

m/rLeptin ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von

Maus- und Ratten-Leptin (Obese Protein)

Deutsch

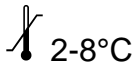
Enzyme Immunoassay for Quantitative Determination of

Mouse and Rat Leptin (Obese Protein)

English

Alle Länder / All countries:

Nur zu Forschungszwecken. Nicht für diagnostische Anwendungen geeignet.
For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.



REF E06


















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/ SI/ FI

Symbols/ Symbole /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ Symbolen/ Symboler/ Symboler/ Symbole/ Szimbólumok/ Symboly/ Symboly/ Символи/ 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 годности/ 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 kasutusjuhendi/ Λάβετε υπόψη σας τις οδηγίες χρήσης/ Vã rugãm sã 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-szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/Partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-număr lot/ Številka serije/ Erã
	Manufactured by/ Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por/ Fabricado por/ Vervaardigd doo/ Fabrikation af/ Tillverkad 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 Referência/ Referentienummer/ Referencenummer/ Beställningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/ Katalógové číslo/ Objednací číslo/ Καταλογος номер/ Tellimisnumber/ Αρ. παραγγελίας/Număr comandã/ Številka naročila/ Viite tai tilausnumero
	Store at between/ Lagerung bei zwischen/ Conserver à entre/ Conservare a tra/ Conservar a temp. entre/ Armazenar entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevaars mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezi/ Температурно ограничение/ Säilitada 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 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 slunečnému světlu/ Да се предпазва от слънчева светлина/ Kaitsta otsese päikesekiirguse eest/ Κρατήστε το μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία/ Τίμησι 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/ incubation vid/ Inkubacija 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/ Premiešať pomocou prístroja Vortex/ Promíchat pomocí přístroje Vortex/ Разбъркване на епруветките с миксер Vortex/ Segada torukesi Vortexi mikseriga/ Αναμίξτε τους σωληνίσκους με αναδευτήρα Vortex/ Amestecați eprubetele cu ajutorul unui agitator vortex/ Mešanje cevčic z mešalnikom Vortex/ Sekoita putket Vortex sekoittajalla
	Mikrotiterplate/ Mikrotiterplatte/ plaque de microtitrage/ Piastra di microtitolazione/ Placa de microtitulación/ Placa de Microtitulação/ Mikrotiterplaat/ Mikrotiterplade/ mikrotiterplatta/ mikrotiterplaat/ Plytka mikrotiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiterplaat/ Τρυβλίο μικροπιλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitrská plošča/ Mikrotitruslevy
	Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituir en/ Reconstituir em/ Rekonstituieren in/ Rekonstituier i/ Rekonstituera/ Rekonstytuować w/ Helyreállítás/ Znovu připravit za/ Znovu pripraviti za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti/ Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ Rekonstitui
	Sample/ Probe/ Echantillon/ Campione/ Muestra/ Amostra/ Monster/ Prøve/ prov/ Próbka/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probă/ Vzorec/ Näyte
	Antibody Conjugate/ Antikörperkonjugat/ Anticorps conjugué/ Coniugato di anticorpo/ Conjugado de anticuerpos/ Conjugado anticorpo/ Antilichaamconjugaat/ Antistoffer-konjugat/ Antikroppskonjugat/ Koniugat antycial/ Antitest páros/ Protílátkový konjugát/ Protílátkový konjugát/ Антитяло конюгат/ Antikehad konjugaat/ Σύμπλοκο αντισώματος/ Compuși din anticorpi/ Antitelesa konjugat/ Vasta-aine konjugaatti

CONJ	Enzyme Conjugate/ Enzymkonjugat/ Conjugué enzymatique/ Coniugato di enzima/ Conjugado de enzimas/ Conjugado Enzima/ Enzymconjugaat/ Enzym-konjugat/ Enzymkonjugat/ Koniugat enzymów/ Enzim páros/ Enzymatický konjugát/ Enzymatický konjugát/ ензим конюгат/ Ensüümi konjugaat/ Σύμπλοκο –ενζύμου/ Compuși din enzime/ Encima konjugat/ Enzymi-konjugaatti
BUF	Buffer/ Puffer/ Tampon/ Tampone/ Tampón/ Tampão/ Buffer/ Buffer/ Buffert/ Bufor/ Puffer/ Puffer/ Puffer/ Буфер/ Puhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα/ Tampon/ Puffer/ 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/ Riediť v pufrí X/ Redit v pufru X/ Разреждане в буфер X/ Lahjendada puhvrís X/ Αραιώστε σε ρυθμιστικό διάλυμα X/ Diluati în tamponul X/ Razredčiti v pufru X/ Laimennetaan x puskurin
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/ Vaskebufferkoncentrat/ Vaskebufferkoncentrat/ 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/ Pesuliusiitiviste
WASHBUF	Washing Buffer/ Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón de lavado/Tampão de Lavagem/ wasbuffer/ Vaskebuffer/ tvättbuffert/ Bufor płukania/ Mosópufer/ Vymývací pufer/ Vymývací pufr/ Промивен буфер/ Pesupuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare /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/ Стопиратс 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/ Odkleic plytkę/ Tányér leragsztása/ Oblepit' podložku lepicou páskou/ Olepit podložku lepicí páskou/ Плака с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerkerleelindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperiti placa 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)/ Mesure 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)/ Merat' 30 minut pri 450 nm (Referenčných filtrov ≥590 nm)/ Měřit 30 minut při 450 nm (Referenční filtr ≥ 590 nm)/ Отчитане в рамките на 30 min при 450 nm (референтен филтър ≥ 590 nm)/ 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/ Literatúra/ Literatura/ Литература// Kirjandus/ Βιβλιογραφία/ Bibliografie/ literatura/ Lähdeluettelo
International Test description	International test description/ internationale Testanleitung/ description internationale de test/ Istruzioni per il test internazionali/ Descripción de ensayo internacional/ Descrição internacional do teste/ internationale testbeschrijving/ internationell testbeskrivning/ Opis testu międzynarodowego/ nemzetközi teszt-útmutató/ Medzinárodný návod k testu/ Mezinárodní návod k testu/ rahvusvaheline katse kirjeldus/ Διεθνείς οδηγίες για εργαστηριακές δοκιμές/ instrucțiuni internaționale pentru testare/ mednarodna navodila za preizkus/ Kansainvälinen käyttöohje
End	in all required wells/ in allen benötigten Vertiefungen/ dans tous les godets requis/ in tutti i pozzetti richiesti/ en todos los pozos requeridos/ em todos os tubos necessários/ in alle nodige putjes/ i alle nødvendige brønde/ i alla nödvändiga brunnar/ we wszystkich potrzebnych wgłębieniach/ minden szükséges forrásban/ vo všetkých potrebných miestach/ ve všech potřebných místech/ във всички необходими ямки/ kõigis vajalikes süvendites/ σε όλες τις απαραίτητες κοιλότητες/ în toate cavitățile necesare/ v vseh zahtevanih vdolbinah/ kaikkiin tarvittaviin mikrotitrauslevyn syvennyksiin

INHALTSVERZEICHNIS / TABLE OF CONTENTS

DEUTSCH	m/rLeptin E06 Gebrauchsanweisung	5
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	KALIBRIERUNG DES ASSAYS	12
10	AUSWERTUNG	12
11	ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG	14
ENGLISH	mouse/rat Leptin ELISA INSTRUCTIONS FOR USE	16
12	Literatur / Literature.....	28
13	INTERNATIONAL ASSAY DESCRIPTION.....	31
14	ASSAY DESCRIPTION.....	32

DEUTSCH m/rLeptin E06 Gebrauchsanweisung

m/rLeptin ELISA	96 Determinations
RUO	Nur zur Forschungszwecken
Testprinzip	Enzymimmunoassay
Dauer (Inkubationszeit)	3 h
Antikörperkonjugat	100fach Konzentrat
Enzymkonjugat	100fach Konzentrat
Verdünnungspuffer	Gebrauchsfertig
Waschpuffer	20fach Konzentrat
Standard	Rekombinantes Maus-Leptin, 7 Einzelstandards: 25-1600 pg/ml, lyophilisiert
Kalibration	Kalibriert am internationalen Maus-Leptin Standard der WHO (NIBSC Code 97/626)
Assay Bereich	10 pg/mL – 8000 pg/mL
Kontrolle	1 Kontrollserum, lyophilisiert
Probe	Maus- und Rattenserum und -plasma
Erforderliches Probenvolumen	Bis zu 50 µL
Proben Verdünnung	mindestens 1:2
Sensitivität	10 pg/mL
Intra- / Interassay Variation	< 10 %

1 ZWECKBESTIMMUNG

Bestimmung von Leptin in Maus- und Ratten Serum und Plasma

2 EINFÜHRUNG

Leptin, das Produkt des ob-Genes (1,2), ist ein vor kurzem identifiziertes Einzelstrang Proteohormon mit einem Molekulargewicht von 16 kD und man nimmt an, dass es eine Schlüsselrolle bei der Regulierung des Körpergewichts spielt. Seine Aminosäuresequenz weist keine größeren Homologien zu anderen Proteinen auf (1). Leptin wird fast ausschließlich von differenzierten Fettzellen produziert (3-5). Es wirkt auf das zentrale Nervensystem ein, vor allem auf den Hypothalamus, wobei es die Nahrungsaufnahme unterdrückt und den Energieverbrauch steigert (2,6-9). Es existieren unterschiedlich gespleißte Formen des Leptin-Rezeptors, die sich in ihrer Länge unterscheiden. Sie gehören zu der Cytokin-Klasse-1-Rezeptor-Familie (10-12) und kommen ubiquitär im Körper vor (10,11,13,14). Dies läßt auf eine umfassende Funktion von Leptin schließen, die bis jetzt aber noch nicht völlig verstanden wird. Eines der vielen Leptin Bindungsproteine stellt eine zirkulierende Form eines Leptin-Rezeptors dar (15). Neben seinem Einfluss auf den Stoffwechsel besitzt Leptin auch einen starken Einfluss auf eine weiter Anzahl endokriner Achsen. In männlichen Mäusen schwächte es die durch Hungern induzierte ausgeprägte Abnahme von LH, Testosteron und Thyroxin bzw. die Zunahme von ACTH und Corticosteron ab. In weiblichen Mäusen verhinderte Leptin die durch Hungern induzierte Verzögerung des Eisprungs (16). Ob/ob-Mäuse, die aufgrund einer ob-Genmutation einen Leptin-Mangel aufweisen, sind unfruchtbar. Dieser Defekt konnte durch Leptinapplikation korrigiert werden, jedoch nicht durch Gewichtsverlust infolge von

Nahrungskarenz (17). Dies lässt darauf schließen, dass Leptin eine wichtige Rolle für die Reproduktion spielt.

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

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

3 TESTPRINZIP

Der Mediagnost **m/rLeptin ELISA, E06**, ist ein sogenannter Sandwich-Assay unter Verwendung zweier spezifischer und hochaffiner Antikörper.

Der an die Mikrotiterplatte gekoppelte erste Antikörper bindet das Leptin aus der Probe, welches im nachfolgenden Schritt vom Biotin-konjugierten anti-Leptin-Antikörper erkannt wird. Danach bindet ein Streptavidin-Peroxidase-Enzymkonjugat hochspezifisch am Biotin. In der abschließenden Substratreaktion wird hochspezifisch der Farbumschlag katalysiert, quantitativ abhängig vom Leptin-Gehalt der Proben.

4 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 Test enthält Material tierischen Ursprungs. Die Bestandteile des Tests 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. Ein Sicherheitsdatenblatt ist auf Nachfrage verfügbar.

4.1 Reagenzien

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

enthalten als Konservierungsmittel eine Mischung aus **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.

4.2 Erste-Hilfe Maßnahmen:

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

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

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

5 PROBEN

5.1 Probenmaterial

Maus- und Rattenserum und -plasma

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

5.2 Probenentnahme

Hämolytische Reaktionen sind zu vermeiden.

5.3 Erforderliches Probenvolumen:

Je nach Leptin Konzentration, maximal 50 µL pro Bestimmung.

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

5.4 Probenstabilität

Unverdünnte Serumproben können bei -20°C aufbewahrt werden, ohne dass die Maus/Ratten-Leptin Aktivität dabei beeinflusst wird. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren ist zu vermeiden, obwohl die Serumspiegel durch einige wenige Zyklen nicht beeinflusst werden. Verdünnte Proben sind maximal für 2 h zu verwenden.

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

5.5 Probenverdünnung


Im Allgemeinen ist eine **Verdünnung von 1:5 bis 1:20** geeignet. Je nach Art, Stamm oder Aufzucht bzw. den individuellen experimentellen Bedingungen kann diese aber variieren. Falls sehr niedrige Leptinkonzentrationen zu erwarten sind, können 1:2 verdünnte Proben eingesetzt werden. Wenn die Probenmenge beschränkt ist, sind bei ausreichender Leptinkonzentration höhere Verdünnungen möglich.

- Verdünnung: **1:5** mit Verdünnungspuffer **VP**
- Beispiel einer Doppelbestimmung: **50 µL** Probe werden zu **200 µL** Verdünnungspuffer **VP** gegeben (Verdünnungsfaktor **5**). Nach dem Mischen werden von dieser Lösung 100 µL pro Bestimmung innerhalb von max. 2 h im Assay eingesetzt.
- Oder **80 µL** Dilution Buffer **VP** werden in eine Vertiefung pipettiert und dazu werden **20 µL** Serum zugesetzt (gut mischen).
- Gegebenenfalls kann, je nach erwarteten Leptinwerten, höher in Verdünnungspuffer **VP** verdünnt werden.

6 MATERIALIEN

6.1 Inhalt der Testpackung

Die im Kit gelieferten Reagenzien sind ausreichend für 96 Tests einschließlich der Standardkurve.

MTP	Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, beschichtet mit Ziegen-anti-Leptin-Antikörper. Die Vertiefungen sind einzeln abbrechbar.	(8x12) Vertiefungen
A-G	Standards , lyophilisiert (rekombinantes Maus-Leptin), die Konzentrationen sind auf dem Qualitätszertifikat angegeben.	7 x 1 mL
KS	Kontrollserum , lyophilisiert, (Mausserum), die Konzentration ist auf dem Qualitätszertifikat angegeben.	1 x 200 µL
AK	Antikörperkonjugat , 100fach konzentriert, Ziegen-anti-Maus-/Ratten Leptin-Antikörper biotinyliert.	1 x 120 µL
EK	Enzymkonjugat (POD) , 100fach konzentriert Streptavidin-Peroxidase-Konjugat.	1 x 120 µL
VP	Verdünnungspuffer , gebrauchsfertig	1 x 120 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	3 x
	Packungsbeilage	1 x
-	Qualitätszertifikat	1 x

6.2 Nicht mitgelieferte, benötigte Materialien

- Entmineralisiertes Wasser oder destilliertes Wasser (Aqua destillata) (**A. dest.**), 950 mL.
- Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen
- Einmalröhrchen aus Polyethylen PE/ Polypropylen PP Röhrchen zum Verdünnen der Proben
- Vortex-Mixer
- Mikrotiterplattenschüttler (350 rpm)
- Mikrotiterplattenwisher (empfohlen)
- Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und ≥ 590 nm

7 TECHNISCHE HINWEISE

Lagerbedingungen

Nach Erhalt sollte der Test-Kit bei 2 - 8°C (rekonstituierte Reagenzien bei -20°C) bis zum Verfallsdatum gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

Haltbarkeit

Die Haltbarkeit der Reagenzien **nach Öffnung** beträgt 4 Wochen. Nicht verwendete Streifen **der Testplatte** sind zusammen mit dem Trockenkissen **luftdicht** in dem wiederverschließbaren Klippbeutel bei 2° - 8°C zu lagern. Die Streifen bitte nur in dem mitgelieferten Rahmen verwenden. **Rekonstituierte Komponenten** (Standard und Kontrollserum) können bei -20°C (oder kälter) aufbewahrt werden. Zur weiteren Verwendung schnell aber schonend Auftauen (keine Temperaturerhöhung über Raumtemperatur und kein übermäßiges Vortexen). **Das Einfrieren ist nur einmal möglich!** 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 und Kontrollserum 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 wird das Kontrollserum im gleichen Verhältnis 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 (Leerwert, Standards **A - G**, Kontrollserum und Proben) sollten stets in Doppelbestimmung durchgeführt werden. Um optimale Ergebnisse zu erhalten, ist auf genaues Pipettieren und strikte Befolgung des Testprotokolls zu achten. Bei der Testdurchführung sollten Standards **A - G**, Kontrollserum KS und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden z.B. in 15 Minuten). Das Enzymkonjugat **EK** sowie nachfolgend die Substratlösung **S** und die Stopplösung **SL** sollten in der gleichen Reihenfolge und in dem gleichen Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

Schütteln

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

Waschen

Korrektes Waschen ist von grundlegender Bedeutung für den sicheren, richtigen und präzisen Ablauf des Testes. Ungenügendes Waschen ist eine häufige Ursache für nicht valide Testdurchführungen. Mögliche Folgen sind unkontrollierte unspezifische Variationen der gemessenen optischen Dichten, die zu falschen Ergebnisberechnungen der Proben führen können. Mögliche Hinweise darauf sind z.B. hohe Leerwerte und variabel streuende Messwerte. Zum Waschen muss der mitgelieferte und auf Gebrauchskonzentration verdünnte Waschpuffer verwendet werden. Das Waschvolumen pro Waschzyklus und Vertiefung muss mindestens 300 µL betragen.

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

Exemplary version, do not use to perform assays

Manuelles Waschen ist eine gute Alternative. Die Waschflüssigkeit kann dabei per Multistepper, Mehrkanalpipette oder auch mit einer Spritzflasche dispensiert werden. Die Waschflüssigkeit kann durch schwingvolles Ausschwenken der Mikrotiterplatte über einem Becken entfernt werden. Falls Absaugvorrichtungen eingesetzt werden, ist darauf zu achten, dass die Oberflächen der Vertiefungen der Mikrotiterplatte nicht beschädigt werden. Nach jedem einzelnen Waschzyklus sollte die verbleibende Restflüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fuselndem Zellstoff gründlich entfernt werden.

8 TESTDURCHFÜHRUNG

Vorbereitung der Reagenzien

Reagenzpräparation:	Rekonstitution:	Verdünnung:
Standards A-G	in 1 mL Verdünnungspuffer	-
Kontrollserum KS	in 200 µL Verdünnungspuffer	z.B. 1:5 mit Verdünnungspuffer VP
Antikörperkonjugat AK		1:100 mit Verdünnungspuffer VP
Enzymkonjugat EK		1:100 mit Verdünnungspuffer VP
Waschpuffer WP	-	1:20 mit Aqua dest.
Probenverdünnung: z.B. 1:5 (50 µL Serum mit 200 µL Verdünnungspuffer VP), sofort Mischen.		
Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.		
Testdurchführung in Doppelbestimmung:		
Pipettieren	Reagenzien	Position
100 µL	Verdünnungspuffer VP (Leerwert)	A1/2
100 µL	Standard A (25 pg/mL)	B1/2
100 µL	Standard B (50 pg/mL)	C1/2
100 µL	Standard C (100 pg/mL)	D1/2
100 µL	Standard D (200 pg/mL)	E1/2
100 µL	Standard E (400 pg/mL)	F1/2
100 µL	Standard F (800 pg/mL)	G1/2
100 µL	Standard G (1600 pg/mL)	H1/2
100 µL	Kontrollserum KS (1:5 verdünnt)	A3/4
100 µL	Proben (1:5 verdünnt)	in die restlichen Vertiefungen
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.		
Proben-Inkubation: 1 h bei 20 - 25°C, 350 rpm		
3x 300 µL	Absaugen und die Platte 3x mit je 300 µL Waschpuffer WP/ Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µL	1:100 verdünnte Antikörperkonjugat AK	In jede Vertiefung
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.		
Inkubation: 1 h bei 20-25°C, 350 rpm		
3x 300 µL	Absaugen und die Platte 3x mit je 300 µL Waschpuffer WP/ Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µL	1:100 verdünnte Antikörperkonjugat EK	In jede Vertiefung
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.		
Inkubation: 30 Minuten bei 20-25°C, 350 rpm		
3x 300 µL	Absaugen und die Platte 3x mit je 300 µL Waschpuffer WP/ Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µL	Substratlösung S	In jede Vertiefung

Substrat S Inkubation: 30 Minuten im Dunklen bei 20 - 25°C		
100 µL	Stopplösung SL	In jede Vertiefung
Messung der Absorption innerhalb von 15 Minuten bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm).		

9 KALIBRIERUNG DES ASSAYS

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

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

10 AUSWERTUNG

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

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

10.1 Erstellung der Standardkurve

Als Standardmaterial wurde der Internationaler Standard für WHO NIBSC 97/626, verwendet. Die bereitgestellten Standards enthalten folgende Maus-Leptinkonzentrationen:

Standard	A	B	C	D	E	F	G
pg/mL	25	50	100	200	400	800	1600

- 1) Ermittlung des Mittelwerts (MW) der optischen Dichte des Leerwertes aus den Doppelbestimmungen (Vertiefung A1/A2).
- 2) Von den Mittelwerten der optischen Dichte der Standardkonzentrationen und der Proben wird der mittlere Leerwert abgezogen.
- 3) Die Standardkonzentrationen (x-Achse) werden gegen die entsprechend bestimmte optische Dichte (y-Achse) aufgetragen.
- 4) Die Berechnung der Standardkurve sollte durch ein statistisches Programm erfolgen, da die Kurve i.Allg. nicht ideal durch eine lineare Regression beschrieben wird. Ein höhergradiges Polynom, 4-Parameter-Anpassungen oder nicht-lineare Regression sind zur Auswertung geeignet, in manchen Fällen kann eine Spline oder Punkt-zu-Punkt Anpassung angebracht sein.

Exemplary version, do not use to perform assays

- 5) Die Multiplikation des jeweiligen hiermit für die Proben berechneten Leptin-Gehaltes mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor der Proben ergibt die Leptinkonzentration in pg/ml.

10.2 Beispiel einer typischen 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.

Standard	A	B	C	D	E	F	G
pg/mL	25	50	100	200	400	800	1600
OD 450-620 nm (Leerwertkorrigierte Extinktion)	0,031	0,072	0,116	0,244	0,483	0,968	1,841

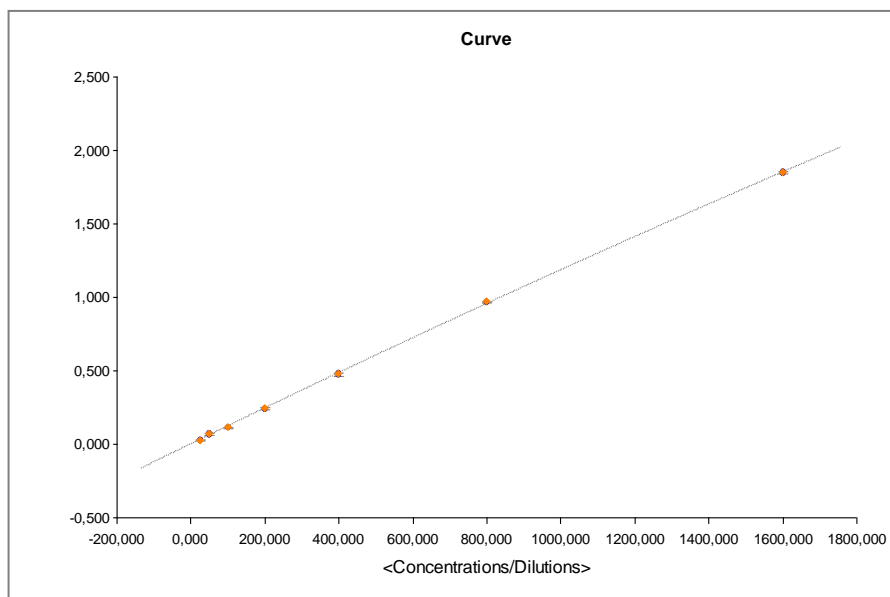


Abbildung 1 Exemplarische Standardkurve

10.3 Beispielhafte Berechnung der Maus /Rat Leptin Konzentration

Probenverdünnung: 1:5

Gemessene Extinktion der Probe: 0,794

Gemessene Extinktion des Leerwertes: 0,134

Differenzdaten der Probe: 0,660

Aus der Differenz der Probenextinktion und der Extinktion des Leerwertes berechnet Ihr Auswertungsprogramm mit der entsprechenden Kurvenanpassung die Leptinkonzentration der verdünnten Probe durch Auflösen der Gleichung (s.u.). In diesem Fall ergibt sich eine Leptinkonzentration in der verdünnten Probe von

$$y = 0,00117x$$
$$x = 548,2 \text{ pg/mL}$$

und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (1:5) somit eine IGF-I Konzentration in der unverdünnten Probe von

$$548,2 \text{ pg/mL} \times 5 = 2741 \text{ pg/mL}$$

11 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG

Die ELISA für Maus/Ratten Leptin (E06) verwendet zwei Polyklonale Antikörper mit hoher spezifischer Affinität für Leptin.

Standards wurden aus rekombinantem Maus-Leptin hergestellt. Er ermöglicht die quantitative Bestimmung von Maus-Leptin.

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

Präparationen vom rekombinanten Maus- und Ratten-Leptin des gleichen Herstellers wurden im Hinblick auf die Quantifizierung durch diesen Test verglichen. Basierend auf der Mengendecklaration des Herstellers wurde im Rattenmaterial im Vergleich zur Maus-Probe ca. 25 % der deklarierten Menge nachgewiesen.

Wenn Sie mit Rattenproben arbeiten, empfehlen wir Ihnen eine individuelle Kalibrierung des Testes vorzunehmen. Der E06-Test ist am internationalen Maus-Leptin Standard der WHO kalibriert (NIBSC Code 97/626 (s. Kapitel 9)).

Die Kreuzreaktivität mit humanem Leptin beträgt 0,7 %.

11.1 Sensitivität

Die praktische Sensitivität des Testes beträgt 10 pg/ml, d.h., 1 pg/Vertiefung (berechnet durch Extrapolation von der Standardkurve).

11.2 Präzision

Intra- Inter-Assay Variabilität

Inter-Assay und Intra-Assay Variationkoeffizienten liegen unter 10 %.

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

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

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

Probe 1 (pg/ml)	1262	1266	1197	1260	1218	1247
---------------------------	------	------	------	------	------	------

Exemplary version, do not use to perform assays

Probe 2 (pg/ml)	869	829	790	826	790	821
Probe 3 (pg/ml)	436	457	464	454	423	418

11.3 Linearität

Die Verdünnungsreihen von Proben ergaben eine Übereinstimmung mit der Standardkurve.

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

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

ENGLISH mouse/rat Leptin ELISA INSTRUCTIONS FOR USE

TABLE OF CONTENTS

ENGLISH	mouse/rat Leptin ELISA INSTRUCTIONS FOR USE	16
1	INTENDED USE	17
2	INTRODUCTION	17
3	PRINCIPLE	18
4	WARNINGS AND PRECAUTIONS	19
5	SAMPLES	20
6	MATERIALS.....	21
7	TECHNICAL NOTES.....	22
8	ASSAY PROCEDURE	23
9	CALIBRATION OF THE ASSAY	24
10	EVALUATION OF RESULTS.....	24
11	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	26
12	Literatur / Literature.....	28
13	INTERNATIONAL ASSAY DESCRIPTION.....	31
14	ASSAY DESCRIPTION.....	32

m/rLeptin ELISA	96 Determinations
RUO	For Research Use Only
Principle of the test	Enzyme Immunoassay
Duration (incubation period)	3 h
Antibody	100fold concentrated
Enzyme Conjugate	100fold concentrated
Dilution Buffer	Ready for use
Washing Buffer	20fach Konzentrat
Standard	Recombinant Mouse Leptin, 7 Separate Standards: 25-1600 pg/ml, lyophilised
Calibration	Calibrated against the international Mouse-Leptin Standard, WHO (NIBSC Code 97/626)
Assay Range	10 pg/mL – 8000 pg/mL
Control	1 Control serum, lyophilised
Sample	Mouse- and Rat- Serum and Plasma
Required sample volume	Up to 50 µL max.
Sample dilution	At least 1:2
Sensitivity	10 pg/mL
Intra- / Interassay Variance	< 10 %

1 INTENDED USE

This enzyme immunoassay kit is suited for measuring Leptin in mouse and rat serum for scientific purposes.

2 INTRODUCTION

Leptin, the product of the ob gene (1,2), is a recently discovered single-chain proteohormone with a molecular weight of 16 kD which is thought to play a key role in the regulation of body weight. Its amino acid sequence exhibits no major homologies with other proteins (1). Leptin is almost exclusively produced by differentiated adipocytes (3-5). It acts on the central nervous system, in particular the hypothalamus, thereby suppressing food intake and stimulating energy expenditure (2,6-9). Leptin receptors - alternatively spliced forms exist that differ in length - belong to the cytokine class I receptor family (10-12). They are found ubiquitously in the body (10,11,13,14) indicating a general role of leptin which is currently not fully understood. A circulating form of the leptin receptor exists which acts as one of several leptin binding proteins (15).

Besides its metabolic effects, leptin was shown to have a strong influence on a number of endocrine axes. In male mice, it blunted the starvation-induced marked decline of LH, testosterone, thyroxine and the increase of ACTH and corticosterone. In female mice, leptin prevented the starvation-induced delay in ovulation (16). Ob/ob mice, which are leptin deficient due to an ob gene mutation, are infertile. This defect could be corrected by administration of leptin, but not through weight loss due to fasting (17), suggesting that leptin is pivotal for reproductive functions.

All these actions may, at least in part, be explained by the suppressive effect of leptin on neuropeptide Y (NPY) expression and secretion by neurons in the arcuate nucleus (6,18,19). NPY is a strong stimulator of appetite (20,21) and is known to be involved in the regulation of

various pituitary hormones, e.g. suppression of GH through stimulation of somatostatin (22,23), suppression of gonadotropins (23) or stimulation of the pituitary-adrenal axis (21). The most important variable that determines circulating leptin levels is body fat mass (24-26). Obviously, under conditions of regular eating cycles, leptin reflects the proportion of adipose tissue (27) showing an exponential relationship (37). This constitutive synthesis of leptin is modulated by a number of non-hormonal and hormonal variables. Stimulators in both rodents and humans are overfeeding (28,29), high fat diets (41), insulin (3,5,30-33) and glucocorticoids (5,34-36). Suppression has been shown for fasting (27), cAMP and beta--3-adrenoceptor agonists (35). From these findings it becomes clear that leptin is an integral component of various metabolic and endocrine feedback loops (38).

3 PRINCIPLE

The Mediagnost m/rLeptin ELISA, E06 is a so-called sandwich-assay. It utilizes two different specific high affinity polyclonal antibodies for this protein. The Leptin in the samples binds quantitatively to the immobilized antibody. In the following step, the biotinylated antibody in turn binds Leptin. After washing, a streptavidin-peroxidase-enzyme conjugate will be added, which will bind highly specific to the biotin of the antibody. Subsequently, the peroxidase catalyzes an enzymatic reaction resulting in a blue coloration. The intensity of the blue color depends on the Leptin content of the sample. The reaction is stopped by the addition of stop solution and color intensity is quantified by measuring the absorption.

4 WARNINGS AND PRECAUTIONS

For In Vitro Use only. For Professional use only.

The Mediagnost kit is suitable only for in vitro and not for internal use in humans and animals. Follow strictly the test protocol. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything has been understood. Mediagnost will not be held responsible for any loss or damage (except as required by statute) howsoever caused, arising out of noncompliance with the instructions provided.

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

Caution: This kit contains material of 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.

Reagents A-G, AK, EK, VP, WP

Contain as preservative a mixture of **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

Mouse and Rat Serum Plasma

Serum as well as Heparin-, EDTA- or Citrate-Plasma plasma are suitable samples. Possible dilution of the sample by the anticoagulant must be considered.

5.2 Specimen collection

Haemolytic reactions have to be avoided.

5.3 Required sample volume:

According to Leptin level of the sample, maximal 50 μL per test.

Samples should be diluted prior to measurement with Dilution Buffer **VP** depending on the expected values.

5.4 Sample stability

Undiluted serum specimen may be stored frozen at -20°C without loss of mouse/rat leptin. Repeated thawing and freezing should be avoided, although levels were found to be unaffected by a few cycles. Diluted samples are stable maximum of 2 h.

5.5 Sample dilution


Generally, a sample dilution of 1:5 to 1:20 is suitable. Depending upon species, stem and breeding and/or the individual experimental conditions this can, however, vary. If very low leptin concentrations are expected, 1:2 diluted samples might be used instead. However, if sample volume is limited, higher dilutions might be useful (provided that leptin concentration is sufficient).

- **1:5** with Dilution Buffer **VP**. E.g. for one double determination, pipette **200 μL** Dilution Buffer **VP** in PE-/PP-Tube (application of a multi-stepper is recommended in larger series); add **50 μL sample** (dilution 1:5). After mixing use **2 x 100 μL** of this dilution in the assay.
- Or, pipette **80 μL** Dilution Buffer **VP** in a well and add **20 μL** Serum (mix well). Depending on the expected Leptin values the samples can be diluted higher in Dilution Buffer **VP**.

6 MATERIALS

6.1 Materials provided

The reagents listed below are sufficient for 96 wells including the standard curve.

MTP	Microtiter plate , ready for use, coated with goat anti-mouse/rat Leptin-antibody. Wells are	(8x12) wells
A-G	Standards , lyophilized, (recombinant mouse Leptin), concentrations are given on vial labels and on quality	7 x 1 mL
KS	Control Serum , lyophilised, (Mouse serum), concentration is given on quality certificate.	1 x 200 µL
AK	Antibody Conjugate , 100-fold concentrated, contains goat biotinylated anti-mouse/rat leptin antibody.	1 x 120 µL
EK	Enzyme Conjugate , 100-fold concentrated contains HRP (Horseradish-Peroxidase)-labelled	1 x 120 µL
VP	Dilution Buffer , ready for use	1 x 120 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 .	3 x
	Instructions for use	1 x
--	Quality Certificate	1 x

6.2 Materials required, but not provided

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

7 TECHNICAL NOTES

Storage Conditions

Store the kit at 2-8°C after receipt until its expiry date. The lyophilized reagents should be stored at –20 °C after reconstitution. Avoid repeated thawing and freezing.

Storage Life

The shelf life of the components **after initial opening** is warranted for **4 weeks**, store the unused strips and microtiter wells **airtight** together with the desiccant at 2-8°C in the clip-lock bag, use in the frame provided. Reconstituted components should be stored at -20°C (or colder). For further use, thaw quickly but gently (avoid temperature increase above room temperature and avoid excessive vortexing). Freezing is only possible once! The 1:20 diluted Washing Buffer **WP** is 4 weeks stable at 2-8°C

Preparation of reagents

Bring all reagents to room temperature (20 - 25°C) before use. Possible precipitations in the buffers have to be resolved before usage by mixing and / or warming. Reagents with different lot numbers cannot be mixed.

Reconstitution

The Standards **A – G** and Control **KS** 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. Thaw quickly but gently for further use (no temperature increases above room temperature and no excessive vortexing). Freezing is only possible once! The wash buffer **WP**, diluted 1:20, is stable for 4 weeks.

Dilution

After reconstitution dilute the Control **KS** with the Dilution Buffer **VP** in the same ratio (1:5) as the sample. The required volume of Washing Buffer **WP** is prepared by 1:20 dilution of the provided 20-fold concentrate with Aqua dest.

Assay Procedure

When performing the assay, Blank, Standards **A-G**, Control **KS** and the samples should be pipette as fast as possible (e.g. <15 minutes). To avoid distortions due to differences in incubation times, Antibody Conjugate **AK** and 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. Stopping Solution **SL** should be added to the plate in the same order as Substrate Solution **S**. All determinations (Blank, Standards **A-G**, Control **KS** 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 Tetramethylbencidine, 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 approx. 350 rpm. Due to certain technical differences deviations may occur, in case the rotation frequency must be adjusted. Insufficient shaking may lead to inadequate mixing of the solutions and thereby to low optical densities, high variations and/ or false values, excessive shaking may result in high optical densities and/ or false values.

Washing

Proper washing is of basic **importance** for a secure, reliable and precise performance of the test. Incomplete washing is common and will adversely affect the test outcome. Possible consequences may be uncontrolled unspecific variations of measured optical densities, potentially leading to false results calculations of the examined samples. Effects like high background values or high variations may indicate washing problems. All washing must be performed with the provided Washing Buffer **WP** diluted to usage concentration. Washing volume per washing cycle and well must be 300 µL at least.

The danger of handling with potentially infectious material must be taken into account. **Manual washing** should be used. Washing Buffer may be dispensed via a multistepper device, a multichannel pipette, or a squirt bottle. Decant contents into a biohazard bin, then blot plate on absorbent tissue. Wash the plate by adding 300µL Washing Buffer **WP**/well, then decant and blot on absorbent tissue. Repeat this step 2 more times for total of 3 washes.

8 ASSAY PROCEDURE

Preparation of reagents		Reconstitution:	Dilution
A-G	Standards	in 1 mL Dilution Buffer VP	-
AK	Antibody		1:100 with Dilution Buffer VP
EK	Enzyme Conjugate		1:100 with Dilution Buffer VP
KS	Control Serum	in 200 µL Dilution Buffer VP	e.g. 1:5 with Dilution Buffer VP

WP	Washing Buffer	-	1:20 with Aqua dest.
Dilute samples 1:5 in Dilution Buffer VP (Mix 50 µL Serum with 200 µL Dilution Buffer VP), mix immediately.			
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 (25 pg/mL)		B1/B2
100 µL	Standard B (50 pg/mL)		C1/C2
100 µL	Standard C (100 pg/mL)		D1/D2
100 µL	Standard D (200 pg/mL)		E1/E2
100 µL	Standard E (400 pg/mL)		F1/F2
100 µL	Standard F (800 pg/mL)		G1/G2
100 µL	Standard G (1600 pg/mL)		H1/H2
100 µL	Control Serum KS (1:5 diluted)		A3/A4
100 µL	Sample (1:5 diluted)		in the rest of the wells according
Cover the wells with the sealing tape.			
Sample-Incubation: 1 h at 20-25°C, 350 rpm			
3x 300 µL	Decant the contents of the wells and wash 3 x with 300 µL		In each well
100 µL	1:100 diluted Antibody Conjugate		In each well
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation: 1 h at 20-25°C, 350 rpm			
3x 300 µL	Decant the contents of the wells and wash 3 x with 300 µL		In each well
100 µL	1:100 diluted Enzyme Conjugate EK		In each well
Incubation: 30 Minutes at 20-25°C, 350 rpm			
3x 300 µL	Decant the contents of the wells and wash 3 x with 300 µL		In each well
100 µL	Substrate Solution S		In each well
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation: 30 Minutes in the Dark at 20-25°C			
100 µL	Stopping Solution SL		In each well
Measure the absorbance within 15 min at 450 nm with ≥ 590 nm as reference wavelength.			

9 CALIBRATION OF THE ASSAY

The Mediagnost Mouse/Rat Leptin ELISA E06 has been calibrated against the International Reference Standard for mouse leptin. The definition of this international reference material, code 97/626, was evaluated in an international collaborative study, with Mediagnost test kits and with participation of Mediagnost (39). The standard preparation of the WHO with code 97/626 (39) is available from the NIBSC (40).

One ampoule of the preparation, reconstituted in 1 ml solution, will be quantified with this kit E06 to the nominal content of 4000 ng mouse leptin.

10 EVALUATION OF RESULTS

The absorbance values of the blank should be below 0.25, these of standard G (1600 pg/ml) should be above 1.0.

The determined and calculated concentration of Control KS should be within the range of the concentration given on vial label.

10.1 Establishing of the standard curve

The standards provided contain the following concentrations of recombinant mouse leptin:

Standard	A	B	C	D	E	F	G
pg/mL	25	50	100	200	400	800	1600

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

10.2 Example of a typical standard curve

The following data is for demonstration only and cannot be used in place of data generation at the time of assay.

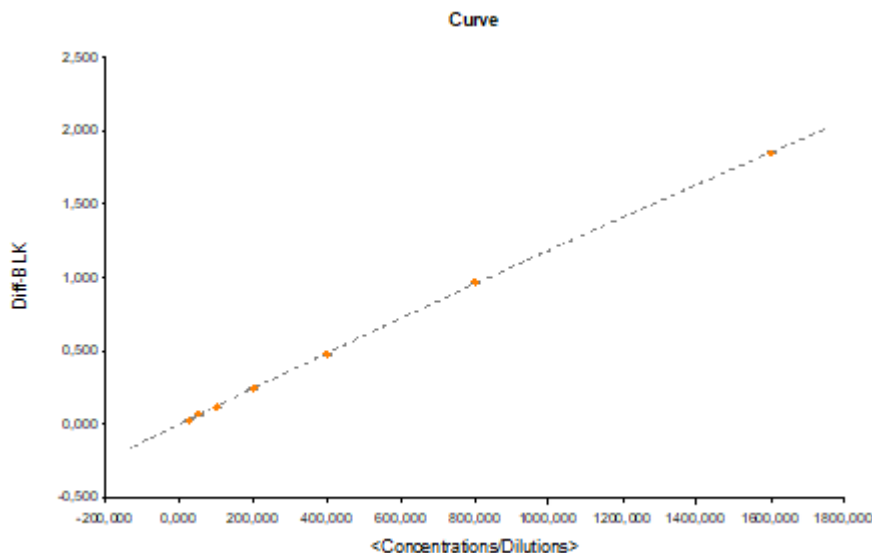


Figure 1 Exemplary standard curve

The exemplary shown standard curve in Figure 3 **cannot** be used for calculation of your test results. You have to establish a standard curve for each test you conduct!

	A	B	C	D	E	F	G
pg/mL	25	50	100	200	400	800	1600
OD (450-620 nm) blank corrected	0.031	0.072	0.116	0.244	0.483	0.968	1.841

10.3 Exemplary calculation of Leptin concentrations

Sample Dilution: 1:5

Measured extinction of your sample:	0.794
Measured extinction of the blank	0.134
Difference Data of the sample	0.660

Your measurement program will calculate the Leptin 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 Leptin concentration in the sample:

$$y = 0.00117x$$

$$x = 548.2 \text{ pg/mL}$$

If the dilution factor (**1:5**) is taken into account the Leptin concentration of the undiluted sample is

$$548.2 \text{ pg/mL} \times 5 = 2741 \text{ pg/mL}$$

11 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The ELISA for Mouse/Rat Leptin E06 utilizes two specific high affinity polyclonal antibodies for these proteins. It recognizes quantitatively mouse leptin. Standards are prepared of recombinant mouse leptin.

A certain degree of cross reactivity against rat leptin allows to use the kit also for measuring rat leptin. Dilutions of rat samples were found as linear as mouse samples. Preparations of recombinant mouse and rat leptin from the same producer were compared regarding their quantification with this kit. The relative potency of the rat material was found to be approx. 25%, compared to the respective mouse material, and, based on the nominal declaration of the producer.

When working with rat samples, individual own calibrating of the kit values is recommended. E06 is calibrated against the WHO NIBSC mouse leptin standard code 97/626 (see above).

The cross reactivity against human leptin is 0.7%.

11.1 Sensitivity

The practical sensitivity of the assay is 10 pg/ml, i.e., 1 pg/well (calculated by extrapolation of the standard curve).

11.2 Precision

Intra- and Inter Assay Variance

Inter-assay and intra-assay variation coefficients were found to be < 10 %,

Table 1 Inter-Assay-Variation: Different sera, independently diluted, measured in duplicate

Sample 1 (pg/ml)	867.9	802.8	874.1	822.5	904.5	821.8	901.9
Sample 2 (pg/ml)	1208.2	1169.6	1306.5	1275.6	1276.8	1212.0	1246.5
Sample 3 (pg/ml)	627.9	631.2	601.0	638.7	590.2	612.2	586.3

Table 2 Intra-Assay-Variation: Different sera independently 1:5 diluted, measured 6fold each in duplicate

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

11.3 Linearity

Dilution was found to be linear over the standard range.

Table 3 Linearity of the sample dilution: Independent assays, independent dilutions as indicated, determinations in duplicate

Dilution	Serum 1 (pg/ml)	Serum 2 (pg/ml)	Serum 3 (pg/ml)	WHO NIBSC Code 97/626 (pg/ml)		
				nominal	1. Dilution results	2. Dilution results
1:2	1002	628	927	1500	1417.5	1609.3
1:4	1170	631	892	750	722.5	838.0
1:8	1212	601	855	375	343.6	397.3
1:16	1307	n.d.	n.d.	187.5	171.0	197.6
1:32	1424	n.d.	n.d.	93.75	88.4	98.2
1:64	1432	n.d.	n.d.	46.88	42.9	53.3
				23.44	21.0	n.d.











12 Literatur / Literature

- 1) Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 372:425-432.
- 1) Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, et al. 1995 Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 269:543-546.
- 2) MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. 1995 Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:9034-9037.
- 3) Rentsch J, Chiesi M. 1996 Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes. *FEBS Lett*. 379:55-59.
- 4) Wabitsch M, Jensen PB, Blum WF, et al. 1996 Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes*. 45:1435-1438.
- 5) Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, et al. 1995 The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature*. 377:530-532.
- 6) Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. 1995 Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. 269:546-549.
- 7) Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, et al. 1995 Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*. 269:540-543.
- 8) Levin N, Nelson C, Gurney A, Vandlen R, de-Sauvage F. 1996 Decreased food intake does not completely account for adiposity reduction after ob protein infusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:1726-1730.
- 9) Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, et al. 1995 Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 83:1263-1271.
- 10) Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, et al. 1996 Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*. 84:491-495.
- 11) Lee GH, Proenca R, Montez JM, et al. 1996 Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*. 379:632-635.
- 12) Lynn RB, Cao GY, Considine RV, Hyde TM, Caro JF. 1996 Autoradiographic localization of leptin binding in the choroid plexus of ob/ob and db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 219:884-889.
- 13) Considine RV, Considine EL, Williams CJ, Hyde TM, Caro JF. 1996 The hypothalamic leptin receptor in humans: identification of incidental sequence polymorphisms and absence of the db/db mouse and fa/fa rat mutations. *Diabetes*. 45:992-994.
- 14) Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, et al. 1996 Evidence of free and bound leptin in human circulation. *J Clin Invest*. 98:1277-1282.
- 15) Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, et al. 1996 Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*. 382:250-252.
- 16) Chehab FF, Lim ME, Lu R. 1996 Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet*. 12:318-320.
- 17) Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, et al. 1996 Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes*. 45:531-535.
- 18) Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. 1996 Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest*. 98:1101-1106.
- 19) Campfield LA, Smith FJ, Burn P. 1996 The OB protein (leptin) pathway - a link between adipose tissue mass and central neural networks. *Horm Metab Res*. 28:619-632.
- 20) Rohner-Jeanrenaud F, Cusin I, Sainsbury A, Zakrzewska KE, Jeanrenaud B. 1996 The loop system between neuropeptide Y and leptin in normal and obese rodents. *Horm Metab Res*. 28:642-648.

- 21) Chan YY, Steiner RA, Clifton DK. 1996 Regulation of hypothalamic neuropeptide-Y neurons by growth hormone in the rat. *Endocrinol.* 137:1319-1325.
- 22) Pierroz DD, Catzeflis C, Aebi AC, Rivier JE, Aubert ML. 1996 Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle inhibits both the pituitary-testicular axis and growth hormone and insulin-like growth factor I secretion in intact adult male rats. *Endocrinol.* 137:3-12.
- 23) Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS. 1995 Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med.* 1:1311-1314.
- 24) Maffei M, Halaas J, Ravussin E, et al. 1995 Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med.* 1:1155-1161.
- 25) Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, et al. 1996 Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med.* 334:292-295.
- 26) Kolaczynski JW, Considine RV, Ohannesian J, et al. 1996 Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: A link with ketogenesis but not ketones themselves. *Diabetes.* 45:1511-1515.
- 27) Harris RB, Ramsay TG, Smith SR, Bruch RC. 1996 Early and late stimulation of ob mRNA expression in meal-fed and overfed rats. *J Clin Invest.* 97:2020-2026.
- 28) Kolaczynski JW, Ohannesian J, Considine RV, Marco C, Caro JF. 1996 Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 91:4162-4165.
- 29) Saladin R, De-Vos P, Guerre-Millo M, et al. 1995 Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature.* 377:527-529.
- 30) Cusin I, Sainsbury A, Doyle P, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. 1995 The ob gene and insulin. A relationship leading to clues to the understanding of obesity. *Diabetes.* 44:1467-1470.
- 31) Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV, et al. 1996 Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: studies in vivo and in vitro. *Diabetes.* 45:699-701.
- 32) Malström R, Taskinen M-R, Karonen S-L, Yki-Järvinen H. 1996 Insulin increases plasma leptin concentrations in normal subjects and patients with NIDDM. *Diabetologia.* 39:993-996.
- 33) De-Vos P, Saladin R, Auwerx J, Staels B. 1995 Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *J Biol Chem.* 270:15958-15961.
- 34) Sliker LJ, Sloop KW, Surface PL, et al. 1996 Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem.* 271:5301-5304.
- 35) Miell JP, Englaro P, Blum WF. 1996 Dexamethasone induces an acute and sustained rise in circulating leptin levels in normal human subjects. *Horm Metab Res.* 28:704-707.
- 36) Blum WF, et al. 1997 Plasma Leptin Levels in Healthy Children and Adolescents: Dependence on Body Mass Index, Body Fat Mass, Gender, Pubertal Stage and Testosterone. *J Clin Endocrinol Metab.* 82:2904-2910.
- 37) Blum WF, 1997 Leptin: The Voice of the Adipose Tissue. *Horm Res.* 48:2-8.
- 38) Robinson CJ, Gaines-Das R, Woollacott D, et al. 2001 The first international standard for human leptin and the first international standard for mouse leptin: comparison of candidate preparations by in vitro bioassays and immunoassays. *J Molecular Endocrinol.* 27: 69-76.
- 39) Address NIBSC: National Institute for Biological Standards and Controls, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Great Britain.
- 40) Bielohuby M, Matsuura M, Herbach N, Kienzle E, Slawik M, Hoefflich A, Bidlingmaier M. Short Term Exposure to Low-Carbohydrate / High Fat Diets Induces Low Bone Mineral

Density and Reduces Bone Formation in Rats. Journal of Bone and Mineral Research, Vol. 25, No. 2, February 2010, pp 275–284

13 INTERNATIONAL ASSAY DESCRIPTION

A-G	STD	Rec in 1 mL BUF VP	-
AK	AK		1:100 DILU BUF VP
EK	EK		1:100 DILU BUF VP
KS	Control	Rec in 200 µL BUF VP	1:5 DILU BUF VP
WP	WASHBUF	-	1:20 DILU A. dest.
-	SPE		1:5 DILU BUF VP
-	°C 20-25 °C ;   max 350 rpm		
100 µL	BUF VP		A1/A2
100 µl	STD A (25 pg/ml)		B1/B2
100 µl	STD B (50 pg/ml)		C1/C2
100 µl	STD C (100 pg/ml)		D1/D2
100 µl	STD D (200 pg/ml)		E1/E2
100 µl	STD E (400 pg/ml)		F1/F2
100 µl	STD F (800 pg/ml)		G1/G2
100 µl	STD G (1600 pg/ml)		H1/H2
100 µl	CONTROL KS	1:5 DILU BUF VP	A3/A4
100 µl	SPE 1:5 DILU	BUF VP	End
TAPE			
 1 h °C 20-25  350 rpm			
3x 300 µL	3x WASHBUF WP		
100 µL	CONJ AK		
TAPE			
 1 h °C 20-25  350 rpm			
3x 300 µL	3x WASHBUF WP		
100 µL	CONJ EK		
TAPE			
 30 min °C 20-25  350 rpm			
3x 300 µL	3x WASHBUF WP		
100 µL	SUBST TMB S		
TAPE			
 30 min °C 20-25 			
H ₂ SO ₄ SL			
MEASURE			

1 ASSAY DESCRIPTION

Preparation of reagents		Reconstitution:	Dilution
A-G	Standards	in 1 mL Dilution Buffer VP	-
AK	Antibody Conjugate		1:100 with Dilution Buffer VP
EK	Enzyme Conjugate		1:100 with Dilution Buffer VP

KS	Control Serum	in 200 µL Dilution Buffer	e.g. 1:5 with Dilution Buffer VP
WP	Washing Buffer	-	1:20 with Aqua dest.
Dilute samples e.g. 1:5 in Dilution Buffer VP (Mix 50 µl Serum with 200 µL Dilution Buffer VP), mix immediately.			
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 (Blanc)	A1/A2
100 µL	Standard A (25 pg/mL)	B1/B2
100 µL	Standard B (50 pg/mL)	C1/C2
100 µL	Standard C (100 pg/mL)	D1/D2
100 µL	Standard D (200 pg/mL)	E1/E2
100 µL	Standard E (400 pg/mL)	F1/F2
100 µL	Standard F (800 pg/mL)	G1/G2
100 µL	Standard G (1600 pg/mL)	H1/H2
100 µL	Control Serum KS (1:5 diluted)	A3/A4
100 µL	Sample (1:5 diluted)	in the rest of the wells according
Cover the wells with the sealing tape.		
Sample-Incubation: 1 h at 20-25°C, 350 rpm		
3x 300 µL	Decant the contents of the wells and wash 3 x with 300 µL	In each well
100 µL	1:100 diluted Antibody Conjugate	In each well
Cover the wells with the sealing tape.		
Incubation: 1 h at 20-25°C, 350 rpm		
3x 300 µL	Decant the contents of the wells and wash 3 x with 300 µL	In each well
100 µL	1:100 diluted Enzyme Conjugate EK	In each well
Incubation: 30 min at 20-25°C, 350 rpm		
3x 300 µL	Decant the contents of the wells and wash 3 x with 300 µL	In each well
100 µL	Substrate Solution S	In each well
Cover the wells with the sealing tape.		
Incubation: 30 Minutes in the Dark at 20-25°C		
100 µL	Stopping Solution SL	In each well
Measure the absorbance within 15 min at 450 nm with ≥ 590 nm as reference wavelength.		