

# Resistin

# ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von  
**humanem Resistin**

Deutsch

Enzymeimmunoassay for quantitative Determination of  
**human Resistin**

English

Europäische Union / European Union\*:  
**für In-vitro-Diagnostik / For In Vitro Diagnostic Use**  
**Nur zum Gebrauch durch Fachpersonal! / Only for professional use!**  
Rest of the world and USA\*\*:  
For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.




















DE/CA40/00809/14



# Symbols/ Symbole /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ symbolen/ Symboler/ Symboler/Symbole/ Szimbólumok/ Symboly/ Symboly/ Символи/ Symbolid/ 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/ 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 respectați instrucțiunile de utilizare/ Uspořevajte navodila za uporabo!/ Lue käyttöohje huolellisesti!
	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 használatához)/ In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určené na diagnostiku „in vitro“)/ In vitro diagnostický zdravotnícký 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-diagnostiikkäyttö
	Lot-Batch Number/ Charge-Chargennummer/ Lot-Code du lot/ Lotto-Numero di lotto/ Lote-Código de lote/ Lote-Código do Lote/Lot-Partijnummer/ Lot-Batchkode/ Partisatskod/ Numer serii/ Tétel-sarzs szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/Partii – 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
	Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referência/ Referentienummer/ Referencennummer /Beställningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/Katalógové číslo/ Objednací číslo/Каталожен номер/Tellimisnumber/ Αρ. παραγγελίας/Număr comandă/ Številka naročila/ viite tai tilausnumero
	Store at between/ Lagerung bei zwischen/ Conserver à entre/ Conservare a tra/ Conservar a temp. Entre/ Armazenaer entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevaeres mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí/ Температурно ограничение/ Säilätida temperatuuridel/ Φύλαξη σε θερμοκρασία/ Depozitare între/ Skladiščenje med/ Säilytys x-y Celsiusasteen lämpötilassa
	Contains sufficient for x tests/ Inhalt ausreichend für x Tests/ Contient suffisant pour x tests/ Contenuto sufficiente per x test/ Contenido suficiente para x pruebas/ Conteúdo suficiente para x testes/ Bevat voldoende voor x bepalingen/ Indeholder tilstrækkeligt til x prøver/ Innehållet räcker till x analyser/ Zawartość na x testów/ Tartalma x teszt elvégzésére elegendő/ Obsahuje materiál pre x testov / Obsah dostačuje pro x testů/ Съдържание достатъчно за x тестове/ Sisust jätkub x katse jaoks/ Το περιεχόμενο επαρκεί για x δοκιμές/ Conținut suficient pentru x teste/ Vsebina zadostuje za x preizkusov/ Sisältö riittää x testille
	Keep away from sunlight/ Nicht dem Sonnenlicht aussetzen/ Conserver à l'abri de la lumière/ Conservare al riparo della luce solare/ No exponer a la luz solar/ Proteger da luz solar/ Niet aan zonlicht blootstellen/ Må ikke udsættes for sollys/ Utsätt inte för solljus/ Nie wystawiać na słońce/ Napfénytől távol tartandó/ Nevystavovat' slnečnému svetlu/ Nevystavovat 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
	Mikrotiterplate/ Mikrotiterplatte/ plaque de microtitrage/ Piastra di microtitolazione/ Placa de microtitulación/ Placa de Microtitulação/ microtiterplaat/ Mikrotiterplade/ mikrotiterplatta/ microtiterplaat/ Płytká microtiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiterplaat/ Τρυβλίο μικροτιτλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitrská plošča/ Mikrotitrauslevy
	Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituir en/ Reconstituir em/ reconstituieren in/ Rekonstituér i/ rekonstituera/ Rekonstytuować w/ Helyreállítás/ Znovu pripraviť za/ Znovu připravit za/ Разтваряне в/ Moodustada uesti / Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ rekonstituo
	Sample/ Probe /Echantillon/ campione/ Muestra/ Amostra/ monster/ Prøve/ prov/ Próbka/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probă/ Vzorec/ Näyte
	AK Antibody and Enzyme Conjugate/ Antikörper und Enzym Konjugat/ anticorps conjugué et conjugué enzymatique/ Coniugato di anticorpo ed enzima/ Conjugado de anticuerpos y enzimas/ Conjugado Anticorpo-Enzima/ antilichaamen enzymconjugaat/ Antistoffer og enzym-konjugat/ antikropp- och enzymkonjugat (antikropp och enzym, konjugat)/ Koniugat antyciał i enzymów/ Antitest és enzim páros/ Prtilátkový a enzymatický konjugát/ Prtilátkový a
	EK

		enzymatický konjugát/ Антитяло и ензим конюгат/ Antikehad ja ensüümi konjugaat/ Σύμπλοκο αντισώματος- ενζύμου/ Compuși din anticorpi și enzime/ Antitelesa in konjugat encima/ Vasta-aine ja entsyymi konjugaatti
<b>DILU</b>	<b>BUF</b>	
<b>X</b>		
	PP/ VP	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/ spád i buffert X/ Rozcieńczenie w buforze X/ Hígítás X pufferben/ Riedit' v pufrí X/ Ředit v pufru X/ Разреждане в бυφερ X/ Lahjendata puhvris X/ Αραιώστε σε ρυθμιστικό διάλυμα X/ Diluați în tamponul X/ Razredźci v pufru X/ Iaimennetaan x puskuriin
<b>CAL</b>	<b>X</b>	
	A-E	Standard X /Standard X/ Etalon X/ Standard X/ Estándar X/ Standard X/ standaard X/ Standard X/ standard X/ Standard X/ Standard X/ Štandard X/ Standard X/ Стандарт X/ Standard X/ Πρότυπο X/ Standard X/ Standardni X/ Kalibraattori X
<b>BUF</b>	<b>X</b>	
	PP/ VP	Buffer / puffer/ Tampon / Tampone / Tampón /Tampão / buffer/ buffer/ buffert/ Bufor / puffer/ pufer/ pufr/ бυφερ/ puhver/ ρυθμιστικό διάλυμα / Tampon /pufer/ puskuriliuos
<b>Control</b>		Control Serum / Kontrollserum/ Contôle sérique/ Siero di controllo/ Suero de control/ Soro de Controlo/ controleserum/ Kontrollserum/ Kontrollserum/ Serum kontrolne/ Ellenőrző szérum/ Kontrollné sérum/ Kontrolní sérum/ Контролен серум/ Kontrollseerum/ Ορός ελέγχου/Ser de control/ Kontrolni serum/ Kontrolli seerumi
<b>WASHBUF</b>	<b>20x</b>	
	WP	Washing Buffer Concentrate/ Waschpufferkonzentrat/ Tampon de lavage conc./ Tampone di lavaggio concentrato/ Tampón de lavado concentrado/ Tampão de Lavagem Concentrado/ wasbuffer, geconcentreerd/ Vaskebufferkoncentrat/ Vaskebufferkoncentrat/ tvättbuffertkoncentrat/ Bufor plukania koncentrat/ Mosópuffer koncentrátum/ Koncentrát γυμνაციო пуфра/ Концентрат на промивен бυфер/ Pesupuhveri kontsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralneга пуфра/ Pesuliuositiivist
<b>WASHBUF</b>		Washing Buffer / Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón de lavado/Tampão de Lavagem/ wasbuffer/ Vaskebuffer/ tvättbuffert/ Bufor plukania/ Mosópuffer/ Γυμνაცი пуфер/ Γυμνაცი пуфр/ Промивен бυфер/ Pesupuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare /Izpiralni pufer/ Pesuliuos
<b>SUBST</b>	<b>TMB</b>	
	S	Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ substraat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Szubsztrátum/ Substrát/ Substrát/ Субстрат Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraattiliuos
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>		
	SL	Stop Solution/ Stopp Lösung/ Stop Solution/ Soluzione di stop/ Stop Solución/ Solução Stop/ stopoplossing/ Stopopløsning/ Stopplösning/ Stop roztwór/ Megállító oldat/ Roztok na ukončenie/ Roztok pro ukončeni/ Стопираш разтвор/ Stopp-lahus/ Διάλυμα διακοπής/ Soluție de oprire/ Stop raztopina/ Pysäytysliuos
<b>TAPE</b>		Cover Plate with sealing tape /Platte abkleben/ Recouvrir la microplaque avec bande adhésive/ Coprire la piastra con nastro adesivo/ Cubrir la placa con una cinta adhesiva/ Cobrir a Placa com fita adesiva/ plaatje met tape afdekken/ Afdækningsplade med tape/ maskera platta/ Odkleić plytkę/ Tányér leragasztása/ Oblepit' podložku lepiacou páskou/ Olepit podložku lepící páskou/ Плака с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerleekleplindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperiți placa cu o bandă adezivă/ Prelepiti ploščo/ Peitã mikrotitrauslevy oheisella teipillä
<b>MEASURE</b>		Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590nm)/Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)./ Mesure l'absorbance en l'espace de 30 min à450 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 plate i løbet af 30 min ved nm (referencefilter ≥590nm)/ Mät inom 30 min vid 450 nm (referensfilter ≥ 590 nm)./ Pomiar w ciągu 30 min przy 450 nm (filtr odniesienia ≥ 590 nm)./ Ki mérés 30 percen belül 450 nm-nél (referenciaszűrő ≥ 590 nm)./ Merať 30 minút pri 450 nm/Měřit 30 minut při 450 nm/ Отчитане в рамките на 30 min при 450 nm (референтен филтър ≥ 590 nm)./ 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)
<b>Literatur</b>		Literature/ Literatur/ Bibliographie/ Letterario/ Bibliografía/ Literatura documentação/ literatuur/ Litteratur/ litteratur/ Literatura/ Irodalom/ Literatúra/ Literatura/ Литература// Kirjandus/ Βιβλιογραφία/ Bibliografie/ literatura/ Lähdeluettelo
<b>International</b>	<b>Test</b>	
<b>description</b>		International test description/ internationale Testanleitung/ description internationale de test/ Istruzioni per il test internazionali/ Descripción de ensayo internacional/ Descrição internacional do teste/ internationale 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
<b>End</b>		in all required wells/ in allen benötigten Vertiefungen/ dans tous les godets requis/ in tutti i pozzetti richiesti/ en todos los pozos requeridos/ em todos os tubos necessários/ in alle nodige putjes/ i alle nødvendige brønde/ i alla nödvändiga brunnar/ we wszystkich potrzebnych wgłębieniach/ minden szükséges forrásban/ vo všetkých potrebných miestach/ ve všech potřebných místech/ във всички необходими ямки/ kõigis vajalikes süvendites/ σε όλες τις απαραίτητες κοιλότητες/ în toate cavitățile necesare/ v vseh zahtevanih vdolbinah /kaikkiin tarvittaviin mikrotitrauslevyn syvennyksiin

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

**Nur zum Gebrauch durch Fachpersonal.**

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

**For in vitro use only!**

**For professional use only!**

**Read entire protocol before use!**

Symbols/ Symbole /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ symbolen/ Symboler/ Symboler/Symbole/ Szimbólumok/ Symboly/ Symboly/ Символи/ Sümbolid/ Σύμβολα/ Simboluri/ Simboli/ Symbolit	2
EINFÜHRUNG	5
MATERIALIEN	7
Inhalt der Testpackung	7
Zusätzlich benötigte Materialien	7
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	8
METHODE	9
GEEIGNETE PROBEN	9
Lagerung der Proben	9
Proben Vorbereitung	9
TESTVORBEREITUNG UND TECHNISCHE HINWEISE	10
TESTDURCHFÜHRUNG	12
AUSWERTUNG	13
Berechnung der Standardkurve	13
LEISTUNGSMERKMALE	14
Standard	14
Sensitivität	14
Spezifität	14
Interferenz	14
Reproduzierbarkeit und Präzision	15
Die Wiederfindung und Verdünnungslinearität	15
REFERENZWERTE	16
INTENDED USE	17
CLINICAL IMPLICATION	17
INTRODUCTION	17
REAGENTS PROVIDED	18
MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	19
WARNINGS AND PRECAUTIONS	19
METHOD	20
SPECIMEN	20
Storage of the samples	20
Sample Preparation	20
ASSAY PREPARATION AND TECHNICAL NOTES	21
ASSAY PROCEDURE	22
ESTABLISHING THE STANDARD CURVE	23
PERFORMANCE CHARACTERISTICS	25
Standards	25
Sensitivity	25
Specificity	25
Interference	25
Reproducibility and Precision	26
Recovery and Linearity	26
EVALUATION OF RESULTS	27
LITERATUR / LITERATURE	28
KURZANLEITUNG MEDIAGNOST RESISTIN ELISA E50	29
SUMMARY – MEDIAGNOST RESISTIN ELISA E50	31
<b>REF</b> E50           International Test description	32

\* please ask for package inserts in your national language  
\*\* please ask for special package insert

# PACKUNGSBEILAGE DEUTSCH

## MEDIAGNOST RESISTIN ELISA E50

- ist geeignet für Resistin Bestimmungen in **Serum-** und **Plasmaproben**
- mit optimierten Spezial-Probenpuffer: sichere Quantifizierung von Resistin - unabhängig vom Absolut-Gehalt
- ist durch die hohe **Sensitivität** (12 pg/ml) ebenfalls sehr geeignet für Messungen in Zellkultur-überständen und in Nicht-Serum-/Plasmaproben (z.B. in Muttermilch, Urin, Speichel)
- ist **schnell**: Inkubationszeit insgesamt nur 4 Stunden
- ist kalibriert mit rekombinantem Resistin:  
Einzel-Standards mit **20, 100, 300, 600** bzw. **1000 pg/ml** Resistin sind im Kit enthalten
- Kontrollserum zur RiliBÄK-konformen **Qualitätssicherung**
- Testplatten enthalten **einzel** **abrechenbare Vertiefungen**, die Teste können genau an den individuellen Bedarf angepasst werden

## ZUGELASSENER VERWENDUNGSZWECK

Messung von humanem Resistin in menschlichem Serum und Plasma

## KLINISCHE BEDEUTUNG

Resistin ist relevant u.a. bei Forschungsarbeiten zu

- Adipositas
- Insulin-Resistenz, Diabetes
- Arteriosklerose
- Entzündung

## EINFÜHRUNG

Resistin, ein 11,3 kDa (1) großes, cysteinreiches Protein wurde, als erstes bei Mäusen gefunden (2) und bildet mit den nahverwandten Proteinen RELM $\alpha$ , RELM $\beta$  und RELM $\gamma$  die Proteinfamilie der „resistin-like molecules“ (RELM). Im Menschen konnte bisher Resistin und RELM $\beta$  (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  $\beta$ -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  $\alpha$ -helicalen zu  $\beta$ -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 kardiovaskulären 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.



## MATERIALIEN

### Inhalt der Testpackung

1)	MTP	<b>Mikrotiterplatte</b> , gebrauchsfertig, mit <b>96 Vertiefungen</b> , die in 12 abnehmbare Streifen á 8 Vertiefungen ( <b>einzeln abbrechbar</b> ) aufgeteilt ist. Die Platte ist mit einem Antikörper gegen humanes Resistin beschichtet.
2)	CAL	<b>Standards A-E</b> , lyophilisiert, enthalten rekombinantes Resistin. Die Verdünnungen der Standardkurve decken einen Bereich von <b>0,02 bis 1 ng/ml (20, 100, 300, 600 und 1000 pg/ml)</b> Resistin ab und werden <b>in je 750 µl Probenpuffer PP</b> rekonstituiert. Achtung: dazu bitte Probenpuffer PP verwenden, da nur so gewährleistet ist, dass die Standards und die jeweiligen Proben unter identischen Bedingungen im selben Spezialpuffer inkubieren.
3)	BUF	<b>Probenpuffer PP, 120 ml</b> , gebrauchsfertig, bitte zum <b>Rekonstituieren der Standards A – E</b> sowie für die <b>Verdünnung der Proben und des Kontrollserums KS</b> verwenden.
4)	BUF	<b>Verdünnungspuffer VP, 25 ml</b> , gebrauchsfertig, bitte zum <b>Rekonstituieren des Kontrollserums KS</b> und für die Verdünnung des <b>Antikörper- und des Enzymkonjugates, AK bzw. EK</b> , verwenden.
5)	Control	<b>Kontrollserum KS</b> , lyophilisiert, enthält humanes Serum und muss in <b>100 µl Verdünnungspuffer VP</b> rekonstituiert werden. Die Resistin Soll-Konzentration und Schwankungsbereich ist auf dem Etikett angegeben. Es sollte im Assay in der gleichen Verdünnung ( <b>in Probenpuffer PP</b> ) wie die jeweiligen Proben bestimmt werden.
6)	Ab	<b>Antikörperkonjugat AK, 120 µl, 100-fach konzentrierte Lösung</b> , enthält biotinylierten anti-Resistin Antikörper und muss vor Gebrauch in <b>Verdünnungspuffer VP 1:100</b> verdünnt werden. Z.B. 10 ml Verdünnungspuffer VP mit 100 µl Antikörperkonjugat AK versetzen, mischen und mit 100 µl pro Vertiefung einsetzen.
7)	CONJ	<b>Enzymkonjugat EK, 120 µl, 100-fach konzentrierte Lösung</b> , enthält POD (Meerettich-Peroxidase)-markiertes Streptavidin und muss vor Gebrauch <b>in Verdünnungspuffer VP 1:100</b> verdünnt werden. Z.B. 10 ml Verdünnungspuffer VP mit 100 µl Enzymkonjugat EK versetzen, mischen und mit 100 µl pro Vertiefung einsetzen.
8)	WASHBUF 20x	<b>Waschpuffer WP, 50 ml, 20-fach konzentrierte</b> , Lösung, bitte <b>vor Gebrauch 1:20 mit A. dest.</b> oder entmineralisiertem Wasser verdünnen (z.B. den gesamten Flascheninhalt von 50 ml im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen). Achtung: endverdünnt ist der Waschpuffer nur 4 Wochen haltbar bei 4-8°C, bitte nur nach Bedarf ansetzen.
9)	SUBST	<b>Substrat S, 12 ml</b> , gebrauchsfertig, Meerettich-Peroxidase-(POD)-Substrat, stabilisiertes H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Tetramethylbenzidin
10)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	<b>Stopplösung SL, 12 ml</b> , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure
11)		<b>Abdeckfolie</b> für Mikrotiterplatten, 3 Stück, selbstklebend

### Zusätzlich benötigte Materialien

Destilliertes oder entmineralisiertes Wasser zum Verdünnen des Waschpuffers WP, 950 ml.

Messbehälter für Verdünnung von Waschpuffer

Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen

Vortex-Mischgerät

Mikrotiterplattenschüttler (350 rpm)

Mikrotiterplattenwasher (empfohlen)

Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und ≥590 nm.

Polyethylen PE/ Polypropylen PP Röhrcchen zum Verdünnen der Proben

## WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Mediagnost E50 Kit ist nur zur In-vitro-Diagnostik und nicht zur inneren Anwendung bei Mensch und Tier geeignet. Dieses Produkt darf nur exakt, wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben, eingesetzt werden. Mediagnost kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht, soweit keine gesetzliche Regelung anderes besagt.

**VORSICHT: Dieser Kit enthält Material humanen und/oder tierischen Ursprungs. Die Bestandteile des Kits sind so zu handhaben, als ob sie infektiös wären.**

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.

Bitte verwenden Sie keine offensichtlich beschädigten oder mikrobiell kontaminierten Reagenzien.

Die gemessenen Extinktionen sind u.a. stark abhängig von der Temperatur, aber die berechneten Werte werden durch die Temperatur nicht beeinflusst.

Bitte benutzen Sie separate Pipettenspitzen für jede Probe, Kontrolle und Reagenz um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Bitte verwenden Sie Behältnisse nur für jeweils einzelne Reagenzien. Gießen Sie die Reagenzien nicht zurück in die Originalgefäße. Mischen Sie den Inhalt der jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatten gründlich. Verwenden Sie die Mikrotiterplattenvertiefungen nur jeweils einmal. Lassen Sie keine Vertiefung während des Assay-Vorgangs völlig austrocknen, sondern fügen Sie die jeweils folgenden Reagenzien sofort nach dem Abschluss des Waschvorganges dazu.

### Menschliches Serum

in folgenden Komponenten enthalten: **KS**

Das humane Material, das für die Präparation dieses Produktes verwendet wird, ist durch von der US-amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde FDA empfohlene Nachweisverfahren auf die Präsenz von Antikörpern gegen Humanes Immundefizienz-Virus (HIV I und II), gegen Hepatitis B-Oberflächenantigen und gegen Hepatitis C Virus geprüft und für negativ befunden worden. Da kein Test das Vorhandensein von infektiösen Erregern völlig ausschließen kann, sollten die Reagenzien gemäß der Vorgaben der Biosicherheitsstufe 2 gehandhabt werden.

**2-Methyl-4-Isothiazolin-3-one** als Konservierungsmittel <0.01% in folgenden Komponenten enthalten:

**AK, EK, VP, PP**

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

**5-Chloro-2-Methyl-2H-Isothiazolin-3-one und 2-methyl-2H-Isothiazol-3-one**

als Konservierungsmittel <0.01% in folgenden Komponenten enthalten: **AK, EK, VP, PP, WP**

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

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.



## 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.

## GEEIGNETE PROBEN

Geeignet sind humane Serum- und Plasmaproben (in korrespondierenden Serum-, Heparinplasma-, EDTA-Plasma-Proben wurden keine signifikanten Abweichungen im Resistin-Gehalt gefunden). Hämolytische Proben scheinen unter Umständen falsch hohe Werte zu liefern, Verwendung solcher Proben sollte kritisch überprüft werden. Übliches Zellkulturmedium, Urin, Speichel, Muttermilch und Zerebrospinalflüssigkeit wurden als geeignet gefunden (Wiederfindung und Verdünnungsvorschläge s. Tabelle 6). Durch den speziellen Probenpuffer ist eine externe Probenvorbehandlung nicht nötig.

Das Blut zur Serumgewinnung mittels standardmäßiger Venenpunktion entnehmen. Die Proben sollten ohne Antikoagulanzen aufbewahrt werden. 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  
in fest verschließbaren Plastikgefäßen.

Die Proben dürfen nicht öfter als 3 Mal eingefroren/aufgetaut werden.

### **Proben Vorbereitung**

Die Proben müssen in **Probenpuffer PP** 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 PP geeignet** sein. Gegebenenfalls kann, je nach erwarteten Resistin-Werten, geringer oder stärker in Probenpuffer PP verdünnt werden. Da der Probenpuffer eine spezielle Zusammensetzung hat, die für die korrekte Bestimmung des Resistins abgestimmt wurde, darf eine Verdünnung von 1:5 nicht unterschritten werden!

Wir empfehlen für den klinischen Bereich eine Serum- oder Plasma-Verdünnung von **1:21**.

Die Resistin-Konzentrationen in anderen humanen Körperflüssigkeiten und in Kulturüberständen können stark von den Serumwerten abweichen.

### Verdünnungsprotokoll:

300 µl Probenpuffer PP 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.

## TESTVORBEREITUNG UND TECHNISCHE HINWEISE

Der Assay ist strikt nach dem Testprotokoll durchzuführen.

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

Die **Haltbarkeit der Reagenzien nach dem erstmaligen Öffnen ist bei sachgemäßer Lagerung für vier Wochen gewährleistet.. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.** Wenn mehrere unabhängige Messungen über eine längere Periode mit einem Kit geplant sind, wird vorherige Aliquotierung der Komponenten in passende Volumina empfohlen.

Alle Komponenten des Kits müssen **vor Gebrauch auf Raumtemperatur** gebracht werden, die 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 geringen optischen Dichten, hohen Streuungen und/oder falschen Werten führen, zu starkes Schütteln dagegen zu erhöhten optischen Dichten und/oder falschen Werten.

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

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

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

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

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

### **Standards und Kontrolle**

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

Für die **Rekonstitution** der lyophilisierten **Kontrolle KS** muss der **Verdünnungspuffer VP** verwendet werden. Sie sollte im Assay in der gleichen Verdünnung **in Probenpuffer PP** wie die jeweiligen Proben bestimmt werden.

Es empfiehlt sich zum Rekonstituieren die Reagenzien 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen zu lassen und sie anschließend kräftig mit einem Vortex-Mixer zu mischen. Schaumbildung muss vermieden werden.

Die rekonstituierten Standards und Kontrollen können **bei -20°C für 4 Wochen** 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.

### **Antikörperkonjugat AK und Enzymkonjugat EK**

Für die Verdünnung der Konzentrate des **Antikörperkonjugates AK** und **Enzymkonjugates EK** wird der **Verdünnungspuffer VP** verwendet. Die gebrauchsfertig 1:100 verdünnten Lösungen sind nur begrenzt haltbar und sollten täglich frisch angesetzt werden.

### **Testplatte**

Nicht verwendete Streifen der Testplatte sind zusammen mit dem Trockenkissen luftdicht in dem wiederverschließbaren Klippbeutel bei 2° - 8°C zu lagern.

### **Substrat**

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

## TESTDURCHFÜHRUNG

Bei der **Testdurchführung** sollten Standards **A-E**, Kontrollserum **KS** und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden (z.B. in 15 Minuten).

Das Antikörperkonjugat **AK** und das Enzymkonjugat **EK** sowie nachfolgend die Substratlösung **S** sowie die Stopplösung **SL** sollten jeweils in derselben Reihenfolge und in demselben Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

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

- 1) In die Vertiefungen A1/A2 werden **100 µl Probenpuffer PP** pipettiert (Leerwert).
- 2) In die Positionen B1/2 werden je **100 µl Standard A (0,02 ng/ml)** gegeben, sowie in die Positionen C1/2 je **100 µl Standard B (0,1 ng/ml)**, in die Positionen D1/2 je **100 µl Standard C (0,3 ng/ml)**, in die Positionen E1/2 je **100 µl Standard D (0,6 ng/ml)**, in die Positionen F1/2 je **100 µl Standard E (1 ng/ml)**.

Zur Kontrolle der korrekten Durchführung des Tests sollten je **100 µl** der in **Probenpuffer PP** 1:21 (oder im jeweiligen Verdünnungsverhältnis der Proben) verdünnten **Kontrolle KS** in die Positionen G1/2 gegeben werden.

In die restlichen Vertiefungen können je **100 µl der verdünnten Proben** (i.Allg. 1:21 in Probenpuffer PP verdünnt) pipettiert werden.

- 3) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **2 Stunden** bei **Raumtemperatur** inkubiert (unter Schütteln 350 rpm).
- 4) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Lösungen abgesaugt und die Platte mit **300 µl Waschpuffer WP** / Vertiefung **fünfmal** gewaschen.
- 5) Nach dem letzten Waschschrift werden **100 µl** des 1:100 in Verdünnungspuffer VP endverdünnten **Antikörperkonjugates AK** in jede Vertiefung pipettiert. Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und der Ansatz **1 Stunde** bei **Raumtemperatur** inkubiert (unter Schütteln, 350 rpm).
- 6) Nach Abschluss dieser Inkubation wird die Platte wie im Schritt 4) beschrieben gewaschen
- 7) Nach dem letzten Waschschrift werden **100 µl** des 1:100 in Verdünnungspuffer VP endverdünnten **Enzymkonjugates EK** in jede Vertiefung pipettiert. Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und der Ansatz **30 Minuten** bei **Raumtemperatur** inkubiert (unter Schütteln, 350 rpm).
- 8) Nach Abschluss dieser Inkubation wird die Platte wie im Schritt 4) beschrieben gewaschen
- 9) In jede Vertiefung werden **100 µl der Substratlösung S** pipettiert.
- 10) Die Platte wird **30 Minuten im Dunkeln** bei **Raumtemperatur** inkubiert.
- 11) Nach Ablauf der Inkubationszeit wird in jede Vertiefung **100 µl Stopplösung SL** pipettiert.
- 12) Die Ausmessung der Farbreaktion erfolgt **innerhalb von 30 Minuten** bei 450 nm ( $\geq 590$  nm).

## AUSWERTUNG

### Berechnung der Standardkurve

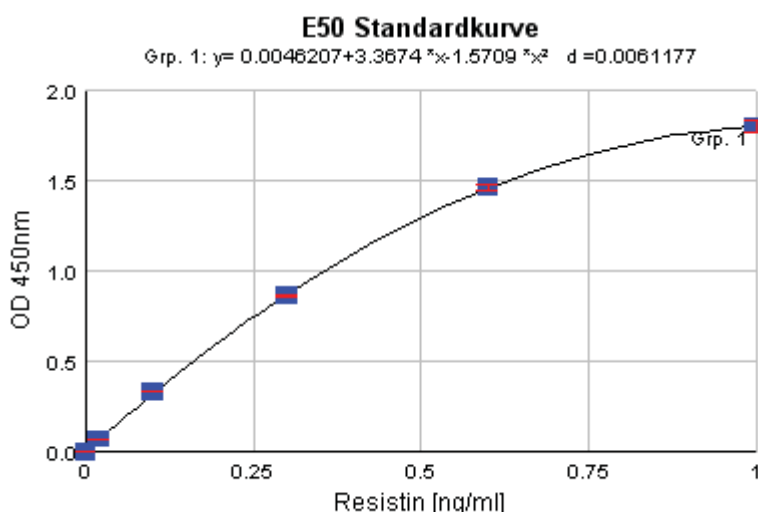
Zur Auswertung des Testes sollte gewährleistet sein, dass die Extinktionen des Leerwertes 0,3 Einheiten nicht überschreiten, Standard E sollte dagegen Extinktionen über 0,8 Einheiten erreichen. Proben, die höhere Extinktionen als der Standard E erzielen, liegen außerhalb der Standardkurve, zur sicheren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

Die bereitgestellten Standards enthalten folgende Resistin-Konzentrationen:

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

Die beispielhafte Standardkurve



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

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

Beispielhafte Berechnung der Resistin– Konzentration 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

$$0,8 - 0,05 = 0,0046207 + 3,3674x - 1,5709x^2$$

$$0,2686 = x$$

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

$$0,2686 \times 21 = 5,72 \text{ ng/mL} = 0,00572 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

## LEISTUNGSMERKMALE

### Standard

Die Standards 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).

### Sensitivität

Die analytische Sensitivität des Assays beträgt **0,012 ng/ml** (12 pg/ml; zweifache Standardabweichung des Null-Standards in 15facher Bestimmung).

### Spezifität

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.

### 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.

	<b>Triglyceride</b>	<b>Bilirubin</b>	<b>Hämolysat</b>
	<b>100 mg/ml</b>	<b>100 µg/ml</b>	<b>1000 µg/ml</b>
Serum 1	101	93	94
Serum 2	115	99	99
Serum 3	104	103	147



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

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

### Reproduzierbarkeit und Präzision

Die **Inter-** und **Intra-Assay** Variationskoeffizienten sind **kleiner als 6,8% bzw. 5%**. Beispielhafte Bestimmungen sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 3:** Inter-Assay-Varianz (angegeben sind Werte aus je 11 Durchführungen)

	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	VK (%)
<b>Probe 1</b>	2,70	0,16	5,94
<b>Probe 2</b>	4,20	0,28	6,77
<b>Probe 3</b>	5,80	0,28	4,79

**Tabelle 4:** Intra-Assay-Varianz

	Anzahl der Bestimmungen	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	VK (%)
<b>Probe 1</b>	16	2,81	0,13	4,49
<b>Probe 2</b>	16	4,79	0,24	4,97

### 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 Resistins betrug im Durchschnitt 98% der theoretisch zu erwartenden Menge.

**Tabelle 6:** Proben wurden angereichert mit 0,3 ng/ml Resistin und gemessen im Vergleich zu nicht angereicherten Proben. Relative Wiederfindung von zugesetzten Resistin wurde 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

## REFERENZWERTE

**Tabelle 7:** 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 8:** 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/m<sup>2</sup>), SA=Standardabweichung

## PACKAGE INSERT ENGLISH

### Mediagnost Resistin ELISA E50

- is suited for Resistin determination in **Serum** and **Plasma** samples
- is extremely **sensitive** (**12 pg/ml  $\cong$  1.2 pg per well**) and, thus allows measurements in cell culture media too and in specimens others than serum e.g. in Cerebrospinal fluid, Amnion fluid, Saliva, Urine, Breast milk
- is **fast**: incubation time a total of 4 hours
- Single Standards with **20, 100, 300, 600,1000 pg/ml** human Resistin are provided in the Kit
- Control Serum **KS** is of human serum
- is calibrated with **recombinant Resistin**
- Microtiter plates are separately breakapart, tests can be adapted to individual requirements

### INTENDED USE

Measurement of human Resistin in human Serum and Plasma Sample

### CLINICAL IMPLICATION

- Resistin is relevant e.g. in research of:
- Adiposity
- Insulin Resistance, Diabetes
- Arteriosclerosis
- Inflammation

### INTRODUCTION

Resistin, a cysteine-rich protein of 11.3 kDa (1), was firstly found in mice (2) and constitutes together with RELM $\alpha$ , RELM $\beta$  and RELM $\gamma$  the protein family of resistin-like molecules (RELM).

In humans, resistin and RELM $\beta$  (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 propeptide 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  $\beta$ -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  $\alpha$ -helical to  $\beta$ -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) macrophages (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.

## REAGENTS PROVIDED

1)	MTP	<b>Microtiter plate</b> , ready for use, with 96 wells, dived up in 12 stripes à 8 wells (separately breakapart), coated with human Resistin antibody.
2)	CAL	<b>Standards A-E, lyophilised, contain recombinant Resistin. Standard values are between 0.02 - 1 ng/ml (20, 100, 300, 600 und 1000 pg/ml) Resistin and have to be reconstituted with 750 µl (each) Sample Buffer PP.</b> Attention: Please use only Sample Buffer PP for this dilution, because only this assures, that the Standards and the respective samples subsequently will incubate under identical conditions in the same special buffer!
3)	BUF	<b>Sample Buffer PP, 120 ml</b> , ready for use, please use for the reconstitution of the Standards A – E and for the sample and Control Serum KS dilution.
4)	BUF	<b>Dilution buffer VP, 25 ml</b> , ready for use, please use this for the <b>reconstitution of Control Serum KS</b> and for the <b>dilution of Antibody Conjugate AK and Enzyme Conjugate EK.</b>
5)	Control	<b>Control Serum KS</b> , lyophilised: Contains human Serum and has to be reconstituted with <b>100 µl Dilution buffer VP.</b> The Resistin target value concentration and the respective range are given on the vial label. The dilution of the <b>Control Serum KS</b> in <b>Sample Buffer PP</b> should be according to the dilution of the respected samples.
6)	Ab	<b>Antibody Conjugate AK, 120 µl, 100fold concentrated solution</b> , contains biotinylated anti-Resistin antibody, please dilute before use 1:100 in <b>Dilution buffer VP</b> : e.g., add 100 µl <b>Antibody Conjugate AK</b> to 10 ml <b>Dilution Buffer VP</b> , mix and use 100 µl/well of this dilution in the assay.
7)	CONJ	<b>Enzyme Conjugate EK, 120 µl, 100fold concentrated solution</b> , contains HRP (Horseradish peroxidase)-labelled Streptavidin, please dilute before use 1:100 in Dilution Buffer VP: e.g. add 100 µl Enzyme conjugate EK to 10 ml Dilution buffer VP, mix and use 100 µl/well of this dilution in the assay.
8)	WASHBUF 20x	<b>Washing Buffer (WP), 50 ml, 20fold concentrated solution. Washing Buffer (WP)</b> has to be diluted 1:20 with distilled or demineralised water before use (e.g. add the complete contents of the flask (50 ml) into a graduated flask and fill up with A. dest. to 1000 ml). Attention: After dilution the Washing Buffer is only 4 weeks stable at 2-8°C, dilute only according to requirements.
9)	SUBST	<b>Substrate (S), 12 ml</b> , ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP)-substrate, stabilised H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Tetramethylbencidine.
10)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	<b>Stopping Solution (SL), 12 ml</b> , ready for use, 0.2 M sulphuric acid, Caution acid!
11)		Sealing tape for covering of the microtiter plate, 3 x, adhesive.

## MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

## WARNINGS AND PRECAUTIONS

### For In Vitro Diagnostic 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. **Temperature will affect the absorbance** readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.

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

Disposal of containers and unused contents should be done in accordance with federal and local regulatory requirements.

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

Caution: This kit contains material of human and/or animal origin. Source human serum for the Control Serum provided in this kit was tested by FDA recommended methods and found non-reactive for Hepatitis-B surface antigen (HBsAg), Hepatitis C virus (HCV), and Human Immunodeficiency Virus 1 and 2 (HIV) antibodies. No known test methods can offer total assurance of the absence of infectious agents; therefore all components and patient's specimens should be treated as potentially infectious.

### 2-Methyl-4-Isothiazolin-3-one

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

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

### 5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-Isothiazol-3-one

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, VP, 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

S28.1 After contact with skin, wash immediately with plenty of water

### Stop solution contains 0.2 M Sulfuric Acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

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.

## 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.

## SPECIMEN

Serum as well plasma samples are suitable (significant deviation of Resistin levels in corresponding serum-, Heparin-, EDTA-, Citrate-plasma-Samples were not found). Haemolytic samples appear to show falsely high Resistin levels, using such samples should be checked out critically. Common cell culture medium, saliva, breast milk and urine were found to be suitable specimens too.

By means of the special sample buffer an external sample preparation prior to the assay is not required (see below).

The blood sample for serum preparation should be gained according to standardized venipuncture procedure. The samples should be stored without anticoagulation reagents. 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  $-20^{\circ}\text{C}$    max. 2 years

in tightly closable plastic tubes.

More than 3 freeze/thaw cycles are not possible.

## Sample Preparation

Samples have to be diluted in Sample Buffer (PP). The excellent linearity of this test system allows sample dilution of 1:5 to 1:400.

In most determinations (serum or plasma samples, and no extreme values expected) a dilution **from 1:10 to 1:50 with Sample Buffer PP** should be suitable. According to expected Resistin levels the dilution with PP can be higher or lower. Because the sample buffer **PP** is special composed for the correct determination of Resistin, the dilution should be **at least 1:5!**

Resistin concentrations may be completely different in body fluids of human origin other than serum or cell culture supernatants.

For clinical purposes we recommend a standard dilution of 1:21.



#### Suggestion for dilution protocol:

Pipette 300 µl Sample Buffer PP in PE-/PP-Tubes (application of a multi-stepper is recommended in larger series), add 15 µl Serum- or Plasma (dilution 1:21). After mixing use 2 x 100 µl of this dilution in the assay.

## **ASSAY PREPARATION AND 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.

The **shelf life** of the components after initial opening is limited to **4 weeks**, if stored appropriately.

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

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

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

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

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

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

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

Manual washing is an adequate alternative option. Washing Buffer may be dispensed via a multistepper device, a multichannel pipette, or a squirt bottle. The fluid may be removed by dynamically swinging out the microtiter plate over a basin. If aspirating devices are used, care has to be taken that the inside well surface is not scratched. Subsequent to every single washing step, the remaining fluid should be removed by inverting the plate and repeatedly tapping it dry on non fuzzy absorbent tissue.

### **Standards and Control**

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

The lyophilised **Control Serum KS** must be reconstituted with the **Dilution Buffer VP**. The dilution of the **Control Serum in Sample Buffer PP** should be according the dilution of the respected samples.

It is recommended to keep reconstituted reagents at room temperature for 15 minutes and then to mix them thoroughly but gently (no foam!) with a Vortex mixer.

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

### Antibody and Enzyme Conjugate

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

### 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°C. It has to be at room temperature for usage!

### Microtiterplate

After initial opening, store the unused strips and microtiter wells together with the desiccant at 2-8°C in the clip-lock bag.

### Substrate Solution

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

## ASSAY PROCEDURE

NOTES: All determinations (Standards, Control Serum 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 Serum and the samples should be pipette as fast as possible (e.g., <15 minutes). To avoid distortions due to differences in incubation times, **Antibody-Conjugate AK** and the **Enzyme Conjugate EK** as well as the 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 **100 µl Sample Buffer PP** in wells A1/A2 (blank) and
- 2) Pipette in positions B1/2 **100 µl of the Standard A** (0.02 ng/ml),  
pipette in positions C1/2 **100 µl of the Standard B** (0.1 ng/ml),  
pipette in positions D1/2 **100 µl of the Standard C** (0.3 ng/ml),  
pipette in positions E1/2 **100 µl of the Standard D** (0.6 ng/ml),  
pipette in positions F1/2 **100 µl of the Standard E** (1 ng/ml).
- 3) To control the correct accomplishment **100 µl** of the 1:21 (or in respective dilution rate of the sample) in **Sample Buffer PP** diluted **Control Serum KS** can be pipetted in positions G1/2.
- 4) Pipette **100 µl** each of the **diluted sample** (e.g. dilute 1:21 with Sample Buffer **PP**) in the rest of the wells, according to requirements.
- 5) Cover the wells with sealing tape and incubate the plate for **2 hours** at **room temperature** (shake at 350 rpm). After incubation aspirate the contents of the wells and wash the wells 5 times with **300 µl Washing buffer WP** / well.
- 6) Following the last washing step pipette **100 µl** of the 1:100 with **Dilution Buffer VP** diluted **Antibody Conjugate AK** in each well. Cover the wells with the sealing tape and incubate **1 hour** at room temperature (shake at 350 rpm).
- 7) After incubation wash the wells 5 times with **Washing Buffer WP** as described in step 5).

- 8) Following the last washing step, pipette **100 µl** of the 1:100 with Dilution Buffer VP diluted **Enzyme Conjugate EK** in each well. Cover the wells with the sealing tape and incubate for **30 minutes** at room temperature (shake at 350 rpm).
  - 9) After incubation wash the wells 5 times with Washing Buffer **WP** as described in the step 5.
  - 10) Pipette **100 µl** of the **TMB-substrate** solution **S** in each well.
  - 11) Incubate the plate for **30 minutes** in the dark at **room temperature**.
  - 12) Stop the reaction by adding **100 µl** of **Stopping Solution SL** to all wells.
- Measure the absorbance within **30 minutes** at **450 nm** (reference filter: **≥ 590 nm**)

## ESTABLISHING THE STANDARD CURVE

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

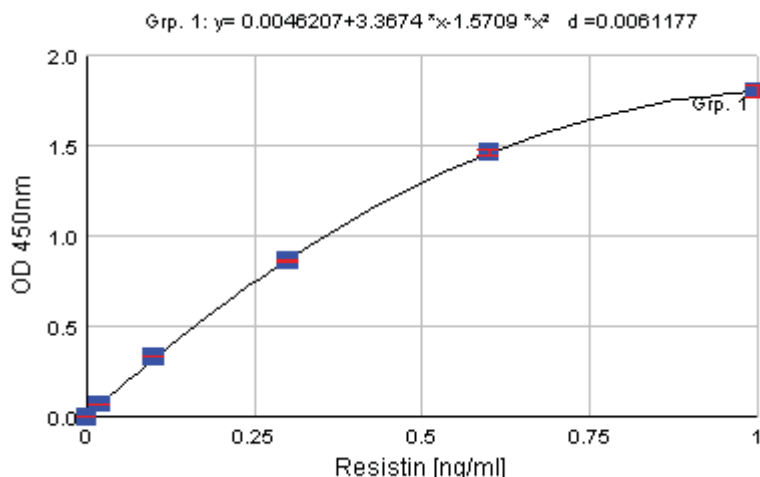
Samples, which yield higher absorbance values than Standard E are beyond the standard curve, for reliable determinations these samples should be tested anew with a higher dilution.

The standards provided contain the following concentrations of Resistin:

<b>Standard</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>
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 other values.
- 3) Plot the standard concentrations on the x-axis versus the mean value of the absorbance of the standards on the y-axis.
- 4) Recommendation: Calculation of the standard curve should be done by using a computer program because the curve is in general (without respective transformation) not ideally described by linear regression. **A higher-grade polynomial, or four parametric logistic (4-PL) curve fit or non-linear regression** are usually suitable for the evaluation (as might be spline or point-to-point alignment in individual cases).
- 5) The **Resistin concentration** of the diluted sample or the diluted control serum KS in ng/ml (or µg/ml according the chosen unit for the standards) is calculated in this way, the Resistin concentration of the **undiluted sample** and of KS is calculated **by multiplication with the respective dilution factor**.

### E50 Standard Curve



**Fig. 1. Exemplary Standard Curve** with a polynomial 2<sup>nd</sup> degree as curve fit.

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

Exemplary calculation of the 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 2<sup>nd</sup> degree).

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

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

$$0.2686 = x$$

if the dilution factor (1:21) is taken into account the Resistin concentration of the undiluted sample is  $0.2686 \times 21 = 5,64 \text{ ng/mL} = 0.00564 \text{ } \mu\text{g/mL}$

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### Standards

The standards 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).

### Sensitivity

The **analytical sensitivity** of the assay yields **0.012 ng/ml** (12 pg/ml; as 2x SD of zero standard in 15fold determination).

### Specificity

Commercially available sera from bovine, cat, chicken, dog, donkey, goat, guinea pig, horse, mouse, pig, rabbit, rat and sheep were diluted (1:10) and used as samples in this assay system and the signal intensity was measured. No cross reactivity was detected.

### 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 were enriched with indicated amount of the potentially interfering substance and measured. Shown is % of Resistin of the native, non enriched serum sample

	<b>Triglyceride 100 mg/ml</b>	<b>Bilirubin 100 µg/ml</b>	<b>Haemolysate 1000 µg/ml</b>
Serum 1	101	93	94
Serum 2	115	99	99
Serum 3	104	103	147

**Table 2:** Effects of coagulation inhibitors were investigated by adding indicated amounts of inhibitors to PP 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 (PP) are shown.

		<b>% of Resistin in PP</b>	
		<b>Mean (n=3)</b>	<b>SD</b>
3.8 g/l	Citrate	94	7.67
0.0068 mol/l	EDTA	93	4.96
30,000 IE/l	Heparin	96	4.89

## Reproducibility and Precision

The inter- and intra assay coefficients of variability are below than 6.8% and 5%, respectively. Exemplary determinations are shown in table 3 and table 4.

**Table 3:** Intra-Assay-Variation

	Number of determinations	Mean value (µg/ml)	Standard deviation (µg/ml)	VC (%)
Sample 1	16	5.87	0.138	2.35
Sample 2	16	12.19	0.377	3.10
Sample 3	6	14.36	0.668	4.66

**Table 4:** Inter-Assay-Variation (results of 11 determinations, each)

	Mean value (ng/ml)	Standard deviation (ng/ml)	VK (%)
Sample 1	2.70	0.16	5.94
Sample 2	4.20	0.28	6.77
Sample 3	5.80	0.28	4.79

## 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 6). The recovery of Resistin yielded on average 98 % of the theoretically expected amount.

**Table 6:** 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



## EVALUATION OF RESULTS

**Table 7:** 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 Proband, AV=Average Value, BMI=Body Mass Index (kg/m<sup>2</sup>), SD=Standard Deviation

**Table 8:** 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

## LITERATUR / LITERATURE

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

## KURZANLEITUNG MEDIAGNOST RESISTIN ELISA E50

Reagenzpräparation:	Rekonstitution:	Verdünnung:
Standards A – E	in 750 µl Probenpuffer PP	
Kontrollserum KS	in 100 µl Verdünnungspuffer VP	1:21 mit Probenpuffer PP
Antikörperkonjugat AK		1:100 mit Verdünnungspuffer VP
Enzymkonjugate EK		1:100 mit Verdünnungspuffer VP
Waschpuffer WP		1:20 mit Aqua dest. (z.B. den gesamten Flascheninhalt von (50 ml) im Standzylinder auf 1000 ml mit A.dest auffüllen).
<b>Probenverdünnung: 1:21</b> (z.B. 15 µl Serum mit 300 µl Probenpuffer PP mischen)		

### Testdurchführung in Doppelbestimmung

Pipetieren	Reagenzien	Position
100 µl	Probenpuffer PP (Leerwert)	A1/2
100 µl	Standard A (0,02 ng/ml)	B1/2
100 µl	Standard B (0,1 ng/ml)	C1/2
100 µl	Standard C (0,3 ng/ml)	D1/2
100 µl	Standard D (0,6 ng/ml)	E1/2
100 µl	Standard E (1,0 ng/ml)	F1/2
100 µl	Kontrollserum KS	G1/2
100 µl	Probenverdünnung	nachfolgende Vertiefungen
Mit Klebefolie die Vertiefungen abdecken.		
<b>Inkubation: 2 h bei RT, 350 rpm</b>		
5x 300 µl	Absaugen und die Platte mit 300 µl Waschpuffer WP / Vertiefung <b>fünfmal</b> waschen.	in jede Vertiefung
100 µl	1:100 verdünntes Antikörperkonjugat AK	in jede Vertiefung
<b>Inkubation: 1 h bei RT, 350 rpm</b>		
5x 300 µl	Absaugen und die Platte mit 300 µl Waschpuffer WP / Vertiefung <b>fünfmal</b> waschen.	in jede Vertiefung
100 µl	1:100 verdünntes Enzymkonjugat EK	in jede Vertiefung
<b>Inkubation: 30 min bei RT, 350 rpm</b>		
5x 300 µl	Absaugen und die Platte mit 300 µl Waschpuffer WP / Vertiefung <b>fünfmal</b> waschen.	in jede Vertiefung
100 µl	Substratlösung S	in jede Vertiefung
<b>Inkubation: 30 min im Dunkeln bei RT</b>		
100 µl	Stopplösung SL	in jede Vertiefung
Messung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)		



## SUMMARY – MEDIAGNOST RESISTIN ELISA E50

Reagent preparation:	Reconstitution:	Dilution:
Standards A – E	in 750 µl Sample Buffer PP	
Control Serum KS	in 100 µl Dilution Buffer VP	1:21 with Sample Buffer PP
Antibody Conjugate AK		1:100 with Dilution Buffer VP
Enzyme Conjugate EK		1:100 with Dilution Buffer VP
Washing Buffer WP		1:20 with Aqua.dest. (e.g., add the complete contents of the flask (50 ml) into a graduated flask and fill with A.dest. to 1000 ml).
<b>Sample dilution: 1:21 (e.g. 15 µl Serum with 300 µl Sample Buffer PP)</b>		

### Assay Procedure for Double Determination

Pipette	Reagents	Position
100 µl	Sample Puffer PP (blank value)	A1/2
100 µl	Standard A (0.02 ng/ml)	B1/2
100 µl	Standard B (0.1 ng/ml)	C1/2
100 µl	Standard C (0.3 ng/ml)	D1/2
100 µl	Standard D (0.6 ng/ml)	E1/2
100 µl	Standard E (1.0 ng/ml)	F1/2
100 µl	Control Serum KS	G1/2
100 µl	Sample dilution	following wells
Cover the wells with the sealing tape.		
<b>Incubation: 2 h at RT, 350 rpm</b>		
5x 300 µl	Aspirate the contents of the wells and wash 5x with 300 µl Wash Buffer WP	each well
100 µl	1:100 diluted Antibody Conjugate AK	each well
<b>Incubation: 1 h at RT, 350 rpm</b>		
5x 300 µl	Aspirate the contents of the wells and wash 5x with 300 µl Wash Buffer WP	each well
100 µl	1:100 diluted Enzyme Conjugate EK	each well
<b>Incubation: 30 min at RT, 350 rpm</b>		
5x 300 µl	Aspirate the contents of the wells and wash 5x with 300 µl Wash Buffer WP	each well
100 µl	Substrate Solution S	each well
<b>Incubation: 30 min in the dark at RT</b>		
100 µl	Stop Solution SL	each well
Measure the absorbance within 30 min at 450 nm with ≥ 590 nm as reference wavelength		

REF E50



## International Test description

CAL A-E	A -E	Rec in 750 µl	BUF PP	
Control	KS	Rec in 100 µl	BUF VP	1:21 DILU BUF PP
AB	AK			1:100 DILU BUF VP
CONJ	EK			1:100 DILU BUF VP
WASHBUF 20x	WP			1:20 DILU A. dest.
SPE				1:21 DILU BUF PP
°C 20-28 °C				

100 µl	BUF PP		A1/2
100 µl	CAL A (0.02 ng/ml)		B1/2
100 µl	CAL B (0.1 ng/ml)		C1/2
100 µl	CAL C (0.3 ng/ml)		D1/2
100 µl	CAL D (0.6 ng/ml)		E1/2
100 µl	CAL E (1 ng/ml)		F1/2
100 µl	CONTROL KS 1:21 DILU BUF PP		G1/2
100 µl	SPE 1:21 DILU BUF PP		
TAPE			

2 h 20-25 350 rpm

5x 300 µl	5x WASHBUF WP
100 µl	Ab AK
TAPE	

1 h 20-25 350 rpm

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

0.5 h 20-25 350 rpm

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

30 min 20-25

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