

m/rIGFBP-3 - ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von
**Maus- und Ratten-
Insulin-like Growth Factor Bindungs Protein - 3**
Deutsch

Enzyme Immunoassay for quantitative Determination of
**Mouse- and Rat-
Insulin-like Growth Factor Binding Protein - 3**
English

For in-vitro use only!



REF E031




























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

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 / Utgångsdatum / Termin Wažności / Lejárati idő / Doba expirácie / Doba expirace
	Consider instructions for use / Bitte Gebrauchsanweisung beachten / Consultez la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las instrucciones de utilización / Consulte as instruções de utilização / Raadpleeg de gebruiksaanwijzing / Se brugsanvisningen / Läs anvisningarna före användning / Proszę przeczytać instrukcję wykonania / Vegyük figyelembe a használati utasításban foglaltakat / Postupujte podľa pokynov na použitie / Postupujte dle návodu k použití
	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 / Lot-Satskod / Numer serii / Lot-Batch szám / Číslo šarže / Číslo šarže
	Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por / Vervaardigd door / Fabrikation af / Tillverkad av / Wyprodukowane pr / Gyártotta / Vyrobéné / Vyrobeno
	Catalogue Number / Bestellnummer / Numéro de référence / Numero di riferimento / Número de referencia / Número de referência / Referentienummer / Referencenummer / Katalognummer / Numer katalogowy / Katalógusszám / Katalógové číslo / Katalogové číslo
	Store at between / Lagerung bei zwischen / Conserver à entre / Conservare a tra / Conservar a temp. entre / Armazene a entre / Bewaar bij tussen / Opbevaars mellem / Förvaras vid / Przechowywać w / Tároljuk ő ő között / Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí
	Contains sufficient for x tests / Inhalt ausreichend für x Tests / Contient suffisant pour x tests / Contenido suficiente per x test / Contiene suficiente para x pruebas / Contém 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 / Obsahuje materiál pro x testů
	Keep away from sunlight / Nicht dem Sonnenlicht aussetzen
	Incubation time / Inkubationszeit
	Incubate at / Inkubation bei
	Shaking / schütteln
	Mikrotiterplate/Mikrotiterplatte
	Reconstitute in / Rekonstituieren in
	Sample / Probe
	AK Antibody Conjugate / Antikörperkonjugat
	EK Enzyme Conjugate/ Enzymkonjugat
	VP Dilute in Buffer X / Verdünnen in Puffer X
	A-G Standard X / Standard X
	KS1, KS2 Control Serum/ Kontrollserum
	Washing Buffer Concentrate / Waschpufferkonzentrat
	WP Washing Buffer / Waschpuffer
	S Substrate
	SL Stopp Solution / Stopp Lösung
	Cover Plate with sealing tape / Platte abkleben
	Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590nm) / Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm).

Packungsbeilage**Deutsch**

Symbols / Symbole	2
TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN + EINSATZMÖGLICHKEITEN	4
EINFÜHRUNG	4
EINSATZMÖGLICHKEITEN	4
Assay Eigenschaften und Validierung	4
Proben: Eignung, Vorbereitung und Lagerung	5
MATERIALIEN	6
Inhalt der Testpackung	6
Zusätzlich benötigte Materialien	6
TECHNISCHE HINWEISE	6
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	7
TESTDURCHFÜHRUNG	8
AUSWERTUNG	9
Berechnung der Standardkurve	9
LITERATUR/ LITERATURE	16

Package Insert**English**

TECHNICAL FEATURES+APPLICATIONS	10
INTRODUCTION	10
INTENDED USE	10
PERFORMANCE CHARACTERISTICS AND VALIDATION	10
SPECIMEN COLLECTION, PREPARATION, AND STORAGE	11
REAGENTS PROVIDED	12
MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	12
REAGENT PREPARATION	12
STORAGE CONDITIONS	13
WARNINGS AND PRECAUTIONS	13
ASSAY PROCEDURE	14
CALCULATION OF RESULTS	15
Establishing the Standard Curve	15
LITREATURE / LITERATUR	16
KURZANLEITUNG–MEDIAGNOST MAUS/RATTEN IGFBP-3 -ELISA E031	16
SUMMARY – MEDIAGNOST MOUSE/RAT IGFBP-3 ELISA E031	18
REF E031 International Test description	20

* please ask for package inserts in your national language

PACKUNGSBEILAGE DEUTSCH

TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN + EINSATZMÖGLICHKEITEN

- ◆ Quantitativer Nachweis von Maus/Ratten IGFBP-3 ohne Probenvorbehandlung
- ◆ Inter-Assay Varianz 8,4 % und Intra-Assay Varianz 4,6 %
- ◆ Analytische Sensitivität von 0,018 ng/ml, (18 pg/ml, bzw. 1,8 pg/Well)

EINFÜHRUNG

Wachstumshormon, Insulin-like Growth Factors und deren Bindungsproteine bilden ein endokrines System, das nicht nur das Längenwachstum in Menschen reguliert, sondern auch viele andere physiologische und pathophysiologische Prozesse wie den Energiestoffwechsel oder das Wachstum von Tumoren beeinflusst.

Die Wirkung des Wachstumshormons erfolgt hauptsächlich durch die Produktion von IGF-I. IGF-I wird nicht nur von der Leber, dem Hauptsyntheseort für zirkulierendes IGF-I, sondern auch von anderen Geweben gebildet. Die biologische Verfügbarkeit von IGF wird dabei von Bindungsprotein (IGFBP) reguliert. Daher sind die Konzentrationen an freiem IGF im menschlichen Blut sehr gering. Erst nach der proteolytischen Spaltung der Bindungsproteine (IGFBP 1-7), werden IGFs freigesetzt und können an den IGF-Rezeptor, einem Tyrosinkinaserzeptor, binden und diesen aktivieren. Die aktivierten Rezeptoren initiieren eine Reihe intrazellulärer Signalkaskaden. Einige der IGFBPs regulieren nicht nur die Verfügbarkeit von IGFs, sondern haben zusätzlich auch IGF-unabhängige Wirkungen in der Zellphysiologie.

IGFBP-3 ist im Blut das häufigste IGFBP, es ist daher von großer Bedeutung für die Regulation der Bioverfügbarkeit von IGF. Dies zeigt sich auch an der Bedeutung der IGFBP-3 Serumkonzentration in der Wachstumstörung-Diagnostik. Weiterhin wurde gezeigt, dass IGFBP-3 Apoptose induzieren kann, das Tumorwachstum fördert und die Migration von Zellen inhibiert - abhängig vom Gewebe und Tumorstadium.

Maus-/Rattenmodelle für in vivo Experimente werden oft für Untersuchungen von IGF-abhängigen und unabhängigen Wirkungen von IGFBP-3 eingesetzt, insbesondere im Bereich der Tumorforschung. Für diesen Zweck bietet Mediagnost mit dem E031 ein verlässliches und sensitives Testsystem für die Bestimmung von IGFBP-3 in Maus- und Rattenproben.

EINSATZMÖGLICHKEITEN

Dieser Enzymimmunoassay Kit ist für die quantitative Bestimmung von IGFBP-3 Konzentrationen in Maus- und Rattenserum, sowie in Zelllysaten und Kernextrakten in wissenschaftlichen Untersuchungen einsetzbar.

Assay Eigenschaften und Validierung

Der Mediagnost ELISA für Maus/Ratten-IGFBP-3 E031 ist ein so genannter Sandwich-Assay unter Verwendung zweier spezifischer und hochaffiner Antikörper. Der an die Mikrotiterplatte gekoppelte erste Antikörper bindet das IGFBP-3 aus der Probe. Im nachfolgenden Schritt bindet am so immobilisierten MAUS/RATTEN-IGFBP-3 der zweite spezifische, biotinylierte Antikörper und daran bindet ein Streptavidin-Peroxidase-Enzymkonjugat. In der abschließenden Substratreaktion wird hochspezifisch der Farbumschlag katalysiert, quantitativ abhängig vom m/rIGFBP-3-Gehalt der Proben.

Die Standards des ELISA E031 bestehen aus **rekombinantem Maus IGFBP-3** in Konzentrationen von **0,078; 0,156; 0,313; 0,625; 1,25; 2,5 und 5 ng/ml**.

Analytische Sensitivität:

Leerwert in 21facher Bestimmung plus 2 Standardabweichung = 0,018 ng/ml

Kreuzreaktivität mit rekombinantem humanem IGFBP3: 0,03%

Die Wiederfindung von rec. Maus IGFBP-3 wurde in **Zellkulturmedium, DMEM** mit 89,4%, in ZKM incl. 5% FCS mit 92,6% bestimmt.

ZKM ist daher als Probenmatrix für den E031 geeignet.

Tabelle 1: Verdünnungslinearität (hier: typische Ergebnisse zweier verschiedener Mausseren)

Verdünnung:	Probe 1 (rekalkuliert, ng/ml)	Verdünnung:	Probe 2 (rekalkuliert, ng/ml)
1:100	351,8	1:20	367,6
1:200	369,1	1:40	414,5
1:400	384,5	1:80	423,4
1:800	381,3	1:160	411,0
1:1600	379,2	1:320	421,9
1:3200	386,1	1:640	455,7
MW / 1SA / VK%	375,3 / 12,9 / 3,46	MW / 1SA / VK%	415,7 / 28,4 / 6,83

MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient

Die **Inter-** und **Intra-Assay** Variationskoeffizienten sind **kleiner als 8,4 % bzw. 4,6 %** Beispielhafte Bestimmungen sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 2 : Inter-Assay-Varianz (n=10)

	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	VK (%)
Probe 1	152,9	6,39	8,36
Probe 2	328,6	5,98	3,64

Tabelle 3: Intra-Assay-Varianz (n=16)

	Mittelwert (ng/ml)	VK (%)
Probe 1	123,8	4,63
Probe 2	395,0	1,99

Proben: Eignung, Vorbereitung und Lagerung

Generell sollten Proben so schnell wie möglich nach der Abnahme gekühlt werden. Falls zwischen Abnahme und Bestimmung ein längerer Zeitraum liegt, sollten die unverdünnten Proben bei -20°C oder kälter in fest verschließbaren Plastikgefäßen aufbewahrt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Serum/Plasma sollte prinzipiell vermieden werden (gegebenenfalls subaliquotieren) einige Zyklen (5x) haben in unseren Versuchen jedoch auf die messbare m/rIGFBP-3 Konzentration keine Auswirkungen gehabt.

Die hohe Sensitivität des Assays erlaubt m/rIGFBP-3 Messungen in kleinen Probenvolumina, deren Größe eher durch die Pipettiergenauigkeit als durch die Menge von m/rIGFBP-3 begrenzt wird. Für die meisten Untersuchungen (z.B. Serum- oder Plasmaproben und keine Extremwerte zu erwarten) sollten **Verdünnungen von 1:301 in Verdünnungspuffer VP geeignet** sein, damit ergibt sich ein Assay-Bereich von 0,018 bis 1505 µg/L. Gegebenenfalls kann, je nach erwarteten m/rIGFBP-3-Werten, geringer oder stärker in Verdünnungspuffer **VP** verdünnt werden.

Vorschlag Verdünnungsprotokoll:

1,5 ml **Verdünnungspuffer VP** in PE-/PP-Gefäße vorlegen (bei größeren Serien empfiehlt sich hierfür die Verwendung eines Multi-Steppers), dazu **5 µl Serum-** oder Plasma pipettieren (Proben sind 1:301 verdünnt) und **jeweils sofort mischen**. Nach dem Mischen bitte innerhalb von 1 Stunde von dieser Lösung **100 µl pro Bestimmung** im Assay einsetzen.

MATERIALIEN**Inhalt der Testpackung**

1)	MTP	Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen, die in 12 abnehmbare Streifen à 8 Vertiefungen (einzeln abbrechbar) aufgeteilt ist. Die Platte ist mit einem Antikörper gegen Maus/Ratten-IGFBP-3 beschichtet.
2)	CAL	Standards A-G, 750 µl , lyophilisiert, enthalten rekombinantes Maus-IGFBP-3. Die Standardkurve deckt einen Bereich von 0,078 bis 5 ng/ml (0,078, 0,156, 0,313, 0,625, 1,25, 2,5 und 5 ng/ml) mIGFBP-3 ab, die einzelnen Standards werden mit je 750 µl Probenpuffer VP rekonstituiert. Für den Assay werden jeweils 100 µl pro Vertiefung eingesetzt.
3)	DILU VP	Verdünnungspuffer VP, 125 ml, gebrauchsfertig , bitte zur Verdünnung der Proben, Kontrollen KS1 und KS2 und der Standards (A-G) verwenden.
4)	Controls	Kontrollseren KS1 and KS2 , je 100 µl , lyophilisiert. KS1 enthält Maus-Serum und KS2 Ratten-Serum. Beide müssen in je 100 µl Verdünnungspuffer VP rekonstituiert werden. Die m/rIGFBP-3 Soll-Konzentrationen und die Schwankungsbereiche sind auf den Etiketten angegeben. Sie sollen im Assay in den gleichen Verdünnungen wie die jeweiligen Proben eingesetzt werden.
5)	Ab	Antikörperkonjugat AK, 12 ml , enthält biotinylierten anti-Maus IGFBP-3 Antikörper, gebrauchsfertig.
6)	CONJ	Enzymkonjugat EK, 12 ml , enthält POD (Meerettich-Peroxidase)-markiertes Streptavidin, gebrauchsfertig.
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)	H₂SO₄	Stopplösung SL, 12 ml , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure
10)		Abdeckfolie für Mikrotiterplatten, 2 Stück, selbstklebend

Zusätzlich benötigte Materialien

Destilliertes oder entmineralisiertes Wasser zum Verdünnen des Waschpuffers WP

Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen

Vortex-Mischgerät

Vorrichtung zum Absaugen der Proben-Lösungen aus den Vertiefungen der Platte (empfohlen wegen potentieller Infektionsgefahr bei humanen Proben)

Mikrotiterplatten-Waschgerät (empfohlen)

Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und 620 nm (bzw. ≥590 nm).

Folienschweißgerät für Alubeutel (empfohlen)

TECHNISCHE HINWEISE

Die Standards **A – G** und Kontrollseren **KS1 + KS2** werden mit dem im Kit enthaltenen Verdünnungspuffer **VP** rekonstituiert. Es empfiehlt sich zum Rekonstituieren die Reagenzien 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen zu lassen und sie anschließend kräftig mit einem Vortex-Mixer zu mischen. Schaumbildung sollte jedoch vermieden werden.

Bei sachgemäßer Handhabung ist die **Haltbarkeit der Reagenzien nach Öffnung** nicht beeinträchtigt. Nicht verwendete Streifen der Testplatte sind zusammen mit dem Trockenkissen luftdicht bei 2° - 8°C zu lagern. **Rekonstituierte Komponenten** (Standards **A – G** und Kontrollseren **KS1 and KS2**) sollten bei -20°C (oder kälter) aufbewahrt werden, dies verlängert die Haltbarkeit auf mind. 3 Monate. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden, obwohl einige Zyklen (3x) in unseren Versuchen keine Auswirkungen gehabt haben. Wenn mehrere unabhängige m/rIGFBP-3-Messungen über eine längere Periode mit einem Kit geplant sind, wird vorherige Aliquotierung der Komponenten in passende Volumina empfohlen.

Der 1:20 gebrauchsfertig verdünnte Waschpuffer **WP** ist nur 4 Wochen haltbar, bitte nur nach Bedarf ansetzen.

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

Bei der **Testdurchführung** sollten Standards **A-G**, Kontrollseren **KS1 + KS2** und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden (z.B. in 15 Minuten). Das Antikörperkonjugat **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.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Mediagnost Kit ist nur für 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.

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).

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.

Tierisches Serum: Maus / Ratte

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

2-Methyl-4-Isothiazolin-3-one

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

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

5-Chloro-2-Methyl-2H-Isothiazolin-3-one and 2-methyl-2H-Isothiazol-3-one

als Konservierungsmittel <0.01% in folgenden Komponenten enthalten: **AK, EK, VP, 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 (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.

TESTDURCHFÜHRUNG

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 Positionen A1/2 je **100 µl Verdünnungspuffer VP** geben, sowie
- 2) in die Positionen B1/2 je **100 µl Standard A (0,078 ng/ml)**,
in die Positionen C1/2 je **100 µl Standard B (0,156 ng/ml)**,
in die Positionen D1/2 je **100 µl Standard C (0,313 ng/ml)**,
in die Positionen E1/2 je **100 µl Standard D (0,625 ng/ml)**,
in die Positionen F1/2 je **100 µl Standard E (1,25 ng/ml)**,
in die Positionen G1/2 je **100 µl Standard F (2,5 ng/ml)**,
in die Positionen A3/4 je **100 µl Standard G (5 ng/ml)**.

Zur Kontrolle der korrekten Durchführung des Tests können je **100 µl** der 1:301 in Probenpuffer **VP** (oder entsprechend der jeweiligen Verdünnung der Proben) verdünnten **Kontrolle KS1 und KS2** in die Positionen H1/2 und A 3/4 gegeben werden.

In die restlichen Vertiefungen können je **100 µl der verdünnten Proben** (i.a., 1:301 in Verdünnungspuffer **VP** verdünnt) pipettiert werden.

Die Verdünnungen bitte sofort nach Probenzugabe mischen und innerhalb von 60 Minuten verwenden.

- 3) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **1 Stunde** bei **Raumtemperatur** inkubiert (wenn möglich unter Schütteln ≥ 350 upm).
- 4) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Lösungen abgesaugt und die Platte mit **250 µl Waschpuffer WP** / Vertiefung **dreimal** gewaschen.
- 5) Nach dem letzten Waschschrift werden **100 µl Antikörperkonjugats AK** in jede Vertiefung pipettiert.
- 6) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **1 Stunde** bei **Raumtemperatur** inkubiert (wenn möglich unter Schütteln ≥ 350 upm).
- 7) Nach Abschluss dieser Inkubation wird die Platte wie in Schritt 4) beschrieben gewaschen.
- 8) Nach dem letzten Waschschrift werden **100 µl Enzymekonjugat EK** in jede Vertiefung pipettiert.
- 9) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **15 min** bei **Raumtemperatur** inkubiert (wenn möglich unter Schütteln ≥ 350 upm).
- 10) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Lösungen abgesaugt und die Platte mit **250 µl Waschpuffer WP** / Vertiefung **dreimal** gewaschen.
- 11) In jede Vertiefung werden **100 µl der Substratlösung S** pipettiert.
- 12) Die Platte wird **15 Minuten im Dunkeln** bei **Raumtemperatur** inkubiert.
- 13) 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 (Referenzfilter ≥ 590 nm, z.B. 620 nm)**.

AUSWERTUNG

Berechnung der Standardkurve

Zur Auswertung des Testes sollte gewährleistet sein, dass die Extinktionen des Leerwertes 0,2 Einheiten nicht überschreiten, Standard G sollte dagegen Extinktionen über 1,0 Einheiten erreichen. Proben, die höhere Extinktionen als der Standard G erzielen, liegen außerhalb der Standardkurve, zur sicheren Bestimmung sollten diese Proben in einer zweiten Testdurchführung bei höherer Verdünnung nochmals bestimmt werden.

Die bereitgestellten Standards enthalten folgende **mIGFBP-3-Konzentrationen**:

Standard	A	B	C	D	E	F	G
ng/ml	0,078	0,156	0,313	0,625	1,25	2,5	5

- 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 hiermit **für die Proben berechneten mIGFBP-3-Gehaltes mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor der Proben** ergibt die mIGFBP-3-Konzentration in ng/ml, Division durch 1000 liefert die Werte in µg/ml bzw. gleichwertig mg/Liter (Bsp: ein Messwert wird mit 3 ng/ml gefunden, Probe war 1:301 verdünnt eingesetzt: $3 \times 301 = 903$ ng/ml, oder 0,903 µg/ml bzw. 0,903 mg/L, je nach gewünschter Einheit).

PACKAGE INSERT ENGLISH

TECHNICAL FEATURES+APPLICATIONS

- ◆ Quantitative determination of mouse/rat IGFBP-3 without sample pretreatment
- ◆ Inter-Assay variation of 8.4% and Intra-Assay variation of 4.6%
- ◆ Analytical sensitivity of 0.018 ng/ml (18 pg/ml; 1,8 pg/well)

INTRODUCTION

Growth Hormone, Insulin-like Growth Factors and their binding proteins build up an endocrine system regulating not only longitudinal growth in humans but also influencing a broad variety of other physiological and pathophysiological processes like energy metabolism or tumor growth. Most effects of Growth Hormone (GH) are exerted by Insulin-like Growth Factors (IGF) mainly produced by the liver but also locally by specific tissues. The effects of IGF are also regulated, specific binding proteins (IGFBP 1-7) regulate bioavailability of IGF. After proteolytic cleavage of the binding proteins IGF is set free and able to bind to its receptor. The autophosphorylation of this tyrosine kinase receptor activates intracellular signalling cascades. Some of these IGFBPs not only regulate the availability of IGF but also exert IGF-independent effects on cell physiology.

IGFBP-3 is the most abundant IGFBP in circulation and therefore of special relevance in regulation of IGF effects. This is reflected by the indicative value of serum IGFBP-3 concentration in diagnostics of growth disturbances. IGFBP-3 has also been shown to be able to induce apoptosis, promote tumor growth and inhibit cellular migration and metastasis dependent on tissue and tumor stage.

INTENDED USE

This enzyme immunoassay kit is suited for measuring IGFBP-3 in mouse and rat serum, cell lysates or nuclear extracts.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS AND VALIDATION

The Mediagnost ELISA for mouse/rat IGFBP-3 (m/rIGFBP-3) E031 is a so-called Sandwich-Assay. It utilizes two specific and high affinity antibodies for this protein. The IGFBP3 in the sample binds to the immobilized first antibody on the microtiter plate. In the following step, the biotinylated and Streptavidin-Peroxidase conjugated second specific anti-mouse IGFBP-3-Antibody binds in turn to the immobilised mIGFBP-3. In the closing substrate reaction the turn of the colour will be high specific catalysed, quantitatively depending on the m/rIGFBP-3-level of the samples.

The standards of the ELISA E031 are **recombinant mouse IGFBP-3** in concentrations of **0.078, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.50 ng/ml and 5 ng/ml**.

Sensitivity

The **analytical sensitivity** of the ELISA E031 yields 0.018 **ng/ml** (2 SD of zero standard in 21fold determination).

The **Inter-** and **Intra-Assay** variation coefficients were found less than **8.36 %** and **4.36%**. Exemplary determinations are shown in table 1 and table 2.

Table 1: Inter-Assay-Variation (n=10)

	Mean Value	Standard Deviation	VC
Sample 1	152.9	6.39	8.36
Sample 2	328.6	5.98	3.64

Table 2: Intra-Assay-Variation (n=16)

	Mean Value	VC
Sample 1	123.8	4.63
Sample 2	395.0	1.99

Cross reactivity with recombinant human IGFBP3: 0.03%

The recovery of rec. mouse IGFBP-3 in **cell culture medium** DMEM was found to be 89.4%, and, in DMEM incl. 5% FCS 92.6%. Therefore cell culture medium seems to be suitable as sample matrix.

Table 3: Linearity (results of 2 different mouse sera)

Dilution:	Sample 1 (recalculated, ng/ml)	Dilution:	Sample 2 (recalculated, ng/ml)
1:100	351.8	1:20	367.6
1:200	369.1	1:40	414.5
1:400	384.5	1:80	423.4
1:800	381.3	1:160	411.0
1:1600	379.2	1:320	421.9
1:3200	386.1	1:640	455.7
AV / 1SD / VC%	375.3 / 12.9 / 3.46	AV / 1SD / VC%	415.7 / 28.4 / 6.83

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

SPECIMEN COLLECTION, PREPARATION AND STORAGE

Samples should be handled as recommended in general: as fast as possible and chilled as soon as possible. In case there will be a longer period between the sample withdrawal and determination store the undiluted samples frozen -20°C or below in tightly closable plastic tubes. Avoid on principal repeated freeze-thaw cycles of serum/plasma (if required, please subaliquote) although m/rIGFBP-3 levels were found to be unaffected by few cycles (5x) in our experiments.

The high sensitivity of the assays allows m/rIGFBP-3 determinations in small sample volumes, which is limited by pipetting accuracy rather than the amount of m/rIGFBP-3.

In most determinations (e.g. Serum- or Plasma samples and no extreme values expected) the dilution of **1:301 with Dilution Buffer VP is suitable**, the respective covered range would be 0.018 to 1505 µg/L. Where required, depending on the expected mIGFBP-3-values, the dilution with **Dilution Buffer VP** can be higher or lower.

Suggestion for dilution protocol:

Pipette **1.5 ml Dilution Buffer VP** in PE-/PP-Tubes (application of a multi-stepper is recommended in larger series), add **5 µl Serum- or Plasma** (dilution 1:301) and mix each tube **immediately**. After mixing use **100 µl** of this solution within 1 hour **per determination** in the assay.

REAGENTS PROVIDED

1)	MTP	Microtiter plate , ready for use: Microtiter plate with 96 wells, divided up in 12 strips with 8 wells separately breakable, coated with anti-mouse/rat IGFBP-3 Antibody, packed in a laminate bag.
2)	CAL	Standards A-G , lyophilised, contain recombinant mouse IGFBP-3. Standard values are between 0,078 – 5 ng/ml (0.078, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25 2.5 and 5 ng/ml) mIGFBP-3, Standards are reconstituted with 750 µl Verdünnungs Buffer VP each . Use 100 µl pro well in the assay.
3)	BUF VP	Dilution Buffer VP , 125 ml, ready for use, please use for dilution of Standards ,Controls and Samples
4)	Controls	Control Sera KS1 and KS2 , 100 µl, lyophilised. KS1 contains mouse serum and KS2 rat serum. Please reconstitute in 100 µl Dilution Buffer VP . The m/rIGFBP-3 target values and the respective ranges are given on the label of the vial. The dilution should be according to the dilution of the respective samples.
5)	Ab	Antibody Conjugate AK , 12 ml, contains biotinylated anti-mouse IGFBP-3 antibody, ready for use. Pipette 100 µl per well.
6)	CONJ	Enzyme Conjugate EK , 12 ml, contains HRP (Horseradish-Peroxidase)-labelled Streptavidin, ready for use. Pipette 100 µl per well.
7)	WASHBUF 20x	Washing Buffer (WP) , 50 ml, 20 X concentrated solution. Dilute 1:20 with Aqua dest. The 1:20 diluted Washing Buffer WP is only 4 weeks stable. Please dilute only according to daily requirements.
8)	SUBST	Substrate (S) , 12 ml, ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP)-substrate, stabilised H ₂ O ₂ Tetramethylbencidine.
9)	H ₂ SO ₄	Stopping Solution (SL) , 12 ml, ready for use, 0.2 M sulphuric acid, Caution acid!
10)		Sealing tape for covering of the microtiter plate, 2 x, adhesive.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Precision pipettes (100 and 200µl) Micropipettes and multichannel pipettes with disposable plastic tips

Distilled or Deionized water for dilution of the Washing Buffer (WP)

Vortex-mixer

Device to aspirate the standards and the samples from the wells (recommended because of the potential danger of infection by human samples)

Timer (120 min. range)

Reservoirs (disposable)

Plate washer and plate shaker (recommended)

Calibrated Micro plate reader ("ELISA-Reader") with filter for 450 and 620nm (or ≥590 nm)

Foil welding device for laminate bags (recommended)

REAGENT PREPARATION

In conducting the assay, follow strictly the test protocol. Room temperature incubation means: Incubation at 20 - 25°C.

Reagents with different lot numbers should not be mixed. The microtiter plate and all reagents are stable unopened until the expiry date, if stored in the dark at 2° - 8°C (see label).

The Standards **A – G** and **Control Sera KS1** and **KS2** are reconstituted with the **Dilution Buffer VP** provided in the Kit. It is recommended to keep the reconstituted reagents at room temperature for 15 minutes and then to mix them thoroughly but gently (no foam should result) with a Vortex mixer.

The 1:20 diluted Washing Buffer **WP** is only 4 weeks stable. Please dilute only according to daily requirements.

Before use, all kit components should be brought to room temperature.

Precipitates, possible in buffers, should be dissolved before use through mixing and warming.

The **Substrate Solution S**, stabilised H₂O₂-Tetramethylbencidine, is photosensitive – store and incubate in the dark.

STORAGE CONDITIONS

The microtiter plate wells and all undiluted reagents are stable until the expiry date if stored in the dark at 2-8°C. Store the unused the microtiter wells together airtight with the desiccant at 2° to 8°C.

The Substrate Solution (S), stabilised H₂O₂-Tetramethylbencidine, is photosensitive – store and incubate in the dark.

Reconstituted Components (**Standards A – G** and **Control Sera KS1 and KS2**) should be stored at -20°C (or below). Freezing extends the expiry at least 3 months. Avoid repeated freeze-thaw cycles although few cycles (3x) in our experiments didn't have an influence on the assay.

In case you plan to perform multiple independent determinations over a longer period with one kit, you should aliquot the components prior to freezing into suitable smaller volumes. This is strongly recommended.

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. The mediagnost GmbH is not liable for any loss or harm caused by non-observance of the instructions, as far as no law withstands.

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.

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, therefore all components and specimens should be treated as potentially infectious.

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.

2-Methyl-4-Isothiazolin-3-one

contained in following components: **AK, EK, VP**

< 0,01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one Solution

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

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

contained in following components: **AK, EK, VP, WP**

< 0,01% (w/w) 5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-Isothiazol-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

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

TMB-Substrate (S) contains 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine.

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.

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 **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 **100µl Dilution Buffer VP** in positions A1/2.
- 2) Pipette in positions B1/2 **100µl each Standard A (0.078 ng/ml)**, pipette in positions C1/2 **100µl each Standard B (0.156 ng/ml)**, pipette in positions D1/2 **100µl each Standard C (0.313 ng/ml)**, pipette in positions E1/2 **100µl each Standard D (0.625 ng/ml)**, pipette in positions F1/2 **100µl each Standard E (1.25 ng/ml)**, pipette in positions G1/2 **100µl each Standard F (2.5 ng/ml)**, pipette in positions H1/2 **100µl each Standard G (5 ng/ml)**.

To control the correct accomplishment **100 µl** of the 1:301 (or in respective dilution rate of the sample) in Dilution Buffer **VP** diluted **Control Sera KS1 and KS2** can be pipetted in positions A3/4 and B3/4.

Pipette **100 µl each** of the **diluted sample** (generally 1:301 diluted in Dilution Buffer **VP**) in the rest of the wells, according to requirements. Please mix the dilutions immediately after sample addition and use within 60 minutes.

- 3) Cover the wells with the sealing tape and incubate the plate for **1 hour at room temperature** (if possible, shake at ≥ 350 rpm).
- 4) After incubation aspirate the contents of the wells and wash the wells 3 times with **250 µl Washing Buffer WP**.
- 5) Following the last washing step, pipette **100 µl** of the **Antibody Conjugate AK**. Cover the wells with the sealing tape and incubate **1 hour at room temperature** (if possible shake at ≥ 350 rpm).
- 6) After incubation wash the wells 3 times with **Washing Buffer WP** as described in step 4)
- 7) Following the last washing step, pipette **100 µl** of the **Enzyme Conjugate EK**. Cover the wells with the sealing tape and incubate **15 min at room temperature** (if possible shake at ≥ 350 rpm).
- 8) After incubation aspirate the contents of the wells and wash the wells 3 times with **250 µl Washing Buffer WP**.
- 9) Pipette **100 µl of the TMB-Substrate solution S** in each well.
- 10) Incubate the plate for **15 Minutes in the dark at room temperature**.
- 11) After incubation pipette **100 µl Stop Solution SL** in each well.
- 12) Measure the absorbance **within 30 minutes at 450 nm** (Reference filter ≥ 590 nm, e.g. 620 nm).

CALCULATION OF RESULTS

For the evaluation of the assay it is required that the absorbance values of the blank should be below 0.20, and the absorbance of standard G should be greater than 1.00.

Samples, which yield higher absorbance values than **Standard G**, are beyond the standard curve, for reliable determinations such samples should be retested at a higher dilution.

Establishing the Standard Curve

The standards provided contain the following concentration of **mIGFBP-3**:

Standard	A	B	C	D	E	F	G
ng/ml	0.078	0.156	0.313	0.625	1.25	2.5	5

- 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 **mIGFBP-3 concentration in ng/ml** of the samples can be **calculated by multiplication with the respective dilution factor**, division by 1000 converts the values in µg/ml or equal mg/Litre (Example: a measured value was 3 ng/ml, Sample was 1:301 diluted: $3 \times 101 = 903$ ng/ml, or 0.903 µg/ml or 0.903 mg/L, according the requested unit).

LITERATURE / LITERATUR

Silha JV, Murphy LJ: Insulin-like growth factor binding proteins in development. *Adv Exp Med Biol.* 2005;567:55-89

Yakar S, Sun H, Zhao H, Pennisi P, Toyoshima Y, Setser J, Stannard B, Scavo L, Leroith D: Metabolic effects of IGF-I deficiency: lessons from mouse models. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2005 Sep;3(1):11-19

Silha JV, Murphy LJ: Insights from insulin-like growth factor binding protein transgenic mice. *Endocrinology.* 2002 Oct;143(10):3711-4.

Firth SM, Baxter RC: Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev.* 2002 Dec;23(6):824-854

Schneider MR, Lahm H, Wu M, Hoeflich A, Wolf E: Transgenic mouse models for studying the functions of insulin-like growth factor-binding proteins. *FASEB J.* 2000 Apr;14(5):629-40

Bielohuby M, Matsuura M, Herbach N, Kienzle E, Slawik M, Hoeflich A, Bidlingmaier M. Short Term Exposure to Low-Carbohydrate / High Fat Diets Induces Low Bone Mineral Density and Reduces Bone Formation in Rats. *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 25, No. 2, February 2010, pp 275–284

KURZANLEITUNG–MEDIAGNOST MAUS-/ RATTEN-IGFBP-3 ELISA E031

Rekonstitution/ Verdünnung von Reagenzien		
Standards A-G	Rekonstitution in Probenpuffer VP	je 750 µl
Kontrollsera KS1 and KS2	Rekonstitution in Probenpuffer VP	100 µl
Waschpuffer WP	verdünnen in A. dest. (z.B. die gesamte Menge von 50 ml im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen)	1:20
Probenverdünnung + Kontrollserum KS1 and KS2: 1:301 in Verdünnungspuffer, Davon 100 µl pro Bestimmung einsetzen		
Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.		

Testdurchführung Doppelbestimmung (Vorschlag):

Pipettieren	Reagenzien	Position
100 µl	Verdünnungspuffer VP als Leerwert	A1 und A2
100 µl	Standard A (0,078 ng/ml)	B1 und B2
100 µl	Standard B (0,156 ng/ml)	C1 und C2
100 µl	Standard C (0,313 ng/ml)	D1 und D2
100 µl	Standard D (0,625 ng/ml)	E1 und E2
100 µl	Standard E (1,25 ng/ml)	F1 und F2
100 µl	Standard F (2,5 ng/ml)	G1 und G2
100 µl	Standard G (5 ng/ml)	H1 und H2
100 µl	Kontrollserum KS1	A3 und A4
100 µl	Kontrollserum KS2	B3 und B4
100 µl	Proben	in die Vertiefungen nach Bedarf

mischen, mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.

Inkubation: 1 h bei RT, ≥ 350 upm

3x 250 µl	Absaugen und die Platte 3x mit je 250 µl Waschpuffer WP / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µl	Antikörperkonjugat AK	In jede Vertiefung

Inkubation: 1 h bei RT, ≥350 upm

3x 250 µl	Absaugen und die Platte 3x mit je 250 µl Waschpuffer WP / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µl	Enzymkonjugat EK	In jede Vertiefung

Inkubation: 15 min bei RT, ≥350 upm

3x 250 µl	Absaugen und die Platte 3x mit je 250 µl Waschpuffer WP / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µl	Substratlösung S	In jede Vertiefung

Inkubation: 15 min im Dunklen bei RT

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

SUMMARY – MEDIAGNOST MOUSE- / RAT-IGFBP-3 ELISA E031

Reconstitution/ Dilution of Reagents		
Standards A-G	Reconstitution in Dilution Buffer VP	750 µl each
Control Sera KS1 and KS2	Reconstitution in Dilution Buffer VP	100 µl
Washing Buffer WP	dilute in A. dest. (e.g. add the complete contents of the flask 50 ml into a graduated flask and fill with A.dest. to 1000 ml)	1:20
Sample Dilution + Control Serum KS1 and KS2: 1:301 in Dilution Buffer VP mix directly and use within max. 60 min.		
Before assay procedure bring all reagents to room temperature		

Proposal of Assay Procedure for Double Determination:

Pipette	Reagents	Well Positions
100 µl	Dilutionbuffer VP as Blank	A1 and A2
100 µl	Standard A (0,078 ng/ml)	B1 and B2
100 µl	Standard B (0,156 ng/ml)	C1 and C2
100 µl	Standard C (0,313 ng/ml)	D1 and D2
100 µl	Standard D (0,625 ng/ml)	E1 and E2
100 µl	Standard E (1,25 ng/ml)	F1 and F2
100 µl	Standard F (2,5 ng/ml)	G1 and G2
100 µl	Standard G (5 ng/ml)	H1 und H2
100 µl	Control Serum KS1	A3 und A4
100 µl	Control Serum KS2	B3 und B4
10 µl	Sample	Pipette sample in the rest of the wells according to requirements

Cover the wells with the sealing tape

Incubation: 1 h at RT, ≥ 350 rpm

3x 250 µl	Aspirate the contents of the wells and wash 3x with 250 µl each WP/well	each well
100 µl	Antibody Conjugate AK	each well

Incubation: 1 h at RT, ≥350 rpm

3x 250 µl	Aspirate the contents of the wells and wash 3x with 250 µl each WP/well	each well
100 µl	Enzyme Conjugate EK	each well

Incubation: 15 min at RT, ≥350 rpm

3x 250 µl	Aspirate the contents of the wells and wash 3x with 250 µl each WP/well	each well
100 µl	Substrate Solution S	each well

Incubation: 15 min in the dark at RT

100 µl	Stop Solution SL	each well
Measure the absorbance within 30 min at 450 nm (≥590 nm Reference)		

REF E031



International Test description

CAL A-G	A-G	Rec in 750 µl VP	100 µl
Control	KS1 and KS2	Rec in 100 µl VP	100 µl
WASHBUF 20x	WP		1:20 DILU A. dest.
SPE + Control 1:301	DILU VP		100 µl
°C 20-25 °C			
100 µl	VP		A1/2
100 µl	CAL A (0.078 ng/ml)		B1/2
100 µl	CAL B (0.156 ng/ml)		C1/2
100 µl	CAL C (0.313 ng/ml)		D1/2
100 µl	CAL D (0.625 ng/ml)		E1/2
100 µl	CAL E (1.25 ng/ml)		F1/2
100 µl	CAL F (2.5 ng/ml)		G1/2
100 µl	CAL G (5 ng/ml)		H1/2
100 µl	CONTROL KS1 1:301	DILU VP	A3/4
100 µl	CONTROL KS2 1:301	DILU VP	B3/4
100 µl	SPE 1:301	DILU VP	
TAPE			

1 h **°C** 20-25 ≥ 350 rpm

3x 250 µl	3x WASHBUF WP
100 µl	Ab AK
TAPE	

1 h **°C** 20-25 ≥ 350 rpm

3x 250 µl	3x WASHBUF WP
100 µl	CONJ EK
TAPE	

15 min **°C** 20-25 ≥ 350 rpm

3x 250 µl	3x WASHBUF WP
100 µl	SUBST TMB s

15 min **°C** 20-25

100 µl	H₂SO₄ SL
MEASURE	