

Vaspin ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von
humanem VASPIN

Deutsch

Enzyme Immunoassay for quantitative Determination of
human VASPIN

English

**Nur zu Forschungszwecken.
Nicht zur diagnostischen Anwendung geeignet.**

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



96

REF

E106



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>

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/ Aegumiskuurpäev/ 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 gebruiksaaanwijzing volgen/ Se brugsanvisningen/ Läs anvisningarna före användning/ Proszę przeczytać instrukcję obsługi/ Vegye figyelembe a használati utasításban foglaltakat/ Postupujte podľa pokynov na použítie/ Dodržujte návod k použití/ Моля, спазвайте инструкцията за употреба/ Palun järgige kasutusjuhendit./ Λάβετε υπόψη σας τις οδηγίες χρήσης/ Vá rugám sa respectați instrucțiunile de utilizare/ Upozorite 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-Batchcode/ Partisatskod/ Numer serii/ Tétel-szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/Partii – partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-număr lot/ Številka serie/ 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/ Τοοτή/ Κατασκευάζεται από/ Produs de/ Proizvajalec/ Valmistaja



Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referência/ Referentienummer/ Referencenummer /Beställningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/Katalógové číslo/ Objednací číslo/Каталожный 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/ Armazenar entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevaars mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí/ Температурно ограничение/ Säilitada temperatuuridel/ Φύλαξη σε θερμοκρασία/ Depozitare între/ Skladiščenje med/ Säilytys x-y Celsiusasteen lämpötilassa



Contains sufficient for x tests/ Inhalt ausreichend für x Tests/ Contient suffisant pour x tests/ 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/ Innehåller räcker till x analyser/ Zawartość na x testów/ Tartalma a 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/ Napufenyti távol tartandó/ Nevystavovat' slonečnému svetlu/ Nevystavovat' slunečnímu světlu/ Да се предпазва от слънчева светлина/ Kaitsa otsese päikesekiirguse eest/ Κρατήστε το μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία/ Τίnete! departe de lumina soarelui/ Ne izpostavljajte sončni svetlobi/ soiaua aurinگونوالتا



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/ Επώση στους/ Incubare la/ Inkubacija pri/ inkubaatiolämpötila



Shaking/ Schütteln/ Mélanger/ Agitare/ Agitar/ Agitação/ Schudden/ Ryster/ Skaka/ Wstrząsanie/ Rázás/ Pretrepat/ Protřepat/ Разклашание/ Raputada/ Ανακινήστε/ Vibrare/ Stresite/ Sekoita



Mikrotiterplate/ Mikrotiterplatte/ plaque de microtitrage/ Piastra di microtitolazione/ Placa de microtitulación/ Placa de Microtitulação/ mikrotiterplaat/ Mikrotiterplade/ mikrotiterplatta/ mikrotiterplaat/ Płyka mikrotiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiiterplaat/ Τρυβλίο μικροπιλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitrská plošča/ Mikrotitrauslevy



Reconstituieren in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer nel/ Reconstituer en/ reconstitueren in/
Rekonstitúér i/ rekonstituera/ Rekonstytuować w/ Helyreállítás/ Znovu pripravíť za/ Znovu připravit za/ Разтваряне в/
Moodustada uuesti / Αναστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ rekonstruoi



Sample/ Probe /Echantillon/ campione/ Muestra/ Amostra/ monster/ Prøve/ prov/ Próbká/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/
Proov/ Δείγμα/ Probǎ/ Vzorec/ Näyte



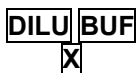
AK Antikörper und Enzym Konjugat/ anticorps conjugué et conjugué enzymatique/ Coniugato di anticorpo ed enzima/ Conjugado de anticuerpos y enzimas/ Conjugado Anticorpo-Enzima/ antilichaamen enzymconjugaat/ Antistoffer og enzym-konjugat/ antikropps- og enzymkonjugat (antikropp og enzym, konjugat)/



EK Koniugat antyciaŕ i enzymów/ Antitest és enzim páros/ Protílátkový a enzymatický konjugát/ Protílátkový a enzymatický konjugát/ Антителο и энзим конюгат/ Antikehad ja ensüümi konjugaat/ Σύνπλοκο αντισώματος-enzύμου/ Campyidín antyciar si enzim/ Antikésses in konjugát enzímok/ Mosto sime je antipari konjugati



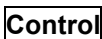
VP *bufer* / *puffer*/ *Tampoon* / *Tampone* / *Tampón* / *Tampão* / *buffer*/ *buffer*/ *buffer*/ *Bufer* / *puffer*/ *pufer*/ *pufr*/ *бүфер*/ *буфер*/ *ουθυιστικό διάλυμα* / *Tampoon* / *pufer*/ *puskariljuus*



Dilute in Buffer X/ Verdünnen in Puffer X/ Diluer dans le tampon X/ Diluire nel tampone X/ Diluir en tampón X/ Diluir no Tampão X/ verdunnen in buffer X/ Fortyndes i buffer X/ späđ i buffert X/ RozcieŃczanie w buforze X/ Hígítás X pufferben/ Riediti' v pufrí X/ Ředit v pufru X/ Разреждање в буфер X/ Lahjendada puhvris X/ Αραιώστε σε ρυθμιστικό διάλυμα X/ Diluati în tamponul X/ Razredčiti v pufru 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 / Standard X / Стандарт X / Standard X / Πρότυπο X / Standard X / Standardni X / Kalibraattori X



KS1	Control Serum / Kontrollserum/ Contôile sérique/ Siero di controllo/ Suero de control/ Soro de Controlo/
KS2	controleserum/ Kontrolserum/ Kontrollserum/ Serum kontrolne/ Ellenőrző szérum/ Kontrolné sérum/ Kontrolní sérum/

WASHBUF 20x	WP	Κοντρόλεν серум/ Kontrollseerum/ Ορός ελέγχου/Ser de control/ Kontrolni serum/ Kontrolli seerumi Washing Buffer Concentrate/ Waschpufferkonzentrat/ Tampon de lavage conc./ Tampone di lavaggio concentrato/ Tampón de lavado concentrado/ Tampão de Lavagem Concentrado/ wasbuffer, geconcentreerd/ Vaskebufferkoncentrat/ Vaskebufferkonzentrat/ tvättbuffertkoncentrat/ Bufor płukania koncentrat/ Mosópuffer koncentrátum/ Koncentrát vymývacieho pufru/ Концентрат на промивен буфер/ Pesupuhvi kontsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralnega pufra/ Pesuliuositiiviste
WASHBUF		Washing Buffer / Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón 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/ Κυβερταρ Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraatiliuos
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 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 plytkę/ Tányér leragasztása/ Oblepiti podložku lepiacou páskou/ Olepit podložku lepicí páskou/ Плака с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerikleelindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperiti placa cu o bandă adezivă/ Prelepiti ploščo/ Peitā 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 plate 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/ Bibliografia/ Literatura documentaço/ 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/ 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 /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

Mediagnost Vaspin ELISA E106	5
Zweckbestimmung	5
Einführung	5
MATERIALIEN	6
Inhalt der Testpackung	6
Zusätzlich benötigte Materialien	6
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	7
METHODE	8
Proben	8
Lagerung der Proben	8
Probenvorbereitung	8
TECHNISCHE HINWEISE	8
TESTDURCHFÜHRUNG	10
Berechnung der Standardkurve	11
Assay Eigenschaften und Leistungsdaten	12
Standards	12
Sensitivität	12
Spezifität	12
Wiederfindung	13
Reproduzierbarkeit und Präzision	14
Linearität	15
Assay Bereich	15
Korrelation mit einem anderen Testsystem	15
Referenzwerte	16

Package Insert English

Mediagnost Vaspin ELISA E106	17
INTENDED USE	17
INTRODUCTION	17
MATERIALS PROVIDED	18
MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	18
WARNINGS AND PRECAUTIONS	19
METHOD	19
SPECIMEN	20
Storage of the samples	20
Sample Preparation	20
TECHNICAL RECOMMENDATIONS	20
ASSAY PROCEDURE	22
ESTABLISHING THE STANDARD CURVE	23
PERFORMANCE CHARACTERISTICS	24
Standards	24
Sensitivity	24
Specificity	24
Recovery	25
Reproducibility and Precision	27
Linearity	27
Assay Range	28
Correlation with another test system.	28
Reference values	28
Literature / Literatur	29
KURZANLEITUNG MEDIAGNOST VASPIN ELISA E106	30
SUMMARY Mediagnost VASPIN ELISA E106	31
REF E106 International Test Description	32

Packungsbeilage Deutsch

Mediagnost Vaspin ELISA E106

- ist geeignet für die Messung von Vaspin in humanem Serum
- ist mit einem Limit of the Blank von 4 pg/ml sehr sensitiv
- ist schnell: Inkubationszeit von 3,5 Stunden
- Einzel-Standards mit **10, 75, 200, 500, 1000 pg/ml** humanem Vaspin
- 2 Kontrollen, für die Qualitätskontrolle nach GLP
- ist kalibriert mit **rekombinantem Vaspin**

Zweckbestimmung

Messung von humanem Vaspin in Serumproben für Forschungszwecke!

Einführung

Der ELISA für die quantitative Messung von humanem Vaspin basiert auf polyklonalen Antikörpern aus Kaninchen, die mittels genetischer Immunisierung gewonnen wurden (cDNA Vaspin SC306941).

Vaspin auch bekannt unter dem Namen Serpin A12 ist ein Serinprotease Inhibitor und besteht 395 Aminosäuren, die 3 β -Faltblätter und 9 α -Helices bilden. Das Molekulargewicht von Vaspin beträgt ungefähr 45.2kDa. Es ist nicht bekannt, dass Vaspin Multimere bildet oder intramolekulare Disulfidbindungen besitzt. Bisher konnten im menschlichen Serum keine Vaspin bindenden Proteine nachgewiesen werden. Die Expression des Vaspin Gens wurde nicht nur in subkutanen und viszeralen Fettgewebe sondern auch in Lebergewebe, Pankreas¹ und der Epidermis, in granulären Keratinocyten und GK Zellen gezeigt².

Die Serum Vaspinkonzentrationen zeigen einen ausgeprägten diurnalen Rhythmus. Sie sind am frühen Morgen, vor dem Frühstück am höchsten und fallen dann ab. Ein solcher präprandialer Anstieg und eine postprandiale Abnahme konnten auch am Mittag und Abend gezeigt werden. Die niedrigste Vaspinkonzentration im Tagesverlauf tritt am Nachmittag auf, dann beginnt ein Anstieg der Konzentration während der Nacht. Die Spitzenwerte liegen bis 250% höher als der Nadir. Damit zeigt Vaspin eine gegenläufige Regulation zu Insulin und Glukose³.

Bei der Messung von Vaspin ist weiterhin zu berücksichtigen, dass die Vaspinkonzentration stark vom Geschlecht abhängig ist. Die Vaspin Level sind höher bei Mädchen und steigen mit dem Alter und dem Fortschreiten der Pubertät.^{1,4} Bei der Beurteilung von Vaspinkonzentration muss ebenfalls berücksichtigt werden, dass Kontrazeptiva zu einem signifikanten Anstieg des Vaspingehalts im Serum führen⁴.

Die Serumkonzentration von Vaspin ist unabhängig vom BMI aber negativ mit der Insulinresistenz und Adipositas assoziiert, daher steigt die Vaspinkonzentration bei sich verschlechternder Insulinresistenz¹. Bei therapeutischer Intervention durch Pharmaka sinkt der Vaspinspiegel wieder⁵. Lebensstilinterventionen führen dagegen, zumindest innerhalb von 10 Monaten, nicht zu einer Abnahme des Vaspingehalts im Serum⁶.

Vaspin könnte jedoch ein Bindeglied zwischen den endokrinen und inflammatorischen Prozessen darstellen, die an der Entstehung von Arteriosklerose oder Diabetes beteiligt sind. Einen Hinweis darauf liefern Untersuchungen, die zeigen, dass Vaspin die TNF- α induzierte

Adhäsion von Monozyten an glatte Muskelzellen sowie die durch TNF- α induzierte intrazelluläre Signalkaskade hemmt.⁸

Der diagnostische Nutzen von Vaspin bleibt damit unklar, insbesondere aufgrund von widersprüchlichen Ergebnissen zur Korrelation mit der Insulin Resistenz im Kindes- und Erwachsenenalter^{1, 4}.

Der Mediagnost Vaspin ELISA ist ein Werkzeug, um die Bedeutung von Vaspin als Biomarker weiter zu untersuchen.

MATERIALIEN

Inhalt der Testpackung

1)	MTP	Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen , die in 12 abnehmbare Streifen à 8 Vertiefungen (einzelne abbrechbar) aufgeteilt ist. Die Platte ist mit einem Antikörper gegen humanes Vaspin beschichtet
2)	STD	Standards A-E , lyophilisiert, enthalten rekombinantes Vaspin. Die Verdünnungen der Standardkurve decken einen Bereich von 10 bis 1000 pg/ml (10, 75, 200, 500, 1000 pg/ml) Vaspin ab und werden mit je 750 µl Verdünnungspuffer VP rekonstituiert. Für den Assay werden jeweils 100 µl pro Vertiefung eingesetzt.
3)	BUF	Verdünnungspuffer VP, 120 ml , gebrauchsfertig, bitte für Rekonstitution der Standards A – E und Kontrollseren KS1 und KS2 sowie für die Verdünnung der Proben und Kontrollseren KS1 und KS2 verwenden.
4)	Control	Kontrollseren KS1/KS2 lyophilisiert, enthalten humanes Serum und müssen in je 250 µl Verdünnungspuffer VP rekonstituiert werden. Die Vaspin Soll-Konzentrationen und die Schwankungsbereiche sind auf den Etiketten angegeben. Sie sollten im Assay in den gleichen Verdünnungen wie die jeweiligen Proben bestimmt werden. Für den Assay werden jeweils 100 µl pro Vertiefung eingesetzt.
5)	Ab	Antikörperkonjugat AK, 12 ml , gebrauchsfertige Lösung, enthält biotinylierten anti-Vaspin Antikörper. Für den Assay werden 100 µl pro Vertiefung eingesetzt.
6)	CONJ	Enzymkonjugat EK, 12 ml , gebrauchsfertige Lösung, enthält POD(Meerettich-Peroxidase)-markiertes Streptavidin Für den Assay werden 100 µl pro Vertiefung eingesetzt.
7)	WASHBUF 20x	Waschpuffer WP, 50 ml , 20-fach konzentrierte Lösung, bitte vor Gebrauch 1:20 mit A.dest. oder entmineralisiertem Wasser verdünnen (z.B. den gesamten Flascheninhalt von 50 ml im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen). Achtung: Endverdünnt ist der Waschpuffer max. 4 Wochen haltbar, nur nach Bedarf ansetzen.
8)	SUBST	Substrat S, 12 ml , gebrauchsfertig, Meerettich-Peroxidase-(POD)-Substrat, stabilisiertes H ₂ O ₂ -Tetramethylbenzidin
9)	H₂SO₄	Stopplösung SL, 12 ml , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure
10)		3x Abdeckfolie für die Mikrotiterplatte, selbstklebend

Zusätzlich benötigte Materialien

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

Messbehälter für Verdünnung von Waschpuffer

Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen

Vortex-Mischgerät

Mikrotiterplattenschüttler (350 rpm)

Mikrotiterplattenwisher (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 E106 Kit ist nur zu Forschungszwecken und nicht zur diagnostischen oder 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.

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.

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

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

Generelle 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.

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

Essen, Trinken und Rauchen ist in diesem Bereich verboten. Niemals mit dem Mund pipettieren.

Direkter Kontakt mit diesem Material muss vermieden werden. Deshalb Laborkleidung und Einmalhandschuhe tragen. Verschüttete Reagenzien müssen sofort aufgewischt und kontaminierte Flächen und Geräte mit einem geeigneten Detergens gereinigt werden.

Menschliches Serum:

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

Das humane Material, das für die Präparation dieses Produktes verwendet wird, wurde auf Antikörpern gegen Humanes Immundefizienz-Virus (HIV I und II), gegen Hepatitis B-Oberflächenantigen und gegen Hepatitis C Virus geprüft. Das Testergebnis war negativ. Da kein Test das Vorhandensein von infektiösen Erregern völlig ausschließen kann, sollten die Reagenzien gemäß der Vorgaben der Biosicherheitsstufe 2 gehandhabt werden.

Reagenzien A-E, AK, EK, VP, WP enthalten < 0,01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one Solution als und / oder < 0,01% (w/w) 5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one und 2-methyl-2H-isothiazol-3-one als Konservierungsmittel: Nicht einnehmen. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung und -handschuhe tragen. Berührung mit Haut, Augen und Kleidung vermeiden. Im Falle von Haut- oder Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen. Bei Einnahme oder Augenkontakt Arzt aufsuchen.

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.

METHODE

Der ELISA zum Nachweis von Vaspin ist ein Sandwich – Immunoassay. Er besteht aus spezifischen, hoch affinen polyklonalen Antikörpern gegen Vaspin. Das Vaspin in den Proben bindet an den, auf der Mikrotiterplatte, immobilisierten 1. Antikörper. Im folgenden Schritt bindet ein mit Biotin konjugierter Antikörper an das Vaspin. Nach einem Waschschriff wird das Streptavidin-Peroxidase Konjugat zugegeben. Die Peroxidase katalysiert die enzymatische Reaktion durch welche sich die Farbe des Substrats ändert. Die Färbung wird umso intensiver, desto mehr Vaspin in der Probe enthalten ist.

Proben

Serum Proben sind für diesen Test geeignet.

Lagerung der Proben

Es wird empfohlen die Proben bei -20°C in dicht verschlossenen Plastikgefäßen zu lagern. Informationen zur Langzeitstabilität von Vaspin stehen noch nicht zur Verfügung.

Probenvorbereitung

Die Proben werden mit Verdünnungspuffer (VP) verdünnt. In der Regel scheint eine Verdünnung von **1:4 mit Verdünnungspuffer VP** ausreichend. Die sehr gute Linearität des Testsystems ermöglicht Verdünnungen von 1:2 – 1:32

Die Vaspinkonzentrationen in unterschiedlichen Körperflüssigkeiten und Zellkulturüberständen können sich stark unterscheiden.

Vorgeschlagenes Verdünnungsprotokoll:

Pipettieren Sie **210 µl Verdünnungspuffer VP** in PE-/PP-Tubes (bei größeren Probenzahlen empfehlen wir die Verwendung eines Multi-Steppers), geben Sie **70 µl Serum hinzu** (Verdünnung 1:4). Mischen Sie die verdünnte Probe gut und nutzen Sie 100 µl der verdünnten Probe pro Vertiefung.

TECHNISCHE HINWEISE

Der Assay ist strikt nach dem Testprotokoll durchzuführen.

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

Bei sachgemäßer Handhabung beträgt die Haltbarkeit der Reagenzien nach Öffnung 4 Wochen.

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

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

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

Korrektes Waschen ist von grundlegender Bedeutung für den sicheren, richtigen und präzisen Ablauf des Testes. Ungenügendes Waschen ist eine häufige Ursache für nicht valide Testdurchführungen. Mögliche Folgen sind unkontrollierte unspezifische Variationen der

gemessenen optischen Dichten, die zu falschen Ergebnisberechnungen der Proben führen können. Mögliche Hinweise darauf sind z.B. hohe Leerwerte und variabel streuende Messwerte.

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

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

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

Für die **Rekonstitution** der lyophilisierten **Standards A-E und Kontrollen KS1 und KS2** muss der im Kit erhaltene **Verdünnungspuffer VP** verwendet werden. Die Kontrollen **KS1** und **KS2** 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 einen Monat gelagert werden. Wiederholte Gefrier-/Tauzyklen sind zu vermeiden.

Waschpuffer

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

Mikrotiterplatte

Nicht verwendete Streifen der Mikrotiterplatte sind zusammen mit dem Trockenkissen luftdicht in dem wiederverschließbaren Klippbeutel bei 2° - 8°C zu lagern. Die Haltbarkeit nach dem Öffnen beträgt 4 Wochen.

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 Antikörperkonjugat AK, das Enzymkonjugat EK sowie nachfolgend die Substratlösung S sollten in der gleichen Reihenfolge und in dem gleichen Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Ebenso sollte die Stopplösung SL in der gleichen Reihenfolge und im gleichen Zeitintervall wie die Substratlösung auf die Mikrotiterplatte gegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

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

- 1) In die Vertiefungen A1/A2 werden **100 µl Verdünnungspuffer VP** pipettiert (Leerwert).
- 2) In die Positionen B1/2 werden je **100 µl Standard A (10 pg/ml)** gegeben, sowie in die Positionen C1/2 je **100 µl Standard B (75 pg/ml)**, in die Positionen D1/2 je **100 µl Standard C (200 pg/ml)**, in die Positionen E1/2 je **100 µl Standard D (500 pg/ml)**, in die Positionen F1/2 je **100 µl Standard E (1000 pg/ml)**. Zur Kontrolle der korrekten Durchführung des Tests können je **100 µl** der 1:4 (oder im jeweiligen Verdünnungsverhältnis der Proben) verdünnten **Kontrollen 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. 1:4 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) Nach dem letzten Waschschrift werden **100 µl des Antikörperkonjugats AK** in die Vertiefungen der Platte pipettiert. Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **1 Stunde** bei **Raumtemperatur** inkubiert (unter Schütteln 350 rpm).
- 6) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Lösungen abgesaugt und die Platte mit **300 µl Waschpuffer WP** / Vertiefung **fünfmal** gewaschen.
- 7) **100 µl des Enzymkonjugates EK** werden in jede Vertiefung pipettiert und **1 Stunde** (unter Schütteln 350 rpm).
- 8) Nach Abschluss dieser Inkubation wird die Platte wie im Schritt 4) beschrieben gewaschen
- 9) In jede Vertiefung werden **100 µl der Substratlösung S** pipettiert.
- 10) Die Platte wird **30 Minuten im Dunkeln** bei **Raumtemperatur** inkubiert.
- 11) **Nach** Ablauf der Inkubationszeit wird in jede Vertiefung **100 µl Stopplösung SL** pipettiert.
- 12) Die Ausmessung der Farbreaktion erfolgt **innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)**.

Berechnung der Standardkurve

Zur Auswertung des Testes sollte gewährleistet sein, dass die Extinktionen des Leerwertes 0,25 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 Vaspinkonzentrationen:

Standard	A	B	C	D	E
ng/ml	0,01	0,075	0,20	0,50	1,0
pg/ml	10	75	200	500	1000

- 1) Ermittlung des **Mittelwerts** der optischen Dichte des Leerwertes aus den Doppelbestimmungen (Vertiefung A1/A2).
- 2) Von den Mittelwerten der optischen Dichte der Standardkonzentrationen und der Proben wird der mittlere Leerwert abgezogen.
- 3) Die Standardkonzentrationen (x-Achse) werden gegen die gemessene optische Dichte (y-Achse) aufgetragen.
- 4) Die Berechnung der Standardkurve sollte durch ein statistisches Programm erfolgen z.B. **lineare Regression, 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 Vaspingehaltes mit dem entsprechenden **Verdünnungsfaktor** der Proben ergibt die Vaspinkonzentration **in ng/ml** (oder pg/ml je nach gewählter Einheit der Standards).

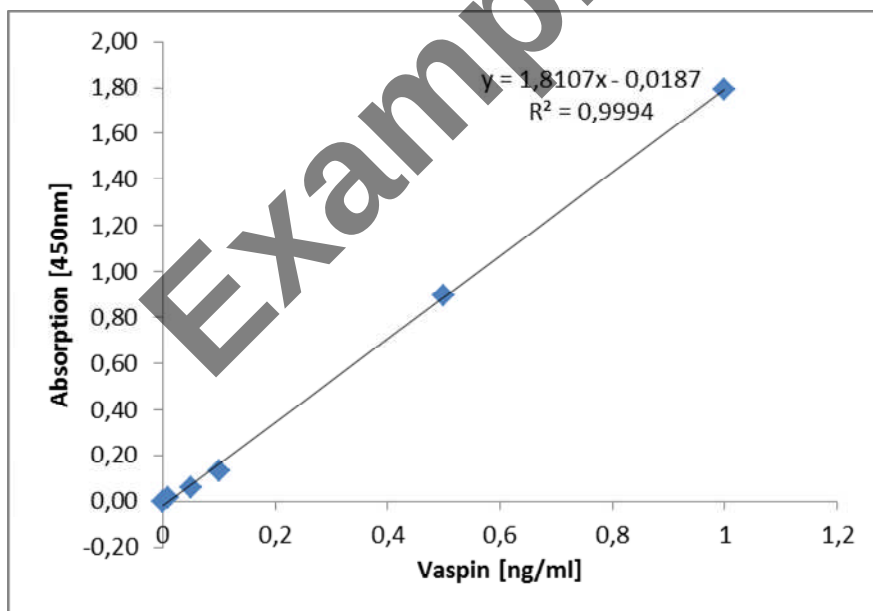


Abb. 1: Exemplarische Standardkurve mit linearer Regression als Auswertalgorithmus.

Die exemplarische Standardkurve in Abbildung 1 kann **nicht** für die Berechnung der Testergebnisse genutzt werden! Für jeden Test muss eine eigene Standardkurve mitgeführt werden.

Exemplarische Berechnung des Vaspingehaltes eines 1:4 verdünnten Serums:
Gemessene Extinktion der Proben ($OD_{450} - OD_{620}$) 0,56

Gemessene Extinktion des Leerwerts ($OD_{450} - OD_{620}$) 0,03

Das Messprogramm berechnet die Vaspinkonzentration der verdünnten Probe automatisch aus dem Leerwert-korrigierten Messwert (0,56 - 0,03). Sie als Anwender müssen dafür nur die geeignete Kurvenanpassung auswählen.

Im hier gezeigten Beispiel wird die folgende Gleichung durch das Programm genutzt, um die Konzentration des Analyten in der Probe zu berechnen:

$$0,53 = 1,8107x - 0,0187$$

$$0,303 = x$$

Bei einem Verdünnungsfaktor von 1:4 ergibt sich für die unverdünnte Probe die folgende Vaspinkonzentration:

$$0,303 \times 4 = 1,212 \text{ ng/ml}$$

Assay Eigenschaften und Leistungsdaten

Standards

Die Standards bestehen aus gereinigtem rekombinantem Vaspin in den Konzentrationen 10; 75; 200; 500 und 1000 pg/ml.

Sensitivität

Zur Bestimmung der analytischen Sensitivität wird das „Limit of the Blank“ durch die Messung von 20 Leerwerten in einem Test ermittelt. Aus der Standardabweichung der Messwert erfolgt dann die Berechnung der Vaspinkonzentration, die sicher vom Leerwert unterschieden werden kann. Die niedrigste messbare Vaspinkonzentration beträgt bei 1 SD vom Leerwert 4 pg/ml (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1: Analytische Sensitivität

Standard Abweichung [a.u.]	1 SD Vaspin [ng/ml]	3 SD Vaspin [ng/ml]	10 SD Vaspin [ng/ml]
0,015	0,004	0,012	0,037

Spezifität

Die Spezifität der eingesetzten polyklonalen Antikörper wurde auf zwei Wegen charakterisiert. Zum einen wurden die Bestandteile eines nativen humanen Serums mittels Größenausschluß-Chromatografie aufgetrennt und die Fraktionen im Vaspin ELISA getestet. Zweitens wurden die im ELISA positiv getesteten Fraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit den polyklonalen Antikörpern analysiert.

Abbildung 2 zeigt, dass der ELISA in den Fraktionen bei 36 kDa ein Signal liefert und dieses Ergebnis wird durch den Western Blot bestätigt. Die theoretische Größe von Vaspin beträgt 45,2 kDa.

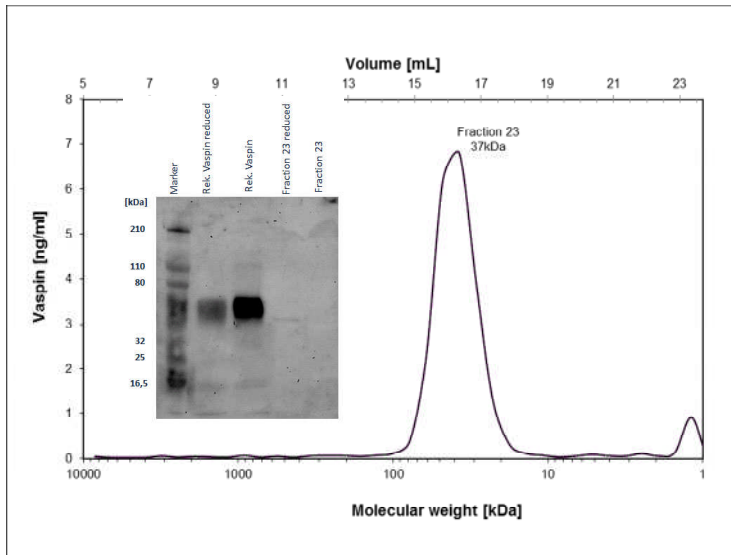


Abbildung 2: Spezifität des Mediagnost Vaspin ELISA.

Humanes Serum (250 µL) wurde mittels SEC Superdex 10/300GL aufgetrennt, die Fraktionsgröße betrug 0,5 ml und die Fließgeschwindigkeit 0,5 ml/min. Die Fraktionen wurden dann 1:4 in Verdünnungspuffer verdünnt und im ELISA als Proben eingesetzt. Die Einfügung zeigt das Ergebnis des Western Blots. Die Proben wurden durch eine 10% SDS PAGE aufgetrennt und mit dem biotinylierten Antikörper aus dem Testsystem in einer Verdünnung von 1:1000 sowie einem Streptavidin Peroxidase Konjugat (1:1500) angefärbt.

Wiederfindung

Zur Evaluation von möglichen Störfaktoren in Serumproben und um die Richtigkeit der Vaspinmessung beurteilen zu können, wurden Anreicherungsversuche durchgeführt. Verschiedene humane Seren wurden mit zwei unterschiedlichen Mengen an Vaspin versetzt. Zur Kontrolle wurden die gleichen Mengen Vaspin zum Verdünnungspuffer gegeben. Die Auswertung erfolgte durch die Berechnung der relativen Wiederfindung in Bezug auf die im Puffer gemessenen Vaspinkonzentrationen.

Tabelle 2: Wiederfindung von rekombinantem Vaspin in humanen Serumproben.

	Endogener Vaspingehalt [ng/ml]	Serum angereichert mit 50 pg/ml [ng/ml]	Serum angereichert mit 500 pg/ml [ng/ml]
Rekombinantes Vaspin in Puffer		0,052	0,408
Probe 1 Wiederfindung [%]	0,233	0,271 95	0,591 87
Probe 2 Wiederfindung [%]	0,1055	0,139 88	0,455 89
Probe 8 Wiederfindung [%]	0,2595	0,302 97	0,705 99
Probe 9 Wiederfindung [%]	0,517	0,588 103	1,013 102
Probe 4 Wiederfindung [%]	0,118	0,151 89	0,432 77
Probe 5 Wiederfindung [%]	0,744	0,943 118	1,066 79
Probe 17 Wiederfindung [%]	1,457	1,601 106	1,915 95
Probe 18 Wiederfindung [%]	0,2895	0,345 101	0,695 92

Die Wiederfindungsrate reicht von 77-102% bei 500 pg/ml und 88 – 118% bei 50 pg/ml Anreicherung, im Durchschnitt wurden **97%** des hinzugefügten Materials wiedergefunden.

Reproduzierbarkeit und Präzision

Tabelle 3: Inter-Assay-Variation (Ergebnisse von 3 unabhängigen Messungen)

	Anzahl	Mittelwert [ng/mL]	VK%
Serum 1	9	0.189	8.55
Serum 2	9	0.823	4.52
Serum 3	9	2.885	4.75

Tabelle 4: Intra-Assay-Variation

	Anzahl	Mittelwert [ng/mL]	VK%
Serum 1	20	0.226	2.85
Serum 2	20	1.192	3.81
Serum 3	20	1.536	1.42

Linearität

Die Linearität der Serumverdünnung ist über einen weiten Bereich sehr gut. Zwei Serumproben mit hohem bzw. niedrigem Vaspingehalt wurden seriell verdünnt und die Verdünnungen im ELISA gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 dargestellt.

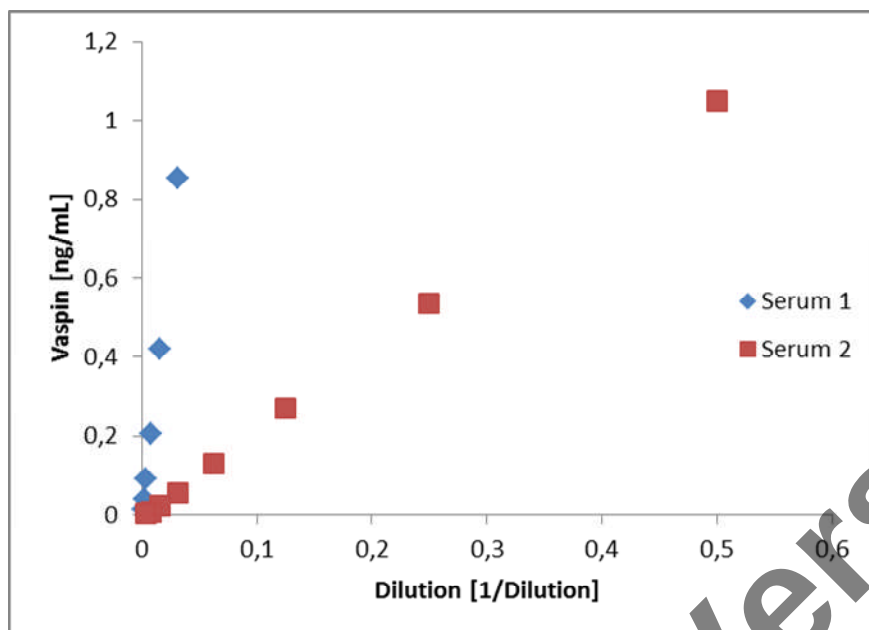


Abbildung 3: Linearität. Zwei Serumproben werden seriell verdünnt und die Vaspin Konzentration in jeder Verdünnung wurde gemessen.

Assay Bereich

Wenn keine Extremwerte zu erwarten sind, sollten Verdünnungen von 1:4 in Verdünnungspuffer (VP) für die meisten Untersuchungen geeignet sein, damit ergibt sich ein Assay-Bereich von 4 pg/ml - 4000 pg/ml.

Korrelation mit einem anderen Testsystem

Der Mediagnost Vaspin ELISA wurde einem kommerziell verfügbaren Vaspin ELISA verglichen. Wie die Abbildung 4 zeigt, korrelieren beide Testssysteme sehr gut miteinander. Nur die absolute Quantifizierung unterscheidet sich um den Faktor 2, was auf Unterschiede in der Kalibration / dem Kalibrationsmaterial zurückzuführen ist.

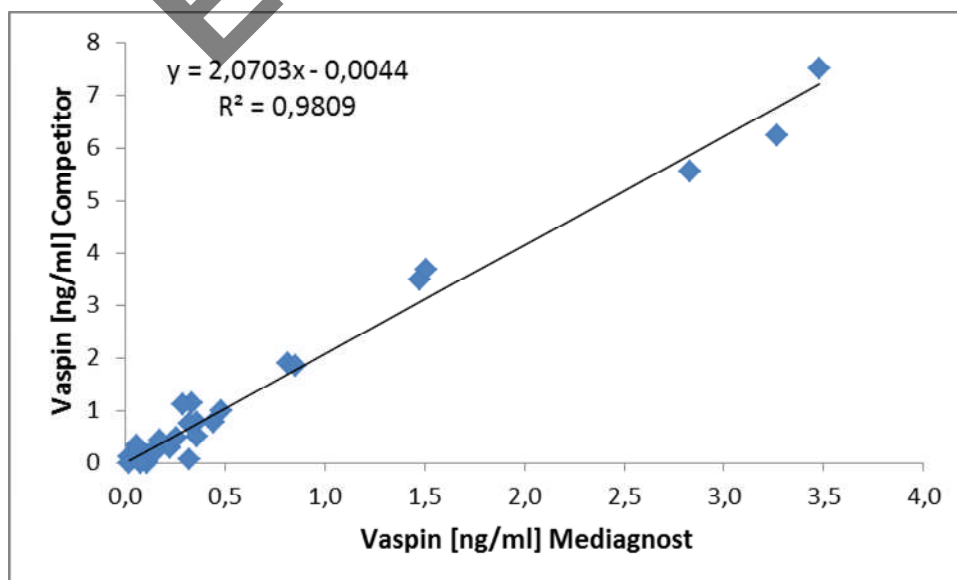


Abbildung 4: Assay Testvergleich Mediagnost Vaspin ELISA / Kommerzieller Testkit

Referenzwerte

Serumproben einer kleinen Gruppe gesunder Blutspender wurden eingesetzt, um die Vaspinkonzentration in gesunden Erwachsenen abschätzen zu können. Informationen bezüglich des Zeitpunktes der Blutentnahme oder der Einnahme von Kontrazeptiva lagen nicht vor. Die Proben wurden in einer Verdünnung 1:4 in den Test eingesetzt.

Alter [Jahre]	Mittelwert Männer [ng/ml]	SA [ng/ml]	Anzahl	Mittelwert Frauen [ng/ml]	SA [ng/ml]	Anzahl
19-25	0,208	0,12	13	2,277	1,8	9
26-30	0,241	0,23	11	1,130	0,88	5
34-44	0,241	0,15	8	0,999	0,78	10
45-54	0,253	0,18	8	0,708	0,69	9
55-68	0,2402	0,20	5	0,503	0,31	5

Bei den weiblichen Blutspendern fällt die Abnahme der Vaspinkonzentration mit zunehmendem Alter ins Auge. Jedoch ist hier zu berücksichtigen, dass Kontrazeptiva zu einem Anstieg der Vaspinkonzentration führen. Die hier beobachtete Zunahme des Vaspingehalts im Serum könnte daher auch Veränderungen im Verhalten der Frauen mit zunehmendem Alter reflektieren und nicht auf physiologische Prozesse zurückzuführen sein.

PACKAGE INSERT ENGLISH

Mediagnost Vaspin ELISA E106

- is suited for Vaspin determination in **serum** samples
- is extremely **sensitive** (Limit of Blank **4 pg/ml**)
- is **fast**: incubation time a total of 3.5 hours
- Single Standards with **10, 75, 200, 500, 1000 pg/ml** human Vaspin are provided in the kit
- 2 Control Sera are provided for quality control purposes according GLP
- is calibrated with **recombinant Vaspin**
- Microtiter plates are separately break apart, tests can be adapted to individual requirements

INTENDED USE

Measurement of human Vaspin human serum. For Research Use Only. Not for Diagnostic Procedures.

INTRODUCTION

The ELISA for quantitative measurement of Vaspin is based on polyclonal rabbit antisera raised by genetic immunization of the rabbits (cDNA Vaspin SC306941).

Vaspin also known as SerpinA12 is a serine protease inhibitor and consists of 395 amino acids forming 3 β -sheets and 9 α -helices. Molecular weight of Vaspin is about 45.2 kDa. It does not form multimeric aggregates or intra-molecular disulfide bridges and no binding proteins in human serum are known. The Vaspin gene is not only expressed by subcutaneous and visceral adipose but also by liver tissue, in the pancreas¹ and in the human epidermis (granular keratinocytes / GK cells)².

"Serum Vaspin levels were **highest in the early morning** before breakfast and fell to trough levels within 2 h after breakfast. Serum Vaspin levels also showed a preprandial rise and postprandial fall at lunch and dinner, although at lesser degrees than at breakfast. Intermeal Vaspin concentrations reached a **nadir in the mid-afternoon** and showed a nocturnal rise, with peak nighttime Vaspin levels being approximately 250% of nadir levels. Unscheduled food ingestion after a prolonged fast significantly reduced serum Vaspin levels, suggesting that energy intake itself has a suppressive effect on serum Vaspin levels. The diurnal pattern of serum Vaspin concentrations was exactly reciprocal to that of insulin and of glucose"³.

A sexual dimorphism has been detected with higher Vaspin levels in girls increasing with age and pubertal stage^{1,4}. A preliminary investigation (n = 81) of Vaspin levels in healthy adult blood donors revealed higher Vaspin levels in women decreasing with increasing age. In this context it is important to reflect, that oral contraceptives significantly increase serum Vaspin concentration⁴.

Serum Vaspin concentration is independent of BMI but negatively associated with insulin sensitivity and obesity, thus "Vaspin was increased with worsening insulin resistance"¹. If glucose metabolism / insulin sensitivity is improved by therapeutic intervention e.g. rosiglitazone, plasma Vaspin concentration decreases significantly⁵. Interestingly lifestyle intervention results in increasing adiponectin concentrations as well as in improved insulin sensitivity but after a 10 months intervention Vaspin concentration remain unchanged⁶. Thus, the mechanism regulating the Vaspin concentration in circulation is still unclear. Vaspin

concentration might be even more influenced by glucose uptake than by body fat at least in pre-pubertal children⁷.

In insulin resistance, diabetes as well as atherosclerosis inflammatory processes are involved and Vaspin might be a link between the endocrine and the immune system. To elucidate the role of Vaspin in inflammation its influence on TNF- α -stimulated production of reactive oxygen species was investigated in smooth muscle cells. Vaspin significantly decreased the TNF- α -induced monocyte adhesion to SMCs as well as TNF- α induced intracellular signal cascade⁸.

The diagnostic value of Vaspin remains unclear, conflicting results question its value as biomarker for visceral or total adipose tissue. As well as regarding insulin resistance while in children Vaspin might correlate with insulin sensitivity¹ but in adults no correlation was found⁴.

The Mediagnost Vaspin ELISA is a tool for the further investigation and validation of Vaspin as a biomarker for the visceral adipose tissue, insulin sensitivity and glucose tolerance.

MATERIALS PROVIDED

1)	MTP	Microtiter plate , ready for use, with 96 wells, divided up in 12 stripes à 8 wells (separately break apart), coated with anti-human Vaspin antibody.
2)	STD	Standards A-E, lyophilised , contain recombinant Vaspin . Standard values are between 0.010 – 1 ng/ml (10, 75, 200, 500, and 1000 pg/ml) Vaspin and have to be reconstituted with 750 μl (each) Dilution Buffer VP . Use 100 μ l pro well in the assay.
3)	BUF	Dilution Buffer VP, 120 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 Vaspin 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)	Ab	Antibody Conjugate AK, 12 ml , ready for use, contains the biotinylated anti-Vaspin antibody. Use 100 μ l for each well in the assay.
6)	CONJ	Enzyme Conjugate EK, 12 ml , ready for use, contains horseradish-peroxidase conjugate to streptavidin. Use 100 μ l for each well in the assay.
7)	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.
8)	SUBST	Substrate (S), 12 ml , ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP)-substrate, stabilised H ₂ O ₂ Tetramethylbencidine.
9)	H₂SO₄	Stopping Solution (SL), 12 ml , ready for use, 0.2 M sulphuric acid, Caution acid!
10)		Sealing tape for covering of the microtiter plate, 3 x, adhesive.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Precision pipettes and multichannel pipettes with disposable plastic tips
 Graduated cylinder for diluting Washing Buffer (WP)
 Distilled or deionized water for dilution of the Washing Buffer (WP), 950 ml
 Vortex-mixer
 Microtiter plate shaker (350 rpm)
 Microtiter plate washer (recommended)
 Micro plate reader ("ELISA-Reader") with filter for 450 and $\geq$ 590 nm
 Polyethylene PE/Polypropylene PP tubes for dilution of samples

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For research and 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.

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.

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

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

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.

Caution: This kit contains material of human and/or animal origin. The components and samples should be treated as potentially infectious.

Do not eat, drink or smoke in these areas. Never pipette the materials with the mouth. Avoid direct contact with these materials by wearing laboratory coats and disposable gloves. Spilled material must be wiped off immediately and should become disinfected. Clean contaminated areas and equipment with a suitable detergent.

Human Serum

Contained in following components: **Control Serum KS1 and KS2.**

The sources of human sera were tested 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.

The reagents **A-E, AK, EK, VP, WP** contain **< 0.01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one** and / or **< 0.01% 5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-Isothiazol-3-one** as preservative:

Do not ingest. Wear suitable protective clothing and gloves. Avoid contact with skin, eyes and clothing. In case of contact with eyes or skin, wash immediately with plenty of water. In case of ingestion or eye contact, seek medical advice.

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

METHOD

The enzyme immunoassay for Vaspin E106 is a so-called Sandwich-Assay. It utilizes specific and high affinity polyclonal antibodies for this protein. The Vaspin in the samples binds to the immobilized first antibody on the microtiter plate. In the following step, the biotinylated antibody binds in turn to Vaspin. After washing, Streptavidin-Peroxidase-Enzyme conjugate will be added,

which will bind highly specific to the biotin and will catalyse the enzymatic reaction, which turns the colour of the substrate, quantitatively depending on the Vaspin level of the samples.

SPECIMEN

Serum samples can be used in this assay.

Storage of the samples

Storage at -20°C in tightly closable plastic tubes is recommended.

Sample Preparation

Samples have to be diluted in Dilution Buffer (VP). For most of the determinations (serum samples, and no extreme values are expected) a dilution **of 1:4 with Dilution Buffer VP** should be suitable. According to expected Vaspin levels the dilution with VP can be higher or lower. The excellent linearity of this test system allows sample dilution of 1:2 to 1:32.

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

Suggestion for dilution protocol:

Pipette **210 μl Dilution Buffer VP** in PE-/PP-Tubes (application of a multi-stepper is recommended in larger series), add **70 μl Serum- or Plasma** (dilution 1:4). 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 and micro titerplate are stable until the indicated expiry, if stored unopened and protected from sunlight at $2 - 8^{\circ}\text{C}$.

The shelf life of the components after opening is 4 weeks, if used appropriately.

Bring all reagents to room temperature ($20 - 25^{\circ}\text{C}$) before use. Possible precipitations in the buffers have to be resolved before usage by mixing and / or warming.

Incubation at room temperature means: $20-25^{\circ}\text{C}$

The incubation steps should be performed at mean rotation frequency of a particularly suitable microtitre 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 Controls

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 1 month 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 $2-8^{\circ}\text{C}$. 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 $2-8^{\circ}\text{C}$ use in the frame provided. After opening the microtiter plate is stable for 4 weeks.

Substrate Solution

The Substrate Solution (S), stabilised H_2O_2 -Tetramethylbencidine, is photosensitive – store and incubate in the dark.

ASSAY PROCEDURE

When performing the assay, the Standards **A-E**, Control Sera **KS1& KS2** and the samples should be pipetted as fast as possible (e.g., 15 minutes). To avoid distortions due to differences in incubation times, 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. **Stop Solution SL** should be added to the plate in the same order as the Substrate Solution **S**. All determinations (Standards, Control Sera and samples) should be assayed in duplicate.

For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

1) Pipette in positions A1/2 **100 µl Dilution Buffer VP (blank)**.

2) Pipette in positions B1/2 **100 µl of the Standard A (10 pg/ml)**,

pipette in positions C1/2 **100 µl of the Standard B (75 pg/ml)**,

pipette in positions D1/2 **100 µl of the Standard C (200 pg/ml)**,

pipette in positions E1/2 **100 µl of the Standard D (500 pg/ml)**,

pipette in positions F1/2 **100 µl of the Standard E (1000 pg/ml)**.

To control the correct accomplishment of the assay **100 µl** of the 1:4 (or in respective dilution ratio of the samples) in Dilution Buffer VP diluted **Control Sera KS1/KS2** can be pipetted in positions G1/2 and H1/2.

Pipette **100 µl** each of the diluted samples (e.g. dilute 1:4 with **Dilution Buffer VP**) in the rest of wells, according to your requirements.

3) Cover the wells with sealing tape and incubate the plate for **1 hour at room temperature** (shake at 350 rpm).

4) After incubation aspirate the contents of the wells and wash the wells 5 times **300 µl Washing Buffer WP** / well.

5) Following the last washing step pipette **100 µl** of the **Antibody Conjugate AK** in each well.

6) Cover the wells with sealing tape and incubate the plate for **1 hour at room temperature** (shake at 350 rpm).

7) After incubation aspirate the contents of the wells and wash the wells 5 times **300 µl Washing Buffer WP** / well.

8) Following the last washing step pipette **100 µl** of the **Enzyme Conjugate EK** in each well.

9) Cover the wells with sealing tape and incubate the plate for **1 hour at room temperature** (shake 350 rpm).

10) After incubation wash the wells 5 times with Washing Buffer **WP** as described in step 4.

11) Pipette **100 µl** of the **Substrate Solution S** in each well.

12) Incubate the microtiter plate for **30 minutes in the dark at room temperature**.

13) Stop the reaction by adding **100 µl Stopping Solution SL** to all wells.

14) 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 0.25, 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 Vaspin:

Standard	A	B	C	D	E
ng/ml	0.010	0.075	0.20	0.5	1.0
pg/ml	10	75	200	500	1000

- 1) Calculate the mean absorbance (MA) value for the blank from the duplicated determination (well A1/A2).
- 2) Subtract the mean absorbance (MA) 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 e.g. **a linear regression, 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 **Vaspin 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 Vaspin concentrations of the **undiluted samples** and of control sera are calculated **by multiplication with the respective dilution factor**.

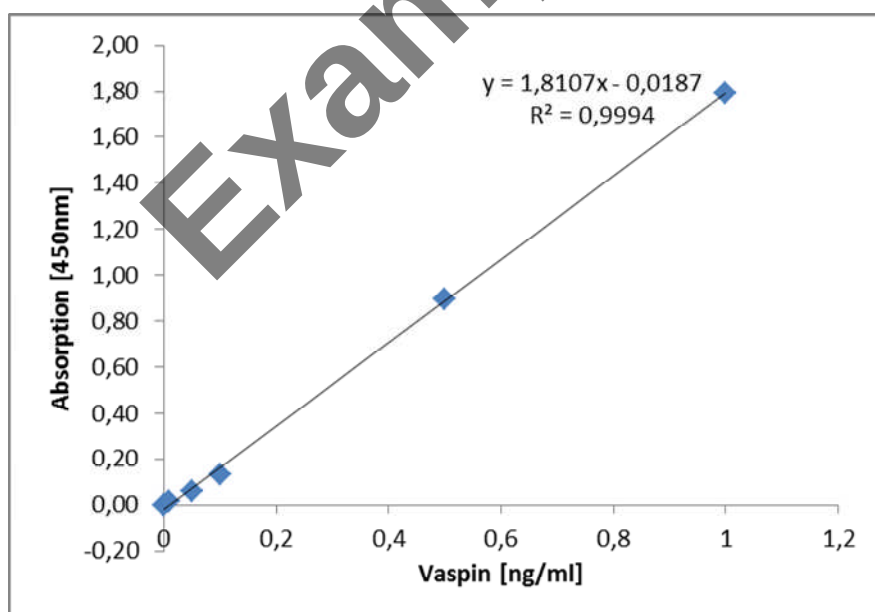


Fig. 1: Exemplary Standard Curve with linear regression for curve analysis.

The exemplary shown calibration 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 Vaspin concentration of a 1:4 diluted sample:

Measured extinction of your sample (OD ₄₅₀ -OD ₆₂₀)	0.56
Measured extinction of the blank (OD ₄₅₀ -OD ₆₂₀)	0.03

Your measurement program will calculate the Vaspin concentration of the diluted sample automatically by using the difference of sample and blank (0.03) for the calculation. You only have to determine the most suitable curve fit (here: linear regression).

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

$$0.53 = 1.8107x - 0.0187$$

$$0.303 = x$$

If the dilution factor (1:4) is taken into account, the Vaspin concentration of the undiluted sample is

$$0.303 \times 4 = 1.212 \text{ ng/ml}$$

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Standards

The standards are prepared from recombinant human Vaspin in concentrations of 10; 75; 200; 500 and 1000 pg/ml (equal to 0.010 -1 ng/ml).

Sensitivity

We measured the blank (dilution buffer only) 16 times in one assay. The resulting standard deviation was used for calculating the concentration which can be differentiated from the blank. Thus, lowest amount of Vaspin detectable is 4 pg/ml.

Table 1: Limit of Detection and Quantification

Standard Deviation [a.u.]	1 SD Vaspin [ng/ml]	3SD Vaspin [ng/ml]	10SD Vaspin [ng/ml]
0.015	0.004	0.012	0.037

Specificity

Specificity of the employed polyclonal antibodies was investigated by two different methods. Proteins of a native serum sample were separated by size exclusion chromatography, resulting fractions were tested a) by the ELISA and b) fractions positive in the ELISA were also tested by western blot. Figure 2 demonstrates that the ELISA detects a signal at about 37 kDa which is confirmed by western blot. Theoretically Vaspin has a molecular weight of 45.2 kDa. In comparison with recombinant Vaspin the signal of the SEC peak fraction is of the same size. Differences of the calculated molecular weight might result of the variability in column calibration as well as of the SEC conditions, like fraction size and flow velocity.

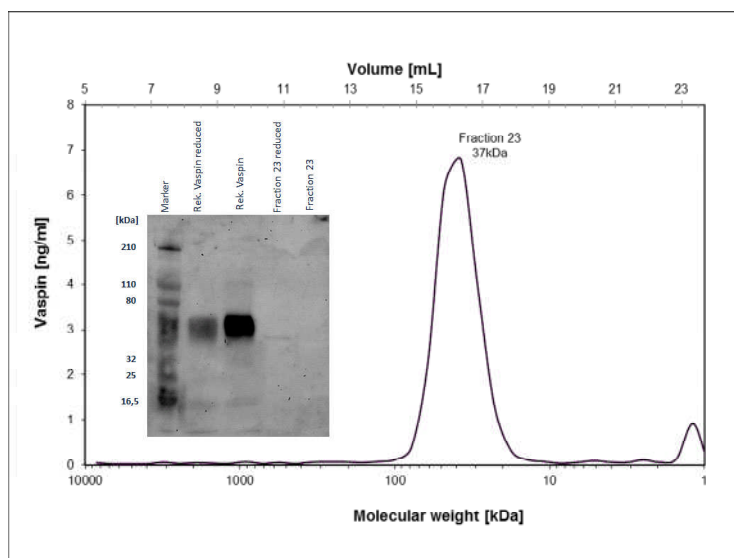


Fig. 2: Specificity of Mediagnost Vaspin ELISA. Human Serum (250 μ L) was separated by SEC Superdex 10/300GL, fraction size was 0.5 ml and flow velocity 0.5 ml/min. Samples were diluted 1:4 in dilution buffer. Inset shows results of western blotting, samples were separated by 10% SDS-PAGE blotted and stained by biotinylated antibody (1:1000) and streptavidin-peroxidase conjugate (1:1500).

Recovery

For evaluation of disturbing substances in serum samples as well as assessing correctness we enriched several human serum samples with two different amounts of recombinant Vaspin. For control purposes same amounts of Vaspin were added to buffer and relative recovery in serum samples was calculated based on the value found in buffer.

Table 2: Recovery of recombinant Vaspin in human serum samples.

	Endogenous Vaspin content [ng/ml]	Serum enriched with 50 pg/ml [ng/ml]	Serum enriched with 500 pg/ml [ng/ml]
Recombinant Vaspin in Buffer		0.052	0.408
Sample 1 Recovery [%]	0.233	0.271 95	0.591 87
Sample 2 Recovery [%]	0.1055	0.139 88	0.455 89
Sample 8 Recovery [%]	0.2595	0.302 97	0.705 99
Sample 9 Recovery [%]	0.517	0.588 103	1.013 102
Sample 4 Recovery [%]	0.118	0.151 89	0.432 77
Sample 5 Recovery [%]	0.744	0.943 118	1.066 79
Sample 17 Recovery [%]	1.457	1.601 106	1.915 95
Sample 18 Recovery [%]	0.2895	0.345 101	0.695 92

Recovery range was 77-102% for 500 pg/ml and 88 – 118% for 50 pg/ml enrichment, on average **97%** of the added recombinant material was found.

Reproducibility and Precision

Table 3: Inter-Assay-Variation (results of 3 independent determinations)

	Number	Mean [ng/mL]	VC%
Serum 1	9	0.189	8.55
Serum 2	9	0.823	4.52
Serum 3	9	2.885	4.75

Table 4: Intra-Assay-Variation

	Number	Mean [ng/mL]	VC%
Serum 1	20	0.226	2.85
Serum 2	20	1.192	3.81
Serum 3	20	1.536	1.42

Linearity

The linearity of serum dilutions is over a very wide range excellent. Two serum samples with high and low Vaspin content were serial diluted and dilution was measured by Vaspin ELISA. Results are shown In Figure 3. It was possible to quantify Vaspin down to 4 pg/ml. In both cases dilution resulted in linear decrease of concentration.

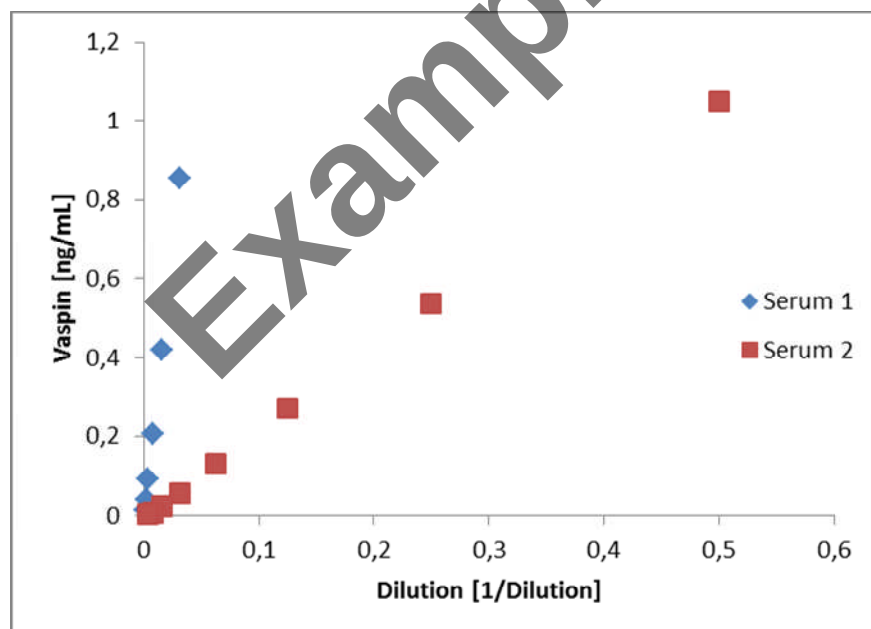


Fig. 3: Linearity. Two serum samples were diluted and concentration of each dilution was measured. Here concentrations are shown.

Assay Range

If no extreme values are expected, the dilution of 1:4 with Dilution Buffer VP is for most determinations suitable, the respective covered range would be 4 pg/ml- 4000 pg/ml.

Correlation with another test system.

Mediagnost Vaspin ELISA was compared with an commercially available Vaspin ELISA. We found a very good correlation of measured values even absolute values differ by factor 2 because of differences in calibration (Figure 4).

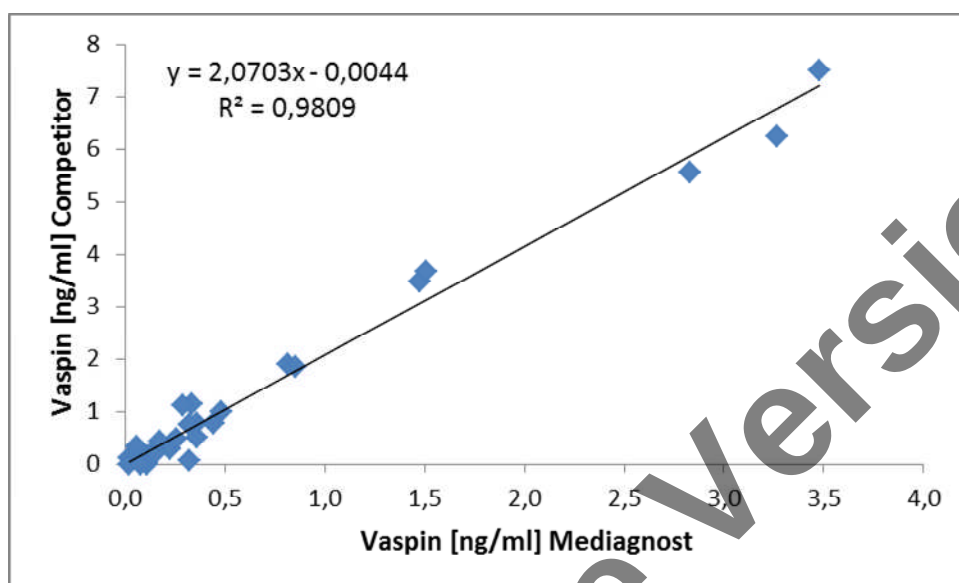


Fig. 4.: Assay Comparison with commercially available Testsystem

Reference values

Serum samples of a small group of healthy blood donors were used to assess the Vaspin concentration in healthy adults. No information regarding sampling time or contraceptive status was available. Samples were diluted 1:4.

Age [years]	Mean Males [ng/ml]	SD [ng/ml]	Number	Mean Femals [ng/ml]	SD [ng/ml]	Number
19-25	0.208	0.12	13	2.277	1.8	9
26-30	0.241	0.23	11	1.130	0.88	5
34-44	0.241	0.15	8	0.999	0.78	10
45-54	0.253	0.18	8	0.708	0.69	9
55-68	0.2402	0.20	5	0.503	0.31	5

In females an age-dependent decline of Vaspin concentrations might be apparent, but it should be reflected that oral contraceptives result in an increase of Vaspin serum concentration. Thus, instead of age dependent changes decline of Vaspin concentration might reflect a changed behavior of women correlating with age.

Literature / Literatur

1. Korner, A. *et al.* Vaspin is related to gender, puberty and deteriorating insulin sensitivity in children, *Int J Obes* 35, 578–586 (2011).
2. Toulza, E. *et al.* Large-scale identification of human genes implicated in epidermal barrier function, *Genome Biol* 8, R107 (2007).
3. Jeong, E. *et al.* Circadian Rhythm of Serum Vaspin in Healthy Male Volunteers: Relation to Meals, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 95, 1869–1875 (2010).
4. Loeffelholz, C. v. *et al.* Circulating vaspin is unrelated to insulin sensitivity in a cohort of nondiabetic humans, *European Journal of Endocrinology* 162, 507–513 (2010).
5. Zhang, L. Li, L. Yang, M. Liu, H. & Yang, G. Elevated circulating vaspin levels were decreased by rosiglitazone therapy in T2DM patients with poor glycemic control on metformin alone, *Cytokine* (2011).
6. Kim, S. M. *et al.* Lifestyle modification increases circulating adiponectin concentrations but does not change vaspin concentrations, *Metabolism* 60, 1294–1299 (2011).
7. Martos-Moreno, G. A. *et al.* Serum visfatin and vaspin levels in prepubertal children: effect of obesity and weight loss after behavior modifications on their secretion and relationship with glucose metabolism, *Int J Obes* (2011).
8. Phalitakul, S. Okada, M. Hara, Y. & Yamawaki, H. Vaspin prevents TNF- α -induced intracellular adhesion molecule-1 via inhibiting reactive oxygen species-dependent NF- κ B and PKC θ activation in cultured rat vascular smooth muscle cells, *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* (2011).

KURZANLEITUNG MEDIAGNOST VASPIN ELISA E106

Rekonstitution / Verdünnung von Reagenzien		
Standards A-E	Rekonstitution in Verdünnungspuffer VP	je 750 µl
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: 1:4 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

Pipettieren	Reagenzien	Position
100 µl	Leerwert (VP)	A1 und A2
100 µl	Standard A (10 pg/ml)	B1 und B2
100 µl	Standard B (75 pg/ml)	C1 und C2
100 µl	Standard C (200 pg/ml)	D1 und D2
100 µl	Standard D (500 pg/ml)	E1 und E2
100 µl	Standard E (1000 pg/ml)	F1 und F2
100 µl	Verdünntes Kontrollserum KS1 (1:4)	G1 und G2
100 µl	Verdünntes Kontrollserum KS2 (1:4)	H1 und H2
100 µl	Probenverdünnung (1:4)	in die Vertiefungen nach Bedarf
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken		

Inkubation: 1 h bei RT (20-25°C), 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-Konjugat AK	in jede Vertiefung

Inkubation: 1 h bei RT (20-25°C), 350 rpm

5 x 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

Inkubation: 1 h bei RT (20-25°C), 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: 0,5 h im Dunkeln bei RT (20-25°C)

100 µl	Stopplösung SL	in jede Vertiefung
Messung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter (≥590 nm))		

SUMMARY Mediagnost VASPIN ELISA E106

Reconstitution / Dilution of Reagents		
Standards A-E	Reconstitution in Dilution Buffer VP	750 µl 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: 1:4 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	Blank (VP)	A1 and A2
100 µl	Standard A (10 pg/ml)	B1 and B2
100 µl	Standard B (75 pg/ml)	C1 and C2
100 µl	Standard C (200 pg/ml)	D1 and D2
100 µl	Standard D (500 pg/ml)	E1 and E2
100 µl	Standard E (1000 pg/ml)	F1 and F2
100 µl	Diluted Control Serum KS1 (1:4)	G1 and G2
100 µl	Diluted Control Serum KS2 (1:4)	H1 and H2
100 µl	Diluted Samples (1:4)	Pipette sample in the rest of the wells according to requirements
Cover the wells with the sealing tape		

Incubation: **1 h at RT (20-25°C), 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- Conjugate AK	each well

Incubation: **1 h at RT (20-25°C), 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	Enzyme-Conjugate EK	each well

Incubation: **1 h at RT (20-25°C), 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: **0.5 h in the dark at RT (20-25°C)**

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



STD A-E	A -E	Rec in 750 µl BUF VP	
Control	KS1 / KS2	Rec in 250 µl BUF VP	
WASHBUF 20x	WP		1:20 DILU A. dest.

Control	1:4 DILU BUF VP
SPE	1:4 DILU BUF VP
°C 20-25 °C	

100 µl	BUF VP	A1/2
100 µl	STD A (10 pg/ml)	B1/2
100 µl	STD B (75 pg/ml)	C1/2
100 µl	STD C (200 pg/ml)	D1/2
100 µl	STD D (500 pg/ml)	E1/2
100 µl	STD E (1000 pg/ml)	F1/2
100 µl	CONTROL KS1 1:4 DILU BUF VP	G1/2
100 µl	CONTROL KS2 1:4 DILU BUF VP	H1/2
100 µl	SPE 1:4 DILU BUF VP	
TAPE		

1 h **°C** 20-25 350 rpm

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

1 h **°C** 20-25 350 rpm

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

1 h **°C** 20-25 350 rpm

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

0.5 h **°C** 20-25

100 µl	H₂SO₄ SL
MEASURE	