

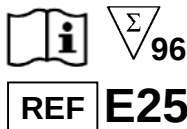
m/r IGF-I - ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von
Maus-/Ratten- Insulin-like Growth Factor-I
(IGFBP-blockiert)
Deutsch

Enzyme Immunoassay for the Quantitative Determination of
Mouse-/Rat- Insulin-like Growth Factor-I
(IGFBP-blocked)
English

Nur zu Forschungszwecken!
Nicht zur diagnostischen Anwendung geeignet.

For Research Use Only.
Not for use in diagnostic procedures.



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>

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

according to DIN EN 980 and EDMA recommendations Standard News 6 2001



Expiry date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Data di scadenza/ Fecha de caducidad/ Data de validade/ Uiterste gebruiksdatum/ Udløbsdato/ Bäst före-datum/ Termin ważności/ Lejárati idő/ Čas expirácie/ Doba expirace/ Срок на годност/ Αεγυμίσκυρπäv/ Ημερομηνία λήξης/ Data de expirare/ Rok uporabe/ Viimeinen käyttöpäivä



Consider instructions for use/ Bitte Gebrauchsanweisung beachten/ Consultez la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las instrucciones de uso/ Respeitar as instruções de utilização, / A.u.b de gebruiksaanwijzing volgen/ Se brugsanvisningen/ Läs anvisningarna före användning/ Proszę przeczytać instrukcję obsługi/ Vegye figyelembe a használati utasításban foglaltakat/ Postupujte podľa pokynov na použitie/ Dodržujte návod k použití/ Моля, спазвайте инструкцията за употреба/ Palun järgige kasutusjuhendit./ Λάβετε υπόψη σας τις οδηγίες χρήσης/ Vá rugám sã respectați instrucțiunile de utilizare/ Upošteвайте 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-Batchcode/ Partisatskod/ Numer serii/ Tétel-sarzs szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/Партиден номер/Partii – partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-număr lot/ Številka serije/ erä



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



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



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



Contains sufficient for x tests/ Inhalt ausreichend für x Tests/ Contient suffisant pour x tests/ Contenido suficiente para x tests/ 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 dostacuje pro x testů/ Съдържание достатъчно за x тестове/ Sisust jätkub x katse jaoks/ Το περιεχόμενο επαρκεί για x δοκιμές/ Conținut suficient pentru x teste/Vsebina zadostuje za x preizkusov/ Sisältö riittää x testille



Keep away from sunlight/ Nicht dem Sonnenlicht aussetzen/ Conserver à l'abri de la lumière/ Conservare al riparo della luce solare/ No exponer a la luz solar/ Proteger da luz solar/ Niet aan zonlicht blootstellen/ Må ikke udsættes for sollys/ Utsätt inte för solljus/ Nie wystawiać na słońce/ Napfénytől távol tartandó/ Nevystavovat slnečnému svetlu/ Nevystavovat slunečnímu světlu/ Да се предпазва от слънчева светлина/ Kaitsta otsese päikesekiirguse eest/ Κρατήστε το μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία/ Țineți departe de lumina soarelui/ Ne izpostavljajte sončni svetlobi/ suojaa auringonvalolta



Incubation time/ Inkubationszeit/ Temps d'incubation/ Tempo d'incubazione/ Tiempo de incubación/ Tempo de incubação/ incubatietijd/Inkubationstid/ inkubationstid/ Czas inkubacji/ Inkubációs idő/ Inkubačná lehota/ Inkubační doba/ Инкубационен период/ Inkubatsiooniaeg/ Χρόνος επώασης/ Timp de incubare/Inkubacijska doba/ inkubaatioaika



incubate at / Inkubation bei/ Incuber à/Incubare a/incubar a/Incubar a/incubatietemperatuur/Inkubation ved/inkubation vid/Inkubacja przy/Inkubáció hőmérséklete/Inkubácia pri/Inkubace při/Инкубира се при/Inkubatsioon temperatuuril/Επώαση στους/Incubare la/Inkubacija pri/ inkubaatiolämpötila



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



Microtiterplate/ Mikrotiterplatte/ plaque de microtitrage/ Piastra di microtitolazione/ Placa de microtitulación/ Placa de Microtitulação/ microtiterplaat/ Mikrotiterplade/ mikrotiterplatta/ microtiterplaat/ Płytko microtiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiiterplaat/ Τρυβλίο μικροπιλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitrská plošča/ Mikrotitrauslevy



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



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



Antibody Conjugate ; Antikörperkonjugat, anticorps conjugué, Coniugato di anticorpo, Conjugado de anticuerpos, Conjugado Anticorpo, antilichaamconjugaat, Antistoffer-konjugat, antikroppskonjugat, Konjugat antyciał, Antitest páros, Prottilátkový konjugát, Prottilátkový konjugát, Антигено конюгат, Antikehad konjugaat Σύμπλοκο αντισώματος, Compuși din anticorpi, Antitelesa konjugat, Vasta-aine konjugaat



Enzyme Conjugate, Enzym Konjugat, conjugué enzymatique, Coniugato di enzima, Conjugado de enzimas, Conjugado Enzima, enzymconjugaat, enzym-konjugat, enzymkonjugat, Konjugat enzymów, Enzim páros, enzymatický konjugát, enzymatický konjugát, ензим конюгат, Ensüümi konjugaat, Σύμπλοκο –ενζύμου, Compuși din enzime, Encima Konjugat, enzimi-konjugaat



Dilute in Buffer X/ Verdünnen in Puffer X/ Diluer dans le tampon X/ Diluire nel tampone X/ Diluir en tampón X/ Diluir no Tampão X/ verdunnen in buffer X/ Fortyndes i buffer X/ späd i buffert X/ Rozcieńczenie w buforze X/ Hígítás X pufferben/ Riedit' v pufrí X/ Ředit v pufru X/ Разреждане в буфер X/ Lahjendada puhvis X/ Αραιώστε σε ρυθμιστικό διάλυμα X/ Diluați în tamponul X/ Razredčiti v pufru X/ laimennetaan x puskuriin



Standard X /Standard X/ Etalon X/ Standard X/ Estándar X/ Standard X/ standaard X/ Standard X/ standard X/ Standard X/ Standard X/ Štandard X/ Standard X/ Стандарт X/ Standard X/ Πρότυπο X/ Standard X/

Control	KS1/ KS2	Standardni X/ Kalibraattori X Control Serum / Kontrollserum/ Contôle sérique/ Siero di controllo/ Suero de control/ Soro de Control/ controleserum/ Kontrolserum/ Kontrollserum/ Serum kontrolne/ Ellenőrző szérum/ Kontrolné sérum/ Kontrolni sérum/ Контролен сeрyм/ Kontrollseerum/ Ορός ελέγχου/Ser de control/ Kontrolni serum/ Kontrolli seerumi
WASHBUF 20x	WP	Washing Buffer Concentrate/ Waschpufferkonzentrat/ Tampon de lavage conc./ Tampone di lavaggio concentrato/ Tampón de lavado concentrado/ Tampão de Lavagem Concentrado/ wasbuffer, geconcentreerd/ Vaskebufferkonzentrat/ Vaskebufferkonzentrat/ tvättbuffertkoncentrat/ Bufor płukania koncentrat/ Mosópuffer koncentrátum/ Koncentrát vymývacieho pufru/ Концентрат на промивен буфер/ Pesupuhvri kontsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralnega pufru/ Pesuliuositiiviste
WASHBUF		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
SUBST TMB	S	Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ substraat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Subsztrátum/ Substrát/ Substrát/ Субстрат Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraattiliuos
H₂SO₄	SL	Stop Solution/ Stopp Lösung/ Stop Solution/ Soluzione di stop/ Stop Solución/ Solução Stop/ stopoplossing/ Stopopløsning/ Stopplösning/ Stop roztwór/ Megállító oldat/ Roztok na ukončenie/ Roztok pro ukončení/ Стопират разтвор/ Stopp-lahus/ Διάλυμα διακοπής/ Soluție de oprire/ Stop raztopina/ Pysäytysliuos
TAPE		Cover Plate with sealing tape /Platte abkleben/ Recouvrir la microplaque avec bande adhésive/ Coprire la piastra con nastro adesivo/ Cubrir la placa con una cinta adhesiva/ Cobrir a Placa com fita adesiva/ plaatje met tape afdekken/ Afdækningsplade med tape/ maskera platta/ Odkleić płytke/ Tányér leragasztása/ Oblepiti podložku lepiacou páskou/ Olepiti podložku lepící páskou/ Плака с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerklleplindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperiti placa cu o bandă adezivă/ Prelepiti ploščo/ Peitā mikrotitrauslevy oheisella teipillä
MEASURE		Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590nm)/Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)./ Mesure l'absorbance en l'espace de 30 min à 450 nm avec ≥590nm longueur d'onde pour référence/Misurazione entro 30 min. a 450 nm (filtro di riferimento ≥ 590 nm)./ Medición de la placa dentro de los siguientes 30 min a 450 nm (filtro de referencia ≥ 590nm)/ Medir a placa dentro de 30 min a 450 nm (Filtro de referência ≥590nm)/ Binnen 30 minuten bij 450 nm meten (referentiefilter ≥ 590 nm)./ Mål plade i løbet af 30 min ved 450 nm (referencefilter ≥590nm)/ Mät inom 30 min vid 450 nm (referensfilter ≥ 590 nm)./ Pomiar w ciągu 30 min przy 450 nm (filtr odniesienia ≥ 590 nm)./ Ki mérése 30 percen belül 450 nm-nél (referenciaszűrő ≥ 590 nm)./ Merat' 30 minút pri 450 nm/Měřit 30 minut při 450 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/ Bibliografia/ Literatura documentaçoão/ 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

Nur zum In-vitro-Gebrauch.

Nur zum Gebrauch durch Fachpersonal.

Nur zu Forschungszwecken.

Nicht für humane oder tierische, therapeutische oder diagnostische Zwecke.

Vor Gebrauch ist die gesamte Packungsbeilage zu lesen!

For in vitro use only!

For Research Use Only!

For professional use only!

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

Read entire protocol before use!

Symbols/ Symbole /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ symbolen/ Symboler/ Symboler/Symbole/ Szimbólumok/ Symboly/ Symboly/ Символы/ Sümbolid/ Σύμβολα/ Simboluri/ Simboli/ Symbolit	2
---	---

Packungsbeilage Deutsch

Inhaltsverzeichnis

Mediagnost Maus/-Ratten-IGF-I ELISA E25	5
Verwendungszweck	5
Einführung	5
Inhalt der Testverpackung	7
Zusätzlich benötigtes Material	7
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	8
TESTPRINZIP	9
Geeignete Proben	9
Lagerung der Proben	9
Proben Vorbereitung	9
Technische Hinweise	10
Testdurchführung	11
Auswertung	12
Berechnung der Standardkurve	12
Leistungsmerkmale	14
Standard	14
Sensitivität	14
Interassay Variabilität	14
Intraassay Variabilität	14
Linearität	14

Package Insert English

Table of Content

Intended Use	16
Reagents Provided	17
Materials Required but not provided	18
WARNINGS AND PRECAUTIONS	18
PRINCIPLE	19
Specimen	19
Storage of the samples	20
Sample Preparation	20
Technical Notes	20
Standards and Controls	21
Washing Buffer	21
Microtiterplate	21
Assay Procedure	22
Calculation of Results	23
Establishing the Standard Curve	23
Performance Characteristics	24
Standards	24
Sensitivity	24
Interassay Variability	24
Intraassay Variability	24
Linearity	25
LITREATURE / LITERATUR	26
KURZANLEITUNG – Mediagnost IGF-I-ELISA E25	28
SUMMARY – MEDIAGNOST IGF-I ELISA E25	30
REF E25 International Test Description	32

PACKUNGSBEILAGE DEUTSCH

Mediagnost Maus/-Ratten-IGF-I ELISA E25

- ist geeignet für IGF-I Bestimmungen in **Maus- und Rattenserum und Plasmen**
- hochsensitiv: **0.029 ng/ml** analytische Sensitivität; benötigtes Probenvolumen ist sehr klein
- ist **schnell**: Inkubationszeit insgesamt nur 2 Stunden
- Einzel-Standards mit **0,5; 2,5; 6; 12; 18 ng/ml** rekombinatem IGF-I sind im Kit enthalten.
- 2 Kontrollserum zur **Qualitätssicherung**
- verwendet **hochaffine Antikörper** gegen m/r-IGF-I
- Testplatten enthalten **einzelne abbrechbare Vertiefungen**

Verwendungszweck

Messung von IGF-I in Maus- und Rattenserum und Plasmen.

Einführung

Neben unterschiedlichen Zellkulturmodellen sowie Studien am Menschen stellen Maus und Ratte einen geeigneten Modellorganismus für präklinische Studien dar. Aus diesem Grund wurde der vorliegende Testkit entwickelt. Er soll als **Werkzeug für die Messung von IGF-I im Maus-/Rattenmodell** im Rahmen der Grundlagenforschung und präklinischer Studien dienen.

Im Folgenden wird, auch wenn ein Vergleich von Mensch und Maus-/Ratte nur begrenzt möglich ist, als Hintergrundinformation das IGF-I System *beim Menschen* kurz dargestellt:

Insulin-like growth factors (IGF)-I und-II spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Proliferation, Differenzierung und spezifischer Funktionen vieler Zelltypen (1-3). IGF-I ist identisch mit Somatomedin C (Sm-C) (4) und hat ein Molekulargewicht von 7649 Dalton (5). Seine wichtigsten Regulatoren sind das Wachstumshormon (WH) und die Ernährung.

Im Gegensatz zu vielen anderen Hormonen sind IGFs mit hoher Affinität an spezifische Bindungsproteine (IGFBP) gebunden. Sieben verschiedene Bindungsproteinen sind derzeit bekannt (7,8,22). Sie binden entweder IGF-I und IGF-II mit ähnlicher Affinität oder weisen eine Präferenz für IGF-II auf (9,10). Ein Hauptproblem bei der Messung von IGF-I resultiert aus der Interferenz mit IGFBPs im Assay. Die direkte Bestimmung in unbehandelten Serumproben (11) führt zu falschen Ergebnissen, weil auf Grund der extrem langsamen Dissoziation des IGF-I/IGFBP-3-Komplexes während der Assay-Inkubationszeit nur ein Teil des IGF-I der Messung zur Verfügung steht. In Abhängigkeit vom Verhältnis von IGF-I zu IGFBPs in der Probe kommt es zu Interferenzen: (s. beispielhaft in Abb.1)

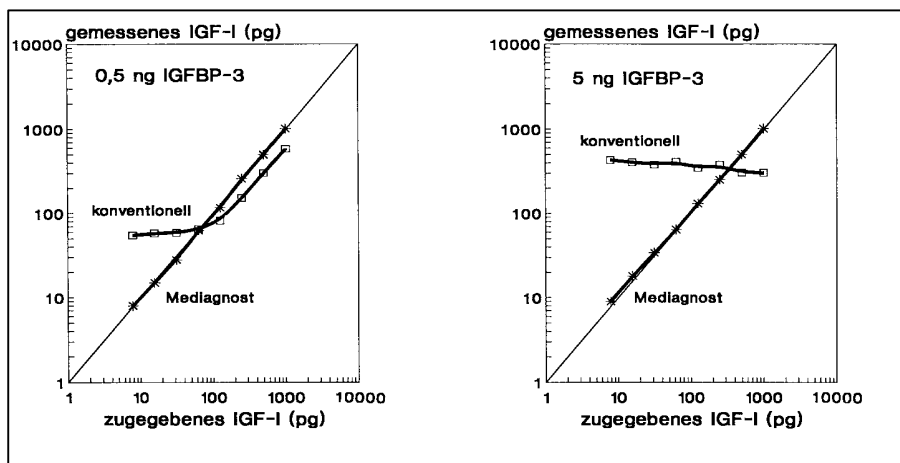


Abb. 1: Interferenz von IGFBP bei IGF-I-Messungen. Bekannte IGF-I-Konzentrationen wurden in Gegenwart von 0,5 ng (links) bzw. 5 ng (rechts) hIGFBP-3 mit einem konventionellen Assay (□) bzw. einem IGFBP-blockierten Mediagnost Assay gemessen.

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurde ein einfacher Assay entwickelt, der vor der eigentlichen Messung keine besondere Probenvorbereitung erfordert, abgesehen von einer Ansäuerung oder Verdünnung in einem speziell zusammengesetzten Puffersystem.

Inhalt der Testverpackung

1)	MTP	Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen , die in 12 abnehmbare Streifen á 8 Vertiefungen (einzelne abbrechbar) aufgeteilt ist. Die Platte ist mit einem Antikörper gegen Maus-/Ratten IGF-I beschichtet.
2)	CAL	Standards A-E , lyophilisiert, enthalten rekombinantes IGF-I. Die Verdünnungen der Standardkurve decken einen Bereich von 0,5 bis 18 ng/ml (0,5; 2,5; 6; 12; 18 ng/ml) IGF-I ab und werden in je 1 ml Probenpuffer PP rekonstituiert. Für den Assay werden jeweils 50 µl pro Vertiefung eingesetzt. Falls die Standards für mehr als eine Assay-Durchführung benötigt werden sollten, empfehlen wir die rekonstituierten Standards gefroren bei -20°C zu lagern. Achtung: die Standards dürfen nur einmal aufgetaut werden – gegebenenfalls bitte in geeigneten Volumina aliquotiert lagern!
3)	BUF	Probenpuffer PP, 125 ml , gebrauchsfertig, bitte zum Rekonstituieren der Standards A – E, der Kontrollseren KS1 & KS2 sowie für die Verdünnung der Proben und Kontrolle verwenden.
4)	Control	Kontrollseren KS1 & KS2 , je 500 µl , lyophilisiert müssen in 500 µl Probenpuffer PP rekonstituiert werden. Die IGF-I Soll-Konzentration und der Schwankungsbereich sind auf den Etiketten angegeben. Sie sollten im Assay in der gleichen Verdünnungen wie die jeweiligen Proben bestimmt werden, die Soll-Konzentration erhält man nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor .
5)	Ab	Antikörper-Konjugat AK, 7 ml, gebrauchsfertig , enthält anti-IGF-I Antikörper. Für den Assay werden jeweils 50 µl pro Vertiefung eingesetzt.
6)	EK	Enzym-Konjugat EK, 12 ml, gebrauchsfertig , enthält POD-markiertes Streptavidin. Für den Assay werden jeweils 100 µl pro Vertiefung eingesetzt.
7)	WASHBUF 20x	Waschpuffer WP, 50 ml , 20-fach konzentrierte Lösung, bitte vor Gebrauch 1:20 mit A.dest. oder entmineralisiertem Wasser verdünnen (z.B. den gesamten Flascheninhalt von 50 ml im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen). Achtung: endverdünnt ist der Waschpuffer nur 4 Wochen haltbar, bitte nur nach Bedarf ansetzen.
8)	SUBST	Substrat S, 12 ml , gebrauchsfertig, Meerettich-Peroxidase-(POD)-Substrat, stabilisiertes H ₂ O ₂ -Tetramethylbenzidin
9)	H ₂ SO ₄	Stopplösung SL, 12 ml , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure
10)		Abdeckfolie für Mikrotiterplatten, 2 Stück, selbstklebend

Zusätzlich benötigtes Material

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

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Mediagnost E25 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 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 seien.

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.

Die Reagenzien **A-E, AK, EK, PP** enthalten als Konservierungsmittel (0,01%)

2-Methyl-4-isothiazolin-3-one Solution

- R34 Verursacht Verätzungen
- R43 Kann bei Hautkontakt zur Sensibilisierung führen
- S26 Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen
- S36/37 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung und -handschuhe tragen.
- S45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen

Die Reagenzien **A-E, AK, EK, PP, WP** enthalten als Konservierungsmittel (0,01%) (w/w)

5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one und 2-methyl-2H-isothiazol-3-one

- R36/38 Reizend für Augen und Haut
- R43 Kann bei Hautkontakt zur Sensibilisierung führen
- S26 Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen
- S28.1 Im Falle von Hautkontakt sofort mit viel Wasser waschen

Substratlösung (S)

Das TMB-Substrat (S) enthält 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin.

- R20/21/R22 Gesundheitsschädlich bei Inhalation, Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
- R36/37/38 Reizend/Irritierend für Augen, Haut und Atmungssystem
- S26 Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen
- S36/37 Geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

Stopplösung (SL)

Die Stopplösung enthält 0,2 M Schwefelsäure (H₂SO₄)

- R36/38 Reizt die Augen und die Haut
- S26 Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.
- S36/37 Geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

Erste-Hilfe Maßnahmen:

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

Nach Augenkontakt: Nach Berührung mit den Augen während mindestens 15 Minuten 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.

TESTPRINZIP

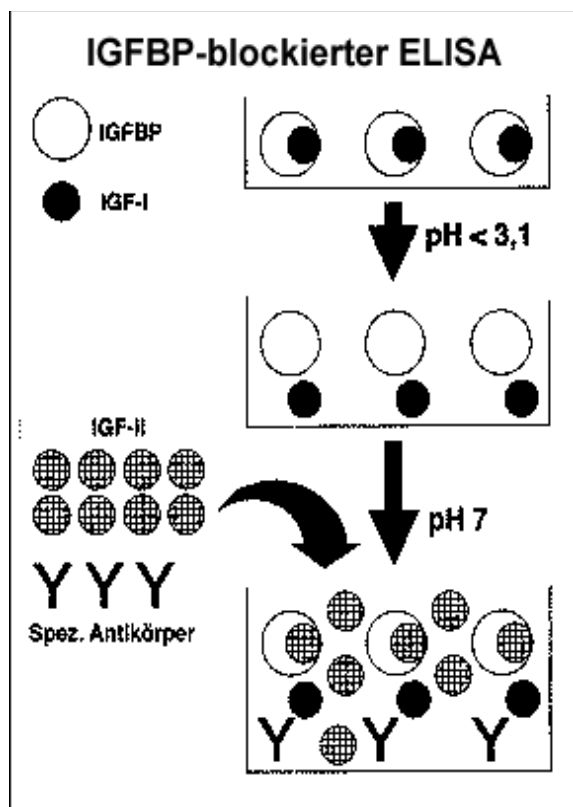


Abb. 2. Prinzip des IGFBP-blockierten ELISA

Geeignete Proben

Geeignet sind Seren und Heparin-, EDTA und Citratplasmen von Ratten und Mäusen. Eine eventuelle Verdünnung der Proben durch das Antikoagulans muss berücksichtigt werden.

Der Einfluss von Heparin (30 IE/mL), EDTA (6,8 mM) und NaCitrat (0,015 M) auf die Messung wurde bestimmt. Pufferlösung wurde mit entsprechenden Mengen der Substanzen sowie rekombinantem Maus-/Ratten IGF-I versetzt und die Wiederfindung bestimmt. Es konnten keine signifikanten Auswirkungen auf die Wiederfindung detektiert werden: Die durchschnittliche Wiederfindung betrug 108%.

Zellkulturmedium ist nach Vorverdünnung von 1:2 mit Probenpuffer PP als Probenmatrix geeignet.

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

Lagerung der Proben

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

Die Proben sollten nicht öfter als zweimal eingefroren/aufgetaut werden. IGF-I erwies sich nach mehrfachen Frier/Tauzyklen in Proben als instabil, entsprechend wurden Messwerte tiefer bestimmt.

Proben Vorbereitung

Die Proben müssen in Probenpuffer PP mindestens 1:10 verdünnt werden. Wir empfehlen im Allgemeinen eine Proben-Verdünnung von **1:100**.

Um IGF-I von den IGFBPs zu dissoziieren, müssen die Proben in einem sauren Puffer verdünnt werden (Abb. 2). Die verdünnten Proben werden dann in die Vertiefungen pipettiert, der pH wird dabei neutralisiert. Nach Neutralisation der Probe besetzt das in hohem Überschuss vorhandene IGF-II die IGF-Bindungsstellen der Bindungsproteine. Dies erlaubt die problemlose Messung des nun freien IGF-I. Bei diesem Verfahren werden also nicht die IGFBP-Moleküle per se entfernt, sondern lediglich deren Funktion und damit ihre Interferenz im Assay neutralisiert. Wegen der extrem niedrigen Kreuzreaktivität des IGF-I-Antikörpers mit IGF-II stört der hohe Überschuss an IGF-II die Interaktion mit IGF-I nicht. Im weiteren Verlauf wird der Assay wie ein konventioneller ELISA unter Verwendung eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugates fortgeführt.

Individuell können Werte aber stark variieren, es empfiehlt sich dies zu prüfen und eventuell die Probenverdünnung anzupassen.

Technische Hinweise

Der Assay ist strikt nach dem Testprotokoll durchzuführen.

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

Alle Komponenten des Kits müssen **vor Gebrauch auf Raumtemperatur** gebracht werden, die evtl. in manchen Puffern vorhandenen Präzipitate müssen vor Gebrauch durch Mischen und Erwärmen wieder gelöst werden. Inkubation bei Raumtemperatur bedeutet: Inkubation bei 20 - 25°C.

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

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

Zum Waschen muss der mitgelieferte und auf Gebrauchskonzentration verdünnte Waschpuffer verwendet werden. Das Waschvolumen pro Waschzyklus und Vertiefung muss mindestens 300 µl betragen.

Die mögliche Gefährdung durch den Umgang mit zumindest potentiell infektiösem Material muss beachtet werden.

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

Manuelles Waschen ist eine gute Alternativoption. Die Waschflüssigkeit kann dabei per Multistepper, Mehrkanalpipette oder auch mit einer Spritzflasche dispensiert werden. Die Waschflüssigkeit kann durch 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 fusselem Zellstoff gründlich entfernt werden.

Standards und Kontrollen

Für die Rekonstitution der lyophilisierten Komponenten (Standards A-E, KS1 & KS2) muss der im Kit erhaltene Probenpuffer PP 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 Standards und Kontrollen können bei –20°C für 2 Monate gelagert werden. Wiederholte Gefrier-/Tauzyklen sind zu vermeiden.

Waschpuffer

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

Testplatte

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

Substrat

Die Substratlösung S, stabilisiertes H₂O₂-Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich – Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

Testdurchführung

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

Bei der Testdurchführung müssen Standards, Kontrollseren und die jeweiligen Proben möglichst in 15 Minuten pipettiert werden.

Alle Inkubationen müssen bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) erfolgen

Das Antikörper- (AK) und Enzymkonjugat (EK) sowie nachfolgend die Substratlösung S sollten in der gleichen Reihenfolge und in dem gleichen Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Ebenso sollte die Stopplösung SL in der gleichen Reihenfolge und im gleichen Zeitintervall wie die Substratlösung auf die Testplatte gegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

- 1) In **alle** Vertiefungen die benutzt werden, bitte **50 µl Antikörperkonjugat AK** pipettieren.
- 2) In die ersten Vertiefungen werden **50 µl Probenpuffer PP** pipettiert (Leerwert). Im Anschluss daran werden jeweils **50 µl der Standardlösungen** oder **der verdünnten Kontrollen** oder **Proben** in die Vertiefungen gegeben.
- 3) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **1 Stunde** bei Raumtemperatur inkubiert (unter Schütteln 350 rpm).
- 4) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Lösungen abgesaugt und die Platte mit **300 µl Waschpuffer WP / Vertiefung fünfmal** gewaschen. Der Waschpuffer sollte vor dem Absaugen mindestens 15 Sekunden in den Vertiefungen verbleiben.

- 5) Nach dem letzten Waschschrift werden **100 µl Enzymkonjugat EK** in jede Vertiefung pipettiert.
- 6) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **0,5 h** bei Raumtemperatur inkubiert (unter Schütteln 350 rpm).
- 7) Nach Abschluss dieser Inkubation wird die Platte wie in Schritt 4) beschrieben gewaschen
- 8) In jede Vertiefung werden **100 µl der Substratlösung S** pipettiert.
- 9) Die Platte wird **30 Minuten** im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert
- 10) Nach Ablauf der Inkubationszeit wird in jede Vertiefung **100 µl Stopplösung SL** pipettiert.
- 11) Die Ausmessung der Farbreaktion erfolgt **innerhalb von 30 Minuten** bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm).

Auswertung

Berechnung der Standardkurve

Zur Auswertung des Testes muss gewährleistet sein, dass die Extinktionen des Leerwertes 0,25 Einheiten nicht überschreiten, Standard E muss dagegen Extinktionen über 1,0 Einheiten erreichen.

Proben, die höhere Extinktionen als der Standard E erzielen, liegen außerhalb der Standardkurve, zur sicheren Bestimmung müssen diese Proben in einer zweiten Testdurchführung bei höherer Verdünnung nochmals bestimmt werden.

Die bereitgestellten Standards enthalten folgende IGF-I Konzentrationen:

Standard	A	B	C	D	E
ng/ml	0,5	2,5	6	12	18

- 1) Ermittlung des **Mittelwerts** der optischen Dichte des Leerwertes aus den Doppelbestimmungen (Vertiefung A1/A2).
- 2) Von den Mittelwerten der optischen Dichte der Standardkonzentrationen und der Proben wird der mittlere Leerwert abgezogen.
- 3) Die Standardkonzentrationen (x-Achse) werden gegen die gemessene optische Dichte (y-Achse) aufgetragen.
- 4) Die Berechnung der Standardkurve sollte durch ein statistisches Programm erfolgen, da die Kurve i. Allg. nicht ideal durch eine lineare Regression beschrieben wird. **Ein höhergradiges Polynom, 4-Parameter-Anpassungen oder nicht-lineare Regression** sind zur Auswertung geeignet, in manchen Fällen kann eine Spline oder Punkt-zu-Punkt Anpassung angebracht sein.
- 5) Aus der Standardkurve erhält man derart die IGF-I-Konzentration der verdünnten Kontrollen KS1 & KS2 bzw. der verdünnten Proben (mit der individuellen Verdünnung, allgemein für Serum- und Plasma empfohlen 1:100). Die **Multiplikation** des jeweiligen berechneten IGF-I-Gehaltes **mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor** ergibt dann die IGF-I-Konzentration der unverdünnten Ausgangslösungen (je nach gewählter Einheit der Konzentration der Standards !).

Die hier beispielhaft gezeigte Standardkurve (Abbildung 3) darf **nicht für die Auswertung** Ihres Testes genutzt werden. Für jeden Test ist eine eigene Standardkurve anzufertigen.

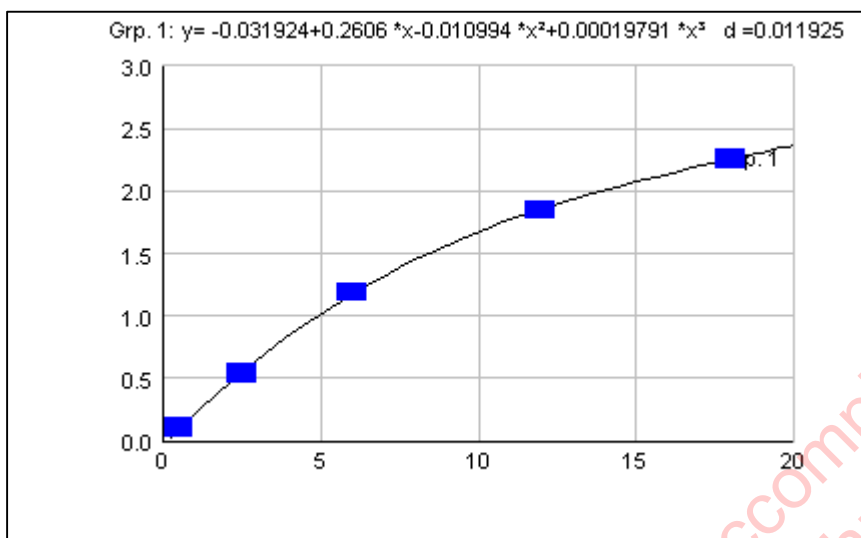


Abb. 3: Typische Standardkurve mit einem Polynom 3. Grades zur Berechnung der Standardkurve

Beispielhafte Berechnung der IGF-I – Konzentration einer unverdünnten Probe:

Gemessene Extinktion der Probe: 0,70
 Gemessene Extinktion des Nullwertes: 0,02

Aus der Differenz der Probenextinktion und der Extinktion des Leerwertes **berechnet Ihr Auswertungsprogramm** mit der entsprechenden Kurvenanpassung (hier: Polynom 3. Grades) die IGF-I Konzentration der verdünnten Probe durch Auflösen der Gleichung aus Abb. 3 nach x. In diesem Fall ergibt sich eine IGF-I Konzentration in der verdünnten Probe von 3.0921

und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (**1:100**) somit eine IGF-I Konzentration in der unverdünnten Probe von 309.21ng/mL

$$y = -0.031924 + 0.2606x - 0.010994x^2 + 0.00019791x^3$$

$$3.0921 = x$$

Leistungsmerkmale

Standard

Die Standards des ELISA E25 bestehen aus **rekombinanten IGF-I** in Konzentrationen von **0,5, 2,5, 6, 12, bzw. 18 ng/ml**.

Sensitivität

Die analytische Sensitivität des **ELISA E25** beträgt **< 0.029 ng/mL**

Interassay Variabilität

	Probe 1	Probe 3	Probe 4
Mittel	471	744	347
SD	24.81	41.8	23.3
VK%	5.3	5.6	6.72
n	10	10	16

Intraassay Variabilität

	Probe 1	Probe 2	Probe3
Mittel [µg/mL]	165	794	514
SD	8,0	47	22
VK%	4,9	5,9	4,2
n	10	10	10

Linearität

ng/mL	Probe 1	Probe 2
1:50	261	888
1:75	332	909
1:100	315	980
1:200	281	960
1:400	290	994
1:600	298	997
1:800	325	983

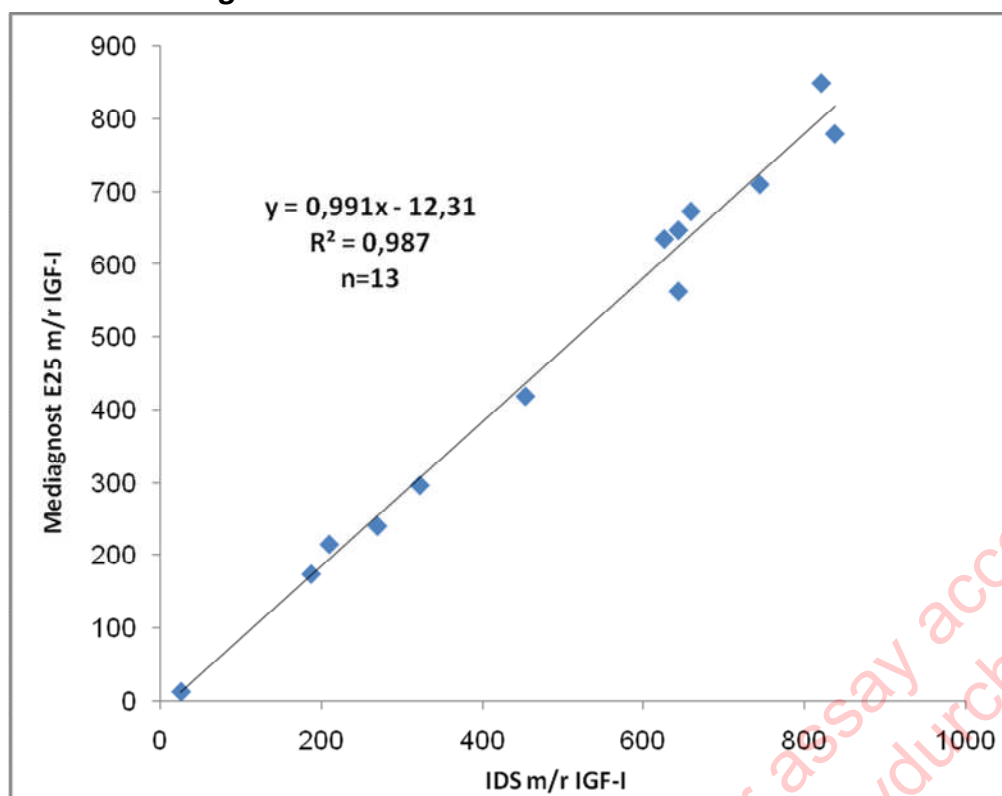
Methoden Vergleich

Abbildung 4: Methoden Vergleich des Mediagnost E25 m/r IGF-I ELISA dem IDS m/r IGF-I ELISA.

PACKAGE INSERT ENGLISH

Mediagnost Mouse/Rat IGF-I ELISA E25

- is suited for IGF-I determination in serum and plasma of **mice and rats**
- high sensitive: **0.029 ng/ml** analytical sensitivity; required sample volume is very small
- is **fast**: incubation time a total of 2 hours
- Single Standards with **0.5, 2.5, 6, 12, 18 ng/ml** recombinant IGF-I are provided in the Kit
- 2 Control Sera are provided for quality control
- uses **high affinity antibodies** against m/r IGF-I
- Microtiter plates are separately breakapart

Intended Use

Measurement of IGF-I in mouse / rat serum and plasma.

INTRODUCTION

Beside different cell culture models and studies with human patients, mice and rats are suitable model organisms for basic research and pre-clinical studies. Thus, we developed this test system as a tool for IGF-I measurements in mice and rat for usage in research and pre-clinical studies. Even if the comparability of mice and humans is limited we offer some background information on the *human* IGF-I system in the following section:

Insulin-like growth factors (IGF) I and II play a pivotal role in regulating the proliferation and differentiation of many cell types (1-3). IGF-I is identical with Somatomedin C (Sm-C) (4) and has a molecular weight of 7649 daltons (5). Its major regulators are growth hormone (GH) and nutrition (6). In contrast to many other peptide hormones, IGFs are avidly bound to specific binding proteins (IGFBP). The seven IGFBPs which are known at present (7,8,22) either bind IGF-I and IGF-II with similar affinities or show a preference for IGF-II (9,10).

A major problem of IGF-I measurement results from the interference of IGFBPs in the assay. Direct determinations in untreated serum samples (11) give false values because of the extremely slow dissociation of the IGF-I/IGFBP-3 complexes during the assay incubation. Depending on the ratio IGF-I to IGFBP in the sample interference comes up (see example Figure 1):

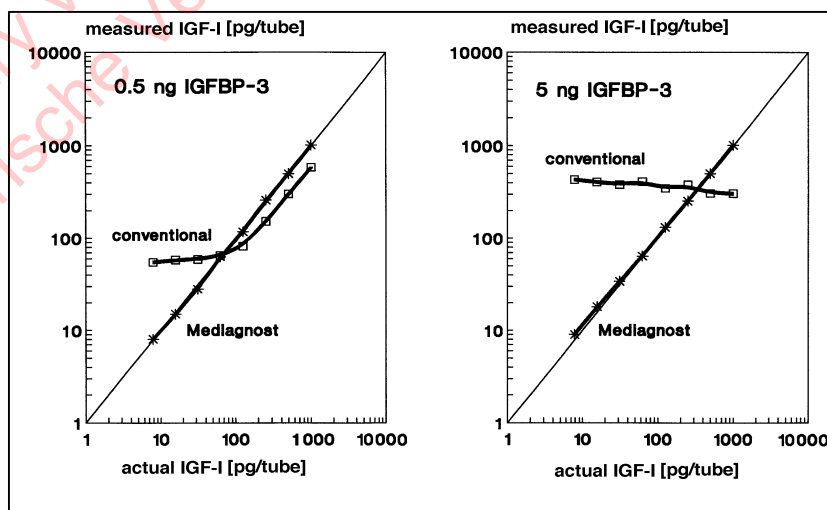


Figure 1. Interference of IGFBP in IGF-I measurements. Known concentrations of IGF-I were assayed in the presence of 0.5 ng (left) or 5 ng (right) hIGFBP-3 by a conventional (□) and by the IGFBP-blocked assay (*).

Therefore, various techniques were applied to physically separate IGF-I from its binding proteins before measurement, including (a) size exclusion chromatography under acidic conditions, (b) solid-phase extraction and (c) acid-ethanol extraction (2,12,13). These techniques, however, are either inconvenient or time-consuming or give incomplete and not-reproducible recoveries. The most widely used method is the acid-ethanol extraction (13,14) with a recovery of only 70-80 % of IGFBP-bound IGF-I as a result of co-precipitation. The absolute results of such an extraction are therefore false low (15). The extraction removes the IGFBPs only insufficiently and leads to reduction in sensitivity of the assay due to pre-dilution of the samples by the extraction procedure. Furthermore, the remaining IGFBP may still interfere in the assay. In addition, the acid-ethanol extraction is ineffective in specimens other than serum or plasma (e.g. cell culture media), in which determination of IGF-I is already difficult enough due to the fact that IGFBPs are frequently present at large excess.

To avoid these difficulties, an uncomplicated assay was developed, in which special sample preparation is not required before measurement.

Reagents Provided

1)	MTP	Microtiter plate , ready for use: Microtiter plate with 96 wells, divided up in 12 stripes à 8 wells (separately breakapart) coated with anti-mouse/rat IGF-I antibody.
2)	CAL	Standards A-E , lyophilised, contain recombinant IGF-I. Standard values are between 0.5 - 18 ng/ml (0.5, 2.5, 6, 12 und 18 ng/ml) IGF-I and have to be reconstituted in 1 ml (each) Sample Buffer PP . 50 µl per well are used in the assay. If the standards are required for more than one assay process we recommend to store the reconstituted Standards frozen at -20°C. Attention: Standards should be thawed only once – where required please store aliquoted in adequate volumes.
3)	DILU	Sample buffer PP, 125 ml , ready for use, please use for the reconstitution of Standards A-E, Control Sera KS1 & KS2 and for the serum dilution.
4)	Control	Control Sera KS1 & KS2 , each 500 µl lyophilised: Sera have to be reconstituted in 500 µl Sample Buffer PP . The IGF-I target values and the respective ranges are given on the vial labels. The dilution of the Control Sera KS 1&2 should be according to the dilution of the respective samples, the target values should be obtained by multiplication with the respective dilution factor .
6)	Ab	Antibody Conjugate AK, 7 ml , ready for use, contains the biotinylated anti-IGF-I antibody. Use 50 µl for each well in the assay.
7)	CONJ	Enzyme Conjugate EK, 12 ml , ready for use, contains horseradish-peroxidase conjugate to streptavidin, use 100 µl for each well in the assay.
6)	WASHBUF 20x	Washing Buffer (WP), 50 ml, 20 X concentrated solution. Washing Buffer (WP) has to be diluted 1:20 with distilled or demineralised water before use (e.g. add the complete contents of the flask (50 ml) into a graduated flask and fill up with A.dest. to 1000 ml). Attention: After dilution the Washing Buffer is only 4 weeks stable, dilute only according to requirements.
7)	SUBST	Substrate (S), 12 ml , ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP)-substrate, stabilised H ₂ O ₂ Tetramethylbencidine.
8)	H ₂ SO ₄	Stopping Solution (SL), 12 ml , ready for use, 0.2 M sulphuric acid, Caution acid!
9)		Sealing tape for covering of the microtiter plate, 2 x, adhesive.

Materials Required but not provided

Precision pipettes and multichannel pipettes with disposable plastic tips
 Vortex-mixer
 Microtiter plate shaker (350 rpm)
 Microtiter plate washer (recommended)
 Micro plate reader ("ELISA-Reader") with filter for 450 and 620nm (or ≥ 590 nm)
 Polyethylene PE/Polypropylene PP tubes for dilution of samples

WARNINGS AND PRECAUTIONS**For in vitro use only. For professional use only.**

Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.

Before use, all kit components should be brought **to room temperature at 20 - 25°C**. Precipitates in buffers should be dissolved before use by thorough mixing and warming.

Do not mix reagents of different lots. Do not use expired reagents.

The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 - 8°C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.

Caution: This kit contains material of human and/or animal origin.

No known test methods can offer total assurance of the absence of infectious agents; therefore all components and specimens should be treated as potentially infectious.

Following components contain < 0.01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one solution as preservative: **A-E, AK, EK, PP**

R34 Irritating to eyes and skin
 R43 Sensibilisation through skin contact possible
 S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice
 S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves
 S45 In case of accident or if you feel unwell seek medical advice

Following components contain < 0.01% (w/w) 5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one as preservative: **A-E, AK, EK, PP, WP**

R36/38 Irritating to eyes and skin
 R43 Sensibilisation through skin contact possible
 S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice
 S28.1 After contact with skin, wash immediately with plenty of water

Stop solution contains 0.2 M Sulfuric Acid (H₂SO₄)

R36/38 Irritating to eyes and skin
 S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice
 S28.1 After contact with skin, wash immediately with plenty of water
 S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves.

Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step. Use separate pipette tips for each sample, control and reagent to avoid cross contamination. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.

TMB-Substrate (S) contains 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine. Store and Incubate in the dark.

R20/21/R22 Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed
 R36/37/38 Irritating to eyes, respiratory system and skin
 S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice
 S28.1 After contact with skin, wash immediately with plenty of water
 S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves

General first aid procedures:

Skin contact: Wash affected area thoroughly with water. Discard 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: If swallowed, wash out mouth thoroughly with water. Immediately see a physician.

Do not eat, drink or smoke in these areas.

Never pipette the materials with the mouth.

Spilled material must be wiped off immediately and should become disinfected. Clean contaminated areas and equipment with a suitable detergent.

PRINCIPLE

The Mediagnost ELISA for m/r IGF-I E25 is a so-called Sandwich-Assay. It utilizes two specific and high affinity antibodies for this protein. The IGF-I in the sample binds to the immobilized first antibody on the microtiter plate, the biotinylated and Streptavidin-Peroxidase conjugated second specific anti-IGF-I-Antibody binds in turn to the immobilized IGF-I. In the closing substrate reaction the turn of the colour will be high specific catalysed, quantitatively depending on the IGF-I-level of the samples.

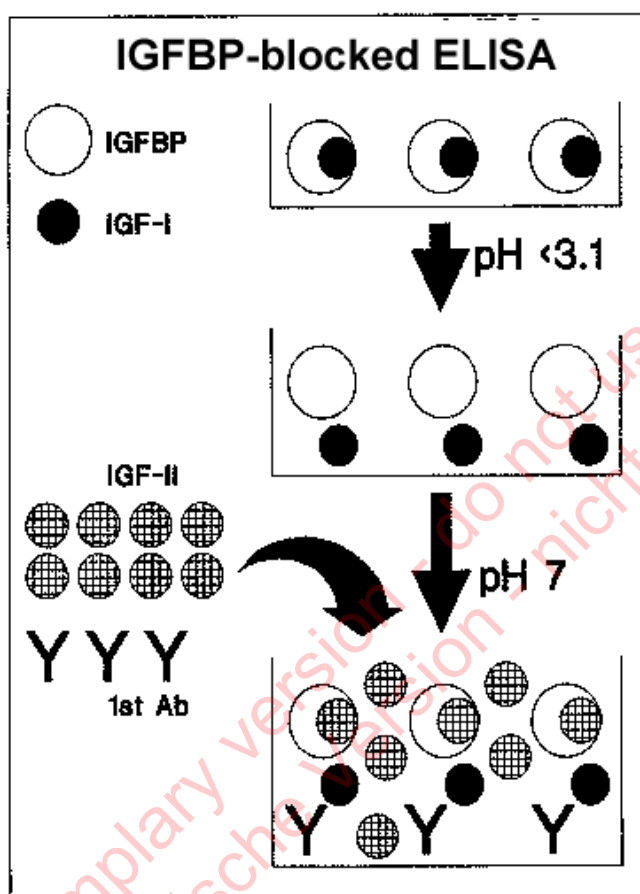


Figure 2: Principle of the IGFBP blocked IGF-I ELISA

In order to dissociate IGF-I from the IGFBPs, the samples must be diluted in an acidic buffer (Figure 2). The diluted samples are then pipetted into the wells, by this the pH-value will be neutralized. After neutralization of the samples, the excess IGF-II occupies the IGF-binding sites of the binding proteins, thus allowing the measurement of resulting free IGF-I. With this method, the IGFBPs are not removed, but their function and therefore their interference in the assay is neutralized. Due to the extremely low cross-reactivity of the IGF-I antibody with IGF-II, the excess of IGF-II does not disturb the interaction with IGF-I.

The test runs like a conventional ELISA using a Streptavidin-Peroxidase-Enzyme Conjugate.

Specimen

Serum samples as well as Heparin-, EDTA- and Citrat-Plasma samples are suited. Possible dilution of the sample by the anticoagulant must be considered.

Influence of Heparin (30 IE/mL), EDTA (6,8 mM) and NaCitrat (0,015 M) on the measurement of IGF-I has been investigated in recovery experiments. Buffer solution was enriched with recombinant IGF-I and the above mentioned substances. No significant influence on the recovery of IGF-I was detected, on average the recovery of recombinant material in comparison to enriched PBS was 108%.

Cell culture medium is suitable as sample matrix after predilution of 1:2 with Sample Buffer PP.

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

Storage of the samples

Storage at RT max. 2 days

Storage at -20°C max. 2 years

More than 2 freeze/thaw cycles are not recommended. IGF-I in samples was found to be unstable under repeated freeze/thaw cycles, measured values declined respectively.

Sample Preparation

Samples have to be diluted at least 1:10 in Sample Buffer (PP).

A serum dilution of 1:100 is in general suitable. However, the IGF-I levels can vary individually significant, we would therefore recommend to check this and adjust the dilution respectively.

Technical Notes

The assay has to be conducted strictly according the test protocol herein.

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

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

Incubation at room temperature means: 20-25°C

The incubation steps should be performed at mean rotation frequency of a particularly suitable microtitre plate shaker. We are recommending 350 rpm. Due to certain technical differences deviations may occur, in case the rotation frequency must become adjusted. Insufficient shaking may lead to inadequate mixing of the solutions and thereby to low optical densities, high variations and/or false values, excessive shaking may result in high optical densities and/or false values.

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

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

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

When using an automatic microtitre 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 multistep device, a multichannel pipette, or a squirt bottle. The fluid may be removed by dynamically swinging out the microtitre plate over a basin. If aspirating devices are used, care has to be taken that the inside well surface is not scratched. Subsequent to every single washing step, the remaining fluid should be removed by inverting the plate and repeatedly tapping it dry on non fuzzy absorbent tissue.

Standards and Controls

For the reconstitution of the lyophilised components (Standards A - E and Control Sera KS1 & KS2) the kit Sample Buffer PP has to be used. It is recommended to keep reconstituted reagents at room temperature for 15 minutes and then to mix them thoroughly but gently (no foam!) with a Vortex mixer.

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

Washing Buffer

The required volume of washing buffer is prepared by 1:20 dilution of the provided 20fold concentrate with deionised water. The diluted Washing Buffer is stable for 4 weeks at $2-8^{\circ}\text{C}$. It has to be at room temperature for usage!

Microtiter plate

Unused microtiter plate stripes have to be stored airtight together with the desiccant bag at $2-8^{\circ}\text{C}$. The labelled expiry is not influenced in case of proper storage.

Assay Procedure

All determinations (Standards, Control Sera KS1 & KS2 and samples) should be assayed in duplicate. For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

When performing the assay, the Standards, Control Sera and the samples should be pipette as fast as possible (e.g., <15 minutes).

All incubations have to be conducted at room temperature (20-25°C)

To avoid distortions due to differences in incubation times, Antibody (AK) and Enzyme Conjugate (EK) as well as the following Substrate Solution S should be added to the plate in the same order and in the same time interval as the samples. Stop Solution SL should be added to the plate in the same order as the Substrate Solution.

- 1) Add **50 µl Antibody Conjugate AK** in **all** wells used
- 2) Add **50 µl Sample Buffer PP** into the first two wells (These wells serve as blanks). Subsequently add 50 µl Standard or 50 µl of diluted Control Sera or diluted samples into wells designated for standards, controls or samples.
- 3) Cover the wells with sealing tape and incubate the plate for **1 hour** at **room temperature** (shake at 350 rpm)
- 4) After incubation, aspirate the contents of the wells and wash the wells **5 times 300 µl Washing Buffer WP / well**. The washing buffer should incubate for at least for 15 seconds/cycle. Tap the plate firmly against several layers of folded paper towels to remove excess washing buffer.
- 5) Following the last washing step pipette **100 µl** of the **Enzyme Conjugate EK** in each well.
- 6) Cover the wells with sealing tape and incubate the plate for **0.5 hour** at **room temperature** (shake 350 rpm).
- 7) After incubation wash the wells **5 times** with Washing Buffer as described in step 4
- 8) Pipette **100 µl of the TMB Substrate** Solution in each well.
- 9) Incubate the plate for **30 minutes in the dark at room temperature (20 - 25°C)**.
- 10) Stop the reaction by adding **100 µl of Stopping Solution**.
- 11) Measure the colour reaction within 30 minutes at 450nm (reference filter ≥590 nm).

Calculation of Results

Establishing the Standard Curve

For the evaluation of the assay it is preconditioned that the absorbance values of the blank should be below 0.25, these of standard E should be above 1.0.

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

Standards are provided in the following concentrations (use the concentration unit as preferred):

Standard	A	B	C	D	E
ng/ml	0.5	2.5	6	12	18

- 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. **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 IGF-I concentration of the diluted sample or the diluted control sera KS1&2 in ng/ml (or µg/ml according the chosen unit for the standards) is calculated in this way, the IGF-I concentration of the **undiluted sample** and of KS1 & KS2 is calculated **by multiplication** with the respective dilution factor.

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

Exemplary calculation of the IGF-I concentration of an diluted sample:

Measured extinction of your sample	0.70
Measured extinction of the blank	0.02

Your **measurement programm** will calculate the IGF-I 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 3rd degree).

In this exemplary case the following equation is solved by the programm to calculate the IGF-I concentration in the sample:

$$y = -0.031924 + 0.2606x - 0.010994x^2 + 0.0019791x^3$$

$$3.0921 = x$$

if the dilution factor (**1:100**) is taken into account the IGF-I concentration of the undiluted sample is 309.21 ng/mL

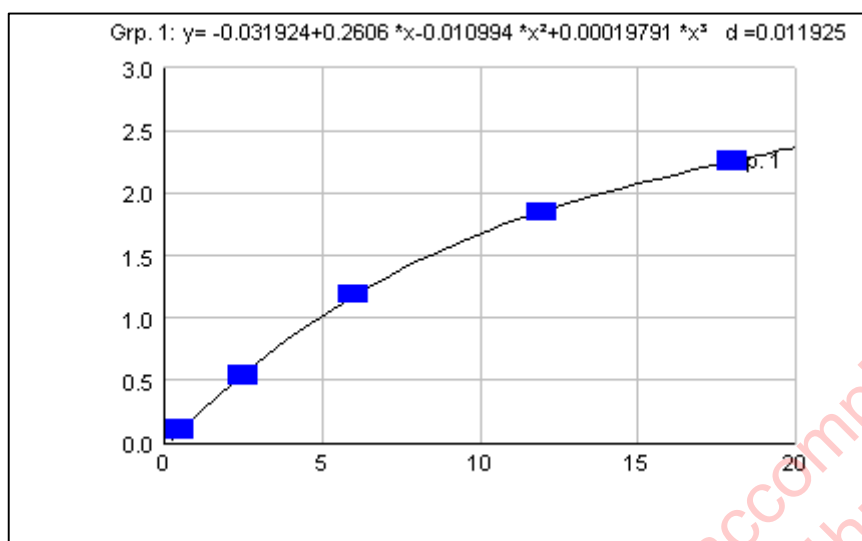


Fig. 3: Exemplary Standard Curve with a polynomial 3rd degree as curve fit.

Performance Characteristics

Standards

The Standards of the ELISA E25 are prepared from **recombinant IGF-I** in concentrations of **0.5, 2.5, 6, 12, 18 ng/mL**.

Sensitivity

The analytical sensitivity of the ELISA E25 yields **< 0.029 ng/mL**

Interassay Variability

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean	471	744	347
SD	24.81	41.8	23.3
VC%	5.3	5.6	6.72
n	10	10	16

Intraassay Variability

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean [µg/mL]	165	794	514
SD	8,0	47	22
VC%	4,9	5,9	4,2
n	10	10	10

Linearity

ng/mL	Probe 1	Probe 2
1:50	261	888
1:75	332	909
1:100	315	980
1:200	281	960
1:400	290	994
1:600	298	997
1:800	325	983

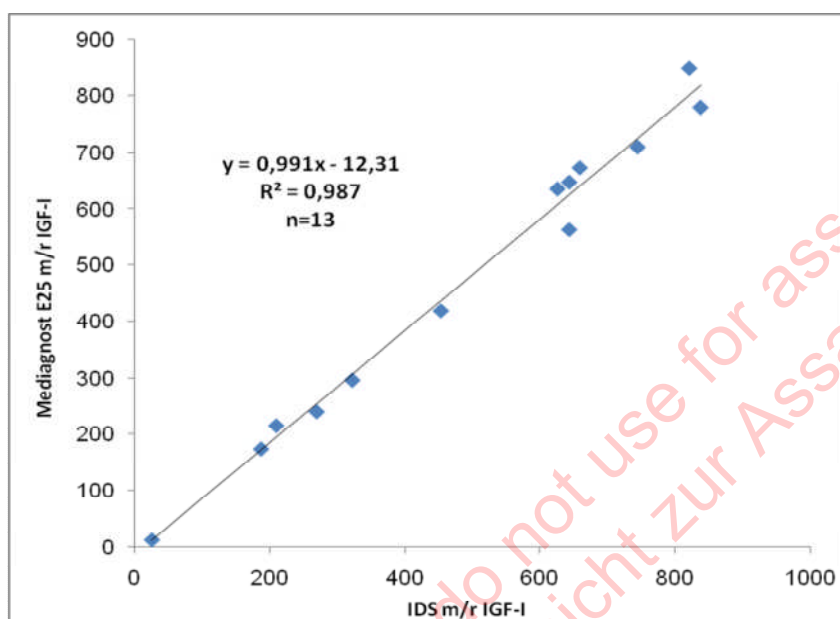
Method Comparison

Figure 4: Method comparison of the Mediatechn E25 m/r IGF-I ELISA and the IDS m/r IGF-I ELISA.

LITREATURE / LITERATUR

- 1) Baxter RC. 1986 The somatomedins: insulin-like growth factors. *Adv Clin Chem.* 25:49-115
- 2) Daughaday WH, Rotwein P. 1989 Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev.* 10:68-91
- 3) Spencer EM (Ed.) 1991 *Modern Concepts of Insulin-Like Growth Factors*. New York: Elsevier.
- 4) Klapper DG, Svoboda ME, Van Wyk JJ. 1983 Sequence analysis of somatomedin-C: confirmation of identity with insulin-like growth factor-I. *Endocrinology.* 112:2215-2217.
- 5) Rinderknecht E, Humbel RE. 1978 The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem.* 253:2769-2276.
- 6) Clemmons DR, Van Wyk JJ. 1984 Factors controlling blood concentration of somatomedin C. *Clin Endocrinol Metab.* 13:113-143.
- 7) Ballard J, Baxter R, Binoux M, et al. 1989 On the nomenclature of the IGF binding proteins. *Acta Endocrinol (Copenh).* 121:751-752.
- 8) Drop SLS. 1992 Report on the nomenclature of the IGF binding proteins. *J. Clin Endocrinol Metab.* 74:1215-1216.
- 9) Martin JL, Baxter RC. 1986 Insulin-like growth factor binding protein from human plasma. Purification and characterization. *J Biol Chem.* 261:8754-8760.
- 10) Binkert C, Landwehr J, Mary JL, Schwander J, Heinrich G. 1989 Cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding a novel insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-2). *EMBO J.* 8:2497-2502.
- 11) Furlanetto RW, Underwood LE, Van Wyk JJ, D'Ercole AJ. 1977 Estimation of somatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay. *J. Clin Invest.* 60:648-657.
- 12) Daughaday WH, Kapadia M, Mariz I. 1987 Serum somatomedin binding proteins: physiologic significance and interference in radioligand assay. *J Lab Clin Med.* 109:355-363.
- 13) Breier BH, Gallaher BW, Gluckman PD. 1991 Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I: solutions to some potential problems and pitfalls. *J Endocrinol.* 128:347-357.
- 14) Daughaday WH, Mariz IK, Blethen SL. 1980 Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites: a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol-extracted serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 51:781-788.
- 15) Blum WF, Gallaher B, Ranke MB. 1992 An IGFBP-blocked IGF-I RIA that measures what it pretends to measure: IGF-I. 74th Annual Meeting of the American Endocrine Society. 293.
- 16) Rosenfeld RG, Wilson DM, Lee PDK, Hintz RL. 1986 Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation. *J Pediatr.* 109:428-433.
- 17) Clemmons DR, Van-Wyk JJ, Ridgway EC, Kliman B, Kjellberg RN, Underwood LE. 1979 Evaluation of acromegaly by radioimmunoassay of somatomedin-C. *N. Engl J Med.* 301:1138-1142

- 18) Zapf J, Walter H, Froesch ER. 1981 Radioimmunological determination of insulin-like growth factors I and II in normal subjects and in patients with growth disorders and extrapancreatic tumor hypoglycemia. J Clin Invest. 68:1321-1330.
- 19) Blum WF. 1992 Insulin-like growth factors and their binding proteins. In: Ranke MB, ed. Functional Endocrinologic Diagnostics in Children and Adolescence. Mannheim: J + J Verlag; 102-117.
- 20) Rieu M, Girard F, Bricaire H, Binoux M. 1982 The importance of insulin-like growth factor (somatomedin) measurements in the diagnosis and surveillance of acromegaly. J Clin Endocrinol Metab. 55:147-153.
- 21) Blum WF, Ranke MB, Bierich JR. 1988 A specific radioimmunoassay for insulin-like growth factor II: the interference of IGF binding proteins can be blocked by excess IGF-I. Acta Endocrinol (Copenh).118:374-380.
- 22) Wilson EM, Oh Y, Rosenfeld RG (1997) Generation and characterization of an IGFBP-7 antibody: Identification of 31 kD IGFBP-7 in human biological fluids and Hs578T human breast cancer conditioned media. J Clin Endocrinol Metab Vol 82, 4:1301-1303
- 23) Ranke MB, Schweizer R, Elmlinger MW, Weber K, Binder G, Schwarze CP, Wollmann HA (2000) Significance of basal IGF-I, IGFBP-3 and IGFBP-2 measurements in the diagnostics of short stature in children. Horm Res 54:60-68
- 24) Ranke MB, Schweizer R, Elmlinger MW, Weber K, Binder G, Schwarze CP, Wollmann HA (2001) Relevance of IGF-I, IGFBP-3 and IGFBP-2 measurements during GH treatment of GH-deficient and non-GH-deficient children and adolescents. Horm Res 55:155-124

KURZANLEITUNG – Mediagnost IGF-I-ELISA E25

Rekonstitution/ Verdünnung von Reagenzien		
Standards A-E	Rekonstitution in Probenpuffer PP	1 ml
Kontrollserum KS1&KS2	Rekonstitution in Probenpuffer PP	500 µl
Waschpuffer WP	verdünnen in A. dest. (z.B. die gesamte Menge von 50 ml im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen)	1:20
Proben und Kontrollseren KS1 & KS2: 1:100 in Probenpuffer PP verdünnen, sofort mischen, mind. 15 min, max. 120 min inkubieren. Davon 50 µl pro Bestimmung einsetzen		
Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.		

Testdurchführung in Doppelbestimmung

Pipettieren	Reagenzien	Position
50 µl	Antikörperkonjugat AK	in <u>alle</u> benötigten Vertiefungen pipettieren
50 µl	Probenpuffer PP als Leerwert	A1 und A2
50 µl	Standard A (0,5 ng/ml)	B1 und B2
50 µl	Standard B (2,5 ng/ml)	C1 und C2
50 µl	Standard C (6 ng/ml)	D1 und D2
50 µl	Standard D (12 ng/ml)	E1 und E2
50 µl	Standard E (18 ng/ml)	F1 und F2
50 µl	Kontrollserum KS1	G1 und G2
50 µl	Kontrollserum KS2	H1 und H2
50 µl	Proben	in Vertiefungen nach Bedarf pipettieren
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.		

Inkubation: 1 h bei RT, 350 rpm

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

Inkubation: 30 min bei RT, 350 rpm

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

Inkubation: 30 min im Dunklen bei RT

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

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

SUMMARY – MEDIAGNOST IGF-I ELISA E25

Reconstitution / Dilution of Reagents		
Standards A-E	Reconstitution in Sample Buffer PP	1 ml
Control Serum KS1	Reconstitution in Sample Buffer PP	500 µl
Control Serum KS2	Reconstitution in Sample Buffer PP	500 µl
Wash Buffer WP	dilute in A. dest. (eg. total volume of 50 ml in a graduated flask and fill up to 1000 ml)	1:20
Sample + Control Sera KS1 and KS2: dilute 1:100 in Sample Buffer PP, mix immediately, incubate at least for 15 min, max. 2h. Use 50 µl for each well in the assay.		
Before conducting the assay equilibrate all reagents to room temperature.		

Assay Procedure for Double Determinations:

Pipette	Reagent	Position
50 µl	Antibody Conjugate AK	in <u>all</u> wells used
50 µl	Sample Buffer PP (blank)	A1 and A2
50 µl	Standard A (0.5 ng/ml)	B1 and B2
50 µl	Standard B (2.5 ng/ml)	C1 and C2
50 µl	Standard C (6 ng/ml)	D1 and D2
50 µl	Standard D (12 ng/ml)	E1 and E2
50 µl	Standard E (18 ng/ml)	F1 and F2
50 µl	Control Serum KS1	G1 and G2
50 µl	Control Serum KS2	H1 and H2
50 µl	Samples	following wells
Cover the wells with the sealing tape.		

Incubation: 1 h at RT, 350 rpm

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

Incubation: 30 min at RT, 350 rpm

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

Incubation: 30min in the dark RT

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

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

REF E25



International Test Description

CAL A-E	A -E	Rec in 1 ml BUF PP	
Control	KS1&KS2	Rec in 500 µl BUF PP	
WASHBUF 20x	WP		1:20 DILU A. dest.

SPE + Control 1:100 DILU BUF PP ↔ ⌚ 0.25 h
°C 20-25 °C

50 µl	Ab	A1 - End
50 µl	BUF PP	A1/2
50 µl	CAL A Std A (0.5 ng/ml)	B1/2
50 µl	CAL B Std B (2.5 ng/ml)	C1/2
50 µl	CAL C Std C (6 ng/ml)	D1/2
50 µl	CAL D Std D (12 ng/ml)	E1/2
50 µl	CAL E Std E (18 ng/ml)	F1/2
50 µl	CONTROL KS 1	G1/2
50 µl	CONTROL KS 2	H1/2
50 µl	SPE	
TAPE		

⌚ 1 h °C 20-25 ↔ 350 rpm

5x 300 µl	5x WASHBUF WP
100 µl	CONJ
TAPE	

⌚ 0.5 h °C 20-25 ↔ 350 rpm

5 x 300 µl	5x WASHBUF WP
100 µl	SUBST TMB S

⌚ 30 min °C 20-25 ☀

100 µl	H ₂ SO ₄ SL
MEASURE	