the contents of the wells and wash the wells **5 times 300 µl Washing Buffer WP** / well.
- 6) Following the last washing step pipette **100 µl** of the **Enzyme Conjugate EK** in each well.
- 7) Cover the wells with sealing tape and incubate the plate for **30 Minutes at room temperature** (shake 350 rpm).
- 8) After incubation wash the wells **5 times** with Washing Buffer **WP** as described in step 5.
- 9) Pipette **100 µl** of the **Substrate Solution S** in each well.
- 10) Incubate the microtiter plate for **30 minutes in the dark at room temperature**.
- 11) Stop the reaction by adding **100 µl Stopping Solution SL** to all wells.
- 12) Measure the absorbance within **30 minutes at 450 nm (Reference filter  $\geq 590$  nm)**



## ESTABLISHING THE STANDARD CURVE

For the evaluation of the assay it is preconditioned that the absorbance values of the blank should be below 0.3, these of standard E should exceed 0.8.

Samples, which yield higher absorbance values than Standard E are beyond the standard curve, for reliable determinations these samples should be tested anew with a higher dilution.

The standards provided contain the following concentrations of Progranulin:

Standard	A	B	C	D	E
ng/ml	0.075	0.25	0.75	1.5	2.5
pg/ml	75	250	750	1500	2500

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

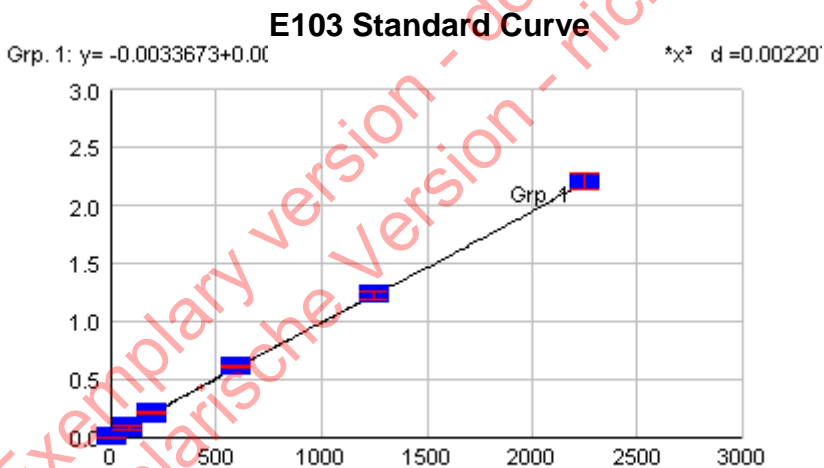


Fig. 1. Exemplary Standard Curve with a polynomial 3 as curve fit.

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

Exemplary calculation of the Progranulin concentration of a 1:41 diluted sample:

Measured extinction of your sample	0.56
Measured extinction of the blank	0.03

Your measurement program will calculate the Progranulin concentration of the diluted sample automatically by using the difference of sample and blank (0.03) for the calculation. You only have to determine the most suitable curve fit (here: polynomial 3 degree).

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

$$0.53 = -0.0033673 + 0.0010631x - 1.0125 \times 10^{-7} x^2 + 2,8552 \times 10^{-11} x^3$$

$$0.5145 = x$$

if the dilution factor (1:41) is taken into account, the Progranulin concentration of the undiluted sample is

$$0.5145 \times 41 = 21.10 \text{ ng/ml}$$

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### Standards

The standards are prepared from recombinant human Progranulin in concentrations of 75, 250, 750, 1500 and 2500 pg/ml (pico gram/ml, equal to 0.075 -2.5 nano gram/ml).

### Sensitivity

The **analytical sensitivity** of the assay yields **0.018 ng/ml** (pg/ml; as 2x SD of zero standard in 19fold determination).

### Specificity

Commercially available sera from bovine, cat, chicken, dog, donkey, goat, guinea pig, horse, mouse, pig, rabbit, rat and sheep were diluted 1:5 und 1:41 and used as samples in this assay system and the signal intensity was measured. No cross reactivity was detected.

## Recovery

The recovery of recombinant Progranulin in serum and plasma samples varied from 91 to 101%.

## Matrix effects

**Table 1:** Matrix effects: % Recovery of recombinant Progranulin in different body fluids

Matrix effects						
Dilution [1:x]	2	5	10	20	40	100
Saliva	> max.	> max.	102 %	-	-	-
Urine	106 %	102 %	107 %	-	-	-
Breast milk	> max.	> max.	> max.	> max.	> max.	108 %
Cell culture media	69 %	81 %	91 %	104 %	-	-
Cerebrospinal fluid	73 %	88 %	93 %	-	-	-
Amnion fluid	> max.	> max.	> max.	> max.	102 %	100 %

- = not determined

## Interference

Interference of physiological appearing substance with the Progranulin measurement was investigated. Serum samples have been enriched with different concentrations of possibly interfering substances and the amount of Progranulin was measured and compared with the Progranulin concentration in the same sample without any enrichment. In table 2 the relative results are shown. None of the tested substances interfered significantly with Progranulin measurement.

**Table 2:** %- Recovery compared to non-enriched serum.

	Triglycerides [100 mg/ml]	Bilirubin [200 µg/ml]	Haemoglobin [1 mg/ml]
%	104	104	117

Effects of coagulation inhibitors were investigating by adding indicated amounts of inhibitors to VP or PBS enriched with 1250 pg/ml Progranulin. Relative amounts of Progranulin determined in inhibitor containing samples in comparison to inhibitor free samples are shown. None of the tested substances interfered significantly with Progranulin measurement.

**Table 3:** Effects of coagulation inhibitors.

		Recovery %
[3.8 g/l]	Citrate	95
[5.4 mmol/l]	EDTA	93
[30 IE/ml]	Heparin	98

None of the tested substances interfered significantly with Progranulin measurement.

## Reproducibility and Precision

The inter and intra assay coefficients of variability are **below 8.0 and 4.4 %**, respectively. Exemplary determinations are shown in table 4 and table 5.

**Table 4:** Inter-Assay-Variation (results of 14 independent determinations)

	Mean (ng/ml)	Standard deviation (ng/ml)	VC (%)
Sample 1	36.78	2.49	6.76
Sample 2	23.40	1.87	7.99
Sample 3	21.52	1.37	6.36

**Table 5:** Intra-Assay-Variation

	Number of determinations	Mean value (ng/ml)	Standard deviation (ng/ml)	VC (%)
Sample 1	19	25.61	0.87	3.38
Sample 2	19	49.74	2.17	4.35

## Linearity

The Mediagnost Progranulin ELISA E103 is over a very wide range dilution authentic. The linearity of serum dilutions is over a very wide range excellent (see table 6).

**Table 6:** Linearity of the sample dilution (characteristic result of three different sera)

Dilution	Sample 1 [ng/ml]	Sample 2 [ng/ml]	Sample 3 [ng/ml]
1:20	21.12	14.34	40.56
1:40	23.58	14.08	45.95
1:80	22.17	15.14	46.17
1:160	20.64	16.08	46.89
1:320	19.53	15.59	47.65
<b>AV / 1SD / VC%</b>	<b>21.41 / 1.54 / 7.20</b>	<b>15.05 / 0.84 / 5.57</b>	<b>45.44 / 2.81 / 6.18</b>

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

## EXPECTATION VALUES

Concentrations of Progranulin human sera of 40 healthy adult donors, at the age of 20 to 65 were determined with the Mediagnost ELISA E103. The concentrations of all samples varied from minimal 21.85 ng/ml to maximal 53.22 ng/ml (see table 7).

**Table 7:** Expectation values for adults in serum

Gender	Number of samples	Median [ng/ml]	Average value [ng/ml]	Standard Deviation [ng/ml]	Min. – Max.: [ng/ml]
female	20	32.22	31.60	5.62	21.85-40.57
male	20	30.71	33.06	8.11	22.27-53.22
total	40	31.32	32.33	17.35	21.85-53.22

## LITERATUR / LITERATURE

1. Daniel R, Daniels E, He Z, Bateman A. Progranulin (acroganin/PC cell-derived growth factor/granulin-epithelin precursor) is expressed in the placenta, epidermis, microvasculature, and brain during murine development. *Dev Dyn* 2003;227:593-9.
2. Eriksen JL, Mackenzie IR. Progranulin: normal function and role in neurodegeneration. *J Neurochem* 2008;104:287-97.
3. Daniel R, He Z, Carmichael KP, Halper J, Bateman A. Cellular localization of gene expression for progranulin. *J Histochem Cytochem* 2000;48:999-1009.
4. Zhu J, Nathan C, Jin W, Sim D, Ashcroft GS, Wahl SM, et al. Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair. *Cell* 2002;111:867-78.
5. Kojima Y, Ono K, Inoue K, Takagi Y, Kikuta K, Nishimura M, et al. Progranulin expression in advanced human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis* 2009;206:102-8.
6. Suzuki M, Lee HC, Kayasuga Y, Chiba S, Nedachi T, Matsuwaki T, et al. Roles of progranulin in sexual differentiation of the developing brain and adult neurogenesis. *J Reprod Dev* 2009;55:351-5.
7. Finch N, Baker M, Crook R, Swanson K, Kuntz K, Surtees R, et al. Plasma progranulin levels predict progranulin mutation status in frontotemporal dementia patients and asymptomatic family members. *Brain* 2009;132:583-91.
8. Ghidoni R, Benussi L, Glionna M, Franzoni M, Binetti G. Low plasma progranulin levels predict progranulin mutations in frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 2008;71:1235-9.
9. Youn BS, Bang SI, Kloting N, Park JW, Lee N, Oh JE, et al. Serum progranulin concentrations may be associated with macrophage infiltration into omental adipose tissue. *Diabetes* 2009;58:627-36.

# KURZANLEITUNG MEDIAGNOST PROGRAMULIN ELISA E103

Rekonstitution / Verdünnung von Reagenzien		
<b>Standards A-E</b>	Rekonstitution in <b>Verdünnungspuffer VP</b>	<b>je 1 ml</b>
<b>Kontrollseren KS1 &amp; KS2</b>	Rekonstitution in <b>Verdünnungspuffer VP</b>	<b>je 250 µl</b>
<b>Waschpuffer WP</b>	verdünnen in <b>A. dest.</b> (z.B. die gesamte Menge von 50 ml im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen)	<b>1:20</b>
<b>Probenverdünnung bzw. Kontrollserumverdünnungen KS1&amp;KS2: 1:41 in Verdünnungspuffer VP, sofort mischen und in max. 60 min. verwenden. Davon 50 µl pro Bestimmung einsetzen.</b>		
Vor der Testdurchführung alle <b>Reagenzien</b> auf <b>Raumtemperatur</b> bringen.		

## Tesdurchführung Doppelbestimmung (Vorschlag):

Pipettieren	Reagenzien	Position
50 µl	Antikörperkonjugat <b>AK</b>	in <b>alle</b> benötigten Vertiefungen pipettieren
50 µl	Verdünnungspuffer <b>VP</b> als Leerwert	A1 und A2
50 µl	Standard <b>A (75 pg/ml)</b>	B1 und B2
50 µl	Standard <b>B (250 pg/ml)</b>	C1 und C2
50 µl	Standard <b>C (750 pg/ml)</b>	D1 und D2
50 µl	Standard <b>D (1500 pg/ml)</b>	E1 und E2
50 µl	Standard <b>E (2500 pg/ml)</b>	F1 und F2
50 µl	Kontrollserum <b>KS1</b>	G1 und G2
50 µl	Kontrollserum <b>KS2</b>	H1 und H2
50 µl	Proben	in Vertiefungen nach Bedarf pipettieren
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.		

### Inkubation: 1 h bei RT, 350 rpm

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

### Inkubation: 30 min bei RT, 350 rpm

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

### Inkubation: 30 min im Dunklen bei RT

100 µl	Stopplösung <b>SL</b>	In jede Vertiefung
Ausmessung innerhalb von 30 min bei <b>450 nm</b> ( $\geq 590$ nm Referenz)		



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

## SUMMARY – MEDIAGNOST PROGRAMULIN ELISA E103

Reconstitution / Dilution of Reagents		
<b>Standards A-E</b>	Reconstitution in <b>Dilution Buffer VP</b>	<b>1 ml each</b>
<b>Control Serum KS1 &amp; KS2</b>	Reconstitution in <b>Dilution Buffer VP</b>	<b>250 µl each</b>
<b>Washing Buffer WP</b>	Dilute in <b>A. dest.</b> (e.g. add the complete contents of the flask 50 ml into a graduated flask and fill with A.dest. to 1000 ml)	<b>1:20</b>
<b>Sample Dilution + Control Sera KS1 &amp; KS2: 1:41 in Dilution Buffer VP mix directly and use within max. 60 min.</b>		
Use <b>50 µl per determination</b>		
Before assay procedure bring all <b>reagents</b> to <b>room temperature</b>		

### Assay Procedure for Double Determinations:

Pipette	Reagent	Position
50 µl	Antibody Conjugate <b>AK</b>	in <b>all</b> wells used
50 µl	Dilution Buffer <b>VP</b> (blank)	A1 and A2
50 µl	Standard <b>A (75 pg/ml)</b>	B1 and B2
50 µl	Standard <b>B (250 pg/ml)</b>	C1 and C2
50 µl	Standard <b>C (750 pg/ml)</b>	D1 and D2
50 µl	Standard <b>D (1500 pg/ml)</b>	E1 and E2
50 µl	Standard <b>E (2500 pg/ml)</b>	F1 and F2
50 µl	Control Serum <b>KS1</b>	G1 and G2
50 µl	Control Serum <b>KS2</b>	H1 and H2
50 µl	Samples	following wells
Cover the wells with the sealing tape.		

#### Incubation: 1 h at RT, 350 rpm

5 x 300 µl	Aspirate the contents of the wells and wash <b>5x</b> with <b>300 µl Wash Buffer WP</b>	each well
100 µl	Enzyme Conjugate <b>EK</b>	each well

#### Incubation: 30 min at RT, 350 rpm

5 x 300 µl	Aspirate the contents of the wells and wash <b>5x</b> with <b>300 µl Wash Buffer WP</b>	each well
100 µl	Substrate <b>S</b>	each well

#### Incubation: 30 min in the dark RT

100 µl	Stop Solution <b>SL</b>	each well
Measure the absorbance within <b>30 min</b> at <b>450 nm</b> with <b>≥ 590 nm</b> as reference wavelength.		



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

<b>Control</b>	1:41 <b>DILU</b> <b>BUF</b> VP
<b>SPE</b>	1:41 <b>DILU</b> <b>BUF</b> VP
°C 20-25 °C	

50 µl	<b>Ab</b>	A1 - End
50 µl	<b>BUF</b> VP	A1/2
50 µl	<b>STD</b> A (75 pg/ml)	B1/2
50 µl	<b>STD</b> B (250 pg/ml)	C1/2
50 µl	<b>STD</b> C (750 pg/ml)	D1/2
50 µl	<b>STD</b> D (1500 pg/ml)	E1/2
50 µl	<b>STD</b> E (2500 pg/ml)	F1/2
50 µl	<b>CONTROL</b> KS 1 1:41 <b>DILU</b> <b>BUF</b> VP	G1/2
50 µl	<b>CONTROL</b> KS 2 1:41 <b>DILU</b> <b>BUF</b> VP	H1/2
50 µl	<b>SPE</b> 1:41 <b>DILU</b> VP	
<b>TAPE</b>		

**A** 1 h °C 20-25 ↔ 350 rpm

5 x 300 µl	5 x <b>WASHBUF</b> WP
100 µl	<b>CONJ</b>
<b>TAPE</b>	

**A** 0.5 h °C 20-25 ↔ 350 rpm

5 x 300 µl	5 x <b>WASHBUF</b> WP
100 µl	<b>SUBST</b> <b>TMB</b> S

**A** 30 min °C 20-25

100 µl	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b> SL
<b>MEASURE</b>	