

IGFBP-6 ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von

humanem insulinähnlichem Wachstumsfaktor Bindungsprotein 6 (IGFBP-6)

Deutsch


Enzyme Immunoassay for Quantitative Determination of

human Insulin-like Growth Factor Binding Protein 6 (IGFBP-6)

English

Alle Länder / All countries:

für Forschungszwecke, nicht für diagnostische Anwendungen.
for Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

 2-8°C

X 96 wells



h **E112**



Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH

M: 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>

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

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

DIN EN ISO 15223-1

	Expiry date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Data di scadenza/ Fecha de caducidad/ Data de validade/ Uiterste gebruiksdatum/ Udløbsdato/ Bäst före-datum/ Termin ważności/ Lejárati idő/ Čas expirácie/ Doba expirace/ Срок на годност/ Aegumiskuupäev/ Ημερομηνία λήξης/ Data de expirare/ Rok uporabe/ Viimeinen käyttöpäivä
	Consider instructions for use/ Bitte Gebrauchsanweisung beachten/ Consultez la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las instrucciones de uso/ Respeitar as instruções de utilização/ A.u.b de gebruiksaanwijzing volgen/ Se brugsanvisningen/ Läs anvisningarna före användning/ Proszę przeczytać instrukcję obsługi/ Vegye figyelembe a használati utasításban foglaltakat/ Postupujte podľa pokynov na použitie/ Dodržujte návod k použití/ Моля, спазвайте инструкцията за употреба/ Palun järgige kasutusjuhendit/ Λάβετε υπόψη σας τις οδηγίες χρήσης/ Vá rugám szárespectați instrucțiunile de utilizare/ Upošteвайте navodila za uporabo!/ Lue käyttöohje huolellisesti!
g	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 number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-număr lot/ Številka serije/ Erä
M	Manufactured by/ Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por/ Fabricado por/ Vervaardigd doo/ Fabrikation af/ Tillverkad av/ Wyprodukowane przez/ Gyártotta/ Vyrobene/ Vyrobeno v/ Производител/ Τοοτja/ Κατασκευάζεται από/ Proodus de/ Proizvajalec/ Valmistaja
h	Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/ Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referência/ Referentienummer/ Referencennummer/ Beställningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/ Katalógovné číslo/ Objednací číslo/ 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/ Armazena entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevares mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí/ Температурно ограничение/ Säilittä tempertaaturidel/ Φύλαξη σε θερμοκρασία/ Depozitare între/ Skladiščenje med/ Säilytys x-y Celsiusasteen lämpötilassa
X	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/ Съдържа 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 slúvnečnému svétlu/ Да се предпазва от слънчева светлина/ Kaitsta otsese päikesekiirguse eest/ Κρατήστε το μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία/ Τηνεji 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/ Inkubačni 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 Röhrchen 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/ Csővecskék keverése örvénykeverővel/ Premiešat' pomocou prístroja Vortex/ Promíchat pomocí přístroje 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
	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 μικροπιλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitriska plošča/ Mikrotitruslevy
	Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituir en/ Reconstituir em/ Rekonstituieren in/ Rekonstituér i/ Rekonstituera/ Rekonstytuować w/ Helyreállítás/ Znovu pripravít' za/ Znovu pripravít za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti/ Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ Rekonstituoi
	Sample/ Probe/ Echantillon/ Campione/ Muestra/ Amostra/ Monster/ Prøve/ prov/ Próbka/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probă/ Vzorec/ Näyte
	Antibody Conjugate/ Antikörperkonjugat/ Anticorps conjugué/ Coniugato di anticorpo/ Conjugado de anticuerpos/ Conjugado anticorpo/ Antilichaamconjugaat/ Antistoffer-konjugat/ Antikroppskonjugat/ Koniugat antycial/ Antitest páros/ Protílátkový konjugát/ Protílátkový konjugát/ Антицяло конюгат/ Antikehad konjugaat/ Σύμπλοκο αντισώματος/ Compuși din anticorpi/ Antitelesa konjugat/ Vasta-aine konjugaati

CONJ	Enzyme Conjugate/ Enzymkonjugat/ Conjugué enzymatique/ Coniugato di enzima/ Conjugado de enzimas/ Conjugado Enzima/ Enzymconjugaat/ Enzym-konjugat/ Enzymkonjugat/ Koniugat enzymów/ Enzim páros/ Enzymatický konjugát/ Enzymatický konjugát/ ензим конюгат/ Ensüümi konjugaat/ Σύμπλοκο –ενζύμου/ Compuși din enzime/ Encima konjugat/ Enzymi-konjugaat
BUF	Buffer/ Puffer/ Tampon/ Tampone/ Tampón/ Tampão/ Buffer/ Buffer/ Buffer/ Bufor/ Puffer/ Pufer/ Pufr/ Буфер/ Puhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα/ Tampon/ Pufer/ Puskuri
DILU BUF 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/ Späd i buffert X/ Rozcieńczenie w buforze X/ Hígítás X pufferben/ Riedit' v pufrí X/ Ředit v pufru X/ Разреждане в буфер X/ Lahjendada puhvris X/ Αραιώστε σε ρυθμιστικό διάλυμα X/ Diluați în tamponul X/ Razredčiti v pufru X/ Laimennetaan x puskuriin
STD	Standard X/ Standard X/ Etalon X/ Standard X/ Estándar X/ Standard X/ Standaard X/ Standard X/ standard X/ Standard X/ Standard X/ Standard X/ Etalon X/ Standard X/ Стандарт X/ Standard X/ Πρότυπο X/ Standard X/ Standardni X/ Standardi X
Control	Control Serum X/ Kontrollserum X/ Contôle sérique X/ Siero di controllo X/ Suero de control X/ Soro de Controlo X/ controleserum X/ Kontrolserum X/ Kontrollserum X/ Serum kontrolne X/ Ellenőrző szérum X/ Kontrolné serum X/ Kontrolní serum X/ Контролен серум X/ Kontrollseerum X/ Ορός ελέγχου X/ Ser de control X/ Kontrolni serum X/ Kontrolli seerumi X
WASHBUF 20x	Washing Buffer Concentrate/ Waschpufferkonzentrat/ Tampon de lavage conc./ Tampone di lavaggio concentrato/ Tampón de lavado concentrado/ Tampão de Lavagem Concentrado/ wasbuffer, geconcentreerd/ Vaskebufferkoncentrat/ Vaskebufferkoncentrat/ tvättbuffertkoncentrat/ Bufor plukania koncentrat/ Mosópuffer koncentrátum/ Koncentrát vymývacieho pufru/ Концентрат на промивен буфер/ Pesupuhvri kontsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralnega pufru/ Pesuluositiviste
WASHBUF	Washing Buffer/ Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón de lavado/ Tampão de Lavagem/ wasbuffer/ Vaskebuffer/ tvättbuffert/ Bufor plukania/ Mosópuffer/ Vymývací pufr/ Vymývací pufr/ Προμивен буфер/ Pesupuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare/ Izpiralni pufer/ Pesuliuos
SUBST TMB	Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ substraat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Szubsztrátum/ Substrát/ Substrát/ Субстрат Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraatiliuos
H₂SO₄	Stopping Solution/ Stopplösung/ Stop Solution/ Soluzione di stop/ Stop Solución/ Solução Stop/ stopoplossing/ Stopopløsning/ Stopplösning/ Stop roztwór/ Megállító oldat/ Roztok na ukončenie/ Roztok pro ukončení/ 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/ Oblepiti podložku lepiacou páskou/ Olepiti podložku lepící páskou/ Плака с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerikleepindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperiți placa cu o bandă adezivă/ Prelepiți ploščo/ Peitã mikrotitrauslevy oheisella teipillä
MEASURE	Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590 nm)/ Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)/ Mesure l'absorbance en l'espace de 30 min à 450 nm avec ≥590 nm 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 ≥ 590 nm)/ Binnen 30 minuten bij 450 nm meten (referentiefilter ≥ 590 nm)./ Mål plade i løbet af 30 min ved nm (referencefilter ≥590 nm)/ 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 (Referenčný filter ≥590 nm)/ Měřit 30 minut při 450 nm (Referenční filtr ≥ 590 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/ 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
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/ kaikkien tarvittaviin mikrotitrauslevyn syvennyksiin

INHALTSVERZEICHNIS / TABLE OF CONTENTS

DEUTSCH	IGFBP-6 ELISA E112 Gebrauchsanweisung	5
1	ZWECKBESTIMMUNG	5
2	EINFÜHRUNG	5
3	TESTPRINZIP	6
4	WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	7
5	PROBEN	8
6	MATERIALIEN	9
7	TECHNISCHE HINWEISE	10
8	TESTDURCHFÜHRUNG	11
9	QUALITÄTSKONTROLLE	12
10	AUSWERTUNG	12
11	EINSCHRÄNKUNGEN / IGFBP-6 BEEINFLUSSENDE FAKTOREN	14
12	REFERENZWERTE	15
13	ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG	15
ENGLISH	IGFBP-6 ELISA, E112 INSTRUCTIONS FOR USE	19
1	INTENDED USE	20
2	INTRODUCTION	20
3	PRINCIPLE	21
4	WARNINGS AND PRECAUTIONS	22
5	SAMPLES	23
6	MATERIALS	24
7	TECHNICAL NOTES	25
8	ASSAY PROCEDURE	26
9	QUALITY CONTROL	27
10	EVALUATION OF RESULTS	27
11	LIMITATIONS OF PROCEDURE / FACTORS INFLUENCING IGFBP-6	29
12	REFERENCE VALUES	29
13	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	29
14	Literatur / Literature	33
	International Assay Description	34

DEUTSCH IGFBP-6 ELISA E112 Gebrauchsanweisung

IGFBP-6 ELISA E112	96 Determinations
RUO	n/a
Testprinzip	Enzyme-linked Immunoassay
Dauer (Inkubationszeit)	3.0 h
Antikörper	spezifische, polyklonale Kaninchen anti-human IGFBP-6 Antikörper
Kreuzreaktivität IGFBP / IGF	< Ø 2%
Puffer	Gebrauchsfertig und 20fach Konzentrat
Standard	5 Einzelstandards: 0,1 – 10 µg/L, rekombinantes humanes IGFBP-6
Assay Bereich	0,026 – 500 ng/mL
Kontrolle	2 Kontrollseren, gefriergetrocknet
Probe	human Serum / Plasma und andere Körperflüssigkeiten
Erforderliches Probenvolumen	10 µL
Proben Verdünnung	1:51
Analytische Sensitivität	0,026 µg/L
Intra- / Interassay Variation	<10 %

1 ZWECKBESTIMMUNG

Messung von humanem IGFBP-6 in menschlichen Serum- und Plasmaproben sowie anderen Körperflüssigkeiten für **Forschungsanwendungen**. Nicht für die Anwendung in diagnostischen Fragestellungen.

2 EINFÜHRUNG

Das Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor Bindungsprotein 6 (IGFBP-6) ist Teil des IGF-Systems welches aus sechs unterschiedlichen Bindungsproteinen und den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF)- I und -II besteht. Die IGFs sind an der Steuerung des menschlichen Wachstums beteiligt. Ihre biologische Aktivität wird durch die Bindungsproteine reguliert. Die IGFBP zeigen eine hohe Sequenzhomologie in ihren N- und C-terminalen Domänen, die für die IGF Bindung verantwortlich sind. Die zentrale „Linker-Region“ ist dagegen hoch variabel und beeinflusst vermutlich die Stabilität und Lokalisation des IGF/IGFBP Komplexes. Die bei einzelnen IGFBP auftretenden postrationalen Modifikationen (Phosphorylierung / Glykosylierung) erfolgen in dieser Region.

IGFBP-6 besteht aus 213 Aminosäuren und zeigt ein Molekulargewicht von ungefähr 34 kDa. Das Protein weist drei Disulfidbrücken im C-terminalen Bereich aus und unterscheidet sich damit von den anderen IGFBP, die über vier Disulfid-Brücken im C-terminus verfügen. IGFBP-6 kann glykosyliert vorliegen (O-Glykosylierung) und wird durch die Cathepsin-D-ähnliche saure Protease, die neutrale Serinprotease und durch die MMP-2/-7/-9/-12 gespalten.

Aufgrund seiner hohen Affinität für IGF-II, die höchste aller IGFBP, besteht die wesentliche Funktion des IGFBP-6 wahrscheinlich in der Regulation der biologischen Aktivität von IGF-II. Auf diese Weise werden Zellproliferation, -migration, -differenzierung und -überleben durch IGFBP-6 beeinflusst. IGF-unabhängige Funktionen sowie intrazelluläre und nukleäre Wirkungen des IGFBP-6 werden diskutiert. Dabei ist Prohibitin-2 ein möglicher Rezeptor über den die IGF-unabhängigen Wirkungen des IGFBP-6 vermittelt werden könnten. Physiologisch könnte IGFBP-6 bei Alterungsprozessen, der Angiogenese und Tumorerkrankungen von Bedeutung sein, eine klinische Indikation für die Messung von IGFBP-6 besteht momentan jedoch nicht (Bach LA, 2015).

3 TESTPRINZIP

Der Mediagnost Test basiert auf polyklonalen Antikörpern und eukaryotisch rekombinant hergestelltem IGFBP-6. Der Mediagnost IGFBP-6 ELISA E112 ist ein so genannter Sandwichassay unter Verwendung spezifischer und hochaffiner, polyklonaler Antikörper. Der an die Mikrotiterplatte gekoppelte erste Antikörper bindet das IGFBP-6 aus der Probe. Im nachfolgenden Schritt bindet an derart gebundenen IGFBP-6 ein mit Biotin-konjugierter IGFBP-6-spezifischer Antikörper und dann ein Streptavidin-Peroxidase Konjugat. In der abschließenden Reaktion katalysiert die gebundene Peroxidase die Umsetzung des Substrats. Diese enzymatische Reaktion führt zu einer, quantitativ vom IGFBP-6-Gehalt der Proben abhängigen, Blaufärbung. Die Reaktion wird durch die Zugabe der Stopplösung beendet und die Farbintensität (gelb) durch die Messung der Absorption bestimmt.

Der Mediagnost IGFBP-6 ELISA112 erlaubt die sichere und reproduzierbare Messung von IGFBP-6 in humanen Körperflüssigkeiten und ist ein Werkzeug für die Erforschung von IGFBP-6 als Biomarker. In einer ersten Studie wurden die IGFBP-6 Konzentrationen in gesunden Blutspendern gemessen und der IGFBP-6 Gehalt im Serum mit durchschnittlich 204 ng/mL bestimmt (Bereich 73-367, n=20).

4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Mediagnost Kit ist nur für Forschungsanwendungen und nicht für die Diagnostik oder 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 Test enthält Material humanen und/oder tierischen Ursprungs. Die Bestandteile des Tests sind so zu handhaben, als ob sie infektiös wären.

Bitte verwenden Sie keine abgelaufenen, offensichtlich beschädigten, mikrobiell kontaminierten oder ausgelaufenen Reagenzien.

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. Ein Sicherheitsdatenblatt ist auf Nachfrage verfügbar.

4.1 Menschliches Serum:

in folgenden Komponenten enthalten: **Kontrollserum KS1 & KS2**

Das humane Material, das für die Präparation dieses Produktes verwendet wird, wurde mit negativem Ergebnis auf Humanen Immundefizienz-Virus (HIV I und II), Hepatitis B-Oberflächenantigen und Hepatitis C Virus getestet. Da kein Test das Vorhandensein von infektiösen Erregern völlig ausschließen kann, sollten die Reagenzien wie potentiell infektiöses Material gehandhabt werden.

4.2 Reagenzien

Reagenzien AK, EK, A-E, VP, WP

enthalten als Konservierungsmittel eine Mischung aus **5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one und 2-methyl-4-isothiazolin-3-one** (<0,015%).

H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
P272	Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
P261	Einatmen von Dampf vermeiden.
P333+P313	Bei Hautreizung oder –ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P302+P352	BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.
P501	Entsorgung des Inhalts /des Behälters gemäß den örtlichen / regionalen / nationalen / internationalen Vorschriften.

Substratlösung (S)

Das TMB-Substrat (S) enthält 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin (<0.05%).

H315	Verursacht Hautreizungen.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H335	Kann Atemwege reizen.
P261	Einatmen von Staub/ Rauch/ Gas/ Nebel/ Dampf/ Aerosol vermeiden.
P305+P351+	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen.
P338	Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

Stopplösung (SL)

Die Stopplösung enthält 0,2 M Schwefelsäure (H₂SO₄)

H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
H314	Verursacht schwere Verätzung der Haut und schwere Augenschäden.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
P301+P330+	BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen.
P331	KEIN Erbrechen herbeiführen.
P305+P351+	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen.
P338	Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
P309+P310	BEI Exposition oder Unwohlsein: Sofort GIFT INFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

4.3 Erste-Hilfe Maßnahmen:

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

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

5 PROBEN

5.1 Probenmaterial

Serum / Plasma sowie weitere Körperflüssigkeiten und Zellkulturmedien.

Der Einfluss von Antikoagulantien auf die IGFBP-6 Messungen wurde mittels korrespondierender EDTA-Plasma und Serumproben evaluiert. Eine von zehn Proben zeigte eine signifikante Reduktion von ~40% der IGFBP-6 Konzentration (EDTA/Aprotinin Plasma) im Vergleich zum Serum. Die durchschnittliche Wiederfindung in EDTA (n=10) und Heparin (n=5) Plasmen betrug 102 bzw. 98%. Des Weiteren wurde die Wiederfindung von rekombinantem IGFBP-6 in verschiedenen Körperflüssigkeiten (Muttermilch, Speichel, Amnionflüssigkeit, Urin, Zellkulturmedium) evaluiert. Abgesehen vom Urin wurde die Wiederfindung des rekombinanten Materials nicht durch die Probenmatrix beeinträchtigt.

5.2 Probenentnahme

Das Blut zur Probengewinnung mittels standardmäßiger Venenpunktion entnehmen. Hämolytische Reaktionen sind zu vermeiden.

5.3 Erforderliches Probenvolumen: 10 µL

5.4 Probenstabilität

In fest verschlossenen, geeigneten Probengefäßen

- Lagerung bei 20-25°C: max. 2 Tage
- Lagerung bei -20°C: mind. 1 Jahre
- Gefrier-Auftau-Zyklen: **max. 1** (Probenabhängig trat eine Signalzunahme bei mehreren Zyklen auf)

Es wird daher empfohlen, die Proben sobald wie möglich nach der Trennung von koagulierten und / oder korpuskulären Bestandteilen gekühlt oder bei -20°C zu lagern und mehr als einen Gefrier-Tau Zyklen zu vermeiden.

5.5 Interferenz

Hämoglobin, Triglyceride und Bilirubin in der Probe stören nicht significant (< 30%) bis zu einer Konzentration von **5 mg/mL, 100 mg/mL** bzw. **200 µg/mL**. Der Einsatz hämolytischer, lipämischer oder ikterischer Proben sollte trotzdem vermieden werden.


5.6 Probenverdünnung

- Verdünnung: **1:51** mit Verdünnungspuffer VP
- Beispiel: **10 µL** Probe werden zu **500 µL Verdünnungspuffer VP** gegeben (Verdünnungsfaktor **51**). Nach dem Mischen werden von dieser Lösung 100 µL pro Bestimmung innerhalb von max. 1 h im Assay eingesetzt.
- Gegebenenfalls kann, je nach erwarteten **IGFBP-6-Werten**, stärker in **Verdünnungspuffer VP** verdünnt werden.
- Achtung: Serum- und Plasmaproben müssen mind. **1:20** in **Verdünnungspuffer VP** verdünnt werden.
- Probenstabilität nach dem Verdünnen in **Verdünnungspuffer VP**: max. 1 h.

6 MATERIALIEN

6.1 Inhalt der Testpackung

Die im Kit gelieferten Reagenzien sind ausreichend für 96 Tests einschließlich der Standardkurve.

MTP	Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, beschichtet mit Kaninchen-anti-hIGFBP-6-Antikörper. Die Vertiefungen sind einzeln abbrechbar.	(8x12) Vertiefungen
A-E	Standards , lyophilisiert (rekombinantes humanes IGFBP-6), die Konzentrationen sind auf dem Qualitätszertifikat angegeben.	5 x 750 µL
KS1	Kontrollserum 1 , lyophilisiert, (humanes Serum), die Konzentration ist auf dem Qualitätszertifikat in ng/mL angegeben.	1 x 250 µL
KS2	Kontrollserum 2 , lyophilisiert, (humanes Serum), die Konzentration ist auf dem Qualitätszertifikat in ng/mL angegeben.	1 x 250 µL
AK	Antikörperkonjugat , gebrauchsfertig, Kaninchen-anti-hIGFBP-6-Antikörper biotinyliert.	1 x 12 mL
EK	Enzymkonjugat (POD) , gebrauchsfertig, Streptavidin-Peroxidase-Konjugat.	1 x 12 mL
VP	Verdünnungspuffer , gebrauchsfertig	1 x 120 mL
WP	Waschpuffer WP , 20fach konzentrierte Lösung	1 x 50 mL
S	Substrat S , gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase (POD)-Substrat, stabilisiertes Tetramethylbenzidin.	1 x 12 mL
SL	Stopplösung SL , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure.	1 x 12 mL
-	Abdeckfolie für die Mikrotiterplatte	3 x
	Packungsbeilage	1 x
-	Qualitätszertifikat	1 x

6.2 Nicht mitgelieferte, benötigte Materialien

- Entmineralisiertes Wasser oder destilliertes Wasser (Aqua destillata) (**A. dest.**), 950 mL
- Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen
- Einmalröhrchen aus Polyethylen PE/ Polypropylen PP Röhrchen zum Verdünnen der Proben
- Vortex-Mixer
- Mikrotiterplattenschüttler (350 rpm)
- Mikrotiterplattenwisher (empfohlen)
- Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und ≥ 590 nm

7 TECHNISCHE HINWEISE

Lagerbedingungen

Nach Erhalt sollte der Test-Kit bei 2 - 8°C (rekonstituierte Reagenzien bei -20°C) bis zum Verfallsdatum gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

Haltbarkeit

Die Haltbarkeit der Reagenzien **nach Öffnung** beträgt 4 Wochen. Nicht verwendete Streifen **der Testplatte** sind zusammen mit dem Trockenkissen **luftdicht** in dem wiederverschließbaren Klippbeutel bei 2° - 8°C zu lagern. Die Streifen bitte nur in dem mitgelieferten Rahmen verwenden. **Rekonstituierte Komponenten** (Standards **A – E** und Kontrollseren **KS1 und KS2**) sollten bei -20°C aufbewahrt werden. Zur weiteren Verwendung schnell aber schonend Auftauen (keine Temperaturerhöhung über Raumtemperatur und kein übermäßiges Vortexen), bis zu 3 dieser Einfrier-Auftauzyklen zeigten keinen Einfluss auf den Test. Der 1:20 gebrauchsfertig verdünnte Waschpuffer **WP** ist nur 4 Wochen haltbar.

Vorbereitung der Reagenzien

Alle Komponenten des Kits müssen **vor Gebrauch auf Raumtemperatur** 20-25°C gebracht werden, die evtl. in manchen Puffern vorhandenen Präzipitate müssen vor Gebrauch durch Mischen und Erwärmen wieder gelöst werden. Reagenzien aus Kits mit unterschiedlichen Chargen-Nummern sollten nicht vermischt werden.

Rekonstitution

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

Verdünnung

Nach der Rekonstitution werden die Kontrollseren **KS1 und KS2** im gleichen Verhältnis (1:51) wie die Proben mit dem Verdünnungspuffer **VP** verdünnt.

Das benötigte Volumen des Waschpuffers **WP** wird vorbereitet, indem das 20fach Konzentrat im Verhältnis 1:20 mit Aqua dest. verdünnt wird.

Inkubation

Inkubation bei Raumtemperatur bedeutet: **Inkubation bei 20 - 25°C**. Die Substratlösung **S**, Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich–Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

Testdurchführung

Die Messungen (Leerwert, Standards **A - E**, Kontrollseren **KS1 und KS2** und Proben) sollten stets in Doppelbestimmung durchgeführt werden. Um optimale Ergebnisse zu erhalten, ist auf genaues Pipettieren und strikte Befolgung des Testprotokolls zu achten. Bei der Testdurchführung sollten Standards **A - E**, Kontrollseren **KS1 und KS2** und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden z.B. in 15 Minuten). Das Antikörperkonjugat **AK**, das Enzymkonjugat **EK** sowie nachfolgend die Substratlösung **S** und die Stopplösung **SL** sollten in der gleichen Reihenfolge und in dem gleichen Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

Schütteln

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.

Waschen

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.

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 fußelndem Zellstoff.

Manuelles Waschen ist eine gute Alternative. 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 fußelndem Zellstoff gründlich entfernt werden.

8 TESTDURCHFÜHRUNG

Vorbereitung der Reagenzien

Reagenzpräparation:		Rekonstitution:	Verdünnung:
A-E	Standards	in 750 µL Verdünnungspuffer VP	-
KS1	Kontrollserum 1	in 250 µL Verdünnungspuffer VP	1:51 mit VP
KS2	Kontrollserum 2	in 250 µL Verdünnungspuffer VP	1:51 mit VP
WP	Waschpuffer	-	1:20 mit Aqua dest.
Proben mit Verdünnungspuffer VP 1:51 verdünnen, sofort mischen, max. 60 min inkubieren. Davon 100 µl pro Bestimmung einsetzen			
Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen.			
Testdurchführung in Doppelbestimmung:			
Pipettieren	Reagenzien		Position
100 µL	Verdünnungspuffer VP (Leerwert)		A1/A2
100 µL	Standard A (0,1 ng/mL)		B1/B2
100 µL	Standard B (0,5 ng/mL)		C1/C2
100 µL	Standard C (1 ng/mL)		D1/D2
100 µL	Standard D (5 ng/mL)		E1/E2
100 µL	Standard E (10 ng/mL)		F1/F2
100 µL	Kontrollserum KS1 (1:51 verdünnt)		G1/G2
100 µL	Kontrollserum KS2 (1:51 verdünnt)		H1/H2
	Probe (1:51 verdünnt)		in die restlichen Vertiefungen nach Bedarf pipettieren
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.			
Proben-Inkubation: 1 h (+/- 5 Minuten) bei 20 - 25°C, 350 rpm			
5x 300 µL	Absaugen und die Platte 5x mit je 300 µL Waschpuffer WP/ Vertiefung waschen.		In jede Vertiefung
100 µL	Antikörperkonjugat AK		In jede Vertiefung
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.			
Inkubation: 1 h (+/- 5 Minuten) bei 20 - 25°C, 350 rpm			
5x 300 µL	Absaugen und die Platte 5x mit je 300 µL Waschpuffer WP/ Vertiefung waschen.		In jede Vertiefung
100 µL	Enzymkonjugat EK		In jede Vertiefung
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.			
Inkubation: 30 Minuten (+/- 5 Minuten) bei 20 - 25°C, 350 rpm			
5x 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
Substrat S Inkubation: 30 Minuten (+/- 2 Minuten) im Dunklen bei 20 - 25°C			
100 µL	Stopplösung SL		In jede Vertiefung
Messung der Absorption innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm).			

9 QUALITÄTSKONTROLLE

GLP erfordert, dass mit jeder Standardkurve Kontrollen mitgeführt werden. Um eine ordnungsgemäße Durchführung zu gewährleisten, sollte eine statistisch signifikante Anzahl der Kontrollen untersucht werden, um Mittelwerte und akzeptable Bereiche zu ermitteln. Die Kit-Kontrollen müssen innerhalb des zulässigen Bereichs, der auf dem QC-Zertifikat angegeben worden ist, gefunden werden. Wenn die Kriterien nicht erfüllt sind, ist der Test ungültig und sollte wiederholt werden.

9.1 Qualitätskriterien

Zur Auswertung des Testes sollte gewährleistet sein, dass die Extinktionen des Leerwertes 0,25 Einheiten nicht überschreiten, **Standard E** sollte dagegen Extinktionen über 1,0 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 rekalkulierte Konzentration des Standards A (0,1 ng/mL) sollte innerhalb von +/-25% des nominalen Wertes liegen und die Variabilität $\leq 25\%$ VK sein. Die Abweichung vom nominalen Wert sollte bei den Standards B – E (0,5 - 10 ng/mL) innerhalb +/-20% liegen und die Variabilität $\leq 20\%$ VK sein. Die Variabilität der Kontrollen KS1 und KS2 sollte $\leq 20\%$ VK sein und die berechnete Konzentration innerhalb des angegebenen Bereichs liegen (Zertifikat).

Der Test ist gültig, wenn sowohl Kontrollserien KS1 und KS2 sowie 5/6 der Standards die auf dem QC-Zertifikat festgelegten Annahmekriterien erfüllen.

10 AUSWERTUNG

10.1 Erstellung der Standardkurve

- 1) Ermittlung des **Mittelwertes** 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 / Kontrollen berechneten IGFBP-6-Gehaltes mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor ergibt die IGFBP-6 Konzentrationen in ng/mL.

6) Beispiel einer typische Standardkurve

Die exemplarischen Daten und die Standardkurve in der Abbildung 1 können **nicht** für die Berechnung der Testergebnisse genutzt werden! Für jeden Test muss eine eigene Standardkurve mitgeführt werden.

	Leerwert	A	B	C	D	E
ng/mL	0	0,1	0,5	1	5	10
OD (450-620 nm)	0,06	0,08	0,26	0,39	1,52	2,48

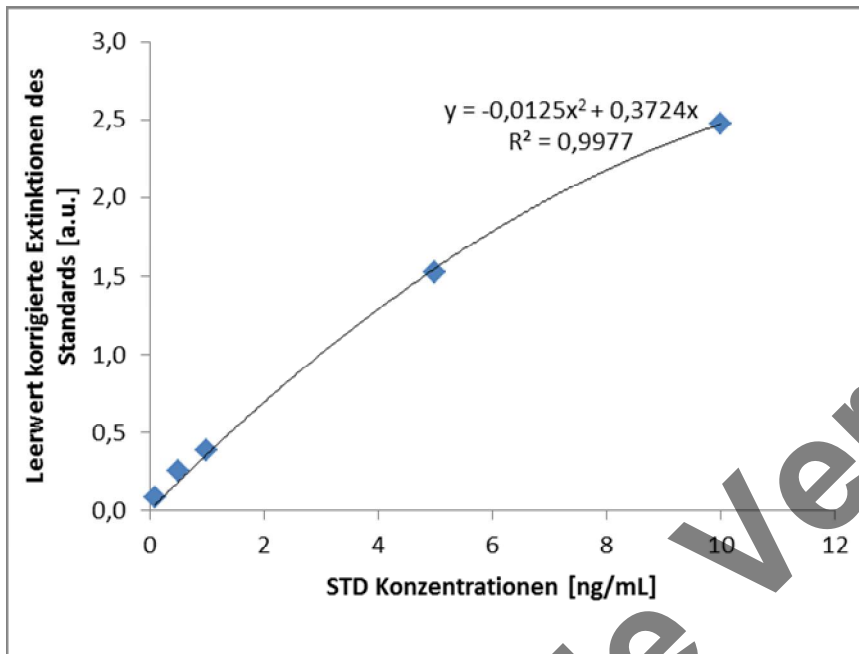


Abbildung 1: Exemplarische Standardkurve

10.2 Beispielhafte Berechnung der hIGFBP-6-Konzentration

Probenverdünnung: 1:51

Gemessene Extinktion der Probe: 1,495

Gemessene Extinktion des Leerwertes: 0,055

Aus der Differenz der Probenextinktion und der Extinktion des Leerwertes (0,055) **berechnet Ihr Auswertungsprogramm** mit der entsprechenden Kurvenanpassung die IGFBP-6 Konzentrationen der verdünnten Probe durch Auflösen der Gleichung (s.u.). In diesem Fall ergibt sich eine IGFBP-6-Konzentration in der verdünnten Probe von

$$y = -0,0125x^2 + 0,3724x$$

$$1,44 = x$$

und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (1:51) ergibt sich somit eine IGFBP-6 Konzentration in der unverdünnten Probe von

$$1,44 \times 51 = 73,44 \text{ ng/mL}$$

10.3 Interpretation der Ergebnisse

Der Mediagnost IGFBP-6 ELISA E112 ist nur für Forschungsanwendungen. Daher hängt die Interpretation der Testergebnisse vom experimentellen Design sowie der Fragestellung ab.

11 EINSCHRÄNKUNGEN / IGFBP-6 BEEINFLUSSENDE FAKTOREN

IGFBP-6 Konzentrationen steigen mit dem Alter und sind in Männern höher als in Frauen, während der Schwangerschaft sinken die Serumspiegel und bei Nierenversagen steigen sie an. In vitro wird die IGFBP-6 Expression, je nach Zellmodell, durch cAMP, IGFs, Retinoinsäure, Vitamin D, p53 und Glucokortikoide beeinflusst. TNF- β sowie β -Catenin inhibieren die IGFBP-6 Promotor Aktivität (Bach, 2015).

Der Mediagnost IGFBP-6 ELISA E112 basiert auf polyklonalen Antikörpern aus Kaninchen. Grundsätzlich können Antikörper-basierte Testsysteme durch heterophile Antikörper sowie Rheumafaktoren, die in der Probe enthalten sind, beeinflusst werden. Das Design des Testsystems wurde so ausgelegt, dass die Einflussmöglichkeiten dieser Faktoren minimiert werden. Vollständig ausgeschlossen werden kann ein solcher Einfluss jedoch nicht, dies ist bei der Beurteilung des Ergebnisses zu berücksichtigen.

Example Version

12 REFERENZWERTE

IGFBP-6 wurde exemplarisch in Proben von 20 gesunden Blutspendern gemessen. Die mittlere Konzentration liegt bei 204 ng/mL (Bereich: 73 – 367).

13 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG

13.1 Sensitivität

Die Sensitivität wurde durch Messen des Leerwertes und der Berechnung der theoretischen Konzentration des Leerwertes + 2SA bestimmt. Die analytische Sensitivität des Mediagnost E112 beträgt als Mittelwert 0,026 ng/mL. In vier unabhängigen Bestimmungen von je 8 Leerwerten wurden Werte von 0,004 ng/mL bis 0,029 ng/mL gefunden.

Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (1:20) ergibt sich somit ein Limit of Detection von 0,5 ng/mL und ein Limit of Quantifikation (10xSA) von 2 ng/mL in der unverdünnten Probe.

13.2 Spezifität

Der Einfluss von IGF-I / -II sowie der IGF-Bindungsprotein 2-5 auf die Messung von IGFBP-6 wurde sowohl durch die direkte Messung der entsprechenden Proteine in Verdünnungspuffer (Kreuzreaktivität) als auch durch Wiederfindungsexperimente untersucht.

Tabelle 1 Spezifität; Kreuzreaktivität des Testsystems mit IGF-I /-II sowie IGFBP-2 bis -5. Die rekombinanten Proteine wurden in Assay Puffer verdünnt und dann als Probe im Test eingesetzt. Des Weiteren wurde STD E in den mit IGF/IGFBP angereicherten Puffern rekonstituiert und die Auswirkung auf die Wiederfindung von IGFBP-6 gemessen. Hier werden relative Kreuzreaktivität und Wiederfindung bei zwei Konzentrationen der jeweiligen IGFBPs sowie der IGFs gezeigt.

	IGFBP-2	IGFBP-3	IGFBP-4	IGFBP-5	IGF-I	IGF-II
[ng/mL]	250	600	250	250	500	500
Kreuzreaktivität in VP [%]	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Wiederfindung STD E [%]	0	5	-3	-7	-5	-17
[ng/mL]	50	300	50	50	100	100
Kreuzreaktivität in VP [%]	0,05	0,08	0,05	0,02	0,00	0,03
Wiederfindung STD E [%]	-3	2	-4	-9	-10	-9

13.3 Präzision

Intra-Assay Variabilität

Die IGFBP-6 Konzentration in Serumproben wurde mindestens 12-mal innerhalb eines Tests bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 gezeigt, der gemessene Variationskoeffizient (VK) ist 1,1 % im Durchschnitt.

Tabelle 2 Intra-Assay Variabilität. Die IGFBP-6 Konzentration der Probe wurde mindestens 12-mal innerhalb eines Tests ermittelt und die Variabilität als Variationskoeffizient (VK) berechnet.

VK [%]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Test 1	1,63	2,24	1,91	4,15
Test 2	1,65	1,99	2,45	2,49
Test 3	1,10	2,66	3,89	1,65
Test 4	4,57	4,06	4,09	1,48
Test 5	1,50	2,89	1,84	2,20
Test 6	1,56	2,43	3,18	1,87

13.4 Inter-Assay Variabilität

Serumproben, wurden in unabhängigen Tests gemessen. Beispielhafte Ergebnisse sind in der Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3 Inter-Assay Variabilität. Die Proben wurden mehrfach unabhängig voneinander verdünnt und der IGFBP-6 Gehalt aus einer Doppelbestimmung berechnet.

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mittelwert [ng/mL]	127	203	187	177	191	109	264	174	73	190	74	151
SA [ng/mL]	9	22	8	15	15	10	12	7	5	10	4	11
VK [%]	7	11	4	8	8	9	4	4	7	5	6	7
n	18	13	13	13	18	21	16	11	13	16	11	11

13.5 Linearität

Die Linearität wurde durch Verdünnung (1:5–1:640) von nativen Seren mit unterschiedlichen IGFBP-6 Konzentration (Probe 1-3) getestet. Ein Vergleich der erwarteten und der gemessenen IGFBP-6 Konzentration der jeweiligen Verdünnung ist in Abbildung 2 gezeigt. Bereits die grafische Beurteilung zeigt, dass eine Verdünnung von $\geq 1:20$ notwendig ist. Dieses Ergebnis konnte durch eine statistische Analyse nach NCCLS/CLSI EP-6A 2003 verifiziert werden. Die Linearität der Probenverdünnung bei Konzentrationen innerhalb der Standardkurve (0,1 – 10 ng/mL) ist gegeben.

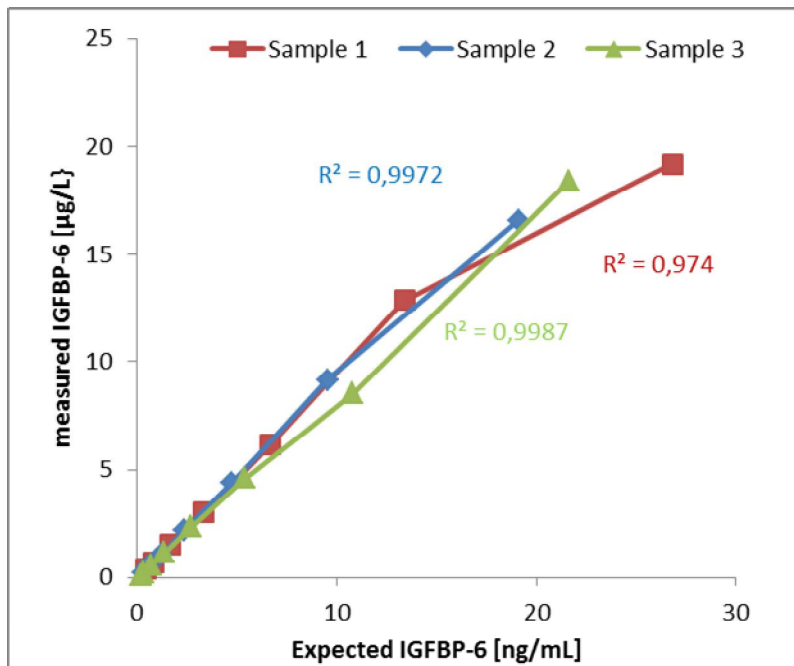


Abbildung 2 Linearität. Vergleich der theoretisch erwarteten und der gemessenen IGFBP-6 Konzentration in den jeweiligen Verdünnungen. Eine 1:20 Verdünnung vorausgesetzt ist die Linearität bis zu einer Konzentration von 0,5 ng/mL gegeben.

13.6 Wiederfindung

Rekombinantes IGFBP-6 wurde in unterschiedlichen Mengen menschlichem Serum zugegeben. Der IGFBP-6 Gehalt der so angereicherten Proben wurde gemessen und die Wiederfindung im Vergleich zu angereicherterem Puffer berechnet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4 gezeigt.

Tabelle 4 Wiederfindung von rekombinatem IGFBP-6. Rekombinantes IGFBP-6 wurde in zwei unterschiedlichen Konzentrationen zu drei humanen Serumproben gegeben, gemessen und die relative Wiederfindung berechnet.

rek. IGFBP-6 [ng/mL]	Relative Wiederfindung [%]		
	Probe 1	Probe 2	Probe 3
272	94,98	94,50	95,59
4,573	101,73	102,36	103,81

13.7 Interferenz

Interferenz von Bilirubin, Triglyceriden und Hemoglobin wurde durch Zugabe von verschiedenen Mengen dieser Stoffe in Humanserum getestet. Zum Vergleich die gleiche Menge an Puffer ohne jede Substanz wurde auch in Serum zugegeben. Tabelle 5 zeigt, dass weder Hämoglobin, Bilirubin noch Triglyceride die Messung von IGFBP-6 in menschlichem Serum beeinflussen.

Tabelle 5 Testung von Interferenz von physiologischen Substanzen auf IGFBP-6 Messung. Drei humane Serumproben wurden mit unterschiedlichen Mengen an Triglyceriden, Bilirubin oder Hämoglobin versetzt und die Auswirkung auf die gemessene IGFBP-6 Konzentration im Vergleich zum nativen Serum bestimmt. Hier gezeigt die höchsten Konzentrationen und ihre Auswirkung auf die Wiederfindung des IGFBP-6 [%].

	Triglyceride 100 mg/mL	Bilirubin 200 µg/mL	Hämoglobin 5 mg/mL
Probe 1	99	96	68
Probe 2	96	100	74
Probe 3	108	107	81

13.8 Rückführbarkeit der Testkalibration

Als Standard wird in eukaryotischen Säugerzellen produziertes rekombinantes IGFBP-6, Reinheitsgrad > 98 % (SDS-PAGE, Silverstain), verwendet. Internationale Standard oder Referenzpräparationen sind nicht verfügbar, daher wird die Rückführbarkeit des Testsystems über Mediagnost interne Probenpanel gewährleistet.

13.9 Variabilität der Standardkurve

Die Messunsicherheit, resultierend aus den statistischen Schwankungen der Standards, wurde aus den rekalkulierten IGFBP-6 Konzentrationen der einzelnen Standardpunkte berechnet.

Die relative Abweichung stimmt mit der Messunsicherheit überein. Die Variabilität der rekalkulierten STD-Konzentrationen war weniger als 20% für alle Standards, sowie %RE (Bereich -18,1 bis 12,6%). Ergebnisse werden in der Tabelle 6 gezeigt.

Der statistisch signifikante Differenzierung der Signalintensität des STD A im Vergleich mit dem Leerwert oder STD B wurde auch durch Welch's t-Test in drei unabhängigen Experimenten gezeigt (n = 8, p <0,01).

Tabelle 6 Variabilität der Standards. Vergleich der rekalkulierten IGFBP-6 Konzentrationen der einzelnen Standardpunkte aus sechs unabhängigen Tests. Die Berechnung erfolgte auf der Basis eines Polynoms 2. Grades als Regressionsmodell für die Kurvenanpassung.

	STD A	STD B	STD C	STD D	STD E
[ng/mL]	0,1	0,5	1	5	10
Test 1	0,10	0,50	1,01	5,00	10,00
Test 2	0,10	0,46	0,98	5,02	9,99
Test 3	0,09	0,59	0,97	4,99	10,01
Test 4	0,13	0,51	1,02	4,99	10,00
Test 5	0,11	0,48	0,99	5,01	10,01
Test 6	0,11	0,51	0,99	5,00	10,00
Mittelwert [ng/mL]	0,11	0,51	0,99	5,00	10,00
VK [%]	12	9	2	0	0

13.10 Kreuzreaktivität

Die Kreuzreaktivitäten von mehreren handelsüblichen tierischen Seren wurden in einer Verdünnung von 1:51 in diesem Assay getestet.

Damit wurde nachgewiesen, dass der Test als heterologer Assay für IGFBP-6-Messung in Serumproben von Eseln, Hühnern, Hunden, Kaninchen, Katzen, Mäusen, Meerschweinchen, Pferden, Ratten, Rindern, Schweinen, Schafen und Ziegen NICHT eingesetzt werden kann.

ENGLISH IGFBP-6 ELISA E112 INSTRUCTIONS FOR USE

TABLE OF CONTENTS

ENGLISH	IGFBP-6 ELISA E112 INSTRUCTIONS FOR USE	19
1	INTENDED USE	20
2	INTRODUCTION	20
3	PRINCIPLE.....	21
4	WARNINGS AND PRECAUTIONS	22
5	SAMPLES.....	23
6	MATERIALS	24
7	TECHNICAL NOTES	25
8	ASSAY PROCEDURE.....	26
9	QUALITY CONTROL.....	27
10	EVALUATION OF RESULTS	27
11	LIMITATIONS OF PROCEDURE / FACTORS INFLUENCING IGFBP-6.....	29
12	REFERENCE VALUES	29
13	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	29
14	Literatur / Literature	33
	International Assay Description.....	34

Example Version

IGFBP-6 ELISA E112	96 Determinations
RUO	n/a
Principle of the test	Enzyme-linked Immunoassay
Duration (incubation period)	3.0 h
Antibodies	specific, polyclonal rabbit anti-human IGFBP-6 antibodies
Cross reactivity with IGFBP-2 /-5 and IGF-I/-II	< Ø 2 %
Buffer	Ready for use and 20fold concentrate
Standard	5 single standards: 0.1 – 10 µg/L, recombinant human IGFBP-6
Assay Range	0.026 – 500 ng/mL
Control	2 control sera, freeze-dried
Sample	human serum / plasma
Required sample volume	10 µL
Sample dilution	1:51
Analytical sensitivity	0.026 µg/L
Intra- / Interassay Variance	<10 %

1 INTENDED USE

Measurement of human IGFBP-6 in human serum / plasma and other body fluids for research use only. Not for diagnostic procedures.

2 INTRODUCTION

The Insulin-like Growth Factor 6 (IGFBP-6) is part of the IGF-System which consists of several binding proteins (1-6) and IGF-I and –II. The Insulin-like Growth Factors are involved in the control of human growth and regulated themselves by their binding proteins. The IGFBPs show high amino acid sequence homology, they have conserved N- and C-terminal domains which are involved in IGF-binding. In contrast the central linker region is highly variable. This region is not directly involved in IGF-binding but influences stability and localisation of the IGFBP / IGF complex and can be modified by glycosylation and phosphorylation.

IGFBP-6 a protein of 213 amino acids and about 34 kDa is somewhat special because of only three disulphide bridges in the C-terminal domain, resulting in a significantly higher affinity (50fold) for IGF-II than IGF-I. Further IGFBP-6 can be O-glycosylated and is cleaved by cathepsin-D-like acid protease, neutral serine protease as well as MMP-2/-7/-9/-12.

Main proposed function of IGFBP-6 is the regulation of the biological availability of IGF-II and thereby it influences cell proliferation, differentiation, migration and survival. Further IGF-independent as well as intra- and nuclear actions of IGFBP-6 are discussed. IGF-independent actions might be transmitted by prohibitin-2 as a potential cell surface receptor. Physiologically IGFBP-6 might be involved in senescence, angiogenesis and cancer. But a clear clinical indication for measurement of plasma IGFBP-6 needs to be determined (Bach, 2015).

3 PRINCIPLE

The Mediagnost assay is based on polyclonal antibodies and recombinant IGFBP-6, expressed in eukaryotic cells. The Mediagnost ELISA for IGFBP-6, E112 is a so-called Sandwich-Assay. It utilizes two specific antibodies of high affinity. First the IGFBP-6 in the sample binds to the immobilized antibody on the microtiter plate. In a two-step sequence, the biotin-conjugated anti-IGFBP-6-Antibody and the streptavidin-peroxidase are bound.

Subsequently, the peroxidase catalyzes an enzymatic reaction resulting in a blue coloration. The intensity of the blue color depends on the analyte content of the sample. The reaction is stopped by the addition of stop solution and color intensity (yellow) is quantified by measuring the absorption.

Mediagnost IGFBP-6 ELISA, E112 allows secure and reproducible measurement of IGFBP-6 in human body fluids and is a suitable tool for the investigation of IGFBP-6 as a biomarker in growth, cancer and bone metabolism. In a preliminary study IGFBP-6 was measured in serum of healthy blood donors and mean concentration of 204 ng/mL was detected (Range: 73-367, n=20).

Example Version

4 WARNINGS AND PRECAUTIONS

For Research Use only. Not for diagnostic procedures. For Professional use only.

The Mediagnost kit is suitable only for in vitro and not for internal use in humans and animals. Follow strictly the test protocol. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything has been understood. Mediagnost will not be held responsible for any loss or damage (except as required by statute) howsoever caused, arising out of noncompliance with the instructions provided.

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

Caution: This kit contains material of human and/or animal origin. Therefore all components and patient's specimens should be treated as potentially infectious.

Appropriate precautions and good laboratory practices must be used in the storage, handling and disposal of the kit reagents. The disposal of the kit components must be made according to the local regulations. Material Safety Data Sheet is available on request.

4.1 Human Serum

Following components contain human serum: **Control Serum KS1 and KS2**

Source human serum for the control sera provided in this kit was tested and found non-reactive for Hepatitis-B surface antigen (HBsAg), Hepatitis C virus (HCV), and Human Immunodeficiency Virus 1 and 2 (HIV). No known methods can offer total security of the absence of infectious agents; therefore all components and patient's specimens should be treated as potentially infectious.

4.2 Reagents

Reagents A-E, AK, EK, VP, WP

Contain as preservative a mixture of **5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one** (<0.015%)

H317	May cause an allergic skin reaction.
P280	Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection.
P272	Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace.
P261	Avoid breathing dust/ fume/ gas/ mist/ vapours/ spray.
P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/ attention.
P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P501	Dispose of contents/ container in accordance with local/ regional/ national/ international regulations.

Substrate Solution (S)

The TMB-Substrate (S) contains 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine (<0.05%)

H315	Causes skin irritation.
H319	Causes serious eye irritation.
H335	May cause respiratory irritation.
P261	Avoid breathing dust/ fume/ gas/ mist/ vapours/ spray.
P305+P351+	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes.
P338	Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

Stopping Solution (SL)

The Stopping solution contains 0.2 M acid sulphur acid (H₂SO₄)

H290	May be corrosive to metals.
H314	Causes severe skin burns and eye damage.
P280	Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection.
P301+P330+	IF SWALLOWED: rinse mouth.
P331	Do NOT induce vomiting.
P305+P351+	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes.
P338	Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P309+P310	IF exposed or if you feel unwell: Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician.

4.3 General first aid procedures:

Skin contact: Wash affected area rinse immediately with plenty of water at least 15 minutes. Remove 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: After swallowing the product, if the affected person is conscious, rinse out the mouth with plenty of water: seek medical advice immediately.

5 SAMPLES

5.1 Sample type

Serum and plasma samples as well as other body fluids and cell culture medium

The influences of anti-coagulants on IGFBP-6 measurements by ELISA E112 were investigated in corresponding EDTA and serum samples. One of 10 samples showed a significant reduction of IGFBP-6 concentration in EDTA/Aprotinin Plasma compared with serum of ~40%. On average recovery of serum IGFBP-6 in EDTA (n=10) and heparin (n=5) plasma was 102 and 98%, respectively. Additionally, recovery of recombinant IGFBP-6 was evaluated in several body fluids (breast milk, saliva, amniotic fluid, urine) as well as in RPMI cell culture medium was tested. The recovery was not impaired in any tested fluids except urine.

5.2 Specimen collection

Use standard venipuncture for the blood sampling. Haemolytic reactions are to be avoided.

Required sample volume: **10 µL**

5.3 Sample stability

In firmly closed sample vials:

- Storage at 20-25°C: max. 2 days
- Storage at -20° C: min. 1 year
- Freeze-thaw cycles: **max. 1** (sample dependent an increase in signal intensity was detected after more cycles)

Therefore it is recommended to keep sample refrigerated or frozen as soon as possible after separation of coagulated and corpuscular blood components and to avoid more than 1 freeze-thaw cycles.

5.4 Interference

Generally, haemolytic, icteric and lipemic samples should be avoided. Interference was tested by addition of triglycerides, haemoglobin or bilirubin to serum samples and measurement of IGFBP-6 recovery. At 100 mg/mL, 5 mg/mL and 200 µg/mL no significant (<30%) interference was detected.


5.5 Sample dilution

- Dilution: **1:51** with **Dilution Buffer VP**
- Pipette **500 µL Dilution Buffer VP** in PE-/PP-Tube (application of a multi-stepper is recommended in larger series); add **10 µL sample** (dilution 1:51). After mixing use 2 x 100 µL of this dilution in the assay.
- Attention: serum and plasma samples must be diluted at least 1:20 in **Dilution Buffer VP**.
- Depending on the expected IGFBP-6 values the samples can be diluted higher in **Dilution Buffer VP**.
- Sample stability after dilution of the sample: maximum 1 hour at 20-25°C.

6 MATERIALS

6.1 Materials provided

The reagents listed below are sufficient for 96 wells including the standard curve.

MTP	Microtiter plate , ready for use, coated with rabbit-anti-hIGFBP-6-antibody. Wells are separately	(8x12) wells
A-E	Standards , lyophilized, (recombinant human IGFBP-6), concentrations are given on vial labels and on quality certificate.	5 x 750 µL
KS1	Control Serum 1 , lyophilised, (human serum), concentration is given on quality certificate in ng/mL.	1 x 250 µL
KS2	Control Serum 2 , lyophilised, (human serum), concentration is given on quality certificate in ng/mL.	1 x 250 µL
AK	Antibody Conjugate , ready for use, contains rabbit biotinylated anti-hIGFBP-6 antibody.	1 x 12 mL
EK	Enzyme Conjugate , ready for use, contains HRP (Horseradish-Peroxidase)-labelled Streptavidin.	1 x 12 mL
VP	Dilution Buffer , ready for use	1 x 120 mL
WP	Washing Buffer , 20-fold concentrated solution	1 x 50 mL
S	Substrate , ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP) substrate, stabilised Tetramethylbencidine.	1 x 12 mL
SL	Stopping Solution , ready for use, 0.2 M sulphuric acid.	1 x 12 mL
-	Sealing Tape , for covering the microtiter plate .	3 x
	Instructions for use	1 x
--	Quality Certificate	1 x

6.2 Materials required, but not provided

- Distilled (Aqua destillata) or deionized water for dilution of the Washing Buffer **WP (A. dest.)**, **950 mL**.
- Precision pipettes and multichannel pipettes with disposable plastic tips
- Polyethylene PE/Polypropylene PP tubes for dilution of samples
- Vortex-mixer
- Microtiter plate shaker (350 rpm)
- Microtiter plate washer (recommended)
- Micro plate reader ("ELISA-Reader") with filter for 450 and ≥ 590 nm

7 TECHNICAL NOTES

Storage Conditions

Store the kit at 2-8°C after receipt until its expiry date. The lyophilized reagents should be stored at -20 °C after reconstitution. Avoid repeated thawing and freezing.

Storage Life

The shelf life of the components **after initial opening** is warranted for **4 weeks**, store the unused strips and microtiter wells **airtight** together with the desiccant at 2-8°C in the clip-lock bag, use in the frame provided. The **reconstituted components** standards **A - E** and Control Sera **KS1** and **KS2** must be stored at -20°C (max. 4 weeks). For further use, thaw quickly but gently (avoid temperature increase above room temperature and avoid excessive vortexing). Up to 3 of the freeze-thaw cycles did not influence the assay. The 1:20 diluted Washing Buffer **WP** is 4 weeks stable at 2-8°C

Preparation of reagents

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. Reagents with different lot numbers cannot be mixed.

Reconstitution

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

Dilution

After reconstitution dilute the Control **KS1** and **KS2** with the Dilution Buffer **VP** in the same ratio (1:51) as the sample. The required volume of Washing Buffer **WP** is prepared by 1:20 dilution of the provided 20 fold concentrate with Aqua dest.

Assay Procedure

When performing the assay, Blank, Standards **A-E**, Controls **KS1** and **KS2** and the samples should be pipette as fast as possible (e.g. <15 minutes). To avoid distortions due to differences in incubation times, Antibody Conjugate **AK** and the Enzyme Conjugate **EK** as well as the succeeding Substrate Solution **S** should be added to the plate in the same order and in the same time interval as the samples. Stopping Solution **SL** should be added to the plate in the same order as Substrate Solution **S**. All determinations (Blank, Standards **A-E**, Control **KS1** and **KS2** and samples) should be assayed in duplicate. For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

Incubation

Incubation at room temperature means: Incubation at 20 - 25°C. The Substrate Solution **S**, stabilised Tetramethylbencidine, is photosensitive—store and incubation in the dark.

Shaking

The incubation steps should be performed at mean rotation frequency of a particularly suitable microtiter plate shaker. We are recommending approx. **350 rpm**. Due to certain technical differences deviations may occur, in case the rotation frequency must be 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.

Washing

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 **WP** 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.

Manual washing should be used. Washing Buffer may be dispensed via a multistepper device, a multichannel pipette, or a squirt bottle. Decant contents into a biohazard bin and then blot plate on absorbent tissue. Wash the plate by adding 300 µL Washing Buffer **WP**/well, then decant and blot on absorbent tissue. Repeat this step 4 more times for total of 5 washes.

8 ASSAY PROCEDURE

Preparation of reagents		Reconstitution:	Dilution
A-E	Standards	in 750 µL Dilution Buffer VP	-
KS1	Control Serum 1	in 250 µL Dilution Buffer VP	1:51 with Dilution Buffer VP
KS2	Control Serum 2	in 250 µL Dilution Buffer VP	1:51 with Dilution Buffer VP
WP	Washing Buffer	-	1:20 with Aqua dest.
Dilute samples 1:51 in Dilution Buffer VP, mix immediately, incubate max. 1h.			
Use 100 µl for each well in the assay.			
Before assay procedure bring all reagents to room temperature 20-25°C .			
Assay procedure in double determination			
Pipette	Reagents		Position
100 µL	Dilution Buffer VP (Blank)		A1/A2
100 µL	Standard A (0.1 ng/mL)		B1/B2
100 µL	Standard B (0.5 ng/mL)		C1/C2
100 µL	Standard C (1 ng/mL)		D1/D2
100 µL	Standard D (5 ng/mL)		E1/E2
100 µL	Standard E (10 ng/mL)		F1/F2
100 µL	Control Serum KS1	(1:51 diluted)	G1/G2
100 µL	Control Serum KS2	(1:51 diluted)	H1/H2
100 µL	Sample	(1:51 diluted)	in the rest of the wells according the requirements
Cover the wells with the sealing tape.			
Sample-Incubation: 1 h (+/- 5 Minutes) at 20-25°C, 350 rpm			
5x 300 µL	Decant the contents of the wells and wash 5 x with 300 µL each Washing Buffer WP/ well		In each well
100 µL	Antibody Conjugate AK		In each well
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation: 1 h (+/- 5 Minutes) at 20-25°C, 350 rpm			
5x 300 µL	Decant the contents of the wells and wash 5 x with 300 µL each Washing Buffer WP/ well		In each well
100 µL	Enzyme Conjugate EK		In each well
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation: 30 Minutes (+/- 5 Minutes) at 20-25°C, 350 rpm			
5x 300 µL	Decant the contents of the wells and wash 5 x with 300 µL each Washing Buffer WP/ well		In each well
100 µL	Substrate Solution S		In each well
Incubation: 30 Minutes (+/- 2 Minutes) in the Dark at 20-25°C			
100 µL	Stopping Solution SL		In each well
Measure the absorbance within 30 min at 450 nm with ≥ 590 nm as reference wavelength.			

9 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls are included in each assay. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance. The test results are only valid, if the test has been performed following the instructions. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state or local standards/laws.

9.1 Quality criteria

For the evaluation of the assay it is required that the absorbance values of the blank should be below 0.25, and the absorbance of standard E should be above 1.00. Samples, which yield higher absorbance values than **Standard E**, should be re-tested with a higher dilution.

Standard A (0.1 ng/mL) should be within +/-25% of its nominal value and $\leq 25\%$ CV. Standards B – E (0.5-10 ng/mL) should be within +/-20% of their nominal values and $\leq 20\%$ CV. Controls KS1 and KS2 should be $\leq 20\%$ CV and be within the specified range.

The assay is valid when both control sera KS1 and KS2 as well as 5/6 standards met the acceptance criteria specified.

10 EVALUATION OF RESULTS

10.1 Establishing of the standard curve

- 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 samples and standards
- 3) Plot the standard concentrations on the x-axis versus the mean value of the absorbance of the standards on the y-axis.
- 4) 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 **four parametric logistic (4-PL) curve fit** should be used for recalculation of IGFBP-6 concentrations.
- 5) The IGFBP-6 concentration in ng/mL of the samples and controls KS1 and KS2 can be calculated by **multiplication** with the **dilution factor of 1:51**.

10.2 Example of a typical standard curve

The following data is for demonstration only and cannot be used in place of data generation at the time of assay.

	Blank	A	B	C	D	E
ng/mL	0	0.1	0.5	1	5	10
OD (450-620 nm)	0.06	0.08	0.26	0.39	1.52	2.48

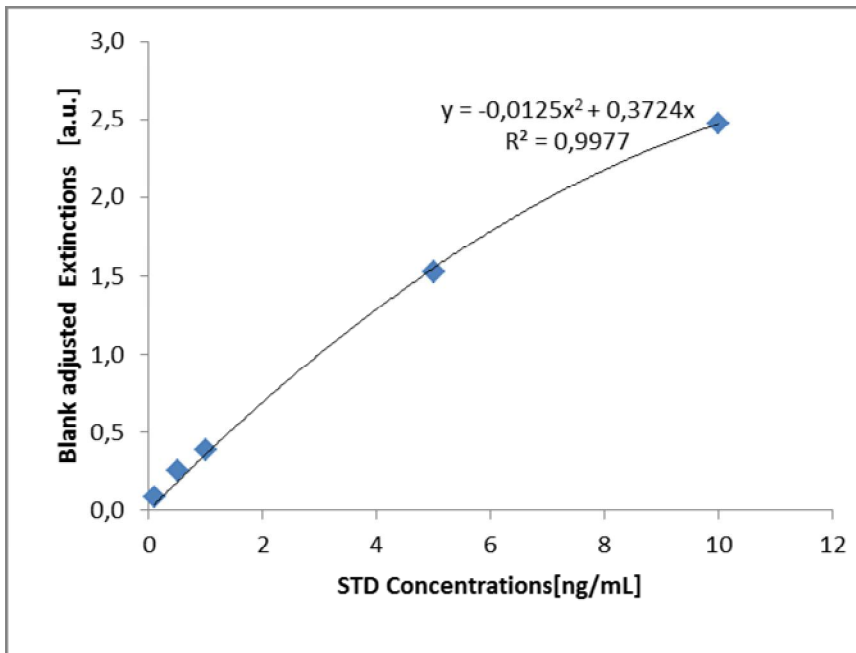


Figure 1 Exemplary Standard Curve

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

10.3 Exemplary calculation of IGFBP-6 concentrations

Sample dilution: 1:51

Measured extinction of your sample: 1.495

Measured extinction of the blank 0.055

Your measurement program will calculate the IGFBP-6 concentration of the diluted sample automatically by using the difference of sample and blank for the calculation. You only have to determine the most suitable curve fit.

In this exemplary case the following equation is solved by the program to calculate the IGFBP-6 concentration in the sample:

$$y = -0.0125x^2 + 0,3724x$$

$$1.44 = x$$

If the dilution factor (1:51) is taken into account the IGFBP-6 concentration of the undiluted sample is

$$1.44 \times 51 = 73.44 \text{ ng/mL}$$

10.4 Interpretation of results

The test is **for research use only**. Not for use in diagnostic procedures. Therefore, interpretation of test results depends on experimental settings and scientific question.

11 LIMITATIONS OF PROCEDURE / FACTORS INFLUENCING IGFBP-6

IGFBP-6 levels increase with age and are higher in men than in women, serum levels decrease during pregnancy and increase in renal failure. In vitro IGFBP-6 expression is influenced by cAMP, IGFs, retinoic acid, Vitamin D, p53 and glucocorticoids depending on the investigated cell model. TNF- β and β -catenin inhibit IGFBP-6 promoter activity (Bach, 2015).

The Mediagnost IGFBP-6 ELISA, E112 is based on polyclonal antibodies from rabbit. Generally, immunological assays are sensible to heterophilic antibodies and rheumatoid factors in the sample. Their influence is reduced by the assay design, but cannot be excluded completely.

12 REFERENCE VALUES

IGFBP-6 was measured in blood samples of healthy blood donors. Measured mean is 204 ng/mL (Range: 73 – 367).

13 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

13.1 Sensitivity

Sensitivity was assessed by measuring the signal of the blank at least 8 times within one test and calculating the theoretical concentration of 2SD of the mean signal measured. The analytical sensitivity of the Mediagnost E112 is on average 0.026 ng/mL, measured in 4 independent tests (Range 0.004 to 0.029 ng/mL).

Based on the minimal required dilution (1:20) and lowest calibration standard (0.1 ng/mL) the lower limit of quantification is 2 ng/mL in the undiluted sample.

13.2 Specificity

Influence of IGFs and IGFBP-2 to -5 on IGFBP-6 measurement was evaluated by direct measurement of potentially cross reactive substances in dilution buffer as well as on IGFBP-6 recovery in standard preparations.

Table 1 Specificity. Cross reactivity of IGF and IGFBPs in IGFBP-6 measurement. The recombinant proteins were diluted in assay buffer to the indicated concentrations and applied as sample. Further STD E was reconstituted in the enriched buffer and the IGFBP-6 concentration was measured. Here the the relative cross reactivity and recovery are shown at two concentrations of the IGFBPs and IGFs.

	IGFBP-2	IGFBP-3	IGFBP-4	IGFBP-5	IGF-I	IGF-II
[ng/mL]	250	600	250	250	500	500
Cross reactivity in VP [%]	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Recovery of STD E [%]	0	5	-3	-7	-5	-17
[ng/mL]	50	300	50	50	100	100
Cross reactivity in VP [%]	0,05	0,08	0,05	0,02	0,00	0,03
Recovery of STD E [%]	-3	2	-4	-9	-10	-9

13.3 Precision

Intra-Assay Variance

IGFBP-6 content of four samples was measured at least 12 times in the same assay. The results are shown in Table 2. The measured coefficient of variation (CV) is 1.1% on average.

Table 2 The Intra-assay variability. The IGFBP-6 concentration was measured 12 or more times in an assay and the variability was calculated as coefficient of variation (CV).

CV [%]	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Test 1	1,63	2,24	1,91	4,15
Test 2	1,65	1,99	2,45	2,49
Test 3	1,10	2,66	3,89	1,65
Test 4	4,57	4,06	4,09	1,48
Test 5	1,50	2,89	1,84	2,20
Test 6	1,56	2,43	3,18	1,87

Inter-Assay

IGFBP-6 content of 12 serum samples was measured in 11 or more independent assays. Exemplary results are shown in Table 3.

Table 3 Inter-Assay variability. Samples were diluted and IGFBP-6 content measured in independent assays.

Sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mean [ng/mL]	127	203	187	177	191	109	264	174	73	190	74	151
CV [%]	7	11	4	8	8	9	4	4	7	5	6	7
[n]	18	13	13	13	18	21	16	11	13	16	11	11

13.4 Linearity

Linearity of the Mediagnost E112 test system was tested by dilution (1:5 up to 1:640) of native sera with different IGFBP-6 contents (Sample 1-3). A comparison of expected and measured concentrations is shown in Figure 2. It becomes apparent that a dilution of 1:10 is not sufficient to allow linearity in all samples. These results were confirmed according to NCCLS/CLSI EP6-A 2003 standard by statistical analysis. A **minimal dilution of $\geq 1:20$** is required for linearity. The linearity of sample dilution is acceptable within the standard curve range.

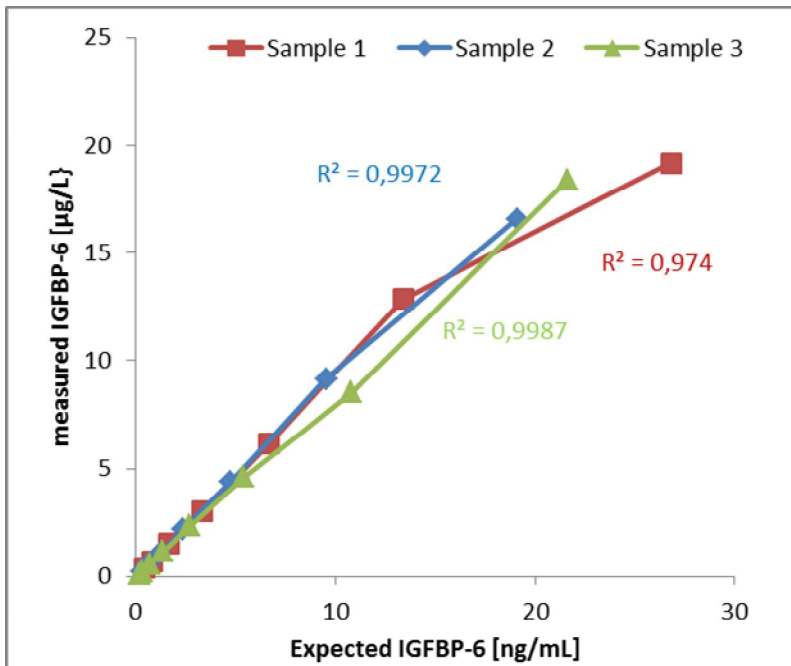


Figure 2 Linearity, measured IGFBP-6 concentrations are shown on y-axis in comparison to the theoretically expected concentration. Linearity up to a concentration of 0.5 ng/mL is given, provided the dilution is 1:20.

13.5 Recovery

Recombinant IGFBP-6 was added in different amounts to human serum. The IGFBP-6 content of the so enriched samples was measured and recovery in comparison to enriched buffer calculated. Results are shown in Table 4.

Table 4 Recovery of recombinant IGFBP-6 in human serum.

Recombinant IGFBP-6 was added in two different concentrations to three human serum samples. The IGFBP-6 content of enriched and non-enriched samples was measured and the relative recovery of added IGFBP-6 calculated.

rec. IGFBP-6 [ng/mL]	Recovery as relative expected value [%]		
	Sample 1	Sample 2	Sample 3
272	94.98	94.50	95.59
4.573	101.73	102.36	103.81

13.6 Interference

Interference of haemoglobin, bilirubin and triglycerides was tested by adding different amounts of these substances to human serum containing IGFBP-6. For comparison the same amount of buffer without any substance was also added to the serum. Table 5 demonstrates that neither haemoglobin, bilirubin nor triglycerides exert significant influence on the measurement of IGFBP-6 in human serum.

Table 5 Interference of physiologic substances on IGFBP-6 measurement. Recovery of IGFBP-6 after adding potentially interfering substances.

[%]	Triglyceride	Bilirubin	Hämoglobin
	100 mg/mL	200 µg/mL	5 mg/mL
Sample 1	99	96	68
Sample 2	96	100	74
Sample 3	108	107	81

13.7 Traceability / Assay Calibration

Recombinant IGFBP-6 produced by mammalian, eukaryotic cells and of >98% purity (SDS-PAGE, Silverstain) is used as standard within the assay. International Standard or Reference preparations are not available. Therefore, traceability is realized by Mediagnost internal serum panels.

13.8 Standard Curve

Uncertainty of the standards was measured as precision of recalculated standard concentration. Relative deviation corresponds to uncertainty. Variability of the recalculated STD concentrations was less than 20% for all standards, as well as %RE (Range -18.1 to 12.6%). Results are shown in Table 6.

The statistically significant differentiation of the signal intensity of STD A compared with the blank or STD B was also shown by Welch's t-test in three independent experiments (n = 8, p <0.01).

Table 6 Uncertainty of the standards. Comparison of the recalculated IGFBP-6 concentrations of the individual standard points of six independent tests is shown. The calculation was based on the 2nd degree polynomic function for curve fitting.

	STD A	STD B	STD C	STD D	STD E
[ng/mL]	0.1	0.5	1	5	10
Test 1	0.10	0.50	1.01	5.00	10.00
Test 2	0.10	0.46	0.98	5.02	9.99
Test 3	0.09	0.59	0.97	4.99	10.01
Test 4	0.13	0.51	1.02	4.99	10.00
Test 5	0.11	0.48	0.99	5.01	10.01
Test 6	0.11	0.51	0.99	5.00	10.00
Mean [ng/mL]	0.11	0.51	0.99	5.00	10.11
CV [%]	12	9	2	0	0

13.9 Cross reactions with animal samples

Several commercially available animal sera have been used as samples in the Mediagnost IGFBP-6 ELISA E112 in a dilution of 1:51 no significant signal (< STD A) was detected. Thus, this assay cannot be used for IGFBP-6 measurement in serum samples of cat, cattle, chicken, dog, donkey, goat, guinea pig, horse, mouse, pig, rabbit, rat and sheep.

14 Literatur / Literature

Taferner A, Micutkova L, Hermann M, Pidder JD, Pircher H Purification and characterization of native human insulin-like growth factor binding protein-6 J Cell Commun. Signal (2011) 5:277-289.

Bach LA Recent insight into the actions of IGFBP-6. J Cell Commun Signal (2015) 9(2):189-200.

Example Version

Example Version

Example Version

International Assay Description

A-E	STD	Rec in 750 µL	BUF VP	-
KS1	Control	Rec in 250 µL	BUF VP	1:51 DILU BUF VP
KS2	Control	Rec in 250 µL	BUF VP	1:51 DILU BUF VP
WP	WASHBUF 20x	-	-	1:20 DILU A. dest.
-	SPE	-	-	1:51 DILU BUF VP
-	°C 20-25 °C ; A max. 1 h; ↔ max 350 rpm			
100 µL	BUF VP			A1/A2
100 µL	STD A (0.1 ng/ml)			B1/B2
100 µL	STD B (0.5 ng/ml)			C1/C2
100 µL	STD C (1 ng/ml)			D1/D2
100 µL	STD D (5 ng/ml)			E1/E2
100 µL	STD E (10 ng/ml)			F1/F2
100 µL	CONTROL KS 1	1:51	DILU BUF VP	G1/G2
100 µL	CONTROL KS 2	1:51	DILU BUF VP	H1/H2
100 µL	SPE	1:51	DILU BUF VP	
TAPE				
A 1 h °C 20-25 ↔ 350 rpm				
5x 300 µL	5x WASHBUF WP			
100 µL	Ab AK			
TAPE				
A 1 h °C 20-25 ↔ 350 rpm				
5x 300 µL	5x WASHBUF WP			
100 µL	CONJ EK			
TAPE				
A 0.5 h °C 20-25 ↔ 350 rpm				
5x 300 µL	5x WASHBUF WP			
100 µL	SUBST TMB S			
A 0.5 h °C 20-25 *				
H ₂ SO ₄ SL				
MEASURE				