

Ghrelin – RIA

Radioimmunoassay für die quantitative Bestimmung von
humanem Ghrelin

Deutsch

Radioimmunoassay for quantitative Determination of
human Ghrelin

English

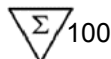
Europäische Union / European Union*
für In-vitro-Diagnostik / for in-vitro diagnostics
Rest of the world: for research use only!

O

DE/CA40/00809/16



IVD



REF **R90**

 **mediagnost**[®]

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
EN/ DE/ FR/ IT/ ES/ PT/ NL/ DK/ SE/ PL/ HU/ SK/ CZ/ BG/ EE/ GR/ RO/ SL/ FI

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

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



Expiry date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Data di scadenza/ Fecha de caducidad/ Data de validade/ Uiterste gebruiksdatum/ Udløbsdato/ Bäst före-datum/ Termin ważności/ Lejárati idő/ Čas expirácie/ Doba expirace/ Срок на годност/ Αεγυμίσκυυρπæv/ 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/ Vã rugãm sã respectați instrucțiunile de utilizare/ Upoštevejte 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 orvosdiagnostikai 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-diagnostiiikkäyttö



Lot-Batch Number/ Charge-Chargennummer/ Lot-Code du lot/ Lotto-Numero di lotto/ Lote-Código de lote/ Lote-Código do Lote/Lot-Partijnumme/ Lot-Batchkode/ Partisatskod/ Numer serii/ Tétel-sarzs szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/Partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-număr lot/ Številka serije/ erä



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



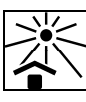
Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referência/ Referentienummer/ Referencennummer /Beställningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/Katalógové číslo/ Objednací číslo/Kataložen номер/Tellimisnumber/ Αρ. παραγγελίας/Număr comandă/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



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



Contains sufficient for x tests/ Inhalt ausreichend für x Tests/ Contient suffisant pour x tests/ Contenido suficiente 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 dostahuje 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/ Da se predpazva ot slnčeva svetlina/ Kaitsta otsese päikesekiirguse eest/ Κρατήστε το μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία/ Țineți departe de lumina soarelui/ Ne izpostavljajte sončni svetlobi/ suojaa auringonvalolta



Radioactive /radioaktiv/ Radioactif/ Radioattivo/ radioactivo/ radioactief/ radioaktiv/radioaktiv/ radioaktywny /radioaktiv/ rádioaktívne/ radioaktívni/ радиоактивно/ radioaktiivne/ Ραδιενεργό/radioactive/ radioaktivno/ radioaktiivinen



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



Mix tubes with a Vortex mixer/ Mix Rührchen mit Vortex Mixer/ Mélanger à l'aide d'un vortex/ Miscelare la provetta con agitatore Vortex/ Tubos de mezcla con mezclador de vortex/ Misturar os tubos com um agitador Vortex/ buisjes mengen met een Vortex/ Blanderør med Vortex-mixer/ Blanda rören med en vortexblandare/ Miksowanie rurek w mikserze Vortex/ Csövecskék keverése örvénykeverővel/ Premiešat' pomocou prístroja Vortex/ Promíchat pomocí prístroje Vortex/ Разбъркване на епруветките с миксер Vortex/ Segada torukesi Vortexi mikseriga/ Αναμίξτε τους σωληνίσκους με αναδευτήρα Vortex/ Amestecați eprubetele cu ajutorul unui agitator vortex/ Mešanje cevčic z mešalnikom Vortex/ Sekoita putket Vortex sekoittajalla

C	Centrifuge/ Zentrifugieren/ Centrifuger/ Centrifugare/ Centrifugar /centrifugeren/ Centrifugering/ centrifugera/ Odwirowywanie/ centrifugálás/ odstredit'/ odstředit/ Центрофугиране/ Tsentrifuugida / Φυγοκέντρωση/ centrifugare/ centrifugirati/ sentrifugoi
All	All/ alle/ Tout/ Tutto/ Todo/ tudo/ alle/ alle/ alla/ wszystkie/ minden/ všetko/ všechno/ всички/κόϊκ/ όλα/ toate/Vsi/kaikki
NOT	Not/ Nicht/ Non/ Non/ No/ Não/ niet/ Ikke/ inte/ nie/ Nem/ не/ mitte / όχι / Nu /Ne/ ei
B₀	maximal Binding/ maximale Bindung/ Liaison maximale/ legame max./ Enlace máximo/ Ligação máxima/ maximale binding/ maksimal binding / maximal binding/ maksymalne wiązanie/maximális kötés/ Maximálne väzby/ Maximální vazby/ максимално свързване/ maksimaalne sidumine/ Μέγιστη δέσμευση/ legáturá maximá/ Maksimalna vez/ Maksimaalinen sidos
TC	Total Counts / Total Counts/ Coups totaux/ Conte totali/ Conteo total/ Total de Contagens/ totaalellingen/ Samlede tællinger/ totalt antal/ Licznik całkowity/ Teljes szám/ Celkový počet/ Celkový počet/ Общо количество/ Σύνολο αποικιών / Număr total/ Skupno število /Kokonaissykäykset
Tube	Streptavidin-coated Tubes / Streptavidin-beschichtete Röhrchen/ tubes revêtus de streptavidine/ Provette rivestite di streptavidina/ Tubos recubiertos con estreptavidina/ Tubos revestidos com Streptavidina/ buisjes met streptavidin gecoat/ Streptavidin-coatede rør/ streptavidinbelagda rör/ Rurki s powłoką streptawidynowym/ Streptavidin-bevonatú csővecskék/ Rúrky s vrstvou streptavidínu Trubičky s vrstvou streptavidínu/ Натоварени със стрептавидин епруветки/ Streptavidiniiga kaetud torukese/ Σωληνίσκοι επικαλυμμένοι με στρεπταβιδίνη/ Eprubete acoperite Streptavidin/ Cevčice, prekrite s streptavidinom/ Streptavidiniilla pinnoitetut putket
Rec in	Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituir en/ Reconstituir em/ reconstituieren in/ Rekonstituér i/ rekonstituera/ Rekonstytuować w/ Helyreállítás/ Znovu pripravít' za/ Znovu pripravít za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti / Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ rekonstitui
SPE	Sample/ Probe /Echantillon/ campione/ Muestra/ Amostra/ monster/ Prøve/ prov/ Próbka/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Πρόβα/ Προov/ Δείγμα/ Probă/ Vzorec/ Náyte
BUF X	AB, PR Buffer/ Puffer/ Tampon/ tampone/ Tampón/ Tampão/ buffer/ Buffer/ buffert/ Bufor/ Puffer/ Puffer/ Puffer/ Буфер/ Puhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα/ tampon/ Puffer/ Puskuri
Tracer	C Tracer / Tracer/ Traceur/ Tracciatore/ Trazador/ Marcador/ tracer/ Tracer/ spårämne/ Indykator/ Nyomjelző/ Indikátor/ Indikátor/ Τρεϊσερ/ Kandur/ Ιχνηθέτης/ Indicator/ Slediina snov/ indikaattori
2.Ab	2.Ab Capture Antibody/ Fang-Antikörper/ Anticorps de capture/ Anticorpo di cattura/ Anticuerpos de captura/ Anticorpo de captura/ vanger-antilichaam/ Fæstet antistof/ fångande antikropp/ Przechwytywanie antyciał/ Elfogó antitest/ Zachytenie protilátky/ Zachycení protilátky/ Захващащо анти тяло/ Haarde-antikehad/ Ακίνητοποιημένο αντίσωμα/ Captură anticorpi/ Lovilna protitelesa / sekundäärinen vasta-aine
1.Ab	1.Ab Specific Antibody/ spezifischer Antikörper/ Anticorps spécifique/ Anticorpo specifico/ Anticuerpos específicos/ Anticorpo específico/ specifike antilichaam/ Specifisk antistof/ specifik antikropp/ Określone antyciała/ specifikus antitest/ Špecifická protilátka/ Špecifická protilátka/ Специфично анти тяло/ eriomased antikehad/ Ειδικό αντίσωμα/ anticorpi specifici/ Specifická protitelesa/ Specifinen vasta-aine
DILU X	Dilute in Buffer X/ Verdünnen in Puffer X/ Diluer dans le tampon X/ Diluire nel tampone X/ Diluir en tampón X/ Diluir no Tampão X/ verdunnen in buffer X/ Fortyndes i buffer X/ späđ i buffert X/ Rozcieńczenie w buforze X/ Hígítás X pufferben/ Riedit' v pufri X/ Ředit v pufru X/ Разреждане в буфер X/ Lahjendada puhvris X/ Αραιώστε σε ρυθμιστικό διάλυμα X/ Diluați în tamponul X/ Razrediti v pufru X/ laimennetaan x puskuriin
CAL X	Std. 1-6 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
Control	CS Control Serum / Kontrollserum/ Contôle sérique/ Siero di controllo/ Suero de control/ Soro de Controlo/ controleserum/ Kontrolserum/ Kontrollserum/ Serum kontrolne/ Ellenőrző szérum/ Kontrolné sérum/ Kontrolní sérum/ Контролен серум/ Kontrollseerum/ Ορός ελέγχου/Ser de control/ Kontrolni serum/ Kontrolli seerumi
MEASURE	Count radioactivity of all Tubes/ Radioaktivität aller Röhrchen messen / Compter l'activité de tous les tubes/ Misurare la radioattività di tutte le provette/ Medir la radioactividad de todos los tubos/ Medir a radioactividade de todos os tubos/ radioactiveit van alle buisjes meten/ Mål radioaktivitet for alle rør/ Mät radioaktiviteten i alla rör/ Zmierzyć radioaktywność wszystkich rurek/ Minden csővecske radioaktivitásának mérése/ Merať rádioaktivitu všetkých rúrok/ Měřit radioaktivitu všech trubiček/ Измерване на радиоактивността на всички епруветки/ Kõigi torukeste radioaktiivsuse mõõtmise / Μετρήστε τη ραδιενέργεια όλων των σωληνίσκων / Măsurați radioactivitatea tuturor eprubetelor / Meritev radioaktivnosti vseh cevčic / Mittaa kaikkien putkien radioaktiivisuus
Literatur	Literature/ Literatur/ Bibliographie/ Letterario/ Bibliografía/ Literatura documentação/ literatuur/ Litteratur/ litteratur/ Literatura/ Irodalom/ Literatura/ Literatura/ Литература// Kirjandus/ Βιβλιογραφία/ Bibliografie/ literatura/ Lähdeluettelo
International Test description	International test description/ internationale Testanleitung/ description internationale de test/ Istruzioni per il test internazionali/ Descripción de ensayo internacional/ Descrição internacional do teste/ internationale testbeschrijving/ internationell testbeskrivning/ Opis testu międzynarodowego/ nemzetközi teszt-útmutató/ Medzinárodný návod k testu/ Mezinárodní návod k testu/ rahvusvaheline katse kirjeldus/ Διεθνείς οδηγίες για εργαστηριακές δοκιμές/ instructiuni internaționale pentru testare/ mednarodna navodila za preizkus/ Kansainvälinen käyttöohje

Symbols / Symbole	2
Packungsbeilage Deutsch	
TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN + EINSATZMÖGLICHKEITEN	5
VERWENDUNGSZWECK	5
EINFÜHRUNG	5
METHODIK	6
Kalibrierung des Assays:	6
Assay Eigenschaften und Validierung	6
Proben: Eignung, Vorbereitung und Lagerung	7
MATERIALIEN	7
Inhalt der Testpackung	7
Zusätzlich benötigte Materialien	7
TECHNISCHE HINWEISE	8
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	8
Radioaktivität	9
TESTDURCHFÜHRUNG	9
Pipettierschema	9
Erweitertes Waschverfahren zur Erhöhung der Präzision	10
AUSWERTUNG	11
Berechnung der Standardkurve	11
Erwartungswerte	12
Package Insert English	
TECHNICAL FEATURES+APPLICATIONS	13
INTENDED USE	13
INTRODUCTION	13
PRINCIPLE	14
Calibration of the Assay	14
PERFORMANCE CHARACTERISTICS	14
SPECIMEN COLLECTION, PREPARATION, AND STORAGE	14
REAGENTS PROVIDED	15
MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	15
REAGENT PREPARATION	15
WARNINGS AND PRECAUTIONS	16
ASSAY PROCEDURE	17
Extended washing procedure for increased precision:	17
CALCULATION OF RESULTS	18
Establishing the Standard Curve	18
Concentration of the control:	18
EXPECTED VALUES	19
LITERATUR/LITERATURE	20
KURZANLEITUNG – Mediagnost hGhrelin RIA R90	22
SUMMARY – Mediagnost Ghrelin R90	23
<u>REF</u> R90 International Test Description	24

* please ask for package inserts in your national language

PACKUNGSBEILAGE DEUTSCH

TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN + EINSATZMÖGLICHKEITEN

- analytische Sensitivität 0,04 ng/ml
- Intra- und Interassay Varianz <10%
- Kontrollserum
- Wiederfindung rekombinanten Ghrelins 97%
- Messung in Serum

VERWENDUNGSZWECK

Mit diesem Radioimmunoassay Kit kann humanes Ghrelin in Serum/ EDTA-Plasma bestimmt werden.

EINFÜHRUNG

Ghrelin ist ein 3.5 kDa großes Protein, das aus 28 Aminosäuren besteht und dessen 3-Serin oktanyliert ist. Die biologische Aktivität des Peptidhormons ist abhängig von der Acylierung dieses Serinrestes (1). Ghrelin wird hauptsächlich im Magen, aber auch im Duodenum und in Herzzellen synthetisiert (2). Die Entdeckung des Ghrelins zeigt, dass der Magen neben seiner Funktion innerhalb des Verdauungsprozesses auch ein endokrines Organ darstellt (3).

Ghrelin kann die Blut-Hirn-Schranke überwinden und ist ein natürlicher Ligand des Growth Hormone Secretagogue Rezeptors in Hypophyse und Hypothalamus (4). Ghrelin besitzt Einfluss auf viele neurologische Prozesse, beispielsweise kann die Erinnerungsfähigkeit durch Ghrelin moduliert werden (5), des Weiteren existiert eine Verbindung zur Physiologie des Schlafes, da die Ghrelinsekretion durch Schlaf beeinflusst wird (6, 7). Neben diesen neurologischen Auswirkungen, die in ihrer gesamten Signalkette noch nicht aufgeklärt sind beeinflusst Ghrelin nicht nur die Wachstumshormon Sekretion sondern auch die Sekretion weiterer Hormone, z.B. ACTH, Kortisol, Prolaktin (8, 9). Es ist auch in den Langerhansschen Inseln nachweisbar und beeinflusst die Regulation der Insulinsekretion (10-12). Die Ghrelin-Werte bei Frauen mit PCO-Syndrom (polycystic ovary syndrome) sind herabgesetzt (24) und korrelieren stark mit Insulinsensitivität. Es wird deutlich, dass viele regulatorische Kreisläufe durch Ghrelin beeinflusst werden.

Zusätzlich zu den endokrinen Aktionen übt Ghrelin Einfluss auf immunologische Prozesse aus. Bei humanen Endothelzellen der Umbilicalvene verhindert Ghrelin in vitro sowohl die basale als auch die TNF-alpha-induzierte Freisetzung von Zytokinen. Die Adhäsion mononuklearer Zellen wurde ebenfalls inhibiert. Die Bedeutung des Ghrelins bei Entzündungsprozessen zeigt sich auch im Tiermodell, so wurde in Ratten die endotoxin-induzierte proinflammatorische Zytokin-Produktion durch intravenös verabreichtes Ghrelin gehemmt (13).

Die Organe, die Ghrelin synthetisieren, wie auch die Lokalisation der bekannten Rezeptoren deuten auf die Bedeutung des Ghrelins sowie die Rolle des Darms in der Appetit-Regulierung hin (1;23). So befinden sich viele Ghrelin Rezeptoren im hypothalamischen Nucleus arcuatus, eine Gehirnregion, die eine Schlüsselfunktion bei der hormonellen Regulation der Nahrungsaufnahme ausübt. Mehrere Untersuchungen zeigten einen, durch Nahrungsaufnahme kontrollierten, zirkadianen Rhythmus der Ghrelinsekretion (14). Kurz vor Nahrungsaufnahme steigen die Ghrelin-Plasmakonzentrationen und sie sinken nach der Mahlzeit. Bei Ess-Störungen reflektiert der Ghrelinspiegel Krankheit: Adipositas führt zu einer verminderten Ghrelinkonzentration im Blut (14) und bei Anorexia Nervosa kann ein Anstieg der Ghrelinkonzentration im Serum nachgewiesen werden (15-17). Ghrelin wirkt möglicherweise als Gegenspieler zu Leptin in der Regulation von Nahrungsaufnahme und Fettverwertung. Bei Patienten mit primärer biliärer Zirrhose sank parallel zu steigenden Leptinspiegeln Ghrelinkonzentration im Serum (16). Auch die Adipogenese wird durch Ghrelin negativ beeinflusst (18). Bei Alterungsprozessen scheint Ghrelin ebenfalls von Bedeutung zu sein. So wurde eine signifikante Abnahme der Ghrelin Konzentration bei älteren Menschen festgestellt (19). Dieses könnte die Alters-Anorexie erklären und bietet ein neues Ziel der Anti-Aging Forschung.

In Untersuchungen zur Bedeutung von Ghrelin bei chronischen Lebererkrankungen zeigte sich, dass die Ghrelinkonzentration im Serum mit mehreren biochemischen und klinischen Parametern korreliert wie z.B.: Enzephalopathie, Anämie, Hypoglykämie, Dysfunktion der Nieren (20).

Patienten mit Prader-Willi-Syndrom (PWS) wiesen einen fast 5fachen Anstieg des Ghrelinserum-Spiegels auf, was darauf hinweist, dass Ghrelin auch in der Pathogenese der Hyperphagie beim PWS beteiligt sein könnte (21, 22).

Ghrelin scheint somit an der Regulation von vielen physiologischen Prozessen beteiligt zu sein. Im Detail ist der Einfluss auf viele dieser Prozesse jedoch noch nicht untersucht worden. Mit dem vorliegenden Testsystem bieten wir Ihnen eine einfache und zuverlässige Methode zur Quantifizierung von humanem Ghrelin in Serum.

METHODIK

Der Radioimmunoassay für humanes Ghrelin verwendet einen polyklonalen Antikörper mit hoher spezifischer Affinität für Ghrelin. Ghrelin wird quantitativ erkannt.

Die Standards werden aus rekombinantem Ghrelin hergestellt, der ¹²⁵I-Tracer aus einem C-terminalen Peptid (AS 15 – 28) mit vorsynthetisiertem Tyrosin.

Kalibrierung des Assays:

Der Mediagnost Ghrelin RIA R90 wurde mit dem in-house Test der Medizinischen Hochschule Hannover, Prof. Dr. Brabant abgeglichen.

Die Standards bestehen aus rekombinantem Ghrelin in Konzentrationen von **200, 400, 800, 1600 und 6400 pg/ml**.

Assay Eigenschaften und Validierung

Die **analytische Sensitivität** des R90 beträgt **40 pg/ml ca.** (10pmol/l). Gemessen als zweifache Standardabweichung des Null-Standards.

Die **Wiederfindung** von rekombinantem hGhrelin in verschiedenen Humansenen betrug im **Mittel 97%** der theoretisch zu erwartenden Menge.

Die Inter- und Intraassay Variationskoeffizienten liegen beide deutlich unter 10%. Beispielhafte Bestimmungen sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 dargestellt.

Spezifität:

Der Assay ist spezifisch für humanes Ghrelin. Der Antikörper zeigt darüber hinaus Kreuzreaktivität mit Kaninchen, Katzen-, Ziegen-, Schaf-, Ratten-, Pferd-, Esel-, Schweine-, Hund, Maus-, Meerschweinchen- und Hamster-Ghrelin. Es wurde keine Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen (z.B. WH oder Insulin) gefunden

Tabelle 1 : Inter-Assay-Varianz

	Mittelwert (pg/ml)	Standardabweichung (pg/ml)	VK (%)
Probe 1	762	55,3	7,3
Probe 2	1085	52,5	4,8
Probe 3	790	65	8,2

Tabelle 2: Intra-Assay-Varianz

	Anzahl der Bestimmungen	Mittelwert (pg/ml)	VK (%)
Probe 1	6	1028,13	2,6
Probe 2	6	1275,95	4,0
Probe 3	6	1325	5,3

Proben: Eignung, Vorbereitung und Lagerung

Geeignet sind **Serum** und **EDTA-Plasma** (nicht geeignet sind Heparin- und Citrat-Plasma). Eine spezielle externe Probenvorbehandlung ist nicht nötig.

Blutproben sollten morgens oder am frühen Nachmittag abgenommen werden. Bei spezifischen Fragestellungen muss der Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme mit in Betracht gezogen werden.

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 hGhrelin Konzentration keine Auswirkungen gehabt.

Im Allgemeinen ist durch den großen Messbereich des Kits eine vorbereitende Serum- oder Plasma-Verdünnung nicht notwendig. Für die meisten Untersuchungen (Serum- oder Plasmaproben und keine Extremwerte zu erwarten) sollten **unverdünnte Proben mit 100 µl pro Röhrchen** eingesetzt, **geeignet** sein. Die Messgenauigkeit ist bei einer Konzentration von 1000 pg/ml maximal.

MATERIALIEN

Inhalt der Testpackung

1)	CAL 1-6	Standards STD 1-6 , lyophilisiert, 750 µl , enthalten rekombinantes humanes Ghrelin. Die Standardkurve deckt einen Bereich von 0,2-6,4 ng/ml Ghrelin ab. Für den Assay werden jeweils 100 µl pro Röhrchen eingesetzt.
2)	NSB	Unspezifische Bindung, NSB , lyophilisiert, 1 ml . Kaninchen IgG
3)	BUF AB	Testpuffer AB , gebrauchsfertig, 30 ml , zur Rekonstitution von 1.AB, TR, NSB, STD und CS
4)	BUF PR	Präzipitations-Reagenz PR , gebrauchsfertig nach Zugabe von 2.Ab, Mischung 1:56, 55 ml
5)	1.Ab	1. Antikörper, 1.Ab , lyophilisiert, 10,5 ml , Rekonstituieren in 10.5 ml AB.
6)	2.Ab	2. Antikörper 2.Ab , lyophilisiert, 1 ml , anti-Kaninchen-IgG. Rekonstituieren in 1 ml AB. Die Lösung wird erst unmittelbar vor Gebrauch zu Reagenz PR gegeben (Verhältnis 1:56). Nur benötigte Menge PR+2.Ab anmischen (500µl/Röhrchen). Der Rest wird eingefroren. Eventuell auftretende Trübungen nach Zugabe von 2.Ab zu Reagenz PR haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.
7)	Tracer	Tracer TR , lyophilisiert, 10,5 ml , < 2,3 µCi bzw. < 85 kBq. in 10,5 ml AB rekonstituieren, rot gefärbt
8)	Control	Kontrolle CS , lyophilisiert, 750 µl , in 750 µl AB rekonstituieren. Soll-Konzentration auf dem Etikett +/- 2SD.

Zusätzlich benötigte Materialien

Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen

Einmal-Röhrchen aus Polystyrol oder Polypropylen. Aufgrund des geringen Volumens des Immun-Präzipitats sollten nur konische Röhrchen verwendet werden.

Vortex-Mischgerät

Kühlbare Zentrifuge

Vorrichtung zum Absaugen der Proben-Lösungen aus Röhrchen (empfohlen aufgrund der Radioaktivität und der potentiellen Infektionsgefahr bei humanen Proben)

Gamma-Zähler

Destilliertes oder demineralisierte Wasser (4°C)

TECHNISCHE HINWEISE

Der Assay ist strikt nach dem Testprotokoll durchzuführen.

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

Für die **Rekonstitution** der lyophilisierten Komponenten muss der im Kit erhaltene **Testpuffer AB** verwendet werden. Es empfiehlt sich zum Rekonstituieren die Reagenzien 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen zu lassen und sie anschließend kräftig mit einem Vortex-Mixer zu mischen. Schaumbildung sollte jedoch vermieden werden. Dies gilt insbesondere für die Kontrolle CS!

Bei sachgemäßer Handhabung ist die **Haltbarkeit der Reagenzien nach Öffnung** nicht beeinträchtigt. Rekonstituierte Komponenten sollten bei -20°C (oder kälter) aufbewahrt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Alle Komponenten des Kits müssen, wenn nicht anders beschrieben, **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.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Mediagnost 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 GmbH kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht, soweit keine gesetzliche Regelung anderes besagt.

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

Angemessene Vorsichtsmaßnahmen und die Regeln der guten Laborpraxis müssen bei Lagerung, Gebrauch und Entsorgung der Bestandteile des Kits eingehalten werden. Die Entsorgung der Bestandteile des Kits muss nach den örtlichen Vorschriften erfolgen.

Menschliches Serum:

in folgenden Komponenten enthalten: **CS**

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 human Immuninsuffizienz 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.

NaAzid

< 0,02% Natriumazid

Die Reagenzien enthalten als Konservierungsmittel Na-Azid, allerdings sehr verdünnt (0,02%). Na-Azid ist sehr giftig, es gelten R-Sätze 28, 32, 50/53 und S-Sätze 28, 45, 60, 61.

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.

Beim Umgang mit radioaktivem und potentiell infektiösem Material müssen folgende Richtlinien befolgt werden:

Das Material sollte in speziell ausgewiesenen Bereichen gelagert und verwendet werden. Essen, Trinken und Rauchen ist in diesem Bereich verboten!

Niemals mit dem Mund pipettieren!

Direkter Kontakt mit diesem Material muss vermieden werden! Deshalb Laborkleidung und Einmalhandschuhe tragen.

Verschüttete Reagenzien müssen sofort aufgewischt und kontaminierte Flächen und Geräte mit einem geeigneten Detergenz gereinigt werden.

Unbenutzte radioaktive Materialien und radioaktiver Abfall müssen entsprechend den Empfehlungen der nationalen Aufsichtsbehörden gelagert werden.

Radioaktivität

Vor der Bestellung oder dem Gebrauch radioaktiver Produkte ist es notwendig, die **Einhaltung der nationalen Bestimmungen oder Gesetze** die deren Anwendung regeln, sicherzustellen. Örtliche Vorschriften der jeweiligen Einrichtung, die Umgang und

Verhalten im Radioaktiv-Arbeitsbereich regeln, müssen befolgt werden. Die hier gegebenen Ratschläge ersetzen nicht die lokalen Regeln, Anweisungen oder Ausbildungen der jeweiligen Einrichtung, ebenso wenig die Anordnungen des zuständigen Strahlenschutzbeauftragten. Es ist wichtig, die Richtlinien der guten Laborpraxis zu erfüllen, daneben gilt es die Besonderheiten im Umgang mit dem Radionuklid Jod-125 zu beachten.

Jod-125 hat eine Halbwertszeit $T_{1/2}$ von 60 Tagen und emittiert 35,5 keV Gamma-Strahlung, 27 – 32 keV Röntgen-Strahlung und keine Beta-Strahlung. Effektive Abschirmung ist durch Blei möglich, die Halbwertschichtdicke beträgt 0,02 mm Blei, Reduktion auf 10% ist durch 0,2 mm zu bewerkstelligen.

Zur Reduzierung der Strahlendosis sollte die Zeit des Umgangs mit Radioaktivität minimiert werden (Arbeitsschritte vorplanen), sowie die Entfernung zur Strahlenquelle maximiert werden (Verdopplung der Entfernung reduziert die Strahlendosis auf ein Viertel). Unsachgemäßes Öffnen von Gefäßen oder Pipettieren von Lösungen kann zur Bildung von Aerosolen, also Freisetzung von Radioaktivität in Tröpfchenform, führen und muss vermieden werden. Der pH-Wert von Lösungen, die Jod enthalten, sollte nicht im sauren Bereich sein, da dies zur Freisetzung von flüchtigem elementarem Jod führen kann.

Einige Jod-Verbindungen können durch Gummihandschuhe diffundieren, deshalb sollten zwei Paar oder Polyethylen- und Gummihandschuhe getragen werden.

Zur Reinigung von kontaminierten Flächen oder Gegenständen sollte, um das Jod-125 chemisch zu stabilisieren, alkalische Natriumthiosulfatlösung und Papier od. Zellstoff verwendet werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

Pipettierschema

Röhrchen Nr.:	Inhalt	AB	STD, CS, Proben	NSB	1.Ab	TR	2. Ab in PR
1,2	Total Counts	-	-	-	-	100	-
3,4	NSB (unspez. Bindung)	100	-	100	-	100	500
5,6	B ₀ (Nullbindung)	100	-	-	100	100	500
7-18	Standards 1-6	-	100 1-6	-	100	100	500
19,20	Kontrollserum	-	100 CS	-	100	100	500
21,22	Probe 1	-	100	-	100	100	500
23,24	Probe 2	-	100	-	100	100	500
etc.							

(Alle Volumina in µl)

1) Beschriftung der Röhrchen nach Pipettierschema (Doppelwerte):

- 1, 2 Gesamtaktivität (total counts, **TC**),
- 3, 4 Reagenz **NSB** (unspezifische Bindung),
- 5, 6 Nullstandard (**B₀**),
- 7-18 **Standards** 1 bis 6
- 19, 20 Kontrolle **CS**
- ab 21 **Proben**

2) Zugabe von je **100 µl** Reagenz **AB** (Testpuffer) in Röhrchen 3, 4 und 5, 6.

- 3) Zugabe von je **100 µl** der **Standards 1-6:**
7, 8 Standard 1 (200 pg/ml)
9, 10 Standard 2 (400 pg /ml); usw. bis 18.
- 4) Zugabe von je **100 µl** Kontrolle **CS** in Röhrrchen 19, 20.
- 5) Zugabe von je **100 µl Probe** ab Röhrrchen 21.
- 6) Zugabe von **100 µl** Reagenz **NSB** in Röhrrchen 3 und 4.
- 7) Zugabe von **100 µl** Reagenz **1.Ab** (1. Antikörper), ab Röhrrchen 5.
- 8) Die Röhrrchen mischen (mit Vortex-Mixer) und **über Nacht** (mindestens 20, maximal 24 Stunden) bei **2-8 °C inkubieren**.
- 9) Zugabe von **100 µl** Reagenz **TR** (Tracer) in alle Röhrrchen. **Röhrrchen 1 und 2 (Gesamtaktivität) mit Stopfen verschließen und bis zum Schritt 16) beiseite stellen.**
- 10) Die restlichen Röhrrchen mischen (mit Vortex-Mixer) und **über Nacht** (mindestens 16, maximal 20 Stunden) bei **2-8°C inkubieren**.
- 11) Zugabe von **Reagenz 2.Ab zu PR** (1:56, mischen); **die Reagenzmischung muss gekühlt sein (2-8 °C)**. Zugabe von je **500 µl** Reagenz **PR** (inkl. 2.Ab), ab Röhrrchen 3.
- 12) Röhrrchen mischen (mit Vortex-Mixer) und zur Präzipitation für **1 Stunde bei 2-8°C** inkubieren.
- 13) Zugabe von je **1 ml** eiskaltem **Wasser**.
- 14) Gekühlt bei **3000 x g** für **20 min.** zentrifugieren.
- 15) Überstand absaugen, um das Präzipitat nicht zu zerstören oder mit abzusaugen, sollte man darüber einen Flüssigkeitsrest von ca. 2 mm stehen lassen (Tipp: Absaugnadel mit Anschlag versehen). **Je nach Laborausstattung und -praxis kann wahlweise auch vorsichtig dekantiert werden!**
- 16) **Alle** Röhrrchen im Gamma-Counter zählen für **1 (bis 3) min.**

Erweitertes Waschverfahren zur Erhöhung der Präzision

Nach der einstündigen Inkubation (Schritt 12) werden die Röhrrchen zentrifugiert (s. Schritt 14) und der Überstand abgesaugt (s. Schritt 15). Anschließend erfolgt die Zugabe von je 1 ml eiskaltem Wasser. Die Zugabe sollte vorsichtig erfolgen, um das Präzipitat nicht zu zerstören. **Auf keinen Fall erneut mischen!** Die Röhrrchen werden dann noch einmal für 5 min. bei 3000 x g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Danach werden die Röhrrchen im Gamma-Counter gezählt. Das erweiterte Waschverfahren erhöht die Präzision der Messungen, ist allerdings mit vermehrtem Arbeitseinsatz verbunden. Die höhere Präzision ist meist nur bei speziellen Fragestellungen von Bedeutung.

AUSWERTUNG

Berechnung der Standardkurve

Die bereitgestellten Standards enthalten folgende Ghrelin-Konzentrationen:

Standard	B ₀	1	2	3	4	5	6
ng/ml	0	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2	6,4
pg/ml	0	200	400	800	1600	3200	6400
pmol/l	0	59	119	237	475	949	1899

1. Ermittlung des Mittelwerts der Doppelbestimmungen.
2. Subtraktion des Mittelwerts der unspezifischen Bindung (NSB, Röhrchen 3 und 4) von den Mittelwerten der Standards, Kontrollen und Proben. Dies entspricht der korrigierten Zählausbeute B.
3. Der korrigierte Wert des Nullstandards (Röhrchen 5 und 6) entspricht B₀.
4. Berechnung der Prozentverhältnisse (%B/B₀): $\%B/B_0 = B/B_0 \times 100 \%$
5. Auftragen von %B/B₀ gegen die Konzentrationen der Standards in halb-logarithmischem oder logit-log Maßstab auf Papier oder per Computerauswertung.
6. Qualitätskontrolle, Berechnung der %NSB/TC:
 NSB / TC (Mittelwert der Röhrchen 3+4/ Mittelwert der Röhrchen 1 und 2) $\times 100 \%$
Soll: %NSB/TC < 5%
7. Qualitätskontrolle, Berechnung der % B₀/TC:
 B_0 (s. 3.) / TC (Gesamtaktivität) $\times 100 \%$.
Soll: %B₀/TC > 20%

Ermittlung der Proben-Konzentrationen:

Die Konzentration (Abszisse, x-Achse) wird entsprechend dem %B/B₀-Wert der Probe aus dem Schaubild abgelesen.

Beispiel:

Mittelwert der Röhrchen 3 und 4 (NSB): 482 cpm

Mittelwert der Röhrchen 5 und 6 (Nullstandard, B₀): 8927 cpm

Mittelwert der Röhrchen 19 und 20 (Kontrolle CS): 4794 cpm

$$\%B/B_0 = \frac{\text{Probe} - \text{NSB}}{B_0 - \text{NSB}} \times 100\% = \frac{4794 - 482}{8927 - 482} \times 100\% = 51,1\%$$

Ein Wert von 51,1% auf der Ordinate (y-Achse) entspricht in dem hier gewählten Beispiel einem Abszissen-Wert von 1055 pg/ml.

Bei vorausgegangener Verdünnung der Probe ergibt sich die Konzentration der Probe durch Multiplikation des aus der Grafik (oder mit Hilfe eines Computer-Programms) ermittelten Werts mit dem Verdünnungsfaktor.

Sollte die Konzentrationsangabe in pmol/l der in pg/ml vorgezogen werden, so müssen die Werte in pg/ml durch 3,371 dividiert werden:

Beispiel: 1055 pg/ml : 3,371 = 313 pmol/l

Konzentration der Kontrolle:

Der aus der Standardkurve ermittelte Wert für die Kontrolle CS sollte innerhalb des etikettierten Bereichs liegen. Die ermittelten Konzentrationen der Proben können nur als valide angesehen werden, wenn die Kontrolle mit einem Wert innerhalb des Sollbereichs gefunden wird. Andernfalls ist eine Fehleranalyse durchzuführen als deren Resultat die Ergebnisse des Testes akzeptiert oder verworfen werden.

Erwartungswerte

	männlich	weiblich
n	52	52
Mittelwert	801,3	1141,9
Standard-abweichung	179,1	507,6
Min	511,0	454,4
Max	1555,2	2565,7
Median	770,5	1032,3

Die Ghrelinkonzentrationen in humanem Serum wurden bislang zwischen minimal 300 pg/ml (90 pmol/l) und maximal 4000 pg/ml (1200 pmol/l) gemessen. Dabei lag die Konzentration der meisten Proben im Bereich von 600 pg/ml (180 pmol/l) bis 1400 pg/ml (420 pmol/l).

Je 52 Seren von männlichen und weiblichen Blutspendern im Alter von 20 bis 65 Jahren wurden auf Ihre Ghrelinkonzentrationen untersucht. Die Messwerte des Mediagnost RIA R90 in pg/ml sind in der Tabelle 4 dargestellt. Es liegen für die Spender keine Informationen bzgl. der Nahrungsaufnahme vor, weitere Untersuchungen zur Definition von Normalwerten sind daher unerlässlich!

Tabelle 3: Ghrelin Serumkonzentrationen von männlichen und weiblichen Blutspendern

PACKAGE INSERT ENGLISH

TECHNICAL FEATURES+APPLICATIONS

- ◆ analytical sensitivity 0.04 ng/ml
- ◆ Intra- and Inter Assay Variance < 10%
- ◆ Recovery of recombinant Ghrelin 97%
- ◆ Control Serum included
- ◆ For measurement in human serum

INTENDED USE

This radioimmunoassay kit is suited for measuring human Ghrelin in serum and EDTA-Plasma.

INTRODUCTION

Ghrelin is a 3.5 kDa protein of 28 amino acids and is serine octanoylated. Bioactivity of this small peptide hormone depends on octanoylation (1). It is mainly synthesized by stomach but also in duodenal and heart cells (2) and therefore indicates the relevance of the stomach as endocrine organ (3).

Ghrelin is able to cross the blood-brain barrier and is a natural ligand of growth hormone secretagogue receptor in pituitary and hypothalamus (4). Ghrelin exert influence on several neurological processes, for instance memory retention can be modulated by ghrelin (5) and Ghrelin secretion is influenced by sleep (6, 7). Not only growth hormone but several other hormones are influenced by Ghrelin e.g. ACTH, cortisol, prolactin (8, 9). It is also present in pancreatic islets and regulates insulin secretion (10-12). In women with polycystic ovary syndrome Ghrelin levels are decreased and highly correlated to insulin sensitivity (24), so there are several regulatory circles influenced by Ghrelin. Additionally to endocrine action Ghrelin exerts influence on immunological processes. In Human umbilical vein endothelial cells Ghrelin inhibits basal and TNF-alpha-induced cytokine release and mononuclear cell binding and in vivo endotoxin-induced proinflammatory cytokine production in rats was also inhibited by intravenous administrated Ghrelin (13).

Sites of Ghrelin synthesis as well as receptor location indicate a role for the hormone and the gut in appetite regulation (1) (23). So many Ghrelin receptors are present in the hypothalamic arcuate nucleus, a brain area important in food intake control. Several investigations demonstrate a circadian rhythm of Ghrelin secretion (14), controlled by ingestion. Shortly before food intake Ghrelin plasma concentration increases and decreases after finishing. In eating disorders Ghrelin levels reflect illness, so obesity suppresses Ghrelin concentration in blood (14) and in anorexia nervosa an increase of Ghrelin serum concentration can be detected (15-17). Ghrelin might act as counterpart to Leptin in the regulation of food intake and fat utilization, so in patients with primary biliary cirrhosis parallel to increasing Leptin levels Ghrelin serum concentration decreases (16). It also influences the adipogenesis negatively (18). A significant decrease of Ghrelin concentration is detected in elderly people (19). This could explain the anorexia of elderly people and offers a new target in anti-aging research.

Further investigation of Ghrelin serum concentration in chronic liver disease resulted in a correlation of Ghrelin concentration with several biochemical and clinical parameters: e.g. encephalopathy, anaemia, hypoglycaemia, renal dysfunction (20).

In Patients with the Prader-Willi-Syndrome show a nearly 5fold increase of serum Ghrelin, so Ghrelin may be involved in the pathogenesis of hyperphagia in PWS (21, 22).

So Ghrelin seems to be involved in the regulation of many physiological processes and its influence on many of these processes has not been investigated in detail. With this test system we provide an easy but reliable tool for the quantification of human Ghrelin in serum.

PRINCIPLE

For the Radioimmunoassay for the determination of human Ghrelin a polyclonal rabbit-antibody of high specificity is used. Ghrelin is measured quantitatively.

Standards are prepared from recombinant Ghrelin, ¹²⁵I-Tracer from a C-terminated peptide (AS 15 – 28) with presynthesised Tyrosine.

Calibration of the Assay

The assay was calibrated against the internal test of Medical School Hannover, Prof. Brabant.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Sensitivity

The analytical **sensitivity** of the assay yields **40 pg/ml (about 10 pmol/L)** measured as 2x SD of zero standards.

Specificity

This assay is specific for human Ghrelin. The antibody shows in addition cross-reactivity with: rabbit, cat, guinea pig, hamster, goat, sheep, rat, horse, donkey, pig, dog, rabbit, mouse and bovine. No cross-reactivity was found with other proteins such as insulin or GH.

Table 1: Intra-Assay-Variation

	Number of determinations	Mean value [pg/ml]	VC%
Sample 1	6	1028.13	2.6
Sample 2	6	1275.95	4.0
Sample 3	6	1325	5.3

Table 2: Inter-Assay-Variation

	Mean value (pg/ml)	Standard deviation	VC%
Sample 1	762	55.3	7.3
Sample 2	1085	52.5	4.8
Sample 3	790	65	8.2

Recovery

Serum spiking experiments with recombinant human Ghrelin yielded a recovery of 97% (± 2%).

SPECIMEN COLLECTION, PREPARATION AND STORAGE

Serum/ EDTA-Plasma samples are suitable (inappropriate are Heparin- and Citrate-Plasma). An external sample preparation prior to assay is not required.

For testing of single blood samples, the specimens may be taken in the morning or early afternoon. For specific questions, the influence of food intake should be taken in consideration.

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 at –20°C or below in tightly closable plastic

tubes. Avoid on principal repeated freeze-thaw cycles of serum/plasma (if required, please subaliquote) although Ghrelin levels were found to be unaffected by few cycles (5x) in our experiments.

Because of the wide effective range of this RIA kit a preparative sample dilution is generally not necessary. For most of the determinations (serum or plasma samples, and no extreme values expected) **the use of undiluted samples 100 µl per tube**, should be appropriate. In case of extremely high Ghrelin levels the sample should and can be diluted in Assay Buffer AB, e.g. 1:10. At a concentration of 1000pg/ml the precision of this assay is maximal.

REAGENTS PROVIDED

1)	CAL 1-6	Standards STD 1-6 , lyophilized, 750 µl , contain human recombinant Ghrelin. The calibration curve covers a range of 2-6.4 ng/ml Ghrelin. Please use 100 µl standard solution per tube .
2)	NSB	unspecific binding, NSB , lyophilized, 1ml . rabbit IgG
3)	BUF AB	Assay Buffer AB , ready-to-use , 30 ml , for reconstitution of 1.AB, TR, NSB, STD and CS
4)	BUF PR	Precipitation-Reagent PR , after addition of 2.Ab ready-to use, dilution of 2.Ab 1:56, 55ml
5)	1.Ab	1. antibody, 1.Ab , lyophilized, 10,5 ml , Reconstitute in 10.5 ml AB.
6)	2.Ab	2. antibody, 2.Ab , lyophilized, 1 ml , anti-rabbit-IgG. Reconstitute in 1 ml AB. 2.Ab Reconstitute with 1 ml reagent AB . Transfer dissolved material to reagent PR immediately before use (Ratio 1:56). Please mix only the required quantity of PR+2.Ab (500µl/vial). The rest can be frozen. The assay is unaffected by the possible occurrence of turbidity after adding 2.Ab to reagent PR .
7)	Tracer	Tracer TR , lyophilized, 10.5 ml , < 2.3 µCi or < 85 kBq. reconstitute in 10.5 ml AB, stained red
8)	Control	Control CS , lyophilized, 750 µl , reconstitute in 750 µl AB. Concentration is given by label +/- 2SD.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Precision pipettes (100 and 200µl) Micropipettes and multichannel pipettes with disposable plastic tips
 Disposable polystyrene or polypropylene tubes. Conical tubes are highly recommended because of the small volume of the immunoprecipitates

Vortex-mixer

Centrifuge

Device to aspirate the fluid from the tubes (recommended because of the potential danger of radioactivity and infection by human samples)

Ice-Cold deionized water

Gamma Counter

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. All reagents are stable unopened until the expiry date, if stored in the dark at 2° - 8°C (see label).

Control Serum CS Reagent 1.Ab, 2.Ab, TR, NSB and STD have to be reconstituted in **Assay Buffer AB**. It is recommended to keep the reconstituted reagents at room temperature for 30 minutes and then to mix them thoroughly but gently (no foam should result) with a Vortex mixer. Transfer reconstituted 2.Ab into the buffer PR. The assay is unaffected by the possible occurrence of turbidity after add in 2.Ab to reagent PR.

The shelf life of the components after opening is not affected, if used appropriately. Reconstituted Components should be stored at -20°C (or below). Repeated freeze-thaw cycles have to be avoided.

Before use, all kit components should be brought to room temperature, if nothing different is indicated. **Precipitates, possible in buffers, should be dissolved before use through mixing and warming.**

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For in-vitro diagnostic use only. For professional use only.

Possession and use of the kit is subject to the regulations of the national nuclear regulatory authorities.

Reagents with different lot numbers should not be mixed.

Reagents contain Sodium-Azide as preservative, however, highly diluted (0.02%). Sodium-Azide is very toxic, R-Phrases: 28, 32, 50/53 and S-Phrases 28, 45, 60, 61 must be considered.

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**, if not indicated differently. Precipitates in buffers should be dissolved before use by thorough mixing and warming. **Temperature WILL affect** the assay. However, values for the patient samples will not be affected.

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.

Radioactivity - Before ordering or using radioactive materials, it is necessary to take the appropriate actions to ensure compliance with national regulations governing their use. Local rules in each establishment, which define actions and behaviour in the radioactivity working areas, should also be adhered to. The advice given here does not replace any local rules, instructions or training in the establishment, or advice from the radiation protection advisers. It is important to follow the code of good laboratory practice in addition to the specific precautions relating to the radionuclide I-125 used.

Iodine-125 has a radioactive half-life T_{1/2} of 60 days and emits 35.5 keV gamma radiation, 27 – 32 keV x-rays and no beta radiation. Shielding is effectively done by lead, first half value layer is 0.02 mm lead, reduction to 10 % is made by 0.2 mm.

To reduce the radiation dose time spent handling radioactivity should be minimized (plan ahead), and distance from source of radiation should be maximized (doubling the distance from the source quarters the radiation dose).

Formation of aerosols, e.g. by improper opening and mixing of vials or pipetting of solutions which may cause minute droplets of radioactivity become airborne, is a hazard and should be avoided.

Solutions containing iodine should not be made acidic, because this might lead to the formation of volatile elemental iodine.

As some iodo-compounds can penetrate rubber gloves, it is advisable to wear two pairs, or polyethylene gloves over rubber.

For cleaning of contaminated areas or equipment, the Iodine-125 should be rendered chemically stable by using alkaline sodium thiosulphate solution together with paper or cellulose tissue.

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.

The handling of radioactive and potentially infectious material must comply with the following guidelines:

The material should be stored and used in a special designated area.

Do not eat, drink or smoke in these areas.

Never pipette the materials with the mouth.

Avoid direct contact with these materials by wearing laboratory coats and disposable gloves.

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

Unused radioactive material and radioactive waste should be disposed according to the recommendations of the national regulatory authorities.

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.

Flow Chart of Assay Protocol

Tube Nr. :	Contents	AB	STD, CS, Samples	NSB	1.Ab	TR	2.Ab in PR
1,2	Total Counts	-	-	-	-	100	-
3,4	NSB	100	-	100	-	100	500
5,6	B ₀ (zero standard)	100	-	-	100	100	500
7-18	Standards 1-6	-	100 STD1-6	-	100	100	500
19,20	Control	-	100 CS	-	100	100	500
21,22	Sample 1	-	100	-	100	100	500
23,24	Sample 2	-	100	-	100	100	500
etc.							

All volumes are given in µl.

- 1) Labelling of the assay tubes should be done in the following order (duplicates):
 - 1, 2 total counts (**TC**),
 - 3, 4 non specific binding (**NSB**)
 - 5, 6 zero standard (**B₀**),
 - 7-18 **Standards** 1 to 6
 - 19, 20 Control **CS**
 - 21,22 etc. **samples**.
- 2) Add **100 µl** of reagent **AB** (Assay Buffer) to tubes 3, 4 and 5,6.
- 3) Add **100 µl** of **Standards 1-6** to tubes 7-18:
 - 7, 8 Standard 1 (200 pg/ml)
 - 9, 10 Standard 2 (400 pg /ml); etc. up to 18.
- 4) Add **100 µl** Control **CS** to tubes 19, 20.
- 5) Add **100 µl** of **sample** to tubes 21, 22, etc.
- 6) Add **100 µl NSB** to tubes 3 and 4.
- 7) Add **100 µl** of Reagent **1.Ab** (1st. Antibody), beginning with tube 5.
- 8) Mix tubes with a Vortex-Mixer and incubate **overnight** at 2-8°C (**at least 20 h, maximal 24 h**).
- 9) Add **100 µl** of Reagent **TR** (Tracer) to all tubes.
Seal tubes 1 and 2 (total counts) with a stopper and remove until step 16.
- 10) Mix the remaining tubes with a Vortex-Mixer and **incubate overnight (at least 16 h, maximal 20 h) at 2-8°C**.
- 11) Add from Reagent **2.Ab** to **PR** (1:56, mix); **the reagent mix must be cooled (2-8 °C)**. Add **500 µl** Reagent **PR** (incl. 2.Ab), beginning with tube 3.
- 12) Mix tubes with a Vortex-Mixer and incubate for precipitation for **1 h at 2-8°C**.
- 13) Add **1 ml ice-cold water**.
- 14) Centrifuge at 2-4°C at **3000 x g for 20 min**.
- 15) Aspirate the supernatant. In order not to destroy or aspirate the small precipitate a rest of approx. 2 mm supernatant should be left over the precipitate. (Tip: Add limit stop to the aspirate needle). Depending on laboratory equipments and common laboratory practice supernatant can also be decanted carefully.
- 16) Count the radioactivity of all tubes in Gamma-Counter for **1 to 3 min**.

Extended washing procedure for increased precision:

After the Incubation of 1 hour (step 12) centrifuge the tubes (s. step 14) and aspirate the supernatant (s. step 15). Add directly 1 ml ice-cold water. This should not be done too vigorously

in order to keep the precipitate intact. **Do not mix again!** Centrifuge the tubes once again at 3000g for 5 min, aspirate the supernatant and count the radioactivity of all tubes in the gamma-counter.

This extended procedure results in a somewhat higher precision bound up with higher work expenditure. The higher precision may be relevant only in special cases.

CALCULATION OF RESULTS

Establishing the Standard Curve

Standard	B ₀	1	2	3	4	5	6
ng/ml	0	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4
pg/ml	0	200	400	800	1600	3200	6400
pmol/l	0	59	119	237	475	949	1899

1. Calculate the average counts of each pair of tubes.
2. Subtract the average of NSB (NSB, Tubes 3 and 4) from the mean counts of the Standards, controls and samples. This corresponds to the corrected B values.
3. The corrected value of the zero standard (tubes 5 and 6) equals B₀.
4. Calculate the percent bound (%B/B₀): $\%B/B_0 = B/B_0 \times 100 \%$
5. Plot %B/B₀ versus the standard concentrations on a semi-logarithmic or logit-log paper respectively or per computer analysis.
6. For quality control calculate the percentage of %NSB/TC:
 NSB / TC (average counts of tubes 3 and 4 / average counts of tubes 1 and 2) $\times 100 \%$. It should be: %NSB/TC < 5%
7. Quality control, Calculate the %B₀/TC:
 B_0 (see step 3.) / TC (total counts) $\times 100 \%$.
 It should be: %B₀/TC > 20%

Evaluation of sample concentrations:

Read the Ghrelin concentration value (abscissa) corresponding to the %B/B₀-Wert of the sample as in the example given below:

Example:

Average counts of the tubes 3 and 4 (NSB): 482 cpm

Average counts of the tubes 5 and 6 (Zero standard, B₀): 8927 cpm

Average counts of the tubes 19 and 20 (Control CS): 4794 cpm

$$\%B/B_0 = \frac{\text{Sample} - \text{NSB}}{B_0 - \text{NSB}} \times 100\% = \frac{4794 - 482}{8927 - 482} \times 100\% = 51.1\%$$

For a 51.1% value on the y-axis (ordinate) corresponds in this example abscissa value of 1055 pg/ml.

Multiplication of this value determined graphically or by aid of a computer program with the dilution factor gives the ghrelin concentration of the sample.

If it is preferred to express the results as pmol/l, the values given as pg/ml have to be divided by 3.371 to obtain pmol/l.

Example: 1055 pg/ml : 3.371 = 313 pmol/l.

Concentration of the control:

The control CS should fit with the labelled concentration range. The measured Ghrelin concentration are only valid, if the measured value of the control is in the labelled concentration range. Otherwise process analysis is required and depending on the results the measured values are accepted or not.

EXPECTED VALUES

Concentration of Ghrelin in human sera varied from minimal 300 pg/ml (90 pmol/L) to maximal 4000 pg/ml (1200 pmol/L) so far. Whereas in most of the samples the concentration ranged between 600 pg/ml (180 pmol/L) and 1400 pg/ml (420 pmol/L).

52 sera or plasma from each healthy male and female blood donors, age 20 to 65 years, were measured regarding their Ghrelin concentration with Mediagnost Ghrelin RIA R90. However, there is no information available regarding the nutritional status of the blood donors. The results in pg/ml are presented in the table 3.

Therefore valid reference values should be generated by an well designed study and the values presented here can only be taken as initial estimation.

Table 3: Ghrelin serum concentration of male and female blood donors.

	Male	Female
n	52	52
Mean	801.3	1141.9
Standard Deviation	179.1	570.9
Min	511.0	454.4
Max	1,555.2	2,565.7
Median	770.5	1,032.3

LITERATUR/LITERATURE

1. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999;402(6762):656-60.
2. Date Y, Kojima M, Hosoda H, et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 2000;141(11):4255-61.
3. Inui A, Asakawa A, Bowers CY, et al. Ghrelin, appetite, and gastric motility: the emerging role of the stomach as an endocrine organ. *Faseb J* 2004;18(3):439-56.
4. Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000;407(6806):908-13.
5. Carlini VP, Varas MM, Cragnolini AB, Schiöth HB, Scimonelli TN, de Barioglio SR. Differential role of the hippocampus, amygdala, and dorsal raphe nucleus in regulating feeding, memory, and anxiety-like behavioral responses to ghrelin. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313(3):635-41.
6. Dzaja A, Dalal MA, Himmerich H, Uhr M, Pollmacher T, Schuld A. Sleep enhances nocturnal plasma ghrelin levels in healthy subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004.
7. Van Cauter E, Latta F, Nedeltcheva A, et al. Reciprocal interactions between the GH axis and sleep. *Growth Horm IGF Res* 2004;14 Suppl A:10-7.
8. Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, et al. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(12):4908-11.
9. Broglio F, Arvat E, Benso A, et al. Ghrelin: endocrine and non-endocrine actions. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2002;15 Suppl 5:1219-27.
10. Poykko SM, Kellokoski E, Horkko S, Kauma H, Kesaniemi YA, Ukkola O. Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes* 2003;52(10):2546-53.
11. Anderwald C, Brabant G, Bernroider E, et al. Insulin-dependent modulation of plasma ghrelin and leptin concentrations is less pronounced in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2003;52(7):1792-8.
12. Soriano-Guillen L, Barrios V, Lechuga-Sancho A, Chowen JA, Argente J. Response of circulating ghrelin levels to insulin therapy in children with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Res* 2004;55(5):830-5.
13. Li WG, Gavrilu D, Liu X, et al. Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB activation in human endothelial cells. *Circulation* 2004;109(18):2221-6.
14. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001;50(8):1714-9.
15. Otto B, Cuntz U, Fruehauf E, et al. Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* 2001;145(5):669-73.
16. Tolle V, Kadem M, Bluet-Pajot MT, et al. Balance in ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(1):109-16.
17. Soriano-Guillen L, Barrios V, Campos-Barros A, Argente J. Ghrelin levels in obesity and anorexia nervosa: effect of weight reduction or recuperation. *J Pediatr* 2004;144(1):36-42.
18. Zhang W, Zhao L, Lin TR, et al. Inhibition of adipogenesis by ghrelin. *Mol Biol Cell* 2004;15(5):2484-91.
19. Rigamonti AE, Pincelli AI, Corra B, et al. Plasma ghrelin concentrations in elderly subjects: comparison with anorexic and obese patients. *J Endocrinol* 2002;175(1):R1-5.
20. Tacke F, Brabant G, Kruck E, et al. Ghrelin in chronic liver disease. *J Hepatol* 2003;38(4):447-54.
21. Cummings DE, Clement K, Purnell JQ, et al. Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome. *Nat Med* 2002;8(7):643-4.
22. Haqq AM, Farooqi IS, O'Rahilly S, et al. Serum ghrelin levels are inversely correlated with body mass index, age, and insulin concentrations in normal children and are markedly increased in Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(1):174-8.
23. Hanusch-Enserer U, Brabant G, Roden M. Ghrelin concentrations in morbidly obese patients after adjustable gastric banding. *N Engl J Med*. 2003 May 22; 348(21):2159-60.
24. Schofl C, Horn R, Schill T, Schlosser HW, Müller MJ, Brabant G. Circulating Ghrelin levels in patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Oct; 87(10): 4607-10

KURZANLEITUNG – Mediagnost hGhrelin RIA R90

Rekonstitution von Reagenzien		
1.Antikörper(1.Ab)	in Testpuffer (AB)	10,5 ml
Tracer (TR)	in Testpuffer (AB)	10,5 ml
NSB	in Testpuffer (AB)	1 ml
Standards (1-6)	in Testpuffer (AB)	750 µl
Kontrollserum CS	in Testpuffer (AB)	750 µl
2.Antikörper (2.Ab)	in Testpuffer (AB) Mit PR mischen. Nur benötigte Menge PR+2.Ab mischen	1 ml (1 ml 2.Ab+ 55 ml PR) oder Verhältnis (1:56)

Serum- oder Plasmaproben können **unverdünnt** eingesetzt werden.

Doppelbestimmungen		Zugabe von Reagenzien [µl]			
Röhrchen Nr. :	Inhalt	AB	STD (1-6), CS, Proben	NSB	1.AB (1. Antikörper)
1,2	Total Counts	-	-	-	-
3,4	NSB	100	-	100	-
5,6	B ₀ (Null Standard)	100	-	-	100
7-18	Standards (1-6)	-	100 STD (1-6)	-	100
19,20	Kontrollserum (CS)	-	100 CS	-	100
21,22	Probe 1	-	100	-	100
23,24	Probe 2	-	100	-	100
etc.					

Alle Röhrchen mit Vortex-Mixer **mischen**.

Inkubation übernacht (mindestens 20 h, maximal 24 h) **bei 2-8°C**

Zugabe von **100 µl** Reagenz **TR** (Tracer) in alle Röhrchen

Röhrchen **1 und 2** (Gesamtaktivität) mit Stopfen verschließen und bis zum Zählen in Gamma-Counter.

Die restlichen Röhrchen mit Vortex-Mixer **mischen**

Inkubation übernacht (mindestens 16 h, maximal 20 h) **bei 2-8°C**

Zugabe von Reagenz **2.Ab** zu **PR** (1:56, mischen); die Reagenzmischung muss gekühlt sein (2-8 °C).
Zugabe von je **500 µl** Reagenz **PR** (inkl. 2.Ab), ab Röhrchen 3.

Alle Röhrchen mit Vortex-mixer **mischen**.

Inkubation 1 h bei **2-8°C**

Zugabe von je **1 ml** eiskaltem **Wasser**, ab Röhrchen 3.

Gekühlt bei **3000 x g** für **20 min.** zentrifugieren.

Überstand **absaugen**, um das Präzipitat nicht zu zerstören oder mit abzusaugen, sollte man darüber einen Flüssigkeitsrest von ca. 2 mm stehen lassen.

Alle Röhrchen im Gamma-Counter zählen.

SUMMARY – Mediagnost Ghrelin R90

Reconstitution of the Reagents		
1st Antibody (1.Ab)	in Assay Buffer (AB)	10.5 ml
Tracer (TR)	in Assay Buffer (AB)	10.5 ml
NSB	in Assay Buffer (AB)	1 ml
Standards (1-6)	in Assay Buffer (AB)	750 µl
Control serum CS	In Assay Buffer (AB)	750 µl
2nd Antibody (2.Ab)	in Assay Buffer (AB) Mix solution with PR . Mix only the required quantity of PR+2ndAb	1 ml (1 ml 2.Ab+ 55 ml PR) or Ratio (1:56)

Serum or plasma **samples** can be used **undiluted**.

Double Determinations		Addition of Reagents [µl]			
Tube Nr. :	Contents	AB	STD (1-6), CS, Samples	NSB	1.AB (1 st Antibody)
1,2	Total Counts	-	-	-	-
3,4	NSB	100	-	100	-
5,6	B ₀ (zero standard)	100	-	-	100
7-18	Standards (1-6)	-	100 STD (1-6)	-	100
19,20	Control serum (CS)	-	100 CS	-	100
21,22	Sample 1	-	100	-	100
23,24	Sample 2	-	100	-	100
etc.					

Mix all tubes with a Vortex-mixer.

Incubation overnight (at least 20 h, maximal 24 h) **at 2-8°C**

Add **100 µl** Reagent **TR** (Tracer) to all tubes.

Seal the tubes 1 and 2 (total counts) with a stopper and **remove until the step 16**.

Mix the remaining tubes with a Vortex-Mixer.

Incubation overnight (at least 16 h, maximal 20 h) **at 2-8°C**

Add from the Reagent **2.Ab to PR (1:56, mix)**, the reagent mix must be cooled (**2-8°C**)
Add **500 µl** reagent **PR** (inc. 2.Ab.), beginning with the tube 3.

Mix tubes with a Vortex mixer.

Incubation 1 h at **2-8°C**

Add **1 ml ice-cold water**, beginning with the tube 3.

Centrifugation at **2-4°C**, **□3000 x g**, **20 min**

Aspirate the supernatant
(a rest of approx. 2 mm of supernatant should be left over the intact precipitate).

Count the radioactivity of all the tubes in a Gamma-Counter.



CAL 1-6	STD 1-6	Rec in 750 µl AB	
Control	CS	Rec in 750 µl AB	
NSB	NSB	Rec in 1 ml AB	
2.Ab	2.Ab	Rec in 1 ml AB	DILU PR 1:56 °C 2- 8
1.Ab	1. Ab	Rec in 10.5 ml AB	
Tracer	TR	Rec in 10.5 ml AB	
SPE			100 µl

°C 20-25 °C

Tubes			BUF AB	CAL	NSB	1.Ab 1.Ab
1/2	Tracer TR = TC	-	-	-	-	-
3/4	NSB	-	100 µl	-	100 µl	-
5/6	B₀	-	100 µl	-	-	100 µl
7/8	CAL STD 1 (0,2 ng/ml)	-	-	100 µl	-	100 µl
9/10	CAL STD 2 (0,4 ng/ml)	-	-	100 µl	-	100 µl
11/12	CAL STD 3 (0,8 ng/ml)	-	-	100 µl	-	100 µl
13/14	CAL STD 4 (1,6 ng/ml)	-	-	100 µl	-	100 µl
15/16	CAL STD 5 (3,2 ng/ml)	-	-	100 µl	-	100 µl
17/18	CAL STD 6 (6,4 ng/ml)	-	-	100 µl	-	100 µl
19/20	CONTROL KS	100 µl	-	-	-	100 µl
21/22	SPE	100 µl	-	-	-	100 µl
↔						

🕒 20-24h °C 2- 8

100µl **Tracer** TR ↔

🕒 16-20h °C 2- 8

500µl **2.Ab** **DILU** PR 1:56 °C 2- 8 **ALL** **NOT** **TC** ↔

🕒 1 h °C 2- 8

1 ml A. dest °C 2- 8 **ALL** **NOT** **TC**

🌀 ≥ 3000× g 20 min °C 2-8

ASP **ALL** **NOT** **TC****MEASURE**