Resistin ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von

humanem Resistin

Deutsch

Enzyme Immunoassay for Quantitative Determination of

human Resistin

English

Europäische Union / European Union:
für In-vitro-Diagnostik / For In Vitro Diagnostic Use
IVD zum Gebrauch durch Fachpersonal! / IVD for professional use!

Alle anderen Länder / All other countries:
Nur für Forschungszwecke. Nicht für diagnostische Anwendungen geeignet.
For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

CE IVD 2-8°C Σ 96 wells

REF **E50**

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version -nicht für Assaydurchführung verwenden

mediagnost®
Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH

: Aspenhaustr. 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/ Sümbolid/ Σύμβολα/ Simboluri/ Simboli/ Symbolit

DIN EN ISO 15223-1

	Expiry date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Data di scadenza/ Fecha de caducidad/ Data de validade/ Uiterste gebruiksdatum/ Udløbsdato/ Bäst före-datum/ Termin ważności/ Lejárati idő/ Čas exspirácie/ Doba exspirace/ Срок на годност/ Aegumiskuupäev/ Ημερομηνία λήξης/ Data de expirare/ Rok uporabe/ Viimeinen käyttöpäivä
	Consider instructions for use/ Bitte Gebrauchsanweisung beachten/ Consultez la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las instrucciones de uso/ Respeitar as instruções de utilização/ A.u.b de gebruiksaanwijzing volgen/ Se brugsanvisningen/ Läs anvisningarna före användning/ Proszę przeczytać instrukcję obsługi/ Vegye figyelembe a használati utasításban foglaltakat/ Postupujte podľa pokynov na použitie/ Dodržujte návod k použití/ Моля, спазвайте инструкцията за употреба/ Palun järgige kasutusjuhendit/ Λάβετε υπόψη σας τις οδηγίες χρήσης/ Vă rugăm să respectaţi instrucţiunile de utilizare/ Upoštevajte navodila za uporabo!/ Lue käyttöohje huolellisesti!
IVD	In vitro Diagnostic Medical Device (for in vitro diagnostic use)/ In-vitro-Diagnostikum (zur In-vitro-Diagnostik)/ Dispositif médical de diagnostic in vitro (Pour usage diagnostique in vitro)/ Dispositivo medico per diagnostica in vitro (per uso diagnostico in vitro)/ Dispositivo médico de diagnóstico in vitro (para uso diagnóstico in vitro)/ Dispositivo Médico para Diagnóstico in vitro (Para Utilização de Diagnóstico in vitro)/ Medisch hulpmiddel voor diagnostiek in vitro (voor diagnostisch gebruik in vitro)/ Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik (Udelukkende til in vitro diagnostisk anvendelse)/ Medicinteknisk produkt avsedd för in vitro-diagnostik (för in vitro-diagnostiskt bruk)/ Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro/ In vitro orvosdiagnosztikai termék (in vitro diagnosztikai használathoz)/ In vitro diagnostický zdravotnícky materiál (určené na diagnostiku „in vitro“)/ In vitro diagnostický zdravotnický materiál (určeno pro diagnostiku „in vitro“)/ Медицинско устройство за ин-витро диагностика (за ин-витро диагностика)/ in vitro diagnostikaseade (in vitro diagnostika tegemiseks)/ In vitro διαγνωστικό (για διάγνωση in vitro)/ Dispozitiv de diagnosticare in vitro (pentru diagnosticarea in-vitro)/ In vitro diagnostika (o in vitro diagnostiki)/ in vitro-diagnostiikkakäyttö
LOT	Lot-Batch Number/ Charge-Chargennummer/ Lot-Code du lot/ Lotto-Numero di lotto/ Lote-Código de lote/ Lote-Código do Lote/Lot-Partijnumme/ Lot-Batchkode/ Partisatskod/ Numer serii/ Tétel-sarzs szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/Partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-număr lot/ Številka serije/ Erä
	Manufactured by/ Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por/ Fabricado por/ Vervaardigd doo/ Fabrikation af/ Tillverkad av/ Wyprodukowane przez/ Gyártotta/ Vyrobené/ Vyrobeno v/ Производител/ Tootja/ Κατασκευάζεται από/ Produs de/ Proizvajalec/ Valmistaja
REF	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/ Каталожен номер/ Tellimisnumber/ Αρ. παραγγελίας/Număr comandă/ Številka naročila/ Viite tai tilausnumero
	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/ Nevystavovať slnečnému svetlu/ Nevystavovat sluwnečnímu světlu/ Да се предпазва от слънчева светлина/ Kaitsta otsese päikesekiirguse eest/ Κρατήστε το μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία/ Ţineţi departe de lumina soarelui/ Ne izpostavljajte sončni svetlobi/ suojaa auringonvalolta
	Store at between/ Lagerung bei zwischen/ Conserver à entre/ Conservare a tra/ Conservar a temp. entre/ Armazenar entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevares mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí/ Температурно ограничение/ Säilitada temperatuuridel/ Φύλαξη σε θερμοκρασία/ Depozitare între/ Skladiščenje med/ Säilytys x-y Celsiusasteen lämpötilassa
Σ	Contains sufficient for x tests/ Inhalt ausreichend für x Tests/ Contient suffisant pour x tests/ Contenuto sufficiente per x test/ Contenido suficiente para x pruebas/ Conteúdo suficiente para x testes/ Bevat voldoende voor x bepalingen/ Indeholder tilstrækkeligt til x prøver/ Innehållet räcker till x analyser/ Zawartość na x testów/ Tartalma x teszt elvégzésére elegendő/ Obsahuje materiál pre x testov/ Obsah dostačuje pro x testů/ Съдържание достатъчно за x тестове/ Sisust jätkub x katse jaoks/ Το περιεχόμενο επαρκεί για x δοκιμές/ Conţinut suficient pentru x teste/ Vsebina zadostuje za x preizkusov/ Sisältö riittää x testille
	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
°C	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/ Pretrepať/ Protřepat/ Разклащане/ Raputada/ Ανακινήστε/ Vibrare/ Stresite/ Sekoita
MTP	Mikrotiterplate/ Mikrotiterplatte/ plaque de microtitrage/ Piastra di microtitolazione/ Placa de microtitulación/ Placa de Microtitulação/ Microtiterplaat/ Mikrotiterplade/ mikrotiterplatta/ microtiterplaat/ Płytka microtiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiiterplaat/ Τρυβλίο μικροτιτλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitrska plošča/ Mikrotitrauslevy
Rec in	Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituir en/ Reconstituir em/ Reconstitueren in/ Rekonstituér i/ Rekonstituera/ Rekonstytuować w/ Helyreállítás/ Znovu pripraviť za/ Znovu připravit za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti/ Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ Rekonstituoi

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment/ Exemplarische Version - nicht für Assaydurchführung verwenden

SPE	Sample/ Probe/ Echantillon/ Campione/ Muestra/ Amostra/ Monster/ Prøve/ prov/ Próbka/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probă/ Vzorec/ Näyte
DET	Antibody Conjugate/ Antikörperkonjugat/ Anticorps conjuguée/ Coniugato di anticorpo/ Conjugado de anticuerpos/ Conjugado anticorpo/ Antilichaamconjugaat/ Antistoffer-konjugat/ Antikroppskonjugat/ Koniugat antyciał/ Antitest páros/ Protilátkový konjugát/ Protilátkový konjugát/ Антитяло конюгат/ Antikehad konjugaat/ Σύμπλοκο αντισώματος/ Compuşi din anticorpi/ Antitelesa konjugat/ Vasta-aine konjugaatti
EC	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/ Compuşi din enzime/ Encima konjugat/ Entsymi konjugaatti
DIL	Dilution Buffer/ Verdünnungspuffer/ Tampon de dilution/ Tampone di diluizione/ Tampón de dilución/ / Tampão de diluição / Verdunningsbuffer/ / Fortyndingsbuffer/ Utspädningsbuffert / Bufor rozcieńczający/ / Hígító puffer/ Riediaci pufor/ Ředicí pufr / Буфер за разреждане/ Lahjenduspuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης / Tampon de diluare/ Pufer za redčenje/ Laimennuspuskuri
SB	Sample Buffer/ Probenpuffer/ Tampon d'échantillon/ Buffer campione/ Tampón de muestra/ Tampão de amostra/ Monsterbuffer/ Prøvebuffer/ Provbuffert/ Bufor próbki/ Mintapuffer/ Pufr na vzorky/ Vzorkovací pufr/ Примерен буфер/ Proovipuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος/ Tampon de probă/ Vzorčni puffer/ Näytepuskuri
X:X	Dilute / Verdünnen / Diluer / Diluire / Diluir / Diluir / Verdunnen / Fortyndes / Späd / Rozcieńczanie / Hígítás / Riediť / Ředit / Разреждане / Lahjendada / Αραιώστε / Diluaţi / Razredčiti / Laimennetaan
CAL A-E	Calibrator X/ Kalibrator X/ calibrateur X/ calibratore X/ calibrador X/ calibrador X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrátor X/ kalibrátor X/ kalibrátor X/ калибратор X/ kalibraator X/ Βαθμονομητής X/ calibrator X/ kalibrator X/ kalibraattori X
CTR1 / CTR2	Control X/ Kontrolle X/ Contôle X/ controllo X/ control X/ Controle X/ controle X/ Kontrol X/ Kontroll X/ kontrolne X/ Ellenőrző X/ Kontrolné X/ Kontrolní X/ Контролен X/ Kontroll X/ ελέγχου X/ control X/ Kontrolni X/ Kontrolli X
WB	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/ Mosópuffer koncentrátum/ Koncentrát vymývacieho pufra/ Концентрат на промивен буфер/ Pesupuhvri kontsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralnega pufra/ Pesuliuositiiviste
WB 1:20	Washing Buffer/ Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón de lavado/Tampão de Lavagem/ wasbuffer/ Vaskebuffer/ tvättbuffert/ Bufor płukania/ Mosópuffer/ Vymývací pufer/ Vymývací pufr/ Промивен буфер/ Pesupuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare /Izpiralni pufer/ Pesuliuos
S	Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ substraat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Szubsztrátum/ Substrát/ Substrát/ Субстрат Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraattiliuos
STP	Stop Solution/ Stopplösung/ Stop Solution/ Soluzione di stop/ Stop Solución/ Solução Stop/ stopoplossing/ Stopopløsning/ Stopplösning/ Stop roztwór/ Megállító oldat/ Roztok na ukončenie/ Roztok pro ukončení/ Стопиращ разтвор/ Stopp-lahus/ Διάλυμα διακοπής/ Soluţie de oprire/ Stop raztopina/ Pysäytysliuos
TAPE	Cover Plate with sealing tape/ Platte abkleben/ Recouvrir la microplaque avec bande adhésive/ Coprire la piastra con nastro adesivo/ Cubrir la placa con una cinta adhesiva/ Cobrir a Placa com fita adesiva/ plaatje met tape afdekken/ Afdækningsplade med tape/ maskera platta/ Odkleić płytkę/ Tányér leragasztása/ Oblepiť podložku lepiacou páskou/ Olepit podložku lepicí páskou/ Плака с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerkleeplindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperiţi 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 dónde pour référence/ Misurazione entro 30 min. a 450 nm (filtro di riferimento ≥ 590 nm)/ Medición de la placa dentro de los siguientes 30 min a 450 nm (filtro de referencia ≥ 590nm)/ Medir a placa dentro de 30 min a 450 nm (Filtro de referência ≥ 590 nm)/ Binnen 30 minuten bij 450 nm meten (referentiefilter ≥ 590 nm)./ Mål plade i løbet af 30 min ved nm (referencefilter ≥590 nm)/ Mät inom 30 min vid 450 nm (referensfilter ≥ 590 nm)./ Pomiar w ciągu 30 min przy 450 nm (filtr odniesienia ≥ 590 nm)/ Ki mérés 30 percen belül 450 nm-nél (referenciaszűrő ≥ 590 nm)/ Merať 30 minút pri 450 nm (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)/ Mõõtmine 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 referinţă ≥ 590 nm)/ Izmerite ploščico v 30 min pri 450 nm (referenčni filter ≥590nm)/ Mittaa 30 minuutin aikana 450 nm:ssä (referenssi suodatin ≥ 590 nm)
Literature	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/ instrucţiuni internaţionale 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 cavităţile necesare/ v vseh zahtevanih vdolbinah/ kaikkiin tarvittaviin mikrotitrauslevyn syvennyyksiin

Exemplary Version not to be used according to the Instructions for use / Exemplarische Version nicht für Arbeitsdurchführung verwenden

INHALTSVERZEICHNIS / TABLE OF CONTENTS

DEUTSCH Resistin ELISA E50 Gebrauchsanweisung 5
1 ZWECKBESTIMMUNG 5
2 EINFÜHRUNG 5
3 METHODE 6
4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN 7
5 MATERIALIEN 8
6 PROBEN 9
7 TECHNISCHE HINWEISE 10
8 TESTDURCHFÜHRUNG 11
9 QUALITÄTSKONTROLLE 12
10 ERSTELLUNG DER KALIBRATIONSKURVE 12
11 EINE BEISPIELHAFTE KALIBRATIONSKURVE 13
12 LEISTUNGSMERKMALE 13
13 REFERENZWERTE 15
14 WISSENSCHAFTLICHE ANWENDUNGEN 16

ENGLISH Resistin ELISA E50 Instructions for Use 18
1 INTENTED USE 18
2 INTRODUCTION 18
3 METHOD 19
4 WARNINGS AND PRECAUTIONS 20
5 MATERIALS 21
6 SAMPLES 22
7 TECHNICAL NOTES 23
8 ASSAY PROCEDURE 24
9 QUALITY CONTROL 25
10 ESTABLISHING THE CALIBRATION CURVE 25
11 PERFORMANCE CHARACTERISTICS 27
12 EVALUATION OF RESULTS 28
13 SCIENTIFIC APPLICATION 29
14 LITERATUR / LITERATURE 30
15 INTERNATIONAL ASSAY PROCEDURE 31
16 ASSAY PROCEDURE 32

Exemplary Version - do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version - nicht für Assaydurchführung verwenden

DEUTSCH Resistin ELISA E50 Gebrauchsanweisung

Resistin ELISA E50	96 Bestimmungen
CE	DE/CA40/00809/14/1
Testprinzip	Enzyme-linked Immunoassay
Dauer (Inkubationszeit)	4 h
Antikörper	Spezifische polyklonale Antikörper
Kalibratoren	Ist kalibriert mit rekombinantem Resistin 5 Einzel-Kalibratoren: 0,02 - 1 ng/mL, rekombinantes Resistin.
Assay-Bereich	0,012 – 21 ng/mL
Kontrollen	2 Kontrollen, gefriergetrocknet
Proben	Human Serum / Plasma
Erforderliches Probenvolumen	15 µL
Probenverdünnung	1:21
Analytische Sensitivität	ø 0,012 µg/L
Intra- / Interassay Variation	ø < 10 %

Exemplarische Version -nicht für Assaydurchführung verwenden
Exemplary version not for assay accomplishment

1 ZWECKBESTIMMUNG

Messung von humanem Resistin in menschlichem Serum und Plasma

2 EINFÜHRUNG

Resistin, ein 11,3 kDa (1) großes, cysteinreiches Protein wurde, als erstes bei Mäusen gefunden (2) und bildet mit den nahverwandten Proteinen RELMα, RELMβ und RELMγ die Proteinfamilie der „resistin-like molecules“ (RELM). Im Menschen konnte bisher Resistin und RELMβ (3) aber keine anderen Resistin-ähnlichen Proteine nachgewiesen werden. Die humane Form des Resistins weist eine Homologie von 53% zum murinen Protein auf (4). Humanes Resistin besitzt 11 Cysteinreste. Es wird als Propeptid von 108 Aminosäuren synthetisiert und als Dimer, bestehend aus je 92 Aminosäuren, sekretiert. Intramolekular liegen fünf Disulfidbrücken vor, zudem erfolgt die Dimerisierung über eine intermolekulare Disulfidbrücke, welche vom Cystein22 (homolog zum murinen Cys26) gebildet wird (5, 6). Aufgrund von Größenausschlusschromatographie konnte die Existenz von oligomeren Resistin-Formen nachgewiesen werden, dabei zeigten sich die oligomeren Strukturen SDS-insensitiv und β-Mercaptoethanol-sensitiv, so dass sie auf Disulfidbrückenbildung zurückgeführt werden können (1). CD- (Circular Dichroismus-) spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass sich die Konformation des Resistins in Abhängigkeit von der Konzentration von α-helicalen zu β-sheet Strukturen verschiebt (1). Die weiterführenden Strukturuntersuchungen beziehen sich zum größten Teil auf das Maus-Modell. Hier konnte gezeigt werden, dass Resistin als Trimer und Hexamer im Serum auftritt (7). In Analogie zum Adiponectin liegt die Vermutung nahe, dass die unterschiedlichen Multimere auch verschiedene biologische Funktionen ausüben (8, 9).

In der Maus konnte die Resistinexpression im weißen Fettgewebe nachgewiesen werden (10), es wird aber auch in der Hypophyse (11) und den Langerhanschen Inseln (12) sowie im braunen Fettgewebe von Ratten exprimiert. Die Resistinexpression in humanen Adipocyten ist dagegen zwar nachweisbar, jedoch in der Menge minimal. Im In-vitro-Versuch konnte allerdings die Produktion von Resistin durch Nicht-Fettzellen in Fettgewebeexplantaten nachgewiesen werden (13). Das humane Resistin-Gen wird vorwiegend im Knochenmark, Lunge und von Pre-Adipocyten (14) sowie Makrophagen (15) wie auch in den Langerhanschen Inseln (12) exprimiert. Ein

Rezeptor, der die biologische Wirkung des Resistins vermitteln könnte, ist bisher noch nicht beschrieben.

Im Maus-Modell konnte ein empirischer Zusammenhang zwischen Fettsucht, Insulin-Resistenz und Resistinkonzentration gezeigt werden. Im humanen System dagegen sind die Ergebnisse entsprechender Studien bisher nicht eindeutig interpretierbar. Zur Assoziation von Resistinkonzentrationen und Adipositas bzw. Insulin-Resistenz im Menschen gibt es zahlreiche Untersuchungen. In einer Reihe dieser Studien kann ein Zusammenhang zwischen der Resistinkonzentration und Fettsucht und/oder Insulin-Resistenz festgestellt werden (16-23). Andere können dies nicht eindeutig bestätigen (14, 16-24).
Im Hinblick auf die Bedeutung von Resistin bei Störungen des Energiestoffwechsels konnte eine signifikante Reduktion des Resistinspiegels bei Patienten mit Anorexia nervosa gezeigt werden (24).

Die Bedeutung von Resistin für weitere physiologische Prozesse wurde auf verschiedenste Weise untersucht. Interessante Ergebnisse zeigten insbesondere Experimente mit Endothelzellen. Hier konnte nachgewiesen werden, dass Resistin die Expression bestimmter Zellmarker wie VACM-1 und ICAM-1 verstärkt (25, 26) und damit möglicherweise endotheliale Entzündungsprozesse (27, 28) und Arteriosklerose beeinflusst. Eine solche Verbindung wird durch Ergebnisse im Tiermodell unterstützt, wo gezeigt werden konnte, dass die Resistin-Sekretion durch Endothelin-1 reguliert wird (29). Die Verbindung zum Endothelin-1 zeigt darüber hinaus, dass Resistin auch in cardiovaskulären Erkrankungen eine Rolle spielen kann (30).
In neusten Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass Resistin die Lipolyse durch reife Adipocyten sowie die Proliferation von Präadipocyten stimuliert (31).
Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass Resistin als Adipozytokin auf vielfältige Prozesse im Organismus Einfluss nimmt, die biologische Bedeutung der Resistin-Wirkung jedoch noch weitgehend unklar ist. Mit optimierten Spezial-Probenpuffer: sichere Quantifizierung von Resistin - unabhängig vom Absolut-Gehalt.

3 METHODE

Der Enzymimmunoassay für Resistin E50 ist ein sogenannter Sandwich-Assay. Er verwendet ein spezifisches, hochaffines polyklonales Kaninchen Antiserum. Das an die Mikrotiterplatte gekoppelte Antiserum bindet quantitativ das Resistin aus der Probe, im nachfolgenden Schritt bindet wiederum biotinyliertes Antiserum am Resistin. Danach kann das Streptavidin-Peroxidase-Enzymkonjugat hochspezifisch am Biotin des Antiserums binden und in der abschließenden Substratreaktion den Farbumschlag quantitativ, abhängig vom Resistin-Gehalt der Proben, katalysieren.

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version - nicht für Assaydurchführung verwenden

4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Für In-Vitro-Diagnostik. Zum Gebrauch durch Fachpersonal.
Der Mediagnost Kit ist nur zur In-vitro-Diagnostik und nicht zur inneren Anwendung bei Menschen und Tier geeignet. Dieses Produkt darf nur exakt wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben eingesetzt werden. Mediagnost GmbH kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht, soweit keine gesetzliche Regelung anderes besagt.
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: **Kontrollen CTR1 & CTR2**
Das humane Material, das für die Präparation dieses Produktes verwendet wird, wurde mit negativem Ergebnis auf Humanes 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 Kalibratoren **CAL A-E, DET, EC, SB, DIL, WB**
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.

Substrat 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 STP
Die Stopplösung enthält 0,2 M Schwefelsäure (H_2SO_4).

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

4.1 *Erste-Hilfe Maßnahmen:*

Nach Hautkontakt: Nach Berührung mit der Haut mindestens 15 Minuten lang mit genügend Wasser abwaschen. Kontaminierte Kleidung und Schuhe wechseln.
Nach Augenkontakt: Nach Berührung mit den Augen mindestens 15 Minuten lang mit genügend Wasser spülen. Ausreichende Spülung durch Spreizung der Augenlider sicherstellen.
Nach Verschlucken: Mund mit Wasser ausspülen, vorausgesetzt die Person ist bei Bewusstsein. Sofort einen Arzt zuziehen.

Exemplary version as an instrument / Exemplarische Version - nicht für Assaydurchführung verwenden

5 MATERIALIEN

5.1 Inhalt der Testpackung

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

MTP	**Mikrotiterplatte,** gebrauchsfertig, beschichtet mit Kaninchen Antikörpern gegen humanes Resistin. Die Vertiefungen sind einzeln abbrechbar.	**(8x12) Vertiefungen**
CAL A-E	**Kalibratoren,** lyophilisiert (rekombinantes humanes Resistin), die Konzentrationen sind auf dem Qualitätszertifikat angegeben. **In 750 µL Probenpuffer SB rekonstituieren**.	**5 x 750 µL**
CTR1	**Kontrolle 1**, lyophilisiert, (humanes Serum), die Konzentration ist auf dem Qualitätszertifikat angegeben. **In 250 µL Verdünnungspuffer DIL rekonstituieren**, mit **Probenpuffer SB verdünnen**.	**1 x 250 µL**
CTR2	**Kontrolle 2**, lyophilisiert, (humanes Serum), die Konzentration ist auf dem Qualitätszertifikat angegeben. **In 250 µL Verdünnungspuffer DIL rekonstituieren,** mit **Probenpuffer SB verdünnen**.	**1 x 250 µL**
DET	**Antikörper-Konjugat**, 100-fach konzentrierte Lösung, Kaninchen-anti-hResistin-Antikörper biotinyliert und muss vor Gebrauch. 1:100 mit **Verdünnungspuffer DIL** verdünnt werden.	**1 x 120 µL**
EC	**Enzymkonjugat (POD),** 100-fach konzentrierte Lösung, Streptavidin-Peroxidase-Konjugat. Enthält POD (Meerettich-Peroxidase) -markiertes Streptavidin und muss vor Gebrauch 1:100 mit **Verdünnungspuffer DIL** verdünnt werden.	**1 x 120 µL**
SB	**Probenpuffer**, gebrauchsfertig	**1 x 120 mL**
DIL	**Verdünnungspuffer,** gebrauchsfertig	**1 x 25 mL**
WB	**Waschpuffer**, 20fach konzentrierte Lösung 1:20 mit Aqua dest. Verdünnen.	**1 x 50 mL**
S	**Substrat**, gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase (POD)-Substrat, stabilisiertes Tetramethylbenzidin.	**1 x 12 mL**
STP	**Stopplösung**, gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure.	**1 x 12 mL**
-	**Abdeckfolie** für die **Mikrotiterplatte**	**3 x**
	Packungsbeilage	**1 x**
-	**Qualitätszertifikat**	**1 x**

Exemplary version do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version-nicht für Assaydurchführung verwenden

5.2 Nicht mitgelieferte, benötigte Materialien

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

6 PROBEN

6.1 Probenmaterial

Serum und Plasma

(Signifikante Abweichungen der Resistin-Werte in entsprechenden Serum-, Heparin-, EDTA-, Citrat-Plasma-Proben wurden nicht gefunden. Eine mögliche Verdünnung der Probe durch das Antikoagulans muss berücksichtigt werden).

Hämolytische Proben scheinen unter Umständen falsch hohe Werte zu liefern, Verwendung solcher Proben sollte kritisch überprüft werden.
Durch den speziellen Probenpuffer ist eine externe Probenvorbehandlung nicht nötig.

6.2 Probenentnahme

Das Blut zur Probengewinnung mittels standardmäßiger Venenpunktion entnehmen. Hämolytische Reaktionen sind zu vermeiden.

6.3 Erforderliches Probenvolumen*:* 15 µL

6.4 Probenstabilität

In fest verschließbaren Plastikgefäßen:

- Lagerung bei 20-25°C max. 2 Tage
- Lagerung bei -20°C mind. 2 Jahre

Die Lagerung von Proben, über einen Zeitraum von 2 Jahren bei -20°C, zeigte keinen Einfluss auf den Messwert.

Einfrieren und Auftauen der Proben sollte minimiert werden.

6.5 Interferenz

Hämoglobin, Triglyceride und Bilirubin in der Probe stören nicht bis zu einer Konzentration von **1 mg/mL, 100 mg/mL** bzw. **100 µg/mL**. Der Einsatz hämolytischer, lipämischer oder ikterischer Proben sollte trotzdem zuvor vom Anwender validiert werden.

6.6 Probenverdünnung

- Verdünnung: **1:21** mit Probenpuffer **SB**

  300 µL Probenpuffer **SB** in PE-/PP-Gefäße vorlegen (bei größeren Serien empfiehlt sich hierfür die Verwendung eines Multi-Steppers), dazu **15 µL** Serum- oder Plasma pipettieren (Verdünnung 1:21). Nach dem Mischen werden von dieser Lösung 2 x 100 µL im Assay eingesetzt.

- Gegebenenfalls kann, je nach erwarteten Resistin-Werten, geringer oder stärker in Probenpuffer **SB** verdünnt werden. **Die Proben müssen in Probenpuffer SB verdünnt werden.** Die gute Linearität des Testsystems (vgl. Leistungsmerkmale) ermöglicht Probenverdünnungen von 1:5 – 1:400. Für die meisten Untersuchungen (Serum- oder Plasmaproben bei denen keine Extremwerte zu erwarten sind) sollten Verdünnungen von 1:10 bis 1:50 in Probenpuffer **SB** geeignet sein.

  Achtung: Serum- und Plasmaproben müssen mind. **1:5** in Probenpuffer **SB** verdünnt werden, da der Probenpuffer eine spezielle Zusammensetzung hat, die für die korrekte Bestimmung des Resistins abgestimmt wurde.

Exemplary Version - do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version -nicht für Assaydurchführung verwenden

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** (**CAL A – E** und Kontrollen **CTR1** und **CTR2**) sollten bei **-20°C** aufbewahrt werden.
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.
Zur weiteren Verwendung schnell aber schonend auftauen (keine Temperaturerhöhung über Raumtemperatur und kein übermäßiges Vortexen). Der 1:20 gebrauchsfertig verdünnte Waschpuffer **WB** ist 4 Wochen haltbar bei **4°C.**

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 dürfen nicht vermischt werden.

Rekonstitution
Für die **Rekonstitution** der lyophilisierten Kalibratoren **CAL A-E** muss der im Kit erhaltene Probenpuffer **SB** verwendet werden.

Für die **Rekonstitution** der lyophilisierten Kontrollen **CTR1** und **CTR2** muss der Verdünnungspuffer **DIL** verwendet 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 Kalibratoren und Kontrollen können **bei -20°C für 4 Wochen** gelagert werden. Wiederholte Gefrier-/Tauzyklen sind zu vermeiden.

Verdünnung
Nach der Rekonstitution werden die Kontrollen **CTR1** und **CTR2** im gleichen Verhältnis (1:21) wie die Proben mit dem Probenpuffer **SB** verdünnt.
Das benötigte Volumen des Waschpuffers **WB** wird vorbereitet, indem das 20fach Konzentrat im Verhältnis 1:20 mit Aqua dest. verdünnt wird. Der endverdünnte Waschpuffer kann 4 Wochen bei 4°C gelagert werden

Antikörper-Konjugat DET und **Enzymkonjugat EC**
Für die Verdünnung der Konzentrate des Antikörperkonjugates **DET** und Enzymkonjugates **EC** wird der Verdünnungspuffer **DIL** verwendet. Die gebrauchsfertig 1:100 verdünnten Lösungen sind nur begrenzt haltbar und sollten täglich frisch angesetzt werden.

Substrat
Das Substrat **S**, stabilisiertes Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich – Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

Testdurchführung
Die Messungen (Leerwert, Kalibratoren **CAL A-E**, Kontrollen **CTR1** und **CTR2** 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 Kalibratoren **CAL A-E**, Kontrollen **CTR1** und **CTR2** und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden). Das Antikörper-Konjugat **DET** Enzym-Konjugat **EC** sowie nachfolgend das Substrat **S** und die Stopplösung **STP** sollten in der gleichen Reihenfolge und in dem gleichen Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

Inkubation
Inkubation bei Raumtemperatur bedeutet: **Inkubation bei 20-25°C**. Das Substrat **S**, stabilisiertes Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich– Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

Schütteln
Die Inkubationen sollen geschüttelt bei mittlerer Umdrehungsfrequenz eines für Mikrotiterplatten geeigneten Schüttlers erfolgen. Wir empfehlen 350 rpm. Bauartbedingt kann die Schüttelfrequenz angepasst werden müssen. Zu geringes Schütteln kann durch ungenügende Vermischung der Lösungen zu verringerten optischen Dichten, hohen Streuungen und/oder falschen Werten führen, zu starkes Schütteln dagegen zu erhöhten optischen Dichten und/oder falschen Werten.

Waschen
Korrektes Waschen ist von grundlegender Bedeutung für den sicheren, richtigen und präzisen Ablauf des Testes. Ungenügendes Waschen ist eine häufige Ursache für nicht valide Testdurchführungen. Mögliche Folgen sind unkontrollierte unspezifische Variationen der gemessenen optischen Dichten, die zu falschen Ergebnisberechnungen der Proben führen können. Mögliche Hinweise darauf sind z.B. hohe Leerwerte und variabel streuende Messwerte. Zum Waschen muss der mitgelieferte und auf Gebrauchskonzentration verdünnte Waschpuffer verwendet werden. Das Waschvolumen pro Waschzyklus und Vertiefung muss mindestens 300 µL betragen.
Die 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 fusselndem Zellstoff.
Manuelles Waschen ist eine gute Alternative. Die Waschflüssigkeit kann dabei per Multistepper, Mehrkanalpipette oder auch mit einer Spritzflasche dispensiert werden. Die Waschflüssigkeit kann durch schwungvolles Ausschwenken der Mikrotiterplatte über einem Becken entfernt werden. Falls Absaugvorrichtungen eingesetzt werden, ist darauf zu achten, dass die Oberflächen der Vertiefungen der Mikrotiterplatte nicht beschädigt werden. Nach jedem einzelnen Waschzyklus sollte die verbleibende Restflüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fusselndem Zellstoff gründlich entfernt werden.

Kommentar Version-draft not for assay accomplishment / Entwurfsversion nicht für Assaydurchführung verwenden

8 TESTDURCHFÜHRUNG

Vorbereitung der Reagenzien

Reagenzpräparation:		Rekonstitution:	Verdünnung:
CAL A-E	**Kalibratoren**	in **750 µL** Probenpuffer **SB**	-
CTR1	**Kontrolle 1**	in **250 µL** Verdünnungspuffer **DIL**	**1:21** mit Probenpuffer **SB**
CTR2	**Kontrolle 2**	in **250 µL** Verdünnungspuffer **DIL**	**1:21** mit Probenpuffer **SB**
DET	**Antikörper-Konjugat** Konz.	-	**1:100** mit Verdünnungspuffer **DIL** ➔ **DET 1:100**
EC	**Enzymkonjugat** Konz.	-	**1:100** mit Verdünnungspuffer **DIL** ➔ **EC 1:100**
WB	**Waschpuffer** Konz.	-	**1:20** mit **Aqua dest.** ➔ **WB 1:20**
Proben + Kontrollen CTR1 und **CTR2** mit Probenpuffer **SB 1:21** verdünnen, **sofort mischen,** (z.B. 15 µL Serum mit 300 µL Probenpuffer **SB** mischen).			
Vor der Testdurchführung alle **Reagenzien** auf **Raumtemperatur (20-25°C)** bringen.			

Testdurchführung in Doppelbestimmung:

Pipettieren	Reagenzien	Position
100 µL	Probenpuffer **SB** (Leerwert)	A1/A2
100 µL	Kalibrator **A** (**0,02 ng/mL**)	B1/B2
100 µL	Kalibrator **B** (**0,1 ng/mL**)	C1/C2
100 µL	Kalibrator **C** (**0,3 ng/mL**)	D1/D2
100 µL	Kalibrator **D** (**0,6 ng/mL**)	E1/E2
100 µL	Kalibrator **E** (**1,0 ng/mL**)	F1/F2
100 µL	Kontrolle **CTR1** (1:21 verdünnt)	G1/G2
100 µL	Kontrolle **CTR2** (1:21 verdünnt)	H1/H2
100 µL	Probe **SPE** (1:21verdünnt)	in die restlichen Vertiefungen nach Bedarf pipettieren
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.		
Proben-Inkubation: 2 h bei 20 - 25°C, 350 rpm		
5x 300 µL	Absaugen und die Platte **5x** mit je **300 µL** Waschpuffer **WB 1:20** / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µL	Antikörper-Konjugat **DET 1:100**	In jede Vertiefung
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.		
Inkubation: 1 h bei 20 - 25°C, 350 rpm		
5x 300 µL	Absaugen und die Platte **5x** mit je **300 µL** Waschpuffer **WB 1:20** / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µL	Enzymkonjugat **EC 1:100**	In jede Vertiefung
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.		
Inkubation: 30 min bei 20 - 25°C, 350 rpm		
5x 300 µL	Absaugen und die Platte **5x** mit je **300 µL** Waschpuffer **WB 1:20** / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µL	Substrat **S**	In jede Vertiefung
Substrat S Inkubation: 30 Minuten im Dunklen bei 20 - 25°C		
100 µL	Stopplösung **STP**	In jede Vertiefung
Messung der Absorption innerhalb von 30 min bei **450 nm** (Referenzfilter ≥ 590 nm).		

Exemplarische Version - nicht zur Durchführung verwenden
Exemplarische Version - nicht zur Durchführung verwenden

9 QUALITÄTSKONTROLLE

GLP (Good Laboratory Practice) erfordert, dass mit jeder Kalibrationskurve Kontrollen mitgeführt werden. Darüber hinaus muss der Benutzer die Regeln von GLP oder anderen geltenden Bundes-, Landes- oder lokalen Standards / Gesetzen strikt einhalten. Die Kit-Kontrollen müssen innerhalb der zulässigen Bereiche, die auf dem QC-Zertifikat angegeben worden sind, gefunden werden. Wenn die Kriterien nicht erfüllt sind, ist der Test ungültig und sollte wiederholt werden.

9.1 Qualitätskriterien

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

10 ERSTELLUNG DER KALIBRATIONSKURVE

Die bereitgestellten Kalibratoren erhalten folgende rek.Resistin-Konzentrationen

Kalibrator	A	B	C	D	E
ng/mL	0,02	0,10	0,30	0,60	1,00
pg/mL	20	100	300	600	1000

1 Ermittlung des Mittelwertes der optischen Dichte des Leerwertes aus den Doppelbestimmungen (Vertiefung A1/A2).

2 Von den Mittelwerten der optischen Dichte der Kalibratoren, Proben und Kontrollen wird der mittlere Leerwert abgezogen.

3 Die Kalibratorkonzentrationen (x-Achse) werden gegen die gemessene optische Dichte (y-Achse) aufgetragen.

4 Die Berechnung der Kalibrationskurve 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** und Kontrollen **CTR1** und **CTR2** berechneten Resistin-Gehaltes mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor der Proben und Kontrollen ergibt die Resistin-Konzentration in ng/mL (oder pg/mL, je nach gewählter Einheit der Kalibratoren).

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version -nicht für Testdurchführung verwenden

11 EINE BEISPIELHAFTE KALIBRATIONSKURVE

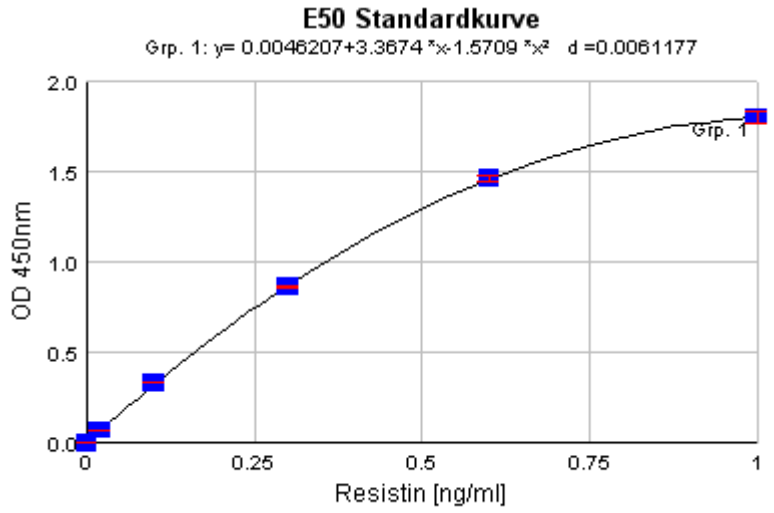

Abb. 1: Typische Kalibrationskurve mit einem Polynom 2. Grades zur Berechnung der Kalibrationskurve

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

Beispielhafte Berechnung der Resistinkonzentration einer 1:21 verdünnten Probe:

Gemessene Extinktion der Probe:	0,85
Gemessene Extinktion des Nullwertes:	0,05

Aus der Differenz der Probenextinktion und der Extinktion des Leerwertes (0,05) **berechnet Ihr Auswertungsprogramm** mit der entsprechenden Kurvenanpassung (hier: Polynom 2. Grades) die Resistinkonzentration der verdünnten Probe durch Auflösen der Gleichung aus Abb. 1 nach x. In diesem Fall ergibt sich eine Resistinkonzentration in der verdünnten Probe von

$$0{,}8 = 0{,}0046207 + 3{,}3674x - 1{,}5709x^2$$
$$0{,}2686 = x$$

und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (**1:21**) somit eine Resistinkonzentration in der unverdünnten Probe von

$$0{,}2686 \times 21 = 5{,}64 \text{ ng/mL} = 0{,}00564 \text{ µg/mL}$$

12 LEISTUNGSMERKMALE

12.1 Kalibrator

Die Kalibratoren des ELISA E50 bestehen aus **rekombinantem humanem** Resistin (19,5 kD, 2 x 92 Aminosäuren, exprimiert in E. coli) in Konzentrationen von **20, 100, 300, 600 bis 1000** pg/mL (pico Gramm/mL, entspricht 0,02 bis 1 ng/mL).

12.2 Sensitivität

Die analytische Sensitivität wurde durch Messung des Leerwertes bestimmt. Dazu wurde die Signalintensität von Leerwert + 2SA anhand der Kalibrationskurve in eine Resistin Konzentration umgerechnet. Die analytische Sensitivität des Assays beträgt 0,012 ng/mL.

Exemplarische Version-do not use for assay accomplishment/ Exemplarische Version -nicht für Assaydurchführung verwenden

12.3 Interferenz

Die Interferenz physiologisch auftretender Substanzen wurde durch Zugabe unterschiedlicher Mengen dieser Substanzen zu Serumproben getestet. In Tabelle 1 ist die relative Wiederfindung im Vergleich zum Serum ohne Zusätze für die maximal zugegebene Menge der potentiell interferierenden Substanz dargestellt. Keine der untersuchten Substanzen beeinflusst das Ergebnis des Testes signifikant.

Tabelle 1: Interferenz: Drei Serum Proben wurden mit den angegebenen Mengen der potentiell beeinflussenden Substanzen angereichert und gemessen. Angezeigt wird % von Resistin der nativen, nicht angereicherten Serum Proben.

	Triglyceride	**Bilirubin**	**Hämolysat**
	100 mg/mL	**100 µg/mL**	**1000 µg/mL**
Serum 1	101	93	94
Serum 2	115	99	99
Serum 3	104	103	147

Tabelle 2: Die Einflüsse der Koagulationshemmer wurden durch Zugabe der angezeigten Mengen der jeweiligen Hemmer in **SB**, die mit 0,3 ng/mL Resistin angereichert wurden untersucht. Die relativen Mengen von Resistin gemessen im Koagulationshemmer angereicherten Proben im Vergleich zu mit 0,3 ng/mL Resistin angereicherten Probenpuffer (SB) werden gezeigt.

		% von Resistin in SB	
		Durchschnittlich (n=3)	**SD**
3,8 g/L	Citrat	94	7,67
0,0068 mol/L	EDTA	93	4,96
30 000 IU/L	Heparin	96	4,89

12.4 Reproduzierbarkeit und Präzision

Die **Inter-** und **Intra-Assay** Variationskoeffizienten sind im Mittel **< 10%**. Beispielhafte Bestimmungen sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 3: Inter-Assay-Varianz

	Anzahl der Bestimmungen	**Mittelwert (ng/mL)**	**Standardabweichung (ng/mL)**	**VK (%)**
Probe 1	26	2,91	0,16	5,55
Probe 2	15	4,58	0,24	5,33
Probe 3	17	4,60	0,23	5,04
Probe 4	7	2,50	0,09	3,37
Probe 5	23	4,09	0,27	6,67

Tabelle 4: Intra-Assay-Varianz

	Anzahl der Bestimmungen	**Mittelwert (ng/mL)**	**Standardabweichung (ng/mL)**	**VK (%)**
Probe 1	16	2,81	0,13	4,49
Probe 2	15	4,79	0,24	4,97

Exemplary Version-do not use for assay performance / Vollständigkeit / Exemplaris - Ve
ht für Assaydurchführung verwenden

12.5 Die Wiederfindung und Verdünnungslinearität

Tabelle 5: Wiederfindung und Verdünnungslinearität
(hier: typische Ergebnisse zweier verschiedener Seren)

Verdünnung	**Probe 1** (nativ 5,5 ng/mL)		**Probe 2** (nativ 2,25 ng/mL)	
	plus 5 ng/mL	Wiederfindung (%)	plus 12,25 ng/mL	Wiederfindung (%)
1:50	9,71	92,5	14,99	103,4
1:100	10,60	101,0	13,64	94,1
1:200	10,44	99,4	14,10	97,2
1:400	10,32	98,3	14,33	98,8

MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient

Die Wiederfindung des Resists betrug durchschnittlich 98% der theoretisch erwarteten Menge.

13 REFERENZWERTE

Tabelle 6: Die Erwartungswerte für Resistin wurden mit dem Mediagnost ELISA E50 in gesunden Probanden bestimmt und analysiert durch Herrn Prof. Dr. J. Kratzsch, Institut für Laboratoriumsmedizin der Universitätsklinik Leipzig.

weiblich				**Resistin (ng/mL):**		
Alter (Jahren):	**n:**	**MW Alter:**	**MW BMI:**	**MW ± SA:**	**25.- 75. Perzentile:**	**Min. – Max.:**
18 - 30	96	23,0	23,1	**7,2 ±** 2,6	5,4 - 8,8	3,1 - 14,7
31 - 40	63	36,5	24,3	**8,1 ±** 2,3	6,4 - 9,6	3,6 - 13,1
41 - 50	67	44,9	24,8	**7,3 ±** 2,5	5,7 - 8,1	4,0 - 16,1
51 - 60	29	54,7	25,0	**7,2 ±** 2,6	5,4 - 8,5	4,0 - 15,5
61 - 65	9	62,7	25,2	**6,6 ±** 1,1	6,0 - 6,7	5,4 - 9,3
männlich				**Resistin (ng/mL):**		
Alter (Jahren):	**n:**	**MW Alter:**	**MW BMI:**	**MW ± SA:**	**25.- 75. Perzentile:**	**Min. – Max.:**
18 - 30	107	23,9	24,1	**6,4 ±** 1,8	5,0 - 7,6	2,5 - 13,1
31 - 40	59	35,9	25,0	**6,7 ±** 3,2	4,8 - 7,4	3,8 - 26,9
41 - 50	66	45,0	25,2	**6,5 ±** 2,8	4,5 - 7,4	2,4 - 16,7
51 - 60	36	54,8	26,4	**6,1 ±** 2,1	4,7 - 7,2	3,2 - 13,3
61 - 68	20	63,2	25,6	**7,2 ±** 1,8	6,0 - 8,2	4,5 - 11,2

Tabelle 7: Zusammenfassung der Erwartungswerte

Geschlecht	Anzahl	**Mittelwert** [ng/mL]	Standardabweichung	**2,5. Perzentile** [ng/mL]	**97,5. Perzentile** [ng/mL]
Männer	288	**6,48**	2,44	3,32	11,68
Frauen	264	**7,41**	2,47	3,68	13,6
Gesamt	552	**6,93**	2,49	3,58	13,12

n=Anzahl; **MW**=Mittelwert, **BMI**=Body Mass Index (kg/m²), **SA**=Standardabweichung

Alte Version nicht für Assaydurchführung verwenden
Alte Version / Version not use for Assay Implishment / Ex

Gebrauchsinformation für wissenschaftliche Anwendungen

14 WISSENSCHAFTLICHE ANWENDUNGEN

Resistin ist relevant u.a. bei Forschungsarbeiten zu:
Adipositas, Insulin-Resistenz, Diabetes, Arteriosklerose, Entzündungen.

Der Assay ist durch die hohe Sensitivität (12 pg/mL) ebenfalls sehr geeignet für Messungen in Zellkulturüberständen und in Nicht-Serum-/Plasmaproben (z.B. in Muttermilch, Urin, Speichel).

Übliches Zellkulturmedium, Urin, Speichel, Muttermilch und Zerebrospinal Flüssigkeit wurden als geeignet gefunden (Wiederfindung und Verdünnungsvorschläge s. Tabelle 8). Durch den speziellen Probenpuffer ist eine externe Probenvorbehandlung nicht nötig.

14.1 Geeignete Proben für Forschungszwecke

Serum, Plasma, Zellkulturüberstand verschiedener humaner Zelllinien, Urin, Speichel, Muttermilch und Liquor.

Die Resistin-Konzentrationen in diesen Proben können stark schwanken, daher muss die optimale Verdünnung im Einzelfall vom Anwender ausgetestet werden.

Tabelle 8: Proben wurden angereichert mit 0,3 ng/mL Resistin und gemessen im Vergleich zu nicht angereicherten Proben. Relative Wiederfindung von zugesetzten Resistin wird gezeigt.

Matrix	Verdünnung	% Wiederfindung
Zerebrospinalflüssigkeit	1:2	129
Zerebrospinalflüssigkeit	1:10	93
Zerebrospinalflüssigkeit	1:40	103
Amnionflüssigkeit	1:10	85
Amnionflüssigkeit	1:40	91
Speichel	1:10	99
Speichel	1:21	86
Urin	1:10	79
Urin	1:21	85
Muttermilch	1:2	97
Muttermilch	1:10	58
Muttermilch	1:21	63
Zellkulturüberstand	1:2	100

14.2 Kreuzreaktivität

Die Kreuzreaktivitäten von mehreren handelsüblichen tierischen Seren wurden in diesem Assay getestet. Handelsübliche Seren von Rind, Katze, Huhn, Hund, Esel, Ziege, Meerschweinchen, Pferd, Maus, Schwein, Kaninchen, Ratte und Schaf wurden 1:10 verdünnt im Test eingesetzt und die Signalintensität wurde gemessen. Es konnte keine Kreuzreaktivität nachgewiesen werden.

Exemplary version-only use
assay acc
nplarische
sion nicht für Assaydurchführung verwendet

ENGLISH Resistin ELISA E50 Instructions for Use

TABLE OF CONTENTS

ENGLISH Resistin ELISA E50 Instructions for Use 18
1 INTENTED USE 18
2 INTRODUCTION 18
3 METHOD 19
4 WARNINGS AND PRECAUTIONS 20
5 MATERIALS 21
6 SAMPLES 22
7 TECHNICAL NOTES 23
8 ASSAY PROCEDURE 24
9 QUALITY CONTROL 25
10 ESTABLISHING THE CALIBRATION CURVE 25
11 PERFORMANCE CHARACTERISTICS 27
12 EVALUATION OF RESULTS 28
13 SCIENTIFIC APPLICATION 29
14 LITERATUR / LITERATURE 30
15 INTERNATIONAL ASSAY PROCEDURE 31
16 ASSAY PROCEDURE 32

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version -nicht für Assaydurchführung verwenden

ENGLISH Resistin ELISA E50 Instructions for Use

Resistin ELISA E50	96 Determination
CE	DE/CA40/00809/14/1
Principle of the test	Enzyme-linked Immunoassay
Duration (incubation periods)	4 h
Antibodies	Specific polyclonal Antibodies
Calibrators	5 single Calibrators: 0.02 - 1 ng/mL, recombinant Resistin
Assay Range	0.012 – 21 ng/mL
Controls	2 Controls, lyophilised
Samples	human serum / plasma
Required sample volume	15 µL
Sample dilution	1:21
Analytical sensitivity	ø 0.012 µg/L
Inter- / Intra Assay	ø < 10 %

Exemplarische Version - nicht für Assaydurchführung verwenden
Exemplary Version - not use for assay accomplishment

1 INTENTED USE

Measurement of human Resistin in human Serum and Plasma Sample.

2 INTRODUCTION

Resistin, a cysteine-rich protein of 11.3 kDa (1), was firstly found in mice (2) and constitutes together with RELMα, RELMβ and RELMγ the protein family of resistin-like molecules (RELM).

In humans, resistin and RELMβ (1) but no other proteins of the RELM family were found. The human form of resistin shows a homology of 53% to the murine protein (4). It has 11 cysteine-residues, is synthesized as a propetide of 108 amino acids and secreted as a dimer, build by a disulfide bridge of cysteine residues (22). Beside this intermolecular disulfide bridge, 5 additional intramolecular ones exist (5,6).

Appearance of multi- and oligomer formation was proved by size exclusion chromatography. Thereby it was shown, that oligomer formation is SDS-insensitive but can be inhibited by β-mercaptoethanol and is therefore likely to be caused by disulfide bridges (1). Further on, the resistin structure seems to be dependent on its concentration, as circular dichroism analysis shows a concentration dependent shift of α-helical to β-sheet structure (1).

Resistin expression was demonstrated in white adipose tissue (10), pituitary (11) and pancreatic islets (12) of mice as well as in brown adipose tissue of rats. In humans, resistin expression in adipocytes can be detected but only at a very low level. But in vitro, resistin expression of non-adipocytes in fatty tissue was shown (13). Human resistin gene is also expressed in pancreatic islets (12), pre-adipocytes (14 marcophages (15) and bone marrow (39). So, resistin is of relevance for inflammation processes as well as for lipid metabolism.

Most investigation refers to the mouse model. Here, the existence of trimeric and hexameric resistin in serum was demonstrated (7). In comparison to adiponectin biology, it is highly probable that different resistin oligomers have different biologic function (8, 9).

In mice, a correlation between adiposity, insulin resistance and resistin expression was found empirically. In humans, respective study results are not clear – several studies show an association of resistin serum concentration and adiposity or insulin resistance (17, 25-31). But others failed in confirming these results (14, 16-24). Therefore, there is requirement for valid and reproducible determination of resistin serum concentration.

Relevance of resistin in other physiologic processes than energy metabolism was investigated by several different approaches. Experiments with endothelial cells gave interesting results. Here, resistin was shown to enhance expression of VCAM-1 and ICAM-1 (33, 34). By this way, resistin is potentially able to influence endothelial inflammation (35, 36) and, thereby atherosclerosis. These results were confirmed by experiments in mice, where endothelin-1 was shown to regulate resistin secretion (37, 38).

In recent research human resistin was shown to increase pre-adipocyte proliferation and lipolysis of mature adipocytes (38). By the way of modulating MAPK-signalling pathways resistin exerts crucial influence on energy metabolism.

Present research demonstrates, that Resistin exerts influence on a broad variety of physiological processes, however a clear and defined biological role of resistin remains still unexisting.

This ELISA-kit enables the user to determine the exact concentration of Resistin in human serum/plasma as well as other body fluids and thereby assists investigation of Resistin biology.

With optimized special sample buffer: reliable quantification of resistin - independent of the absolute content.

3 METHOD

The enzyme immunoassay for Resistin E50 is a so-called Sandwich-Assay. It utilizes a specific high affinity polyclonal rabbit antiserum coated on the wells of a microtiter plate. The Resistin in the samples binds quantitatively to the immobilized antiserum. In the following step, the biotinylated antiserum binds in turn to Resistin. After washing, Streptavidin-Peroxidase-Enzyme conjugate will be added, which will bind highly specific to the biotin of the antiserum and will catalyse in the closing substrate reaction the turn of the colour, quantitatively depending on the Resistin level of the samples.

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version-nicht für Assaydurchführung verwenden

4 WARNINGS AND PRECAUTIONS

For In Vitro Diagnostic Use only. For Professional use only.

The Mediagnost kit is suitable only for in vitro diagnostics 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.

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

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

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: **Controls CTR1 and CTR2**

Source human serum for the Controls 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 CAL A-E, DET, EC, SB, DIL, WB

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 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.

Stop Solution STP

The Stop solution contains 0.2 M acid sulphur acid (H_2SO_4)

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.

Exemplarische Version nur zur Kenntnis und Begleitung / Exemplarische Version nicht für Assaydurchführung verwenden

5 MATERIALS

5.1 Materials provided

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

MTP	**Microtiter plate,** ready for use, coated with rabbit-anti-resistin-antibody. Wells are separately breakable.	**(8x12) wells**
CAL A-E	**Calibrators**, lyophilized, (recombinant human Resistin), concentrations are given on vial labels and on quality certificate. **Reconstitute in 750 µL Sample Buffer SB.**	**5 x 750 µL**
CTR1	**Control 1,** lyophilised, (human serum), concentration is given on quality certificate. **Reconstitute in 250 µL Dilution Buffer DIL. Dilute** with **Sample Buffer SB.**	**1 x 250µL**
CTR2	**Control 2,** lyophilised, (human serum), concentration is given on quality certificate. **Reconstitute in 250 µL Dilution Buffer DIL. Dilute** with **Sample Buffer SB.**	**1 x 250 µL**
DET	**Antibody Conjugate, 100fold concentrated solution,** contains rabbit biotinylated anti-resistin antibody**. Before use, dilute**1:100 with **Dilution Buffer DIL.**	**1 x 120 µL**
EC	**Enzyme Conjugate, 100fold concentrated solution,** contains HRP (Horseradish-Peroxidase)-labelled Streptavidin. **Before use, dilute** 1:100 with **Dilution Buffer DIL.**	**1 x 120 µL**
SB	**Sample Buffer,** ready for use.	**1 x 120 mL**
DIL	**Dilution Buffer,** ready for use.	**1 x 25 mL**
WB	**Washing Buffer,** 20-fold concentrated solution. Dilute 1:20 with Aqua dest.	**1 x 50 mL**
S	**Substrate,** ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP) substrate, stabilised Tetramethylbencidine.	**1 x 12 mL**
STP	**Stop 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**

5.2 Materials required, but not provided

- Distilled (Aqua destillata) or deionized water for dilution of the Washing Buffer **WB (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

Exemplary version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version-nicht für Assaydurchführung verwenden

6 SAMPLES

6.1 Sample type

Serum and Plasma
Serum as well plasma samples are suitable (significant deviation of Resistin levels in corresponding serum-, Heparin-, EDTA-, Citrate-plasma-Samples were not found. A possible dilution of the sample by the anticoagulant must be taken into account).
Haemolytic samples appear to show falsely high Resistin levels, using such samples should be checked out critically
By means of the special sample buffer an external sample preparation prior to the assay is not required.

6.2 Specimen collection

Use standard venipuncture for the blood sampling. Haemolytic reactions are to be avoided.

6.3 Required sample volume: 15 µL

6.4 Sample stability

In firmly closable plastic tubes.

- Storage at 20 -25°C: max. 2 days
- Storage at –20°C min. 2 years

The storage of samples, over a period of 2 years at -20°C, showed no effect on the measured value. Freeze/thaw cycles of samples should be minimized.

6.5 Interference

Triglyceride, bilirubin and hemolysate in the sample do not interfere to a concentration of 100 mg/mL and 100 µg/mL or 1 mg/mL. However, the use of hemolytic, lipemic or icteric samples should be validated by the user.

6.6 Sample dilution

- Dilution: **1:21** with Sample Buffer **SB**
- Pipette 300 µL Sample Buffer SB in PE-/PP-Tubes (application of a multi-stepper is recommended in larger series), add 15 µL Serum- or Plasma (dilution1:21). After mixing use 2 x 100 µL of this dilution in the assay
- According to expected Resistin levels the dilution with SB can be higher or lower. The excellent linearity of this test system allows sample dilution of 1:5 to 1:400.
- Because the Sample Buffer **SB** is special composed for the correct determination of Resistin, the dilution should be **at least 1:5**!

Exemplary Version - not use for assay accomplishment / Exemplarische Version -nicht für Assaydurchführung verwenden

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. The **reconstituted components:** Calibrators **A-E** and Controls **CTR1** and **CTR2** must be stored at –20°C (max. 4 weeks). For further use, thaw quickly but gently (avoid temperature increase above room temperature and avoid excessive vortexing). The 1:20 diluted Washing Buffer **WB** 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 Calibrators **A – E** are reconstituted with the Sample Buffer **SB**.

The Controls **CTR1 and CTR2** are reconstituted with the Dilution Buffer **DIL**.

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.

The reconstituted calibrators and controls can be stored for 4 weeks at –20°C. Repeated freeze/thaw cycles have to be avoided.

Dilution

After **reconstitution, dilute the Controls CTR1 and CTR2** with the Sample Buffer **SB** in the same ratio (**1:21) as the samples.**
The required volume of Washing Buffer **WB** is prepared by 1:20 dilution of the provided 20fold concentrate with Aqua dest.

The diluted Washing Buffer is stable for 4 weeks at 2-8°C. It has to be at room temperature for usage!

Antibody and Enzyme Conjugate

Use the Dilution Buffer **DIL** for the dilution of the Antibody Conjugate **DET** and Enzyme Conjugate **EC** 100fold concentrates. The diluted solutions are only limited stable at 2-8°C and should be prepared daily fresh.

Assay Procedure

When performing the assay, Blank, Calibrators **A-E**, Controls **CTR1 and CTR2** 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 **DET** and the Enzyme Conjugate **EC** as well as the succeeding Substrate **S** should be added to the plate in the same order and in the same time interval as the samples. Stop Solution **STP** should be added to the plate in the same order as Substrate **S**.
All determinations (Blank, Calibrators **A-E**, Controls **CTR1** and **CTR2** 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 **S**, stabilised Tetramethylbencidine, is photosensitive–storage and incubation in the dark.

Shaking

The incubation steps should be performed at mean rotation frequency of a microtiter plate shaker. We recommend 350 rpm. Depending on the design of the shaker, the shaking frequency should 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 **WB** diluted to usage concentration. Washing volume per washing cycle and well must be 300 µL at least.

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 dynamical swinging out the microtiter plate over a basin. If aspirating devices are used, care has to be taken that the inside well surface is not scratched. Subsequent to every single washing step, the remaining fluid should be removed by inverting the plate and repeatedly tapping it dry on non-fuzzy absorbent tissue.

Exemplar Version – not use for assay accomplishment / Exemplarische Version – nicht für Assayduchführung verwenden

8 ASSAY PROCEDURE

Preparation of reagents		Reconstitution:	Dilution
CAL A-E	**Calibrators**	in **750 µL** Sample Buffer **SB**	-
CTR1	**Control 1**	in **250 µL** Dilution Buffer **DIL**	**1:21** with Sample Buffer **SB**
CTR2	**Control 2**	in **250 µL** Dilution Buffer **DIL**	**1:21** with Sample Buffer **SB**
DET	**Antibody Conjugate conc.**	-	**1:100** with Dilution Buffer **DIL** ➔ **DET 1:100**
EC	**Enzyme Conjugate conc.**	-	**1:100** with Dilution Buffer **DIL** ➔ **EC 1:100**
WB	**Washing Buffer conc.**	-	**1:20** with **Aqua dest.** ➔ **WB 1:20**

Samples + Controls CTR1 and CTR2: dilute 1:21 in Sample Buffer SB, mix immediately

Before assay procedure bring all reagents to room temperature **(20-25°C)**.

Assay procedure in double determination

Pipette	Reagents	Position
100 µL	Sample Buffer **SB** (blank value)	A1/A2
100 µL	Calibrator **A** (**0.02 ng/mL**)	B1/B2
100 µL	Calibrator **B** (**0.1 ng/mL**)	C1/C2
100 µL	Calibrator **C** (**0.3 ng/mL**)	D1/D2
100 µL	Calibrator **D** (**0.6 ng/mL**)	E1/E2
100 µL	Calibrator **E** (**1.0 ng/mL**)	F1/F2
100 µL	Control **CTR1** (1:21 diluted)	G1/G2
100 µL	Control **CTR2** (1:21 diluted)	H1/H2
100 µL	Sample **SPE** (1:21 diluted)	in the rest of the wells according the requirements

Cover the wells with the sealing tape.

Sample Incubation: 2 h at 20-25°C, 350 rpm		
5x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and **wash 5x** with **300 µL** each Washing Buffer **WB 1:20** **/ well**	In each well
100 µL	Antibody Conjugate **DET 1:100**	In each well

Cover the wells with the sealing tape.

Incubation: 1 h at 20-25°C, 350 rpm		
5x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and **wash 5x** with **300 µL** each Washing Buffer **WB 1:20** **/ well**	In each well
100 µL	Enzyme Conjugate **EC 1:100**	In each well

Cover the wells with the sealing tape.

Incubation: 30 Minutes at 20-25°C, 350 rpm		
5x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and **wash 5x** with **300 µL** each Washing Buffer **WB 1:20** **/ well**	In each well
100 µL	Substrate **S**	In each well

Incubation: 30 Minutes at 20-25°C, in the dark at RT		
100 µL	Stop Solution **STP**	In each well

Measure the absorbance within 30 min at **450 nm** with ≥ 590 nm as reference wavelength.

Exemplarische Version -nicht zur Durchführung verwenden
Exemplary Version - not for assay establishment / Exemplarische Version -nicht

9 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice (GLP) requires that controls are included in each assay. The test results are only valid if the test has been performed following the instructions. Moreover, the user must strictly adhere to the rules of GLP or other applicable federal, state or local standards/laws. All Calibrators and kit controls must be found within the acceptable ranges as stated on the QC Certificate. If the criteria are not met, the run is not valid and should be repeated.

9.1 Quality Criteria

For the evaluation of the assay it is required that the absorbance values of the blank should be below **0.25**, and the absorbance of Calibrator **E** should be above **1.0**.
Samples, which yield higher absorbance values than **Calibrator E**, should be re-tested with a higher dilution.

10 ESTABLISHING THE CALIBRATION CURVE

The calibrators provided contain the following concentrations of recombinant Resistin:

Calibrator	A	B	C	D	E
ng/mL	0.02	0.10	0.30	0.60	1.00
pg/mL	20	100	300	600	1000

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 samples, controls and calibrators.
3) Plot the calibrator concentrations on the x-axis versus the mean value of the absorbance of the calibrators on the y-axis.
4) Recommendation: Calculation of the calibration 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 **Resistin concentrations** of the diluted samples or the diluted control sera in ng/mL (or pg/mL according the chosen unit for the calibrators) are calculated in this way, the Resistin concentrations of the **undiluted samples** and of controls are calculated **by multiplication with the respective dilution factor**.

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version - nicht für Durchführung verwenden

E50 Calibration Curve

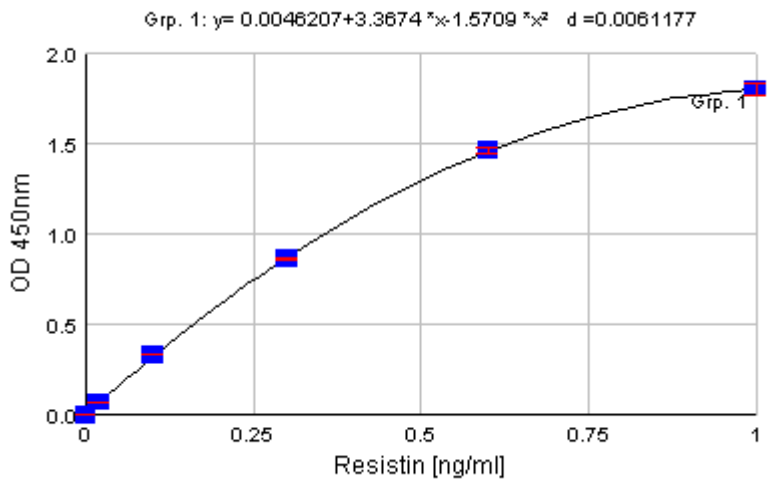

Fig. 1. Exemplary Calibration Curve with a polynomial 2nd degree as curve fit.

The exemplary shown calibration curve in Fig.1 **cannot** be used for calculation of your test results. You have to establish a calibration curve for each test you conduct!
Exemplary calculation of the Resistin concentration of a 1:21 diluted sample:

Measured extinction of your sample	0.85
Measured extinction of the blank	0.05

Your measurement program will calculate the Resistin 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 (here: polynomial 2nd degree).

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

$$y = 0.0046207 + 3.3674x - 1.5709x^2$$
$$0.2686 = x$$

if the dilution factor (1:21) is taken into account the Resistin concentration of the undiluted sample is

$$0.2686 \times 21 = 5{,}64 \text{ ng/mL} = 0.00564 \text{ µg/mL}$$

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version -nicht für Assaydurchführung verwenden

11 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1 Calibrators

The calibrators are prepared from recombinant human Resistin (19.5 kDa, 2 x 92 amino acids, expressed in E. coli) in concentrations of 20, 100, 300, 600 and 1000 pg/mL (pico Gramm / mL, equal to 0.02 ng/mL-1 ng/mL).

11.2 Sensitivity

The analytical sensitivity was determined by measuring the blank value. For this purpose, the signal intensity of blank value + 2SD was converted into a resistin concentration using the calibration curve. The analytical sensitivity of the assay is 0.012 ng / mL.

11.3 Interference

Interference of physiological appearing substance with the Resistin measurement was investigated. Serum samples have been enriched with different concentrations of possibly interfering substances and the amount of Resistin was measured and compared with the Resistin concentration in the same sample without any enrichment. In table 1 the relative results are shown. None of the tested substances interfered significantly with Resistin measurement.

Table 1. Interference: Three serum samples where enriched with indicated amount of the potentially interfering substance and measured. Shown is % of Resistin of the native, non-enriched serum sample

	Triglyceride 100 mg/mL	Bilirubin 100 µg/mL	Haemolysate 1 mg/mL
Serum 1	101	93	94
Serum 2	115	99	99
Serum 3	104	103	147

Table 2. Effects of coagulation inhibitors were investigating by adding indicated amounts of inhibitors to SB enriched with 0.3 ng/mL Resistin. Relative amounts of Resistin measured in inhibitor containing samples in comparison to 0.3 ng/mL Resistin containing Sample Buffer **SB** are shown.

		% of Resistin in SB	
		Mean (n=3)	SD
3.8 g/L	Citrate	94	7.67
0.0068 mol/L	EDTA	93	4.96
30.000 IU/L	Heparin	96	4.89

11.4 Reproducibility and Precision

The inter- and intra assay coefficients of variability are in average < 10%.
Exemplary determinations are shown in table 3 and table 4.

Table 3. Inter-Assay-Variation

	Number of determinations	Mean value (ng/mL)	Standard deviation (ng/mL)	VC (%)
Sample 1	26	2.91	0.16	5.55
Sample 2	15	4.58	0.24	5.33
Sample 3	17	4.60	0.23	5.04
Sample 4	7	2.50	0.09	3.37
Sample 5	23	4.09	0.27	6.67

Table 4. Intra-Assay-Variation

	Number of determinations	Mean value (ng/mL)	Standard deviation (ng/mL)	VC (%)
Sample 1	16	2.81	0.13	4.49
Sample 2	15	4.79	0.24	4.97

11.5 Recovery and Linearity

The Mediagnost Resistin ELISA E50 is over a very wide range dilution authentic. The linearity of serum dilutions is over a very wide range excellent (s.Tab.5).

Table 5: Recovery and linearity of the Sample Dilution (characteristic results of two different sera)

Dilution	**Sample 1** (native 5.5 ng/mL)		**Sample 2** (native 2.25 ng/mL)	
	plus 5 ng/mL	Recovery (%)	plus 12.25 ng/mL	Recovery (%)
1:50	9.71	92.5	14.99	103.4
1:100	10.60	101.0	13.64	94.1
1:200	10.44	99.4	14.10	97.2
1:400	10.32	98.3	14.33	98.8

Different human sera were spiked with recombinant human Resistin in varying concentrations (e.g. in Table 5). The recovery of Resistin yielded on average 98 % of the theoretically expected amount.

12 EVALUATION OF RESULTS

Table 6: The expected values for Resistin were determined with the Mediagnost ELISA E50 in healthy probands and analysed by Prof. Dr. J. Kratzsch. Institute for Laboratory Medicine, University of Leipzig.

Female				**Resistin (ng/mL):**		
Age (Years):	**n:**	**AV Age:**	**AV BMI:**	**AV ± SD:**	**25.- 75. Percentile:**	**Min. – Max.:**
18 - 30	96	23.0	23.1	**7.2 ±** 2.6	5.4 – 8.8	3.1 – 14.7
31 - 40	63	36.5	24.3	**8.1 ±** 2.3	6.4 – 9.6	3.6 – 13.1
41 - 50	67	44.9	24.8	**7.3 ±** 2.5	5.7 – 8.1	4.0 – 16.1
51 - 60	29	54.7	25.0	**7.2 ±** 2.6	5.4 – 8.5	4.0 – 15.5
61 - 65	9	62.7	25.2	**6.6 ±** 1.1	6.0 – 6.7	5.4 – 9.3
Male				**Resistin (ng/mL):**		
Age (Years):	**n:**	**AV Age:**	**AV BMI:**	**AV ± SD:**	**25.- 75. Percentile:**	**Min. – Max.:**
18 - 30	107	23.9	24.1	**6.4 ±** 1.8	5.0 – 7.6	2.5 – 13.1
31 - 40	59	35.9	25.0	**6.7 ±** 3.2	4.8 – 7.4	3.8 – 26.9
41 - 50	66	45.0	25.2	**6.5 ±** 2.8	4.5 – 7.4	2.4 – 16.7
51 - 60	36	54.8	26.4	**6.1 ±** 2.1	4.7 – 7.2	3.2 – 13.3
61 - 68	20	63.2	25.6	**7.2 ±** 1.8	6.0 – 8.2	4.5 – 11.2

n=Number of Probands. **AV**=Average Value. **BMI**=Body Mass Index (kg/m²). **SD**=Standard Deviation

Table 7: Grouping of the expected values

Sex	**Number**	**Mean [ng/mL]**	**Standard deviation**	**2.5. Percentile**	**9.5. Percentile**
Male	288	6.48	2.44	3.32	11.68
Female	264	7.41	2.47	3.68	13.60
Total	552	6.93	2.49	3.58	13.12

Instructions for use for scientific application

13 SCIENTIFIC APPLICATION

Resistin is relevant e.g. in research of: Adiposity Insulin Resistance, Diabetes Arteriosclerosis Inflammation. Due to Assays high sensitivity (12 pg/mL) this is also suitable for measurements in cell culture supernatants and in non-serum / plasma samples (e.g. in breast milk, urine, saliva).

13.1 Samples suitable for scientific application

Serum and Plasma, common cell culture medium, saliva, breast milk and urine were found to be suitable specimens too.
Resistin concentrations may be completely different in body fluids of human origin other than serum or cell culture supernatants.
(See Table 8 for recovery and dilution recommendations). Due to the special Sample Buffer, external sample pre-treatment is not necessary.

Table 8: Samples were enriched with 0.3 ng/mL Resistin and measured in comparison to non-enriched sample. Relative recovery of added Resistin is shown.

Matrix	Dilution	% Recovery
Cerebrospinal fluid	1:2	129
Cerebrospinal fluid	1:10	93
Cerebrospinal fluid	1:40	103
Amnion fluid	1:10	85
Amnion fluid	1:40	91
Saliva	1:10	99
Saliva	1:21	86
Urine	1:10	79
Urine	1:21	85
Breast milk	1:2	97
Breast milk	1:10	58
Breast milk	1:21	63
Cell culture supernatant	1:2	100

13.2 Cross reactivity

The cross-reactivities of several commercially available animal sera were tested in this assay. Commercially available sera from cattle, cat, chicken, dog, donkey, goat, guinea pig, horse, mouse, pig, rabbit, rat and sheep were diluted 1:10 and used in the test and the signal intensity was measured. No cross-reactivity could be detected.

Exemplary Version - not for assay performance
Exemplarische Version - nicht für Assaydurchführung verwenden

14 LITERATUR / LITERATURE

Literature

1.Aruna B. Ghosh S. Singh AK. Mande SC. Srinivas V. Chauhan R. Ehtesham NZ. Human recombinant resistin protein displays a tendency to aggregate by forming intermolecular disulfide linkages. Biochemistry 2003;42(36):10554-9.
2.Steppan CM. Lazar MA. Resistin and obesity-associated insulin resistance. Trends Endocrinol Metab 2002;13(1):18-23.
3.Yang RZ. Huang Q. Xu A. McLenithan JC. Eisen JA. Shuldiner AR. Alkan S. Gong DW. Eison JA. Comparative studies of resistin expression and phylogenomics in human and mouse. Biochem Biophys Res Commun 2003;310(3):927-35.
4. Banerjee RR. Lazar MA. Resistin: molecular history and prognosis. J Mol Med 2003;81(4):218-26.
5. Banerjee RR. Lazar MA. Dimerization of resistin and resistin-like molecules is determined by a single cysteine. J Biol Chem 2001;276(28):25970-3.
6.Raghu P. Ghosh S. Soundarya K. Haseeb A. Aruna B. Ehtesham NZ. Dimerization of human recombinant resistin involves covalent and noncovalent interactions. Biochem Biophys Res Commun 2004;313(3):642-6.
7. Patel SD. Rajala MW. Rossetti L. Scherer PE. Shapiro L. Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. Science 2004;304(5674):1154-8.
8. Kim KH. Zhao L. Moon Y. Kang C. Sul HS. Dominant inhibitory adipocyte-specific secretory factor (ADSF)/resistin enhances adipogenesis and improves insulin sensitivity. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101(17):6780-5.
9. Chen J. Wang L. Boeg YS. Xia B. Wang J. Differential dimerization and association among resistin family proteins with implications for functional specificity. J Endocrinol 2002;175(2):499-504.
10. 0.Beltowski J. Adiponectin and resistin--new hormones of white adipose tissue. Med Sci Monit 2003;9(2):RA55-61.
11. Morash BA. Ur E. Wiesner G. Roy J. Wilkinson M. Pituitary resistin gene expression: effects of age. gender and obesity. Neuroendocrinology 2004;79(3):149-56.
12. Minn AH. Patterson NB. Pack S. Hoffmann SC. Gavrilova O. Vinson C. Harlan DM. Shalev A. Resistin is expressed in pancreatic i slets. Biochem Biophys Res Commun 2003;310(2):641-5.
13. Fain JN. Cheema PS. Bahouth SW. Lloyd Hiler M. Resistin release by human adipose tissue explants in primary culture. Biochem Biophys Res Commun 2003;300(3):674-8.
14. Janke J. Engeli S. Gorzelniak K. Luft FC. Sharma AM. Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. Obes Res 2002;10(1):1-5.
15. Patel L. Buckels AC. Kinghorn IJ. Murdock PR. Holbrook JD. Plumpton C. Macphee CH. Smith SA. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. Biochem Biophys Res Commun 2003;300(2):472-6.
16. Youn BS. Yu KY. Park HJ. Lee NS. Min SS. Youn MY. Cho YM. Park YJ. Kim SY. Lee HK. Park KS. Plasma resistin concentrations measured by enzyme-linked immunosorbent assay using a newly developed monoclonal antibody are elevated in individuals with type 2 diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab 2004;89(1):150-6.
17. Chen XD. Lei T. Xia T. Gan L. Yang ZQ. Increased expression of resistin and tumour necrosis factor-alpha in pig adipose tissue as well as effect of feeding treatment on resistin and cAMP pathway. Diabetes Obes Metab 2004;6(4):271-9.
18. Volarova de Courten B. Degawa-Yamauchi M. Considine RV. Tataranni PA. High serum resistin is associated with an increase in adiposity but not a worsening of insulin resistance in Pima Indians. Diabetes 2004;53(5):1279-84.
19. Shalev A. Patterson NB. Hirshberg B. Rother KI. Harlan DM. Resistin serum levels in type 1 diabetes pre- and post-islet transplantation. Metabolism 2004;53(4):403-4.
20. Fujinami A. Obayashi H. Ohta K. Ichimura T. Nishimura M. Matsui H. Kawahara Y. Yamazaki M. Ogata M. Hasegawa G. Nakamura N. Yoshikawa T. Nakano K. Ohta M. Enzyme-linked immunosorbent assay for circulating human resistin: resistin concentrations in normal subjects and patients with type 2 diabetes. Clin Chim Acta 2004;339(1-2):57-63.
21. Degawa-Yamauchi M. Bovenkerk JE. Juliar BE. Watson W. Kerr K. Jones R. Zhu Q. Considine RV. Serum resistin (FIZZ3) protein isincreased in obese humans. J Clin Endocrinol Metab 2003;88(11):5452-5.
22. Azuma K. Katsukawa F. Oguchi S. Murata M. Yamazaki H. Shimada A. Saruta T. Correlation between serum resistin level and adiposity in obese individuals. Obes Res 2003;11(8):997-1001.
23. Wang H. Chu WS. Hemphill C. Elbein SC. Human resistin gene: molecular scanning and evaluation of association with insulin sensitivity and type 2 diabetes in Caucasians. J Clin Endocrinol Metab 2002;87(6):2520-4.
24. Brichard SM. Delporte ML. Lambert M. Adipocytokines in anorexia nervosa: a review focusing on leptin and adiponectin. Horm Metab Res 2003;35(6):337-42.
25. Kawanami D. Maemura K. Takeda N. Harada T. Nojiri T. Imai Y. Manabe I. Utsunomiya K. Nagai R. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions. Biochem Biophys Res Commun 2004;314(2):415-9.
26. Verma S. Li SH. Wang CH. Fedak PW. Li RK. Weisel RD. Mickle DA. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. Circulation 2003;108(6):736-40.
27. Kaser S. Kaser A. Sandhofer A. Ebenbichler CF. Tilg H. Patsch JR. Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. Biochem Biophys Res Commun 2003;309(2):286-90.
28. Lu SC. Shieh WY. Chen CY. Hsu SC. Chen HL. Lipopolysaccharide increases resistin gene expression in vivo and in vitro. FEBS Lett 2002;530(1-3):158-62.
29. Zhong Q. Lin CY. Clarke KJ. Kemppainen RJ. Schwartz DD. Judd RL. Endothelin-1 inhibits resistin secretion in 3T3-L1 adipocytes. Biochem Biophys Res Commun 2002;296(2):383-7.
30. Barton M. Carmona R. Ortmann J. Krieger JE. Traupe T. Obesity-associated activation of angiotensin and endothelin in the cardiovascular system. Int J Biochem Cell Biol 2003;35(6):826-37.
31. Ort TA. A. A.; MacDougall. J.R.;Nelson. P.J.; Rothenberg. M.E.; Wu. F.; Eisen. A.; Halvorsen. Y.-D.C. Recombiant human FIZZ3/Resistin Stimulates Lipolysis in Cultured Human Adipocytes. Mouse Adipose Explants and in Normal Mice. Endocrinology 2005; doi:10.1210/en.2004-1421.

Eingeschränkte Version - Do not use for assay accomplishment. Exemplarische Version - nur für Assaydurchführung verwenden

15 INTERNATIONAL ASSAY PROCEDURE

International Test Description

CAL A-E	**Rec in 750 µL SB**	**-**
CTR1	**Rec in 250 µL DIL**	**1:21 SB**
CTR2	**Rec in 250 µL DIL**	**1:21 SB**
DET	**-**	**1:100 DIL** **➔ DET 1:100**
EC	**-**	**1:100 DIL** **➔ EC 1:100**
WB 20x	**-**	**1:20 A. dest.** **➔ WB 1:20**
SPE		**1:21 SB**
-	**°C 20-25°C, ↔**	

100 µL	**SB**	A1/A2
100 µL	**CAL A (0.02 ng/mL)**	B1/B2
100 µL	**CAL B (0.1 ng/mL)**	C1/C2
100 µL	**CAL C (0.3 ng/mL)**	D1/D2
100 µL	**CAL D (0.6 ng/mL)**	E1/E2
100 µL	**CAL E (1 ng/mL)**	F1/F2
100 µL	**CTR1 1:21 SB**	G1/G2
100 µL	**CTR2 1:21 SB**	H1/H2
100 µL	**SPE 1:21 SB**	
	TAPE	
	2 h °C 20-25°C ↔ 350 rpm	
5x 300 µL	**5x WB 1:20**	
100 µL	**DET 1:100**	
	TAPE	
	1 h °C 20-25°C ↔ 350 rpm	
5x 300 µL	**5x WB 1:20**	
100 µL	**EC 1:100**	
	TAPE	
	30 min °C 20-25°C ↔ 350 rpm	
5x 300 µL	**5x WB 1:20**	
100 µL	**S**	
	30 min °C 20-25°C	
100 µL	**STP**	
	MEASURE	

Exemplary version - not use for assay accomplishment / Exemplarische Version - nicht für Assaydurchführung verwenden

16 ASSAY PROCEDURE

Preparation of reagents		Reconstitution:	Dilution
CAL A-E	**Calibrators**	in **750 µL** Sample Buffer **SB**	-
CTR1	**Control 1**	in **250 µL** Dilution Buffer **DIL**	**1:21** with Sample Buffer **SB**
CTR2	**Control 2**	in **250 µL** Dilution Buffer **DIL**	**1:21** with Sample Buffer **SB**
DET	**Antibody Conjugate Conc.**	-	**1:100** with Dilution Buffer **DIL** ➔ **DET 1:100**
EC	**Enzyme Conjugate Conc.**	-	**1:100** with Dilution Buffer **DIL** ➔ **EC 1:100**
WB	**Washing Buffer conc.**	-	**1:20** with **Aqua dest.** ➔ **WB 1:20**
Samples + Controls CTR1 and CTR2: dilute 1:21 in Sample Buffer SB, mix immediately			
Before assay procedure bring all reagents to room temperature **(20-25°C)**.			

Assay procedure in double determination

Pipette	Reagents	Position
100 µL	Sample Buffer **SB** (blank value)	A1/A2
100 µL	Calibrator **A** (**0.02 ng/mL**)	B1/B2
100 µL	Calibrator **B** (**0.1 ng/mL**)	C1/C2
100 µL	Calibrator **C** (**0.3 ng/mL**)	D1/D2
100 µL	Calibrator **D** (**0.6 ng/mL**)	E1/E2
100 µL	Calibrator **E** (**1.0 ng/mL**)	F1/F2
100 µL	Control **CTR1** (1:21 diluted)	G1/G2
100 µL	Control **CTR2** (1:21 diluted)	H1/H2
100 µL	Sample **SPE** (1:21 diluted)	in the rest of the wells according the requirements
Cover the wells with the sealing tape.		
Sample Incubation: 2 h at 20-25°C, 350 rpm		
5x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and **wash** 5 x with **300 µL** each Washing Buffer **WB 1:20** / **well**	In each well
100 µL	Antibody Conjugate **DET 1:100**	In each well
Cover the wells with the sealing tape.		
Incubation: 1 h at 20-25°C, 350 rpm		
5x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and **wash** 5 x with **300 µL** each Washing Buffer **WB 1:20** / **well**	In each well
100 µL	Enzyme Conjugate **EC 1:100**	In each well
Cover the wells with the sealing tape.		
Incubation: 30 Minutes at 20-25°C, 350 rpm		
5x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and **wash** 5 x with **300 µL** each Washing Buffer **WB 1:20** / **well**	In each well
100 µL	Substrate **S**	In each well
Incubation: 30 Minutes at 20-25°C, in the dark at RT		
100 µL	Stop Solution **STP**	In each well
Measure the absorbance within 30 min at **450 nm** with ≥ 590 nm as reference wavelength.		

Exemplarische Version -nicht für Anschriftenung verwenden
Exemplarische Version -nicht für Assay accompagnement / Exemplarische Version -nicht für Anschriftenung verwenden