

Chemerin

ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von
humanem Chemerin

Deutsch

Enzymeimmunoassay for quantitative Determination of
human Chemerin

English

Nur zu Forschungszwecken!
Nicht zur diagnostischen Anwendung geeignet.

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



REF **E102**



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 /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ Symbolen/ Symboler/ Symboler/ Symbole/ Szimbólumok/ Symboly/ Symboly/ [icon] Sùmbolid/ [icon] 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/ Aegumiskuuupäev/ Ημερομηνία λήξης/ Data de expirare/ Rok uporabe/ Viimeinen käyttöpäivä
	Consider instructions for use/ Bitte Gebrauchsanweisung beachten/ Consultez la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las instrucciones de uso/ Respeitar as instruções de utilização,/ A.u.b de gebruiksaanwijzing volgen/ Se brugsanvisningen/ Läs anvisningarna före användning/ Proszę przeczytać instrukcję obsługi/ Vegye figyelembe a használati utasításban foglaltakat/ Postupujte podľa pokynov na použitie/ Dodržujte návod k použití/ Моля, спазвайте инструкцията за употреба/ Palun järgige kasutusjuhendit./ Λάβετε υπόψη σας τις οδηγίες χρήσης/ Vă rugăm să respectați instrucțiunile de utilizare/ Upošteвайте navodila za uporabo!/ Lue käyttöohje huolellisesti!
	Lot-Batch Number/ Charge-Chargennummer/ Lot-Code du lot/ Lotto-Numero di lotto/ Lote-Código de lote/ Lote-Código do Lote/Lot-Partijnummer/ Lot-Batchkode/ Partisatskod/ Numer serii/ Tétel-sarzs szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/ Partii – partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-număr lot/ Številka serije/ Erä
	Manufactured by/ Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/Fabricado por/ Fabricado por/ Vervaardigd doo/ Fabrikation af/ Tillverkad av/ Wyprodukowane przez/ Gyártotta / Vyrobené/ Vyrobeno v/ Производител/ Tootja/ Κατασκευάζεται από/ Produs de/ Proizvajalec/ Valmistaja
	Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/ Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referência/ Referentnummer/ Referencenummer/ Beställningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/ Katalógové číslo/ Objednací číslo/ Каталоген 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/ Armazenaar entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevares mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí/ Температурно ограничение/ Säilittä temperatuuridel/ Φύλαξη σε θερμοκρασία/ Depozitare între/ Skladištenje med/ Säilytys x-y Celsiusasteen lämpötilassa
	Contains sufficient for x tests/ Inhalt ausreichend für x Tests/ Contient suffisant pour x tests/ Contenuto sufficiente per x test/ Contenido suficiente para x pruebas/ Conteúdo suficiente para x testes/ Bevat voldoende voor x bepalingen/ Indeholder tilstrækkeligt til x prøver/ Innehållet räcker till x analyser/ Zawartość na x testów/ Tartalma x teszt elvégzésére elegendő/ Obsahuje materiál pre x testov/ Obsah dostačuje pro x testů/ Съдържание достатъчно за x тестове/ Sisust jätkub x katse jaoks/ Το περιεχόμενο επαρκεί για x δοκιμές/ Conținut suficient pentru x teste/ Vsebina zadostuje za x preizkusov/ Sisältö riittää x testille
	Keep away from sunlight/ Nicht dem Sonnenlicht aussetzen/ Conserver à l'abri de la lumière/ Conservare al riparo della luce solare/ No exponer a la luz solar/ Proteger da luz solar/ Niet aan zonlicht blootstellen/ Må ikke udsættes for sollys/ Utsätt inte för solljus/ Nie wystawiać na słońce/ Napfénytől távol tartandó/ Nevystavovat' slnečnému svetlu/ Nevystavovat' slunečnímu světlu/ Да се предпазва от слънчева светлина/ Kaitsta otsese päikesekiirguse eest/ Κρατήστε το μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία/ Τίnete! departe de lumina soarelui/ Ne izpostavljajte sončni svetlobi/ suojaa auringonvalolta
	Incubation time/ Inkubationszeit/ Temps d'incubation/ Tempo d'incubazione/ Tiempo de incubación/ Tempo de incubação/ incubatietijd/Inkubationstid/ inkubationstid/ Czas inkubacji/ Inkubációs idő/ Inkubačná lehota/ Inkubační doba/ Инкубационен период/ Inkubatsiooniaeg/ Χρόνος επώασης/ Timp de incubare/ Inkubacijska doba/ inkubaatioaika
	incubate at/ Inkubation bei/ Incuber à/ Incubare a/ incubar a/ Incubar a/ incubatietemperatuur/ Inkubation ved/ inkubation vid/ Inkubacja przy/ Inkubáció hőmérséklete/ Inkubácia pri/ Inkubace při/Инкубира се при/ Inkubatsioon temperatuuril/ Επώαση στους/ Incubare la/ Inkubacija pri/ inkubaatiolämpötila
	Shaking/ Schütteln/ Mélanger/ Agitare/ Agitar/ Agitação/ Schudden/ Ryster/ Skaka/ Wstrząsanie/ Rázás/ Pretrepat/ Protřepat/ Разклащане/ Raputada/ Ανακινήστε/ Vibrare/ Stresite/ Sekoita
	Mikrotiterplate/ Mikrotiterplatte/ plaque de microtitrage/ Piastra di microtitolazione/ Placa de microtitulación/ Placa de Microtitulação/ microtiterplaat/ Mikrotiterplade/ mikrotiterplatta/ microtiterplaat/ Płytko microtiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiterplaat/ Τρυβλίο μικροτιτλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitrská plošča/ Mikrotitrauslevy
	Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituir en/ Reconstituieren in/ Rekonstituér i/ rekonstituera/ Rekonstytuować w/ Helyreállítás/ Znovu připravit za/ Znovu připravit za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti/ Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ rekonstituoi
	Sample/ Probe /Echantillon/ campione/ Muestra/ Amostra/ monster/ Prøve/ prov/ Próbka/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probă/ Vzorec/ Näyte
	AK Antibody and Enzyme Conjugate/ Antikörper und Enzym Konjugat/ anticorps conjuguée et conjugué enzymatique/ Coniugato di anticorpo ed enzima/ Conjugado de anticuerpos y enzimas/ Conjugado Anticorpo-Enzima/ antilichaamen enzymconjugaat/ Antistoffer og enzym-konjugat/ antikropps- och enzymkonjugat (antikropp och enzym, konjugat)/ EK Koniugat antyciał i enzymów/ Antitest és enzim páros/ Protílátkový a enzymatický konjugát/ Protílátkový a enzymatický konjugát/ Антицiяло и ензим конюгат/ Antikehad ja ensüümi konjugaat/ Σύμπλοκο αντισώματος-enzύμου/ Compuși din anticorpi și enzime/ Antitelesa in konjugat encima/ Vasta-aine ja entsymi konjugaatti
	VP Dilute in Buffer X/ Verdünnen in Puffer X/ Diluer dans le tampon X/ Diluire nel tampone X/ Diluir en tampón X/ Diluir no Tampão X/ Verdunnen in buffer X/ Fortyndes i buffer X/ Späd i buffert X/ Rozcieńczanie w buforze X/ Hígítás X pufferben/ Riedit' v pufri X/ Ředit v pufriu X/ Разреждане в буфер X/ Lahjendada puhvris X/ Αραιώστε σε ρυθμιστικό διάλυμα X/ Diluati în tamponul X/ Razredčiti v pufriu X/ Laimennetaan x puskuriin
	A-E Standard X/ Standard X/ Etalon X/ Standard X/ Estándar X/ Standard X/ Standaard X/ Standard X/ Standard X/ Standard X/ Standard X/ Štandard X/ Стандарт X/ Standard X/ Πρότυπο X/ Standard X/ Standardni X/ Kalibraattori X
	KS1/ Control Serum/ Kontrollserum/ Contrôle sérique/ Siero di controllo/ Suero de control/ Soro de Controllo/ KS2 Controlserum/ Kontrolserum/ Kontrollserum/ Serum kontrolne/ Ellenőrző szérum/ Kontrolné sérum/ Kontrolní sérum/ Контролен серум/ Kontrollseerum/ Ορός ελέγχου/ Ser de control/ Kontrolni serum/ Kontrolli seerumi

WASHBUF 20x	WP	Washing Buffer Concentrate/ Waschpufferkonzentrat/ Tampon de lavage conc./ Tampone di lavaggio concentrato/ Tampion de lavado concentrado/ Tampão de Lavagem Concentrado/ Wasbuffer, geconcentreerd/ Vaskebufferkonzentrat/ Vaskebufferkonzentrat/ Tvättbuffertkonzentrat/ Bufor płukania koncentrat/ Mosópuffer koncentrátum/ Koncentrát vymývacieho pufru/ Концентрат на промивен буфер/ Pesupuhvri kontsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralnega pufru/ Pesuliuositiiviste
WASHBUF		Washing Buffer/ Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampion de lavado/ Tampão de Lavagem/ Wasbuffer/ Vaskebuffer/ Tvättbuffert/ Bufor płukania/ Mosópuffer/ Vymývací pufer/ Vymývací pufr/ Промивен буфер/ Pesupuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare/ Izpiralni pufer/ Pesuliuos
SUBST TMB	S	Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ Substraat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Szubsztrátum/ Substrát/ Substrát/ Cyбcтpaт Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraattiliuos
H₂SO₄	SL	Stop Solution/ Stopp Lösung/ Stop Solution/ Soluzione di stop/ Stop Solución/ Solução Stop/ Stopoplossing/ Stopopløsning/ Stopplösning/ Stop roztwór/ Megállító oldat/ Roztok na ukončenie/ Roztok pro ukončeni/ Стопираш разтвор/ Stopp-lahus/ Διάλυμα διακοπής/ Soluție de oprire/ Stop raztopina/ Pysäytysliuos
TAPE		Cover Plate with sealing tape/ Platte abkleben/ Recouvrir la microplaque avec bande adhésive/ Coprire la piastra con nastro adesivo/ Cubrir la placa con una cinta adhesiva/ Cobrir a Placa com fita adesiva/ plaatje met tape afdekken/ Afdækningsplade med tape/ Maskera platta/ Odkleić płytkę/ Tányér leragasztása/ Oblepiť podložku lepiacou páskou/ Olepit podložku lepicí páskou/ Плака с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerklleplindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperiți placa cu o bandă adezivă/ Prelepiti ploščo/ Peitã mikrotitrauslevy oheisella teipillä
MEASURE		Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590nm)/ Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)/ Mesure l'absorbance en l'espace de 30 min à 450 nm avec ≥590nm longueur d'onde pour référence/ Misurazione entro 30 min. a 450 nm (filtro di riferimento ≥ 590 nm)/ Medición de la placa dentro de los siguientes 30 min a 450 nm (filtro de referencia ≥ 590nm)/ Medir a placa dentro de 30 min a 450 nm (Filtro de referência ≥590nm)/ Binnen 30 minuten bij 450 nm meten (referentiefilter ≥ 590 nm)/ Mål plade i løbet af 30 min ved 450 nm (referencefilter ≥590nm)/ Mät inom 30 min vid 450 nm (referensfilter ≥ 590 nm)/ Pomiar w ciągu 30 min przy 450 nm (filtr odniesienia ≥ 590 nm)/ Ki mérés 30 percen belül 450 nm-nél (referenciaszűrő ≥ 590 nm)/ Merať 30 minút pri 450 nm/ Měřit 30 minut při 450 nm/ Отчитане в рамките на 30 min при 450 nm (референтен филтър ≥ 590 nm)/ Mõõtmise 30 min jooksul 450 nm korral (võrdlusfilter ≥ 590 nm)/ Μέτρηση εντός 30 min στα 450 nm (φίλτρο αναφοράς ≥ 590 nm)/ Măsurare în decurs de 30 min la 450 nm (filtru de referință ≥ 590 nm)/ Izmerite ploščico v 30 min pri 450 nm (referenčni filter ≥590nm)/ Mittaa 30 minuutin aikana 450 nm:ssä (referenssi suodatin ≥ 590 nm)
Literatur		Literature/ Literatur/ Bibliographie/ Letterario/ Bibliografía/ Literatura documentação/ Literatuur/ Litteratur/ Litteratur/ Literatura/ Irodalom/ Literatúra/ Literatura/ Литература/ Kirjandus/ Βιβλιογραφία/ Bibliografie/ Literatura/ Lähdeluettelo
International Test description		International test description/ internationale Testanleitung/ description internationale de test/ Istruzioni per il test internazionali/ Descripción de ensayo internacional/ Descrição internacional do teste/ Internationale testbeschrijving/ Internationell testbeskrivning/ Opis testu międzynarodowego/ Nemzetközi teszt-útmutató/ Medzinárodný návod k testu/ Mezinárodní návod k testu/ Rahvusvaheline katse kirjeldus/ Διεθνείς οδηγίες για εργαστηριακές δοκιμές/ Instrucțiuni internaționale pentru testare/ Mednarodna navodila za preizkus/ Kansainvälinen käyttöohje
End		In all required wells/ In allen benötigten Vertiefungen/ Dans tous les godets requis/ In tutti i pozzetti richiesti/ En todos los pozos requeridos/ Em todos os tubos necessários/ In alle nodige putjes/ I alle nødvendige brønde/ I alla nödvändiga brunnar/ We wszystkich potrzebnych wgłębieniach/ Minden szükséges forrásban/ Vo všetkých potrebných miestach/ Ve všech potřebných místech/ във всички необходими ямки/ Kõigis vajalikes süvendites/ σε όλες τις απαραίτητες κοιλότητες/ în toate cavitățile necesare/ V vseh zahtevanih vdolbinah/ Kaikkiin tarvittaviin mikrotitrauslevyn syvennyksiin

Nur zu Forschungszwecken.

Nicht für humane oder tierische, therapeutische oder diagnostische Zwecke.

Nur zum In-vitro-Gebrauch.

Nur zum Gebrauch durch Fachpersonal.

Vor Gebrauch ist die gesamte Packungsbeilage zu lesen!

For Research Use Only!

Not for use in diagnostic procedures!

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

For in vitro use only!

For professional use only!

Read entire protocol before use!

Symbols/ Symbole /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ Symbolen/ Symboler/ Symboler/ Symbole/ Szimbólumok/ Symboly/ Symboly/ Символи/ Sümbolid/ Σύμβολα/ Simboluri/ Simboli/ Symbolit	2
--	---

Packungsbeilage

Deutsch

ZUGELASSENER VERWENDUNGSZWECK	5
EINFÜHRUNG	5
MATERIALIEN	7
Inhalt der Testpackung	7
Zusätzlich benötigte Materialien	7
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	8
METHODE	9
GEEIGNETE PROBEN	9
Lagerung der Proben	9
Proben Vorbereitung	9
TECHNISCHE HINWEISE	10
TESTDURCHFÜHRUNG	12
AUSWERTUNG	13
Berechnung der Standardkurve	13
LEISTUNGSMERKMALE	15
Standard	15
Sensitivität	15
Spezifität	15
Wiederfindung	15
Matrix Effekte	14
Interferenz	15
Reproduzierbarkeit und Präzision	16
Die Verdünnungslinearität	17
ERWARTUNGSWERTE	17

Package Insert

English

INTENDED USE	18
INTRODUCTION	18
MATERIALS PROVIDED	19
MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	19
WARNINGS AND PRECAUTIONS	20
METHOD	21
SPECIMEN	21
Storage of the samples	21
Sample Preparation	21
TECHNICAL RECOMMENDATIONS	22
ASSAY PROCEDURE	24
ESTABLISHING THE STANDARD CURVE	25
PERFORMANCE CHARACTERISTICS	26
Standards	26
Sensitivity	26
Specificity	26
Recovery	26
Matrix effects	23
Interference	26
Reproducibility and Precision	27
Linearity	27
EXPECTATION VALUES	28

LITERATUR / LITERATURE	29
KURZANLEITUNG MEDIAGNOST CHEMERIN ELISA E102	30
SUMMARY – MEDIAGNOST CHEMERIN ELISA E102	31
REF 102 International Test Description	28

PACKUNGSBEILAGE DEUTSCH

MEDIAGNOST CHEMERIN ELISA E102

- ist geeignet für Chemerin Bestimmungen in **Serum-** und **Plasmaproben**
- ist durch die hohe **Sensitivität** (5 pg/ml) ebenfalls sehr geeignet für Messungen in Zellkultur-überständen und in Nicht-Serum-/Plasmaproben (z.B. in Muttermilch, Urin, Liquor, Amnionflüssigkeit)
- ist **schnell**: Inkubationszeit insgesamt nur 2,5 Stunden
- ist kalibriert mit rekombinantem Chemerin
Einzel-Standards mit **25, 100, 250, 400** bzw. **600 pg/ml** Chemerin sind im Kit enthalten
- Kontrollserum zur RiliBÄK-konformen **Qualitätssicherung**
- Testplatten enthalten **einzelne abbrechbare Vertiefungen**, die Tests können genau an den individuellen Bedarf angepasst werden

ZUGELASSENER VERWENDUNGSZWECK

Messung von humanem Chemerin in menschlichem Serum und Plasma.

EINFÜHRUNG

Chemerin ist auch unter dem Namen Tazarotene-induziertes Gen 2 (TIG2) oder Retinoic acid receptor responder 2 (RARRES2) bekannt. Es wird als Präcursor-Protein, bestehend aus 163 Aminosäuren und einem N-terminalen Signalpeptid mit 20 Aminosäuren, synthetisiert. Das Signalpeptid wird bei der Sekretion des Proteins abgespalten. Im Blut liegt die inaktive Proform von Chemerin vor. Sie enthält sechs Cysteinreste und so wird die Existenz von drei intramolekularen Disulfidbrücken (1) angenommen.

Die Expression von Prochemerin konnte in Leber-, Lungen-, Hypophysen-, Lymphknoten-, in Magen- und im Fettgewebe nachgewiesen werden (1, 2). Prochemerin ist im Blut, in Aszites von Eierstock- und Leberkrebs-Patienten und in Synovialflüssigkeit von Arthritis-Patienten (1) nachgewiesen worden. Chemerinrezeptoren sind in der Milz, in den Lymphknoten, im Dünndarm, im Lungengewebe sowie in Makrophagen und in den unreifen dendritischen Zellen entdeckt worden (1, 3). Serin- oder Cysteinproteasen wandeln Prochemerin in die biologisch aktive Form, Chemerin, um. In Abhängigkeit davon, durch welche Protease die Aktivierung erfolgt, kann das aktive Protein entweder pro- oder anti-inflammatorisch wirken.

Die proteolytische Spaltung von Chemerin ist durch folgende Serinproteasen beschrieben worden: Trypsin, Plasmin, Elastase, Cathepsin G, Cysteinproteasecathepsin S und Calpains (4-6). Das aktive Protein ist in der Regulation von Prozessen des unspezifischen und spezifischen Immunsystems involviert und tritt zum Beispiel als starkes Chemoattractant für unreife Dendriten und Makrophagen auf. Durch die Bindung an spezifische Chemerinrezeptoren werden intrazelluläre Signalmoleküle in ihrer Aktivität beeinflusst. Die C-terminale Domäne von Chemerin ermöglicht die Bindung an den ChemR23/CMKLR1 Rezeptor und hat einen pro-inflammatorischen Effekt, indem es zu einem Ca^{2+} Einstrom und die Aktivierung der Kinase ERK1/2 bewirkt. Zusätzlich kann Chemerin über die N-terminale Domäne an den CCRL2 Rezeptor binden und auf diese Weise den C-Terminus benachbarten Zellen mit ChemR23 Rezeptor präsentieren. Erfolgt die Spaltung des Prochemerin durch Cysteinproteasen, wirken die resultierenden Peptide inhibierend auf den ChemR23/CMKLR1 Rezeptor und damit anti-inflammatorisch.

Vor kurzem ist die Bedeutung von Chemerin für die Lipogenese und für den Metabolismus von Adipozyten entdeckt worden (2,7). Goralski et al. zeigten in Mäusen, dass Chemerin sowie die Rezeptor(ChemR23)-Expression in Adipozyten des viszeralen und subkutanen Fettgewebes nachzuweisen ist. Die Expression und Sekretion von Chemerin steigt während der Differenzierung der Adipozyten an. Das 16kDa große, aktive Chemerin konnte auch in konditioniertem Medium von Adipozyten nachgewiesen werden.

Intrazelluläre Signalwege in Adipozyten (z.B. die Stimulierung von MAPK p42/44 (ERK1/2) Phosphorylierung) können durch Chemerin beeinflusst werden. Weiter zeigen die Autoren, dass Chemerin auch bei ausdifferenzierten Adipozyten die Genexpression beeinflussen kann.

Beruhend auf diesen Resultaten, wird ein Einfluss von Chemerin auf das metabolische Syndrom und die Entstehung einer Insulinresistenz vermutet. Diese Studie zeigt, dass Chemerin vermehrt durch das Fettgewebe adipöser Patienten exprimiert wird und in der Lage ist, die Insulinsensitivität von Muskelzellen sowie die Insulin-induzierte Lipolyse und Lipogenese in Adipozyten (8, 9) zu vermindern.

Es wurde weiter gezeigt, dass Chemerin mit Markern von Entzündungshemmern und mit Komponenten des metabolischen Syndroms (10,11) sowie mit der Nierenfunktion (12) assoziiert ist.

Für die weitere Untersuchung der Funktionen von Chemerin und seiner Bedeutung als Biomarker für metabolische Krankheiten, wird eine zuverlässige Messmethode vorausgesetzt. Mediagnost bietet ein sensitives und reproduzierbares Testsystem für die quantitative Messung von Chemerin an. Basierend auf hochspezifischen Antikörpern bestimmt das Testsystem die Konzentration von Gesamt-Chemerin in Serum, Plasma, Urin, Speichel und anderen Körperflüssigkeiten sowie in Zellkulturüberständen.

MATERIALIEN

Inhalt der Testpackung

1)	MTP	Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, mit 96 Vertiefungen , die in 12 abnehmbare Streifen á 8 Vertiefungen (einzel n abbrechbar) aufgeteilt ist. Die Platte ist mit einem Antikörper gegen humanes Chemerin beschichtet.
2)	CAL	Standards A-E , lyophilisiert, enthalten rekombinantes Chemerin. Die Verdünnungen der Standardkurve decken einen Bereich von 0,025 bis 0,6 ng/ml (25, 100, 250, 400 und 600 pg/ml) Chemerin ab und werden in je 1 ml Verdünnungspuffer VP rekonstituiert.
3)	DILU	Verdünnungspuffer VP, 125 ml , gebrauchsfertig nach Schütteln, bitte zur Rekonstitution der Standards und Kontrollseren und zur Verdünnung der Proben und Kontrollseren verwenden.
4)	Control	Kontrollseren KS1 und KS2 lyophilisiert, enthalten humanes Serum und müssen in je 250 µl Verdünnungspuffer VP rekonstituiert werden. Die Chemerin Soll-Konzentration und Schwankungsbereiche sind auf den Etiketten angegeben. Sie sollten im Assay in den gleichen Verdünnungen (in Verdünnungspuffer VP) wie die jeweiligen Proben bestimmt werden.
5)	AbCONJ	Antikörper-POD-Konjugat AK, 12 ml , gebrauchsfertig, enthält biotinylierten anti-human Chemerin Antikörper und POD (Meerettich-Peroxidase)-markiertem Streptavidin. Für den Assay wird jeweils 100 µl pro Vertiefung eingesetzt.
6)	WASHBUF 20x	Waschpuffer WP, 50 ml, 20fach 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.
7)	SUBST	Substrat S, 12 ml , gebrauchsfertig, Meerettich-Peroxidase-(POD)-Substrat, stabilisiertes H ₂ O ₂ -Tetramethylbenzidin
8)	H ₂ SO ₄	Stopplösung SL, 12 ml , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure
9)		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
 Mikrotiterplattenschüttler (350 rpm)
 Mikrotiterplattenwasher (empfohlen)
 Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und ≥590 nm
 Polyethylen PE/ Polypropylen PP Röhrchen zum Verdünnen der Proben

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Mediagnost E102 Kit ist nur zum In-vitro-Gebrauch und nicht zur inneren Anwendung bei Mensch und Tier geeignet. Dieses Produkt darf nur exakt, wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben, eingesetzt werden. Mediagnost kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht, soweit keine gesetzliche Regelung anderes besagt.

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

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

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

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

Menschliches Serum

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

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

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

AK, EK, VP

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

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

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

METHODE

Der Enzymimmunoassay für hChemerin E102 ist ein sogenannter Sandwich-Assay unter Verwendung zweier spezifischer und hochaffiner Antikörper. Der an die Mikrotiterplatte gekoppelte erste Antikörper bindet das Chemerin aus der Probe. Im nachfolgenden Schritt bindet am derart gebundenen Chemerin der biotinylierte und Streptavidin-Peroxidase konjugierte 2. anti-Chemerin-Antikörper. In der abschließenden Substratreaktion wird hochspezifisch der Farbumschlag katalysiert, quantitativ abhängig vom Chemeringehalt der Proben.

GEEIGNETE PROBEN

Uneingeschränkt geeignet sind Serumproben. Des Weiteren zeigten NaCitrat (10,6 mmol/l), EDTA (5,4 mmol/l) sowie Heparin (30 IE/ml) keinen Einfluss auf die Chemerinmessung.

Lagerung der Proben

Lagerung bei RT	max. 3 Tage
Lagerung bei 4°C	max. 6 Tage
Lagerung bei -20°C	max. 2 Jahre

in fest verschließbaren Plastikgefäßen.

Die Messwerte einer Serum- und einer Plasmaprobe zeigten bis zu 10 Auftau-/ Einfrierzyklen keine signifikanten Abweichungen, es wurden Werte im Bereich von 92 bis 104% des Sollwertes gefunden.

Proben Vorbereitung

Die Proben müssen in **Verdünnungspuffer VP** verdünnt werden. Für die meisten Untersuchungen (Serum- oder Plasmaproben bei denen keine Extremwerte zu erwarten sind) sollten **Verdünnungen von 1:505 in Verdünnungspuffer VP geeignet** sein. Gegebenenfalls kann, je nach erwarteten Chemerinwerten, geringer oder stärker in Verdünnungspuffer VP verdünnt werden.

Die gute Linearität des Testsystems (vgl. Tabelle 6) ermöglicht Probenverdünnungen von **1:250–1:1000**.

Die Chemerinkonzentration in anderen humanen Körperflüssigkeiten und in Kulturüberständen kann stark von den Serumwerten abweichen (s. Tabelle 1).

Verdünnungsprotokoll:

1000 µl Verdünnungspuffer VP in PE-/PP-Gefäße vorlegen (bei größeren Serien empfiehlt sich hierfür die Verwendung eines Multi-Steppers), dazu 10 µl Serum oder Plasma pipettieren (Verdünnung 1:101). Im zweiten Schritt wird von der vorverdünnten Probe 50 µl mit 200 µl VP verdünnt (Verdünnung 1:505). Nach dem Mischen werden von dieser Lösung 100 µl pro Bestimmung im Assay eingesetzt.

TECHNISCHE HINWEISE

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

Bei sachgemäßer Handhabung ist die **Haltbarkeit der Reagenzien nach Öffnung** nicht beeinträchtigt. **Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.** Wenn mehrere unabhängige Messungen über eine längere Periode mit einem Kit geplant sind, wird vorherige Aliquotierung der Komponenten in passende Volumina empfohlen.

Alle Komponenten des Kits müssen **vor Gebrauch auf Raumtemperatur** gebracht werden, die evtl. in manchen Puffern vorhandenen Präzipitate müssen vor Gebrauch durch Mischen und Erwärmen wieder gelöst werden.

Inkubation bei Raumtemperatur bedeutet: Inkubation bei **20 - 25°C**.

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

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

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

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

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

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

Standards und Kontrollen

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

Für die **Rekonstitution** der lyophilisierten **Kontrollen KS1 und KS2** muss der **Verdünnungspuffer VP** verwendet werden. Sie sollten im Assay in der gleichen Verdünnung **in Verdünnungspuffer VP** wie die jeweiligen Proben bestimmt werden.

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

Die rekonstituierten Standards und Kontrollen können bei -20°C für 2 Monate gelagert werden.

Waschpuffer

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

Testplatte

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

Substrat

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

TESTDURCHFÜHRUNG

Bei der **Testdurchführung** sollten Standards **A-E**, Kontrollseren **KS1 & KS2** und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden (z.B. in 15 Minuten). Das Antikörper-POD-Konjugat **AK**, die Substratlösung **S** sowie die Stopplösung **SL** sollten jeweils in der selben Reihenfolge und in dem selben Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

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

1) In die Vertiefungen A1/A2 werden **100 µl Verdünnungspuffer VP** pipettiert (Leerwert).

2) In die Positionen B1/2 werden je **100 µl Standard A (25 pg/ml)** gegeben, sowie

in die Positionen C1/2 werden je **100 µl Standard B (100 pg/ml)**,

in die Positionen D1/2 werden je **100 µl Standard C (250 pg/ml)**,

in die Positionen E1/2 werden je **100 µl Standard D (400 pg/ml)**,

in die Positionen F1/2 werden je **100 µl Standard E (600 pg/ml)**.

Zur Kontrolle der korrekten Durchführung des Tests sollten je **100 µl** der in **Verdünnungspuffer VP 1:505** (oder im jeweiligen Verdünnungsverhältnis der Proben) verdünnten **Kontrollseren KS1 und KS2** in die Positionen G1/2 und H1/2 gegeben werden.

In die restlichen Vertiefungen können je **100 µl der verdünnten Proben** (i.Allg. 1:505 in Verdünnungspuffer VP verdünnt) pipettiert werden.

3) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **1 Stunde** bei **Raumtemperatur** inkubiert (unter Schütteln **350 rpm**).

4) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Lösungen abgesaugt und die Platte mit **300 µl Waschpuffer WP** / Vertiefung **fünfmal** gewaschen.

5) Im Anschluss an den letzten Waschschrift werden **100 µl des Antikörper-POD-Konjugates AK** in jede Vertiefung pipettiert.

6) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und der Ansatz **1 Stunde** bei **Raumtemperatur** inkubiert (unter Schütteln **350 rpm**).

7) Nach Abschluss dieser Inkubation wird die Platte wie im Schritt 4) beschrieben gewaschen.

8) In jede Vertiefung werden **100 µl der Substratlösung S** pipettiert.

9) Die Platte wird **30 Minuten im Dunkeln** bei **Raumtemperatur** inkubiert.

10) Nach Ablauf der Inkubationszeit wird in jede Vertiefung **100 µl Stopplösung SL** pipettiert.

11) Die Ausmessung der Farbreaktion erfolgt **innerhalb von 30 Minuten** bei 450 nm ≥ 590 .

AUSWERTUNG

Berechnung der Standardkurve

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

Die bereitgestellten Standards enthalten folgende Chemerinkonzentrationen:

Standard	A	B	C	D	E
ng/ml	0,025	0,10	0,25	0,4	0,6
pg/ml	25	100	250	400	600

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

Die beispielhafte Standardkurve

Grp. 1: $y = 0.0039285 + 0.0042173 \cdot x + 2.6356e-006 \cdot x^2 - 3.5684e-009 \cdot x^3$ $d = 0.007921$

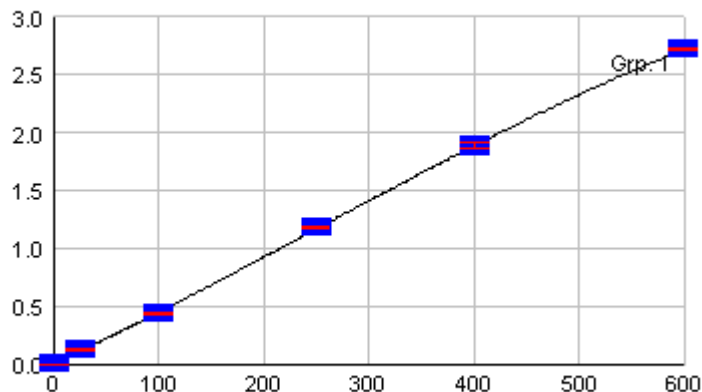


Abb. 1: Typische Standardkurve mit einem Polynom 3. Grades zur Berechnung der Standardkurve

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

Beispielhafte Berechnung der Chemerinkonzentration einer 1:505 verdünnten Probe:

Gemessene Extinktion der Probe: 0,56
 Gemessene Extinktion des Nullwertes: 0,02

Aus der Differenz der Probenextinktion und der Extinktion des Leerwertes (0,54) **berechnet Ihr Auswertungsprogramm** mit der entsprechenden Kurvenanpassung (hier: Polynom 3. Grades) die Chemerinkonzentration der verdünnten Probe durch Auflösen der Gleichung aus Abb. 1 nach x. In diesem Fall ergibt sich eine Chemerinkonzentration in der verdünnten Probe von

$$0,54 = 0,0039285 + 0,0042173x + 2,6356 \times 10^{-6}x^2 - 3,5684 \times 10^{-9}x^3$$

$$0,12 = x$$

und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors **1:505** somit eine Chemerinkonzentration in der unverdünnten Probe von

$$0,12 \times 505 = 60,65 \text{ ng/ml}$$

LEISTUNGSMERKMALE

Standard

Die Standards des ELISA E102 bestehen aus **rekombinantem humanem** Chemerin in Konzentrationen von **25, 100, 250, 400 bis 600** pg/ml (pico Gramm/ml, entspricht 0,025 bis 0,6 nano Gramm/ml).

Sensitivität

Die analytische Sensitivität des Assays beträgt **0,005 ng/ml** (5 pg/ml; zweifache Standardabweichung des Null-Standards in 19facher Bestimmung).

Spezifität

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

Wiederfindung

Die Wiederfindung von rekombinantem Chemerin in Serum- und Plasmaproben variierte zwischen 81 und 103%.

Matrixeffekte

Tabelle 1: Wiederfindung von rekombinantem Chemerin in verschiedenen Körperflüssigkeiten.

Matrixeffekte						
Verdünnung [1:x]	2	5	10	100	500	1000
Speichel	35 %	52 %	70 %	-	-	-
Urin	92 %	92 %	91 %	-	-	-
Muttermilch	90 %	88 %	86 %	-	-	-
Zellkultur- medium	91 %	100 %	95 %	104 %	-	-
Liquor	> max.	> max	> max	96 %	92 %	94 %

- = nicht bestimmt

Interferenz

Die Interferenz physiologisch auftretender Substanzen wurde durch Zugabe unterschiedlicher Mengen dieser Substanzen zu Serumproben getestet. In Tabelle 3 ist die relative Wiederfindung im Vergleich zum Serum ohne Zusätze für die maximal zugegebene Menge der potentiell interferierenden Substanz dargestellt.

Tabelle 2 %-Wiederfindung im Vergleich zum Normalserum

	Triglyceride [100 mg/ml]	Bilirubin [200 µg/ml]	Hämoglobin [1 mg/ml]
%	107,6	98,6	108,5

Keine der untersuchten Substanzen beeinflussten das Ergebnis des Testes signifikant.

Die Einflüsse der Koagulationshemmstoffe wurden durch Zugabe der angegebenen Konzentrationen der jeweiligen Hemmstoffe in Verdünnungspuffer VP bzw. in PBS , die mit 125 pg/ml Chemerin angereichert wurden, untersucht. Die relativen Werte von Chemerin gemessen in Koagulationshemmstoff angereicherten Proben im Vergleich zu Proben ohne Koagulationshemmstoffe werden gezeigt.

Tabelle 3: Die Einflüsse der Koagulationshemmer

		Wiederfindung in %
[3,8 g/l]	Citrat	103,4
[5,4 mmol/l]	EDTA	100,4
[30 IE/ml]	Heparin	103,0

Keine der untersuchten Substanzen beeinflussten das Ergebnis des Testes signifikant.

Reproduzierbarkeit und Präzision

Die **Inter-** und **Intra-Assay** Variationskoeffizienten sind **kleiner als 5,16 % bzw. 2,76 %**. Beispielhafte Bestimmungen sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 4: Inter-Assay-Varianz (angegeben sind Werte aus je 8 Durchführungen)

	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	VK (%)
Probe 1	70,91	3,42	5,16
Probe 2	123,88	6,80	5,87
Probe 3	147,96	6,06	4,38

Tabelle 5: Intra-Assay-Varianz

	Anzahl der Bestimmungen	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	VK (%)
Probe 1	20	85,03	1,85	2,17
Probe 2	20	142,33	3,93	2,76

Die Verdünnungslinearität

Die Linearität der Probenverdünnungen ist gegeben bei Verdünnungen von 1:250 bis 1:1000.

Tabelle 6: Verdünnungslinearität (hier: typische Ergebnisse dreier verschiedener Seren).

Verdünnung:	Probe 1 [ng/ml]	Probe 2 [ng/ml]	Probe 3 [ng/ml]
1:250	57,03	113,35	129,71
1:375	58,63	110,44	129,99
1:500	58,07	112,49	131,99
1:625	54,88	111,31	134,34
1:750	54,29	107,36	133,61
1:875	53,26	103,61	129,31
1:1000	53,51	101,59	126,43
MW / 1SA / VK%	55,67 / 2,21 / 3,97	108,59 / 4,55 / 4,19	130,77 / 2,74 / 2,09

MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient

ERWARTUNGSWERTE

Die Chemerin Konzentrationen in humanen Serumproben von gesunden Probanden im Alter zwischen 20 und 65 wurden mit dem Mediagnost E102 Kit gemessen. Die Konzentration aller Proben lagen im Bereich von 79,69 ng/ml bis 154,86 ng/ml (s. Tabelle 7).

Tabelle 7: Erwartungswerte in Serum gesunder Erwachsener

Geschlecht	Anzahl der Proben	Mittelwert [ng/ml]	Median [ng/ml]	Standard-abweichung [ng/ml]	Min. – Max.: [ng/ml]
weiblich	20	107,92	105,42	17,47	82,15-142,72
männlich	20	102,47	97,75	17,22	79,69-154,86
gesamt	40	105,20	104,22	17,35	79,69-154,86

PACKAGE INSERT ENGLISH

Mediagnost Chemerin ELISA E102

- is suited for Chemerin determination in **Serum** and **Plasma** samples
- is extremely **sensitive (5 pg/ml)** and thus allows measurements in cell culture media too and in specimens others than serum e.g. in cerebrospinal fluid, urine, breast milk and amniotic fluid
- is **fast**: incubation time a total of 2.5 hours
- Single Standards with **25, 100, 250, 400, 600 pg/ml** human Chemerin are provided in the kit
- 2 Control Sera are provided for quality control purposes according GLP
- is calibrated with **recombinant Chemerin**
- Microtiter plates are separately breakapart, tests can be adapted to individual requirements

INTENDED USE

Measurement of human Chemerin in human serum and plasma samples.

INTRODUCTION

Chemerin, also known as tazarotene-induced gene 2 (TIG2) or retinoic acid receptor responder 2 (RARRES2), is synthesized as precursor protein of 163 amino acids including a N-terminal signal peptide of 20 amino acids, which is chipped of enduring secretion. The inactive, circulation proform of Chemerin contains six cystein residues and thus three intramolecular disulfide bridges are suggested (1).

Prochemerin expression has been demonstrated for liver, lung, pituitary, lymph node, stomach and adipose tissue (1, 2). It has been detected in blood, ascitic fluids from ovary and liver cancer and synovial fluids from arthritic patients (1). Different receptors have been found in spleen, lymph node, small intestine, lung tissue as well as in macrophages and immature dendritic cells (1, 3).

Prochemerin is converted into its biologically active form by serine or cystein proteases, resulting in pro- or anti-inflammatory actions of the active protein, respectively. Proteolytic cleavage of Chemerin has been described for following serine proteases tryptase, plasmin, elastase, cathepsin G as well as for the cystein proteases cathepsin S and calpains (4-6).

The active protein is involved in innate and adaptive immune responses and for instance acts as a strong chemoattractant for immature dendritic cells and macrophages. It influences intracellular signaling by binding to its specific receptors. The C-terminal domain of Chemerin allows binding to the receptor ChemR23/CMKLR1 and elicits a pro-inflammatory stimulus by inducing Ca^{2+} influx and ERK1/2 activation. Further, the N-terminal domain of Chemerin binds to the CCRL2 receptor and allows presentation of the C-terminal domain to neighbor cells. In case of Prochemerin cleavage by cystein proteases the resulting peptides act inhibitory on the ChemR23/CMKLR1 receptors and thus have anti-inflammatory effects.

Recently, the relevance of Chemerin in adipogenesis and adipocyte metabolism has been discovered (2, 7). Goralski et al. demonstrated in mice that Chemerin as well as receptor (ChemR23) expression is present in adipocytes of visceral and subcutaneous adipose tissue. The expression and secretion increases enduring adipocyte differentiation. The active Chemerin of 16 kDa has been found in the conditioned media of adipocytes. Intracellular signaling networks in adipocytes are also influenced by Chemerin e.g. stimulation of MAPK p42/44 (ERK1/2) phosphorylation was demonstrated. Further, the authors also show a post-differentiation effect of Chemerin on gene expression in adipocytes.

Based on these results an influence of Chemerin on metabolic syndrome and insulin resistance was purposed. This studies reveal that Chemerin is more expressed by adipose tissue of obese patients and is able to impair insulin sensitivity of muscle cells and insulin mediated lipolysis and lipogenesis

in adipocytes (8, 9). It has been shown that Chemerin is associated with markers of inflammation and components of the metabolic syndrome (10, 11) as well as with renal function (12).

For the further investigation of Chemerin functions and its quality as biomarker in metabolic diseases reliable measurement of Chemerin in different body fluids is a prerequisite. Mediagnost offers a sensitive and reproducible test system for the quantitative measurement of Chemerin. Based on highly specific antibodies total Chemerin is measured.

MATERIALS PROVIDED

1)	MTP	Microtiter plate , ready for use, with 96 wells, dived up in 12 stripes à 8 wells (separately breakapart), coated with human Chemerin antibody.
2)	CAL	Standards A-E, lyophilised , contain recombinant Chemerin . Standard values are between 0.025 – 0.6 ng/ml (25, 100, 250, 400 und 600 ng/ml) Chemerin and have to be reconstituted with 1 ml (each) Dilution Buffer VP . Use 100 µl pro well in the assay.
3)	DILU	Dilution buffer VP, 125 ml , ready for use, after shaking. Please use this for the reconstitution of Standards and Control Sera and for the dilution of Control Sera and Samples .
4)	Control	Control Sera KS1 and KS2, 250 µl , lyophilised, contain human Serum and should be reconstituted in each 250 µl Dilution Buffer VP . The Chemerin target values and the respective ranges are given on the vial labels. The dilution should be according to the dilution of the respected samples. Use 100 µl pro well in the assay.
5)	AbCONJ	Antibody-HRP-Conjugate AK, 12 ml , ready for use, contains a mixture of biotinylated anti-human Chemerin Antibody and HRP (Horseradish Peroxidase)-labelled Streptavidin. Use 100 µl pro well in the assay.
6)	WASHBUF 20x	Washing Buffer (WP), 50 ml, 20-fold concentrated solution . Washing Buffer (WP) has to be diluted 1:20 with distilled or demineralised water before use (e.g. add the complete contents of the flask (50 ml) into a graduated flask and fill up with A. dest. to 1000 ml). Attention: After dilution the Washing Buffer is only 4 weeks stable, dilute only according to requirements.
7)	SUBST	Substrate (S), 12 ml , ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP)-substrate, stabilised H ₂ O ₂ Tetramethylbencidine.
8)	H ₂ SO ₄	Stopping Solution (SL), 12 ml , ready for use, 0.2 M sulphuric acid, Caution acid!
9)		Sealing tape for covering of the microtiter plate, 2 x, adhesive.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

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

Temperature will affect the absorbance readings of 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.

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

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

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

< 0.01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one Solution

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

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

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

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

Stop solution contains 0.2 M Sulfuric Acid (H₂SO₄)

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

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

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

General first aid procedures:

Skin contact: Wash affected area thoroughly with water. Discard contaminated cloths and shoes.

Eye contact: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water at least 15 minutes. In order to assure an effectual rinsing spread the eyelids.

Ingestion: If swallowed, wash out mouth thoroughly with water. Immediately see a physician.

Do not eat, drink or smoke in these areas.

Never pipette the materials with the mouth.

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

METHOD

The Mediagnost ELISA for Chemerin is a so-called Sandwich-Assay. It utilizes two specific and high affinity antibodies for this protein. The Chemerin 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-Chemerin-Antibody binds in turn to the immobilised Chemerin. In the closing substrate reaction the turn of the colour will be high specific catalysed, quantitatively depending on the Chemerin-level of the samples.

SPECIMEN

Serum samples are suitable. Further neither EDTA (5.4 mmol/l), Sodium Citrate (10.6 mmol/l) nor Heparin (30 IU/ml) did interfere with Chemerin measurement.

Storage of the samples

Storage at RT max. 3 days
Storage at 4°C max. 6 days
Storage at -20°C max. 2 years
in tightly closable plastic tubes.

The measured values of serum and plasma samples did not show significant deviations up to 10 thaw/freezing cycles, values within the range of 92 to 104 % of the target value were found.

Sample Preparation

Samples have to be diluted in Dilution Buffer (VP).
In most determinations (serum or plasma samples, and no extreme values expected) a dilution **from 1:505 with Dilution Buffer VP** should be suitable. According to expected Chemerin levels the dilution with VP can be higher or lower. The excellent linearity of this test system allows sample dilution of 1:250 to 1:1000 (see table 6).

Chemerin concentrations may be completely different in body fluids of human origin other than serum or cell culture supernatants (see table 1).

Suggestion for dilution protocol:

Pipette **1 ml Dilution Buffer VP** in PE-/PP-Tubes (application of a multi-stepper is recommended in larger series), add **10 µl** Serum- or Plasma (dilution 1:101). Dilute in the second step **50 µl** of the **pre-diluted** sample with **200 µl Dilution Buffer VP** (dilution 1:505). After mixing use 100 µl per determination of this dilution in the assay.

TECHNICAL RECOMMENDATIONS

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

The shelf life of the components after opening is not affected, if used appropriately.

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

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

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

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

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

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

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

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

Standards and Control

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

The lyophilised **Control Sera KS1 and KS2** must be **reconstituted** with the **Dilution Buffer VP**. The dilution should be according to the dilution of the respected samples. It is recommended to keep reconstituted reagents at room temperature for 15 minutes and then to mix them thoroughly but gently (no foam!) with a Vortex mixer.

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

Washing Buffer

The required volume of Washing Buffer is prepared by 1:20 dilution of the provided 20-fold concentrate with deionised water. The diluted Washing Buffer is stable for 4 weeks at 2-8°C. It has to be at room temperature for usage!

Microtiter plate

Store the once unused microtiter strips and wells together with the desiccant in the tightly closed clip lock bag at 2-8°C and use in the frame provided. The labelled expiry is not influenced in case of proper storage.

Substrate Solution

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

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

ASSAY PROCEDURE

NOTES: All determinations (Standards, Control Sera and Samples) should be assayed in duplicate. For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

When performing the assay, the Standards, Control Sera and the samples should be pipette as fast as possible (e.g. < 15 minutes). To avoid distortions due to differences in incubation times, the **Antibody-POD-Conjugate AK**, the **Substrate Solution S** as well as the **Stop Solution SL** should be added to the plate in the same order and in the same time interval each, respectively.

- 1) Add **100 µl Dilution Buffer VP** in wells A1/A2 (blank).
- 2) Pipette in positions B1/2 **100 µl of the Standard A** (25 pg/ml),
pipette in positions C1/2 **100 µl of the Standard B** (100 pg/ml),
pipette in positions D1/2 **100 µl of the Standard C** (250 pg/ml),
pipette in positions E1/2 **100 µl of the Standard D** (400 pg/ml),
pipette in positions F1/2 **100 µl of the Standard E** (600 pg/ml).
- 3) To control the correct accomplishment **100 µl** of the 1:505 (or in respective dilution rate of the sample) in **Dilution Buffer VP** diluted **Control Sera KS1 or KS2** can be pipetted in positions G1/2 and H1/2.
- 4) Pipette **100 µl** each of the **diluted sample** (e.g. dilute 1:505 with Dilution Buffer **VP**) in the rest of the wells, according to requirements.
- 5) Cover the wells with sealing tape and incubate the plate for **1 hour** at **room temperature** (shake at **350 rpm**). After incubation aspirate the contents of the wells and wash the **wells 5 times** with **300 µl Washing Buffer WP** / well.
- 6) Following the last washing step pipette **100 µl** of the **Antibody-POD-Conjugate AK** in each well.
- 7) **Cover the wells with the sealing tape** and incubate **1 hour** at **room temperature** (shake at **350 rpm**)
- 8) After incubation wash the wells **5 times** with **Washing Buffer WP** as described in step 5.
- 9) Pipette **100 µl** of the **TMB-substrate solution S** in each well.
- 10) Incubate the plate for **30 minutes** in the dark at **room temperature**.
- 11) Stop the reaction by adding **100 µl** of **Stopping Solution SL** to all wells.
- 12) Measure the absorbance within **30 minutes** at **450 nm** (**reference filter: ≥ 590 nm**).

ESTABLISHING THE STANDARD CURVE

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

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

The standards provided contain the following concentrations of Chemerin:

Standard	A	B	C	D	E
ng/ml	0.025	0.10	0.25	0.40	0.60
pg/ml	25	100	250	400	600

- 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 **Chemerin concentration** of the diluted sample or the diluted control sera in pg/ml (or ng/ml according the chosen unit for the standards) is calculated in this way, the Chemerin concentrations of the **undiluted samples** and of control sera are calculated **by multiplication with the respective dilution factor**.

E102 Standard Curve

Grp. 1: $y = 0.0039285 + 0.0042173 \cdot x + 2.6356e-006 \cdot x^2 - 3.5684e-009 \cdot x^3$ $d = 0.007921$

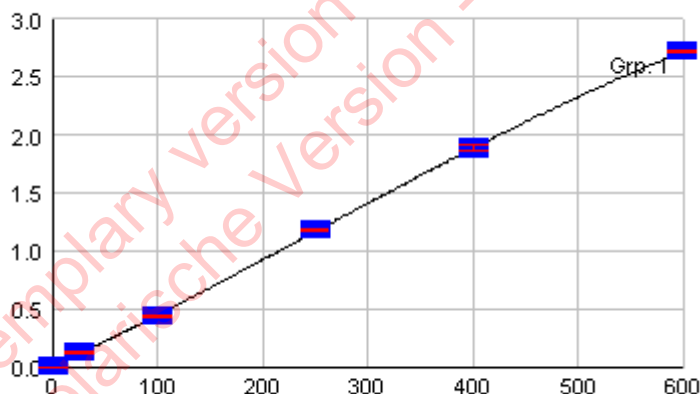


Fig. 1. Exemplary Standard Curve with a polynomial 3 as curve fit.

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

Exemplary calculation of the Chemerin concentration of a 1:505 diluted sample:

Measured extinction of your sample	0.56
Measured extinction of the blank	0.02

Your measurement program will calculate the Chemerin concentration of the diluted sample automatically by using the difference of sample (0.02) and blank for the calculation. You only have to determine the most suitable curve fit (here: polynomial 3 degree).

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

$$0.54 = 0.0039285 + 0.0042173x + 2.6356 \times 10^{-6}x^2 - 3.5684 \times 10^{-9}x^3$$

$$0.12 = x$$

If the dilution factor 1:505 is taken into account, the Chemerin concentration of the undiluted sample is $0.12 \times 505 = 60.65 \text{ ng/ml}$

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Standards

The standards are prepared from recombinant human Chemerin (in concentrations of 25, 100, 250, 400 and 600 pg/ml (pico gram/ml, equal to 0.025 nano gram/ml-0.6 ng/ml).

Sensitivity

The **analytical sensitivity** of the assay yields **0.005 pg/ml** (5 pg/ml; as 2 x SD of zero standard in 19-fold determination).

Specificity

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

Recovery

The recovery of recombinant Chemerin in serum and plasma samples varied from 81 to 103%.

Matrix Effects

Table 1: Matrix effects: % Recovery of recombinant Chemerin in different body fluids.

Matrix effects						
Dilution [1:x]	2	5	10	100	500	1000
Saliva	35	52	70	-	-	-
Urine	92	92	91	-	-	-
Breast milk	90	88	86	-	-	-
Cell culture media	91	100	95	104	-	-
Cerebro-spinal fluid	> max.	> max.	> max.	96	92	94

- = not determined

Interference

Interference of physiological appearing substance with the Chemerin measurement was investigated. Serum samples have been enriched with different concentrations of possibly interfering substances and the amount of Chemerin was measured and compared with the Chemerin concentration in the same sample without any enrichment. In table 2 the relative results are shown. None of the tested substances interfered significantly with Chemerin measurement.

Table 2: %- Recovery compared to non-enriched serum.

	Triglycerides [100 mg/ml]	Bilirubin [200 µg/ml]	Haemoglobin [1 mg/ml]
%	107.6	98.6	108.5

Effects of coagulation inhibitors were investigated by adding indicated amounts of inhibitors to VP or PBS enriched with 125 pg/ml Chemerin. Relative amounts of Chemerin determined in inhibitor containing samples in comparison to inhibitor free samples are shown in table 3. None of the tested substances interfered significantly with Chemerin measurements.

Table 3: Effects of coagulation inhibitors.

		% Recovery
[3.8 g/l]	Citrate	103.4
[5.4 mmol/l]	EDTA	100.4
[30 IE/ml]	Heparin	103.0

Reproducibility and Precision

The inter and intra assay coefficients of variability are **below 5.16 and 2.17 %**, respectively. Exemplary determinations are shown in table 4 and table 5.

Table 4: Inter-Assay-Variation (results of 8 determinations, each).

	Mean value (ng/ml)	Standard deviation	VC
Probe 1	70.91	3.42	5.16
Probe 2	123.88	6.80	5.87
Probe 3	147.96	6.06	4.38

Table 5: Intra-Assay-Variation

	Number of	Mean value	Standard deviation	VC
Probe 1	20	84.33	1.71	2.02
Probe 2	20	142.33	3.93	2.76

Linearity

The Mediagnost Chemerin ELISA E102 is over a very wide range dilution authentic, the linearity of serum dilutions is over a dilution range of 1:250 to 1:1000 excellent (see table 6).

Table 6: Linearity of the Sample Dilution (characteristic results of three different sera).

Dilution	Sample 1 [ng/ml]	Sample 2 [ng/ml]	Sample 3 [ng/ml]
1:250	57.03	113.35	129.71
1:375	58.63	110.44	129.99
1:500	58.07	112.49	131.99
1:625	54.88	111.31	134.34
1:750	54.29	107.36	133.61
1:875	53.26	103.61	129.31
1:1000	53.51	101.59	126.43
AV / 1SD / VC%	55.67 / 2.21 / 3.97	108.59 / 4.55 / 4.19	130.77 / 2.74 / 2.09

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

EXPECTATION VALUES

Concentrations of Chemerin in human sera of 40 healthy adult donors, at the age of 20 to 65 were determined with the Mediagnost ELISA E102. The concentrations of all samples varied from minimal 79.69 ng/ml to maximal 154.86 ng/ml (see table 7).

Table 7: Expectation values in sera of healthy adults (measured values in ng/ml).

Gender	No. of samples	Average value [ng/ml]	Median [ng/ml]	Standard Deviation [ng/ml]	Min. – Max.: [ng/ml]
female	20	107.92	105.42	17.47	82.15-142.72
male	20	102.47	97.75	17.22	79.69-154.86
total	40	105.20	104.22	17.35	79.69-154.86

LITERATUR / LITERATURE

1. Wittamer V, Franssen JD, Vulcano M, Mirjolet JF, Le Poul E, Migeotte I, et al. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J Exp Med* 2003;198:977-85.
2. Bozaoglu K, Bolton K, McMillan J, Zimmet P, Jowett J, Collier G, et al. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology* 2007;148:4687-94.
3. Roh SG, Song SH, Choi KC, Katoh K, Wittamer V, Parmentier M, Sasaki S. Chemerin--a new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;362:1013-8.
4. Du XY, Zabel BA, Myles T, Allen SJ, Handel TM, Lee PP, et al. Regulation of chemerin bioactivity by plasma carboxypeptidase N, carboxypeptidase B (activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor), and platelets. *J Biol Chem* 2009;284:751-8.
5. Zabel BA, Allen SJ, Kulig P, Allen JA, Cichy J, Handel TM, Butcher EC. Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades. *J Biol Chem* 2005;280:34661-6.
6. Yoshimura T, Oppenheim JJ. Chemerin reveals its chimeric nature. *J Exp Med* 2008;205:2187-90.
7. Goralski KB, McCarthy TC, Hanniman EA, Zabel BA, Butcher EC, Parlee SD, et al. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *J Biol Chem* 2007;282:28175-88.
8. Sell H, Laurencikienė J, Taube A, Eckardt K, Cramer A, Horrigs A, et al. Chemerin is a novel adipocyte-derived factor inducing insulin resistance in primary human skeletal muscle cells. *Diabetes* 2009;58:2731-40.
9. Tan BK, Chen J, Farhatullah S, Adya R, Kaur J, Heutling D, et al. Insulin and metformin regulate circulating and adipose tissue chemerin. *Diabetes* 2009;58:1971-7.
10. Stejskal D, Karpisek M, Hanulova Z, Svestak M. Chemerin is an independent marker of the metabolic syndrome in a Caucasian population--a pilot study. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2008;152:217-21.
11. Lehrke M, Becker A, Greif M, Stark R, Laubender RP, von Ziegler F, et al. Chemerin is associated with markers of inflammation and components of the metabolic syndrome but does not predict coronary atherosclerosis. *Eur J Endocrinol* 2009;161:339-44.
12. Pfau D, Bachmann A, Lossner U, Kratzsch J, Bluher M, Stumvoll M, Fasshauer M. Serum levels of the adipokine chemerin in relation to renal function. *Diabetes Care*;33:171-3.

KURZANLEITUNG MEDIAGNOST CHEMERIN ELISA E102

Rekonstitution / Verdünnung von Reagenzien		
Standards A-E	Rekonstitution in Verdünnungspuffer VP	je 1 ml
Kontrollseren KS1 & KS2	Rekonstitution in Verdünnungspuffer VP	je 250 µl
Waschpuffer WP	verdünnen in A. dest. (z.B. die gesamte Menge von 50 ml im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen)	1:20
Probenverdünnung bzw. Kontrollserumverdünnungen KS1&KS2: 1:505 in Verdünnungspuffer VP, sofort mischen und in max. 60 min. verwenden.		
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 (25 pg/ml)	B1 und B2
100 µl	Standard B (100 pg/ml)	C1 und C2
100 µl	Standard C (250 pg/ml)	D1 und D2
100 µl	Standard D (400 pg/ml)	E1 und E2
100 µl	Standard E (600 pg/ml)	F1 und F2
100 µl	Kontrollserum KS1	G1 und G2
100 µl	Kontrollserum KS2	H1 und H2
100 µl	Proben	in die Vertiefungen nach Bedarf
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken		

Inkubation: 1 h bei RT, 350 rpm

5 x 300 µl	Absaugen und die Platte 5x mit je 300 µl Waschpuffer WP / Vertiefung waschen	In jede Vertiefung
100 µl	Antikörper-POD-Konjugat AK	In jede Vertiefung

Inkubation: 1 h bei RT, 350 rpm

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

Inkubation: 30 min im Dunklen bei RT

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

SUMMARY – MEDIAGNOST CHEMERIN ELISA E102

Reconstitution / Dilution of Reagents		
Standards A-E	Reconstitution in Dilution Buffer VP	1 ml each
Control Serum KS1 & KS2	Reconstitution in Dilution Buffer VP	250 µl each
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 Sera KS1 & KS2: 1:505 in Dilution Buffer VP, mix directly and use within max. 60 min. Use 100 µl per determination		
Before assay procedure bring all reagents to room temperature		

Proposal of Assay Procedure for Double Determination:

Pipette	Reagents	Well Positions
100 µl	Dilution Buffer VP as Blank	A1 and A2
100 µl	Standard A (25 pg/ml)	B1 and B2
100 µl	Standard B (100 pg/ml)	C1 and C2
100 µl	Standard C (250 pg/ml)	D1 and D2
100 µl	Standard D (400 pg/ml)	E1 and E2
100 µl	Standard E (600 pg/ml)	F1 and F2
100 µl	Control Serum KS1	G1 and G2
100 µl	Control Serum KS2	H1 and G2
100 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

5 x 300 µl	Aspirate the contents of the wells and wash 5x with 300 µl each WP/well	each well
100 µl	Antibody-POD-Conjugate AK	each well

Incubation: 1 h at RT, 350 rpm

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

Incubation: 30 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)		



CAL A-E	A -E	Rec in 1 ml VP	
Control	KS1&KS2	Rec in 250 µl VP	
WASHBUF 20x	WP		1:20 DILU A. dest.

Control	1:505 DILU VP
SPE	1:505 DILU VP
°C 20-25 °C	

100 µl	BUF VP	A1/2
100 µl	CAL A (25 pg/ml)	B1/2
100 µl	CAL B (100 pg/ml)	C1/2
100 µl	CAL C (250 pg/ml)	D1/2
100 µl	CAL D (400 ng/ml)	E1/2
100 µl	CAL E (600 pg/ml)	F1/2
100 µl	CONTROL KS1 1:505 DILU VP	G1/2
100 µl	CONTROL KS2 1:505 DILU VP	H1/2
100 µl	SPE 1:505 DILU VP	
TAPE		

1 h **°C** 20-25 350 rpm

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

1 h **°C** 20-25 350 rpm

5 x 300 µl	5x WASHBUF WP
100 µl	SUBST TMB s
0.5 h °C 20-25	
100 µl	H₂SO₄ SL
MEASURE	