

m/rIGFBP-2 ELISA

Ezymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von

Maus und Ratten insulinähnlichem Wachstumsfaktor Bindungsprotein-2 (m/rIGFBP-2)

Deutsch

Enzyme Immunoassay for Quantitative Determination of

Mouse and Rat Insulin-like Growth Factor Binding Protein-2 (m/rIGFBP-2)

English

für Forschungsanwendungen / for research use only

Not for use in diagnostic procedures.

zum Gebrauch durch Fachpersonal! / for professional use!

I 2-8°C

X 96

i

h E08

















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>

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 szá respectați instrucțiunile de utilizare/ Upoštevajte navodila za uporabo!/ Lue käyttöohje huolellisesti!
	Lot-Batch Number/ Charge-Chargennummer/ Lot-Code du lot/ Lotto-Numero di lotto/ Lote-Código de lote/ Lote-Código do Lote/Lot-Partijnummer/ Lot-Batchkode/ Partisatskod/ Numer serii/ Tétel-sarzs szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/Partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-număr lot/ Številka serije/ Erä
	Manufactured by/ Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por/ Fabricado por/ Vervaardigd door/ Fabrikation af/ Tillverkad av/ Wyprodukowane przez/ Gyártotta/ Vyrobene/ Vyrobeno v/ Производител/ Tootja/ Κατασκευάζεται από/ Produs de/ Proizvajalec/ Valmistaja
	Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/ Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referência/ Referentienummer/ Referencenummer/ Bestellningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/ Katalógové číslo/ Objednací číslo/ Каталоген номер/ Tellimisnumber/ Αρ. παραγγελίας/Număr comandă/ Številka naročila/ Viite tai tilausnumero
	Store at between/ Lagerung bei zwischen/ Conserver à entre/ Conservare a tra/ Conservar a temp. entre/ Armazenaar entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevares mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí/ Температурно ограничение/ Säilätada 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/ Innehållet räcker till x analyser/ Zawartość na x testów/ Tartalma x teszt elvégzésére elegendő/ Obsahuje materiál pre x testov/ Obsah dostatočuje pro x testů/ Съдържание достатъчно за x тестове/ Sisust jätkub x katse jaoks/ Το περιεχόμενο επαρκεί για x δοκιμές/ Conținut suficient pentru x teste/ Vsebina zadostuje za x preizkusov/ Sisältö riittää x testille
	Keep away from sunlight/ Nicht dem Sonnenlicht aussetzen/ Conserver à l'abri de la lumière/ Conservare al riparo della luce solare/ No exponer a la luz solar/ Proteger da luz solar/ Niet aan zonlicht blootstellen/ Må ikke udsættes for sollys/ Utsätt inte för solljus/ Nie wystawiać na słońce/ Napfénytől távol tartandó/ Nevystavovat slnečnému svetlu/ Nevystavovat slnečnému svetlu/ Да се предпазва от слънчева светлина/ Kaitsta otsese päikesekiirguse eest/ Κρατήστε το μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία/ Țineți departe de lumina soarelui/ Ne izpostavljajte sončni svetlobi/ suojaa auringonvalolta
	Incubation time/ Inkubationszeit/ Temps d'incubation/ Tempo d'incubazione/ Tiempo de incubación/ Tempo de incubação/ incubatietijd/ Inkubationstid/ inkubationstid/ Czas inkubacji/ Inkubációs idő/ Inkubačná lehota/ Inkubační doba/ Инкубационен период/ Inkubatsiooniaeg/ Χρόνος επώασης/ Timp de incubare/ Inkubacijska doba/ inkubaatioaika
	Incubate at/ Inkubation bei/ Incuber à/ Incubare a/ incubar a/ Incubar a/ incubatietemperatuur/ Inkubation ved/ inkubation vid/ Inkubacja przy/ Inkubáció hőmérséklete/ Inkubácia pri/ Inkubace při/ Инкубира се при/ Inkubatsioon temperatuuril/ Επώαση στους/ Incubare la/ Inkubacija pri/ Inkubaatiolämpötila
	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/ Promichat 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/ Mikrotiterplaat/ Mikrotiterplade/ mikrotiterplatta/ mikrotiterplaat/ Płytko microtiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiterplaat/ Τρυβλίο μικροπιλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitrská plošča/ Mikrotitruslevy
	Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituir en/ Reconstituir em/ Reconstituieren in/ Rekonstituér i/ Rekonstituera/ Rekonstytuować w/ Helyreállítás/ Znovu připravit za/ Znovu připravit za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti/ Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ Rekonstituo
	Sample/ Probe/ Echantillon/ Campione/ Muestra/ Amostra/ Monster/ Prøve/ prov/ Próbka/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probă/ Vzorec/ Näyte

Ab & CONJ	Antibody and Enzyme Conjugate/ Antikörper und Enzym Konjugat/ Anticorps conjuguée et conjugué enzymatique/ Coniugato di anticorpo ed enzima/ Conjugado de anticuerpos y enzimas/ Conjugado Anticorpo-Enzima/ Antilichaam- en enzymconjugaat/ Antistoffer og enzym-konjugat/ Antikropps- och enzymkonjugat (antikropp och enzym, konjugat)/ Koniugat antyciał i enzymów/ Antitest és enzim páros/ Protílátkový a enzymatický konjugát/ Protílátkový a enzymatický konjugát/ Антитяло и ензим конюгат/ Antikehad ja ensüümi konjugaat/ Σύμπλοκο αντισώματος-ενζύμου/ Compuși din anticorpi și enzime/ Antitelesa in konjugat encima/ Vasta-aine ja entsyymi konjugaatti
BUF	Buffer/ Puffer/ Tampon/ Tampone/ Tampón/ Tampão/ Buffer/ Buffer/ Buffert/ Bufor/ Puffer/ Pufer/ Pufr/ Буфер/ Puhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα/ Tampon/ Puffer/ 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/ Ηίγítás X pufferben/ Riedit' v pufrí X/ Ředit v pufru X/ Разреджәне 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/ Štandard 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 Controllo 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 płukania koncentrat/ Mosópufer koncentrátum/ Koncentrát vymývacieho pufru/ Концентрат на промивен буфер/ Pesurpuhvi kontsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralnega pufru/ Pesuliuositiiviste
WASHBUF	Washing Buffer/ Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón de lavado/Tampão de Lavagem/ wasbuffer/ Vaskebuffer/ tvättbuffert/ Bufor płukania/ Mosópufer/ Vymývací pufer/ Vymývací pufr/ Προμивен буфер/ Pesurpuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare/ Izpiralni pufer/ Pesuliuos
SUBST TMB	Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ substraat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Szubsztrátum/ Substrát/ Substrát/ Субстрат Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraattiliuos
H₂SO₄	Stopping Solution/ Stopplösung/ Stop Solution/ Soluzione di stop/ Stop Solución/ Solução Stop/ stopoplossing/ Stoporpløsning/ Stoppløsning/ 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/ Пластика с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerikleerplindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperiti placa cu o bandă adezivă/ Prelepiti 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 (Referenčných filtrov ≥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/ vseh zahtevanih vdolbinah/ kaikkiin tarvittaviin mikrotitrauslevyn syvennyksiin

Nicht für humane oder tierische, therapeutische oder diagnostische Zwecke.
Vor Gebrauch ist die gesamte Packungsbeilage zu lesen!

Not for human or animal therapeutic or diagnostic use.
Read entire protocol before use!

INHALTSVERZEICHNIS / TABLE OF CONTENTS

GEBRAUCHSANWEISUNG.....	5
1 ZWECKBESTIMMUNG	5
2 EINFÜHRUNG	5
3 TESTPRINZIP.....	6
4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	6
5 PROBEN.....	7
6 MATERIALIEN.....	8
7 TECHNISCHE HINWEISE	9
8 TESTDURCHFÜHRUNG	10
9 QUALITÄTSKONTROLLE	11
10 AUSWERTUNG	11
11 ERWARTUNGSWERTE	13
12 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG.....	13
ENGLISH INSTRUCTIONS FOR USE.....	16
LITERATUR / LITERATURE	26
INTERNATIONALE ASSAY DESCRIPTION.....	28

Example Version

DEUTSCH Gebrauchsanweisung

m/rIGFBP-2 ELISA E08	96 Bestimmungen
Testprinzip	Sandwich ELISA
Dauer (Inkubationszeit)	3 h
Antikörperkonjugat	100fach Konzentrat
Enzymkonjugat	100fach Konzentrat
Puffer & Substrat	gebrauchsfertig
Standards	7 Einzelstandards: 31,25 - 2000 pg/mL, gefriergetrocknet, natives Maus IGFBP-2
Kalibrierung	Die Kalibration des Assays erfolgte mittels rekombinatem Maus-IGFBP-2 der Firma R&D Systems Inc.
Assay Range	0,01 –200 ng/mL
Kontrolle	1 Kontrollserum, gefriergetrocknet
Proben	Serum oder Plasma von Ratten und Mäusen
Erforderliches Probenvolumen	10 µL
Probenverdünnung	1:100
Analytische Sensitivität	0,01 ng/mL
Durchschnittliche Intra- / Interassay Varianz	< 10%

1 ZWECKBESTIMMUNG

Quantitative Messung von insulinähnlichem Wachstumsfaktor Bindungsprotein 2 (IGFBP-2) in Maus und Ratten Serum für wissenschaftliche Zwecke.

2 EINFÜHRUNG

Im **humanen System** regulieren die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGFs) die Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Zelladhäsion und den Metabolismus in verschiedensten Geweben und Zelltypen.

IGFBP-2 ist ein unglykosyliertes Polypeptid von 31,3 kDa, das binäre IGF-Komplexe bildet und keine zirkadiane Rhythmik aufweist. Seine Konzentration im Blut steigt beim Fasten, nach Traumata und größeren Operationen, am stärksten aber bei malignen Erkrankungen an.

Bei verschiedenen Tumorarten (5-10) steigt das IGFBP-2 streng mit dem Grad der Progression an und geht in Remission auf normale Werte zurück. Unter WH-Therapie z.B. bei Minderwuchs (4) und bei WH-Abusus (Doping) nimmt die IGFBP-2-Konzentration ab. Bei Trisomie 18 ist IGFBP-2 im maternalen Serum erniedrigt und IGFBP-1 erhöht; daher ist das IGFBP-2 / IGFBP-1 Verhältnis hierfür ein Marker (17).

Transgene Organismen stellen eine gute Möglichkeit dar, die Funktion von Genen/Proteinen zu erforschen. Das Maus-/ Ratten-Modell stellt ein geeignetes System zur weitergehenden Untersuchung der Bedeutung von IGFBP-2 in physiologischen und pathologischen Prozessen dar. So führt die Überexpression des IGFBP-2 Gens in Mäusen zu einer Reduktion der postnatalen Gewichtszunahme (18) und zu einer 30%igen Gewichtsreduktion der Milz. Alle anderen Organe weisen jedoch nur eine moderate Gewichtsreduktion auf. Effekte von IGFBP-2 auf den Organismus können jedoch durch die veränderte Expression der anderen IGF-Bindungsproteine kompensiert werden. Insbesondere im Rahmen der Erforschung der

Tumorbiologie kann das Maus-/Ratten-System Modellcharakter für systemische Untersuchungen einnehmen. Die Beeinflussung der Physiologie von Tumorzellen konnte am Beispiel von IGFBP-2 transfizierten adrenokortikalen Tumorzellen anhand einer signifikant erhöhten Katalaseaktivität gezeigt werden (19). IGFBP-2 interagiert auch über das RGD-Aminosäuremotiv mit Tumorzellen und kann bspw. die Invasion vom Gliomazellen stimulieren (20).

3 TESTPRINZIP

Der Mediagnost **m/rIGFBP-2, E08**, ist ein sogenannter Sandwich-Assay unter Verwendung zweier spezifischer und hochaffiner Antikörper.

Der an die Mikrotiterplatte gekoppelte erste Antikörper bindet das IGFBP-2 aus der Probe, welches im nachfolgenden Schritt vom Biotin-konjugierten anti-IGFBP-2-Antikörper erkannt wird. Danach bindet ein Streptavidin-Peroxidase-Enzymkonjugat hochspezifisch am Biotin. In der abschließenden Substratreaktion wird hochspezifisch der Farbumschlag katalysiert, quantitativ abhängig vom IGFBP-2-Gehalt der Proben.

4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

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

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

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.

Reagenzien AK, EK, VP, WP

enthalten als Konservierungsmittel **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 GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

4.1 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

Maus- und Rattenserum und -plasma

5.2 Probenentnahme

Hämolytische Reaktionen sind zu vermeiden.

5.3 Erforderliches Probenvolumen: 10 µL

5.4 Probenstabilität

In fest verschließbaren, geeigneten Probengefäße

- Lagerung bei 4°C: max. 3
- Gefrier/Auftau-Zyklen: max. 5

Proben sollten möglichst schnell mindestens bei +4°C gelagert werden. Für die Langzeitlagerung muss die Probe eingefroren und bei -20°C aufbewahrt werden. Bis zu 5 Einfrier- und Auftauzyklen zeigten keinen erheblichen Effekt auf die die gemessenen IGFBP-2 Konzentrationen.

5.5 Interferenz

Hämoglobin in der Probe stören bis zu einer Konzentration von **5 mg/mL** nicht. Der Einsatz hämolytischer, lipämischer oder ikterischer Proben sollte trotzdem zuvor vom Anwender validiert werden.

5.6 Probenverdünnung

Die Serumproben müssen vor der Messung verdünnt werden. Ein Extraktionsschritt ist nicht erforderlich.

- Verdünnung: **1:100** mit Probenpuffer **VP**
- Beispiel: **10 µL Probe** werden zu **990 µL Verdünnungspuffer VP** gegeben (Verdünnungsfaktor 1:100), oder für größere Serien einfacher mit 1000 µL Verdünnungspuffer **VP** (1:101).
- Alternative Probenverdünnung, wenn die **Probengröße limitierend** ist: eine **Probenmindestmenge von 2,5 µL** werden mit 250 µL Verdünnungspuffer **VP** verdünnt (Verdünnung 1:101). Das Pipettieren von so kleinen Probenmengen erfordert jedoch höchste Genauigkeit.
- Nach dem Mischen innerhalb von 1 Stunde von dieser Lösung mit einer Endverdünnung von (1:100), **100 µL** pro Bestimmung im Assay einsetzen.
- Serumproben sollten vor der Messung 1:20 bis 1:500 mit Verdünnungspuffer **VP** verdünnt werden, je nach erwarteten IGFBP-2-Werten (s. Kapitel: Erwartungswerte).

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-IGFBP-2-Antikörper. Die Vertiefungen sind einzeln abbrechbar.	(8x12) Vertiefungen
A-G	Standards , lyophilisiert (natives Maus IGFBP-2), die Konzentrationen sind auf den Etiketten und auf dem QC-Zertifikat angegeben.	7 x 1 mL
KS	Kontrollserum , lyophilisiert, (Maus Serum), die Konzentration ist auf dem QC-Zertifikat angegeben.	1x 250 µL
AK	Antikörperkonjugat 100fach konzentriert, Ziegen-anti-mIGFBP-2-Antikörper biotinyliert	1 x 120 µL
EK	Enzymkonjugat (POD) 100fach konz. Streptavidin Peroxidase-Konjugat	1 x 120 µL
VP	Verdünnungspuffer , gebrauchsfertig. Bitte vor Gebrauch Schütteln!	1 x 120 mL
WP	Waschpuffer , 20fach konzentrierte Lösung	1 x 50 mL
S	Substratlösung , gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase (POD)-Substrat	1 x 12 mL
SL	Stopplösung , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure.	1 x 12 mL
-	Abdeckfolie für die Mikrotiterplatte	2 x
	Packungsbeilage	1 x
-	Qualitätskontrollzertifikat (QC-Zertifikat)	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 – G** und Kontrollserum 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-G** und Kontrollserum **KS** 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 wird das Kontrollserum **KS** im gleichen Verhältnis (1:100) 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**, stabilisiertes H₂O₂-Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich–Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

Testdurchführung

Die Messungen (Leerwert, Standards **A-G**, Kontrollserum **KS** 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-G**, Kontrollserum **KS** und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden (z.B. in 15 Minuten). Das Antikörperkonjugat **AK** und 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 fuselndem 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 fuselndem Zellstoff gründlich entfernt werden.

8 TESTDURCHFÜHRUNG

Reagenzpräparation:		Rekonstitution:	Verdünnung:
Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen.			
A-G	Standards	in 1 mL Verdünnungspuffer VP	-
KS	Kontrollserum	in 250 µL Verdünnungspuffer VP	1:100 mit Verdünnungspuffer VP
AK	Antikörperkonjugat	-	1:100 mit Verdünnungspuffer VP
EK	Enzymkonjugat	-	1:100 mit Verdünnungspuffer VP
WP	Waschpuffer	-	1:20 mit Aqua dest.
Proben mit Verdünnungspuffer VP 1:100 verdünnen			
Testdurchführung in Doppelbestimmung:			
Pipettieren	Reagenzien		Position
100 µL	Verdünnungspuffer VP (Leerwert)		A1/A2
100 µL	Standard A (31,25 pg/mL)		B1/B2
100 µL	Standard B (62,5 pg/mL)		C1/C2
100 µL	Standard C (125 pg/mL)		D1/D2
100 µL	Standard D (250 pg/mL)		E1/E2
100 µL	Standard E (500 pg/mL)		F1/F2
100 µL	Standard F (1000 pg/mL)		G1/G2
100 µL	Standard G (2000 pg/mL)		H1/H2
100 µL	Kontrollserum KS (1:100 verdünnt)		A3/A4
100 µL	Probe (1:100 verdünnt)		in die restlichen Vertiefungen nach Bedarf pipettieren
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.			
Proben-Inkubation: 1 h 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 (1:100 verdünnt)		In jede Vertiefung
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.			
Inkubation: 1 h 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 (1:100 verdünnt)		In jede Vertiefung
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.			
Inkubation: 0.5 h 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: 0.5 h 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. Der Kontrollwert muss konform mit den auf dem QC-Zertifikat angegebenen Wert bzw. zulässigen Bereich sein. 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 G sollte dagegen Extinktionen über 1,0 Einheiten erreichen. Proben, die höhere Extinktionen als der Standard G erzielen, liegen außerhalb der Standardkurve, zur sicheren Bestimmung sollten diese Proben in einer zweiten Testdurchführung bei höherer Verdünnung nochmals bestimmt werden.

10 AUSWERTUNG

10.1 Erstellung der Standardkurve

Die bereitgestellten Standards enthalten folgende native mIGFBP-2-Konzentrationen:

Standard	A	B	C	D	E	F	G
pg/mL	31,25	62,5	125	250	500	1000	2000
ng/mL	0,03125	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2

- 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 berechneten IGFBP-2-Gehaltes mit dem entsprechenden **Verdünnungsfaktor** der Proben ergibt die **IGFBP-2-Konzentration in ng/mL** (oder pg/mL, je nach gewählter Einheit der Standards).

10.2 Beispiel einer typischen 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	F	G
pg/mL	0,0	31,25	62,5	125	250	500	1000	2000
OD (450-620 nm)	0,112	0,042	0,083	0,159	0,325	0,632	1,237	2,27

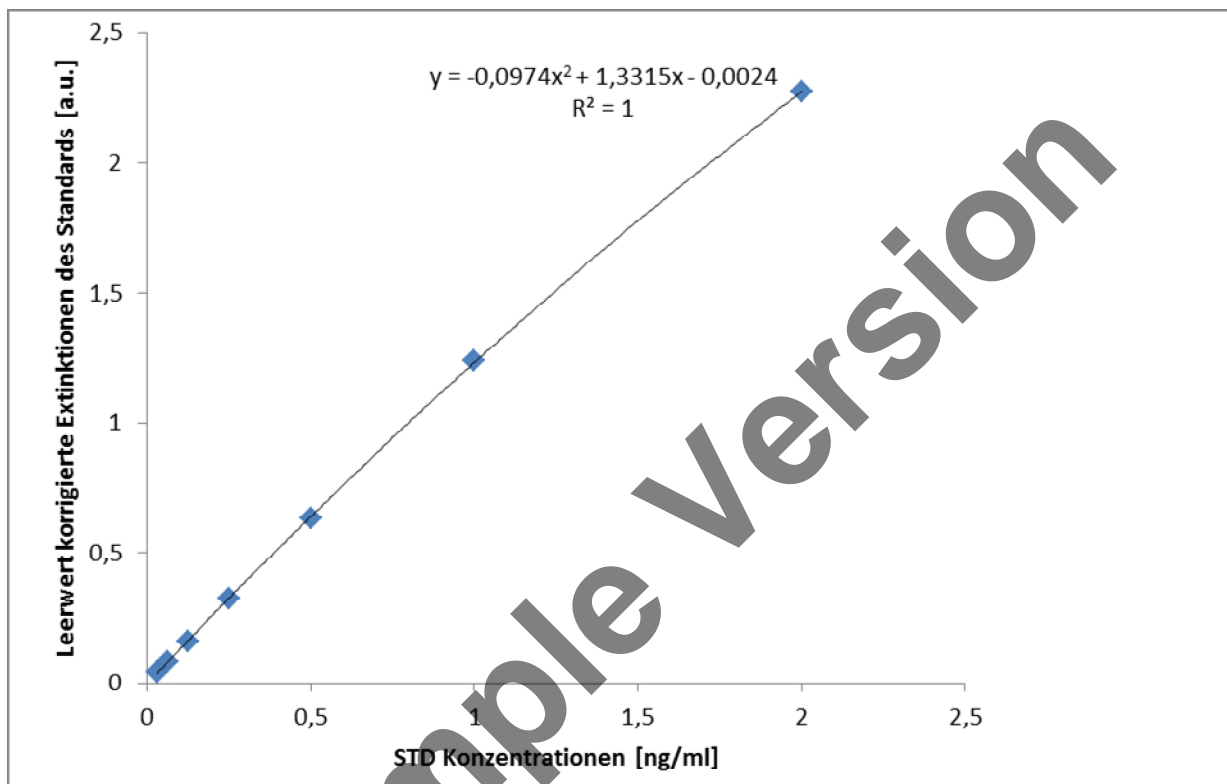


Abbildung 1: Exemplarische Standardkurve

10.3 Beispielhafte Berechnung der IGFBP-2-Konzentration

Probenverdünnung: 1:100

Gemessene Extinktion der Probe: 0,961

Gemessene Extinktion des Leerwertes: 0,112

Aus der Differenz der Proben-Extinktion und der Extinktion des Leerwertes (0,112) **berechnet Ihr Auswertungsprogramm** mit der entsprechenden Kurvenanpassung (hier: Polynom 2. Grades) die IGFBP-2-Konzentration der verdünnten Probe durch Auflösen der Gleichung aus Abb. 1. In diesem Fall ergibt sich eine IGFBP-2-Konzentration in der verdünnten Probe von

$$0,849 = -0,0974x^2 + 1,3315x - 0,0024$$

$$R^2 = 1$$

$$0,673 \text{ ng/mL} = x$$

und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (**1:100**) somit eine IGFBP-2-Konzentration in der unverdünnten Probe von

$$0,673 \text{ ng/mL} \times 100 = 67,3 \text{ ng/mL}$$

11 ERWARTUNGSWERTE

IGFBP-2 Konzentrationen wurden in mehreren handelsüblichen Maus- und Rattenserum getestet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 1: Erwartungswerte IGFBP-2-Serumkonzentrationen von 5 Maus- und 4 Rattenserum

	n	Median	min.	max.
Mausserum	5	81.0 ng/ml	38,1 ng/mL	105,7 ng/mL
Rattenserum	4	24.2 ng/ml	10,7 ng/mL	59,7 ng/mL

Je nach Tierstamm, Mutation oder Individuum können die IGFBP-2 Serum-Konzentrationen variieren. Wir empfehlen eine vorherige individuelle Überprüfung.

12 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG

12.1 Sensitivität

Die Sensitivität wurde durch Messen des Leerwertes und der Berechnung des theoretischen Konzentration des Leerwertes + 2SD ermittelt. Die analytische Sensitivität dieses Testes beträgt 0.01 ng/ml.

12.2 Kalibrierung

Die Kalibration des Assays erfolgte mittels rekombinatem Maus-IGFBP-2 der Firma R&D Systems Inc. (Minneapolis, USA; www.rndsystems.com).

12.3 Spezifität

Die Spezifität dieses ELISAs wurde durch Testen von Kreuzreaktivität mit menschlichen IGFBPs: IGFBP -1, -2, -3, -4, -5, und -6 sowie mit rekombinatem Maus und Ratten IGFBP-3 untersucht. Diese wurden als Proben mit einer Konzentration von 500 ng/ml verwendet. Die gemessene Kreuzreaktivität betrug jeweils weniger als 10 %.

12.4 Präzision

Intra-Assay-Varianz

Drei Proben wurden mehrfach in dem gleichen Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 zu sehen. Der ermittelte Variationskoeffizient betrug im Mittel 3.9%

Tabelle 2: Intra-Assay Variation

	Probe 1	Probe 2	Probe 3
Mittel [ng/mL]	124,25	9,39	42,22
SA [ng/mL]	4,08	0,32	2,51
VK%	3,29	3,41	5,96
n	16	16	16

Inter-Assay-Varianz

Vier Serumproben wurden in 16 unabhängigen Tests gemessen. Der Variationskoeffizient betrug im Mittel 5.1% (SA 1.3). Beispielhafte Ergebnisse werden in der Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3: Inter-Assay Variation

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Mittel [ng/mL]	126,07	102,75	25,60	10,40
SA [ng/mL]	5,09	3,95	1,21	0,61
VK%	4,04	3,84	4,73	5,89
n	16	16	16	16

Linearität

Drei verschiedenen Serumproben wurden in einem Bereich von 1:5 bis 1:320 verdünnt. Die gemessene m/rIGFBP-2-Konzentration in jeder Lösung wurde mit dem theoretisch erwarteten Wert (Abbildung 2) verglichen.

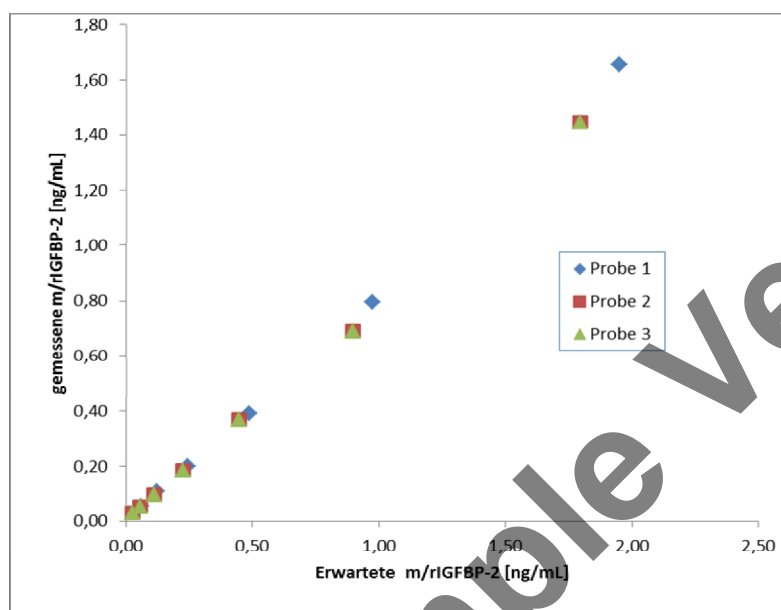


Abbildung 2: Linearität: Dargestellt sind die gemessenen Konzentrationen in a) Maus- und b) Rattenserum in verschiedenen Verdünnungen

12.5 Kreuzreaktivität mit anderen Spezies

Mehrere handelsübliche Tierseren wurden als Proben (1:10 / 1:100) in diesem Test verwendet. Messbare Signale wurden im Serum der folgenden Arten detektiert: Pferd, Meerschweinchen, Hund, Katze, Esel, Ziege.

Keine Signal wurden detektiert in: Schwein-, Rinder-, Kaninchen-, Hühner- oder Schafs-Proben

TABLE OF CONTENTS

ENGLISH INSTRUCTIONS FOR USE	16
1 INTENDED USE.....	16
2 INTRODUCTION.....	16
3 ASSAY PRINCIPLE	17
4 WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	17
5 SAMPLES.....	18
6 MATERIALS	19
7 TECHNICAL NOTES	20
8 ASSAY PROCEDURE	21
9 QUALITY CONTROL.....	22
10 EVALUATION OF RESULTS	22
11 EXPECTED VALUES.....	24
12 PERFORMANCE CHARACTERISTICS	24
LITERATUR / LITERATURE.....	26
INTERNATIONALE ASSAY DESCRIPTION	28

Example Version

ENGLISH Instructions for use

m/rIGFBP-2 ELISA E08	96 Determinations
Principle of the test	Sandwich ELISA
Duration (incubation period)	3 h
Antibody Conjugate	100-fold concentrate
Enzyme Conjugate	100-fold concentrate
Buffer and Substrate	Ready for use
Standards	7 single standards: 31.25 - 2000 pg/mL, lyophilized, native mouse IGFBP-2
Calibration	The assay is calibrated against the recombinant Mouse-IGFBP-2 of R&D Systems Inc.
Assay Range	0.01 –200 ng/mL
Control	1 Control Serum, lyophilized
Sample	Serum from rat and mouse
Required sample volume	10 µL
Sample dilution	1:100
Analytical sensitivity	0.01 ng/mL
Average Intra- / Inter-Assay Variance	< 10%

1 INTENDED USE

This enzyme immunoassay kit is suited for measuring IGFBP-2 in mouse and rat serum for scientific purposes.

2 INTRODUCTION

Insulin-like growth factors (IGFs) regulate the proliferation, differentiation, apoptosis, cell adhesion and metabolism in various tissues and cell types

IGFBP-2 is an unglycosylated polypeptide of 31.3 kDa, which forms binary IGF-complexes and shows no circadian rhythm in the circulation. The serum concentration of IGFBP-2 increases in fasting, after major surgery and after trauma, but the increasing of the concentration is most intensive in malignant diseases.

The correlation of the IGFBP-2 level to the degree of progression is a striking feature in various tumor types as is the normalization of the IGFBP-serum levels after remission (5-10). During the GH-therapy, e.g. in short stature and in GH-abuse (doping) the IGFBP-2 level decreases. In Trisomy 18 IGFBP-2 in maternal serum is decreased and IGFBP-1 is increased; therefore the ratio IGFBP-2 /IGFBP-1 is a marker for this chromosome abnormality (17).

Transgenic organisms are a good opportunity to investigate the function of genes or proteins. The mouse or rat model is a well-suited system for investigation of the relevance of IGFBP-2 in physiological and pathological processes. Over expression of the IGFBP-2 gene in mice results in a weight reduction of 30% in spleen and moderately reduced weight in other organs (18). Effects of IGFBP-2 on the organism can be compensated through the modified expression of other IGF-Binding proteins.

Especially in tumor biology the mouse and rat systems enable investigation of the systemic relevance of IGFBP-2. IGFBP-2 influences tumor cells as it induces catalase activity in adrenocortical cells (19). Furthermore IGFBP-2 interacts with tumor cells via its RGD-amino acid sequence and seems to stimulate cell invasion of glioma cells (20).

3 ASSAY PRINCIPLE

The Mediagnost m/rIGFBP-2 ELISA, E08 is a so-called sandwich-assay. It utilizes two different specific high affinity polyclonal antibodies for this protein. The IGFBP-2 in the samples binds quantitatively to the immobilized antibody. In the following step, the biotinylated antibody in turn binds IGFBP-2. After washing, a streptavidin-peroxidase-enzyme conjugate will be added, which will bind highly specific to the biotin of the antibody. Subsequently, the peroxidase catalyzes an enzymatic reaction resulting in a blue coloration. The intensity of the blue color depends on the IGFBP-2 content of the sample. The reaction is stopped by the addition of stop solution and color intensity is quantified by measuring the absorption.

4 WARNINGS AND PRECAUTIONS

For In Vitro Use only. 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 obvious 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.

Reagents AK, EK, VP, WP

Contain as preservative **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' Tetramethylbencidine (<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. General first aid procedures:

4.1 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

Mouse and Rat Serum Plasma

5.2 Specimen collection

Haemolytic reactions have to be avoided.

5.3 Requested sample volume: 10 µl serum.

5.4 Sample stability

- In firmly closable sample vials
- Storage at 4°C: max 3 Days
- Freeze/-thaw cycles: max.5

It is recommended to store samples as soon as possible at least at 4°C. For any long time storage the sample has to be kept frozen at -20°C.

Samples were kept frozen and freeze-thaw cycles were applied. Up to 5 freeze-thaw cycles did not change the measured IGFBP-2 concentration significantly.

5.5 Interferenz

Hemoglobin in the sample do not interfere to a concentration of **5 mg/mL**.

However, the use of hemolytic, lipemic or icteric samples should be validated by the user.

5.6 Sample dilution

Samples must be diluted prior to measurement prior to measurement. An extraction step is not required.

- **Dilution: 1:100** with Dilution Buffer **VP**
- Example: Pipette **990 µL Dilution Buffer VP** in PE-/PP-Tubes add **10 µL Serum** (dilution factor 100).
- If sample size is **limiting, a minimum of 2.5 µL** sample might be used alternatively, dilution in 250 µL Dilution Buffer **VP** yields a dilution of **1:101**
- After Mixing use 100 µL of this dilution in the assay.
- Serum samples should be diluted prior to measurement 1:20 – 1:500-fold with Dilution Buffer **VP**, depending on the expected values (see chapter Expected Values).

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-IGFBP-2 antibody. Wells are separately breakable.	(8x12) wells
A-G	Standards , lyophilised (native mouse IGFBP-2), concentrations are given on the vial labels and on the QC-certificate.	7 x 1 mL
KS	Control Serum , lyophilised, (mouse serum), the concentration is given on the QC-Certificate .	1 x 250 µL
AK	Antibody Conjugate 100-fold concentrated, goat-anti-mIGFBP-2-Antibody biotinylated	1 x 120 µL
EK	Enzymkonjugat (POD) 100-fold concentrated, Streptavidin Peroxidase-Conjugate	1 x 120 µL
VP	Dilution Buffer , ready for use. Please shake before 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	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	2 x
	Instructions for use	1 x
-	Quality Control Certificate (QC-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-G** and Control Serum **KS** 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 – G** and Control **KS** 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 Serum **KS** with the Dilution Buffer **VP** in the same ratio (1:100) 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-G**, Control Serum **KS** 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**, 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-G**, Control Serum **KS** 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 H₂O₂-Tetramethylbenzidine, 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 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.

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 dynamical 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.

8 ASSAY PROCEDURE

Preparation of reagents:		Reconstitution:	Dilution:
Before assay procedure bring all reagents to room temperature 20-25°C .			
A-G	Standards	in 1 mL Dilution Buffer VP	-
KS	Control Serum	in 250 µL Dilution Buffer VP	1:100 with Dilution Buffer VP
AK	Antbody Conjugate	-	1:100 with Dilution Buffer VP
EK	Enzyme Conjugate	-	1:100 with Dilution Buffer VP
WP	Washing Buffer	-	1:20 with Aqua dest.
Sample dilution: with Dilution Buffer VP 1:100			
Assay Procedure in Double Determination:			
Pipettie	Reagenzien		Position
100 µL	Dilution Buffer VP (Blank)		A1/A2
100 µL	Standard A (31.25 pg/mL)		B1/B2
100 µL	Standard B (62.5 pg/mL)		C1/C2
100 µL	Standard C (125 pg/mL)		D1/D2
100 µL	Standard D (250 pg/mL)		E1/E2
100 µL	Standard E (500 pg/mL)		F1/F2
100 µL	Standard F (1000 pg/mL)		G1/G2
100 µL	Standard G (2000 pg/mL)		H1/H2
100 µL	Control Serum	(1:100 diluted)	A3/A4
100 µL	Sample	(1:100 diluted)	in the rest of the wells according the requirements pipettieren
Cover the wells with the sealing tape.			
Sample Incubation: 1 h at 20-25°C, 350 rpm			
5x 300 µL	Aspirate 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 (1:100 diluted)		In each well
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation: 1 h at 20-25°C, 350 rpm			
5x 300 µL	Aspirate 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 (1:100 diluted)		In each well
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation: 0.5 h at 20-25°C, 350 rpm			
5x 300 µL	Aspirate 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
Substrat S Incubation: 0.5 h in the Dark at 20-25°C			
100 µL	Stopping Solution SL		In jede Vertiefung
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. The measured control value must be concordant with the valid range stated on the QC Certificate.

If the criteria are not met, the run is not valid and should be repeated. Each laboratory should use known samples as further controls.

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 **G** should be above 1.00.

Samples, which yield higher absorbance values than Standard **G**, should be re-tested with a higher dilution.

10 EVALUATION OF RESULTS

10.1 Establishing of the standard curve

The standards provided contain the following concentrations of native mIGFBP-2:

Standard	A	B	C	D	E	F	G
pg/mL	31.25	62.5	125	250	500	1000	2000
ng/mL	0.03125	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2

- 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 absorbance 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) Recommendation: Calculation of the standard curve should be done by using a computer program, because the curve is in general (without respective transformation) not ideally described by linear regression. **A higher-grade polynomial, or four parametric logistic (4-PL) curve fit or non-linear regression** are usually suitable for the evaluation (as might be spline or point-to-point alignment in individual cases).
- 5) The IGFBP-2 concentration in ng/mL (or pg/mL, according the chosen unit for the standards) of the samples can be calculated by **multiplication** with the respective **dilution factor**.

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	F	G
pg/mL	0.0	31.25	62.5	125	250	500	1000	2000
OD (450-620 nm)	0.112	0.042	0.083	0.159	0.325	0.632	1.237	2.27

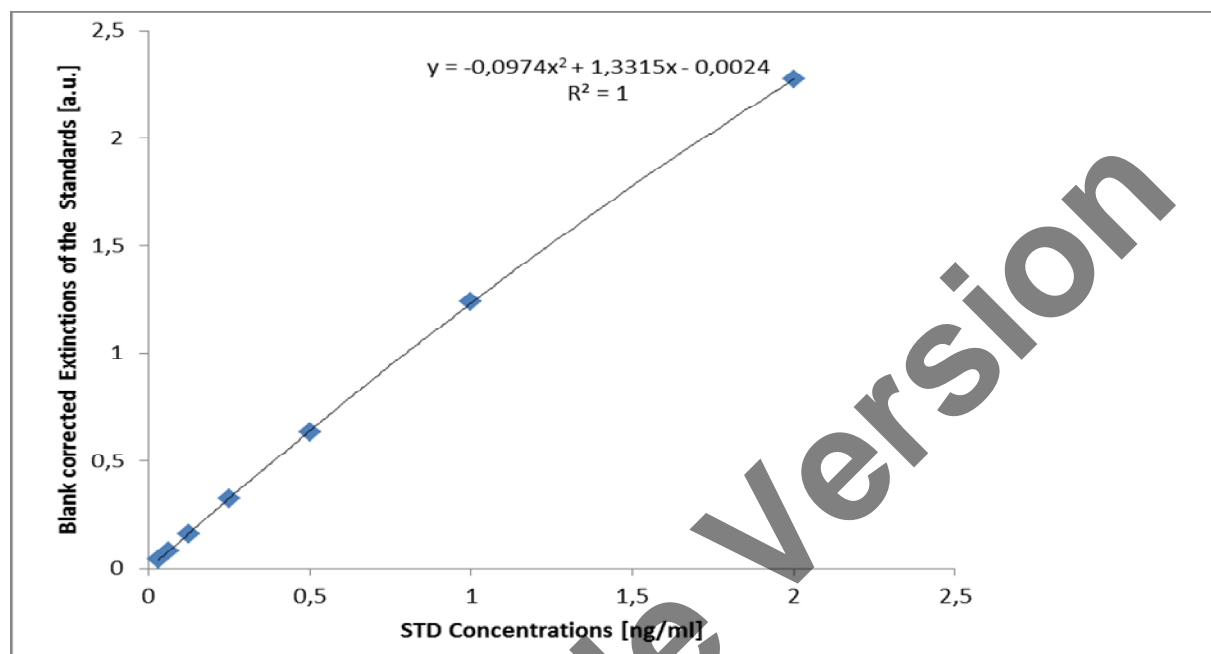


Figure 1: Exemplary standard curve

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-2 concentrations

Sample dilution: 1:100

Measured extinction of your sample 0.961

Measured extinction of the blank 0.112

Your measurement program will calculate the IGFBP-2 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 (here: polynomial 2nd degree).

In this exemplary case the following equation is solved by the program to calculate the IGFBP-2 concentration in the sample:

$$0.849 = -0.0974x^2 + 1.3315x - 0.0024$$

$$0.673 = x$$

If the dilution factor (**1:100**) is taken into account the IGFBP-2 concentration of the undiluted sample is

$$0.673 \text{ ng/mL} \times 100 = 67.3 \text{ ng/mL}$$

11 EXPECTED VALUES

Several commercially available mouse and rat sera have been tested for their IGFBP-2 concentrations, following results were obtained:

Table 1: Expected values IGFBP-2 serum concentrations from 5 mouse- and 4 rat sera

	n	Median	min.	max.
Mouse Sera	5	81.0 ng/ml	38.1 ng/mL	105.7 ng/mL
Rat Sera	4	24.2 ng/ml	10.7 ng/mL	59.7 ng/mL

Significant variations of serum values depending on the individual animal or the respective strain or mutant are likely, prior verification is recommended.

12 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

12.1 Sensitivity

Sensitivity was assessed by measuring the blank and calculating the theoretical concentration of the blank +2SD. The analytical sensitivity of the E08 is 0.01 ng/ml.

12.2 Calibration

The assay has been calibrated against the recombinant Mouse-IGFBP-2 of R&D Systems Inc. (Minneapolis, USA; www.rndsystems.com).

12.3 Specificity

The specificity of this ELISA was investigated by testing cross reactivity with human IGFBPs: IGFBP-1, -2, -3, -4, -5, and -6 as well as with recombinant mouse and rat IGFBP-3. These parameters were applied as samples with a concentration of 500 ng/mL. Measured cross reactivity was less than 10% each.

12.4 Reproducibility and Precision

Intra-assay-Variation

Four serum samples were measured in 16 independent assays. On average the coefficient of variation was 5.1% (SD 1.3). Exemplary results are shown in table 2.

Table 2: Intra-Assay Variation

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean [ng/mL]	124.25	9.39	42.22
SD [ng/mL]	4.08	0.32	2.51
CV%	3.29	3.41	5.96
n	16	16	16

Inter-assay-Variation

Four serum samples were measured in 16 independent assays. On average the coefficient of variation was 5.1% (SD 1.3). Exemplary results are shown in table 3.

Table 3: Inter-Assay Variation

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Mean [ng/mL]	126,07	102,75	25,60	10,40
SD [ng/mL]	5,09	3,95	1,21	0,61
CV%	4,04	3,84	4,73	5,89
n	16	16	16	16

12.5 Linearity

Three different serum samples were diluted and the recalculated m/rIGFBP-2 concentration measured in each dilution is compared to the theoretically expected value (Figure 2). Samples were diluted from 1:5 up to 1:320.

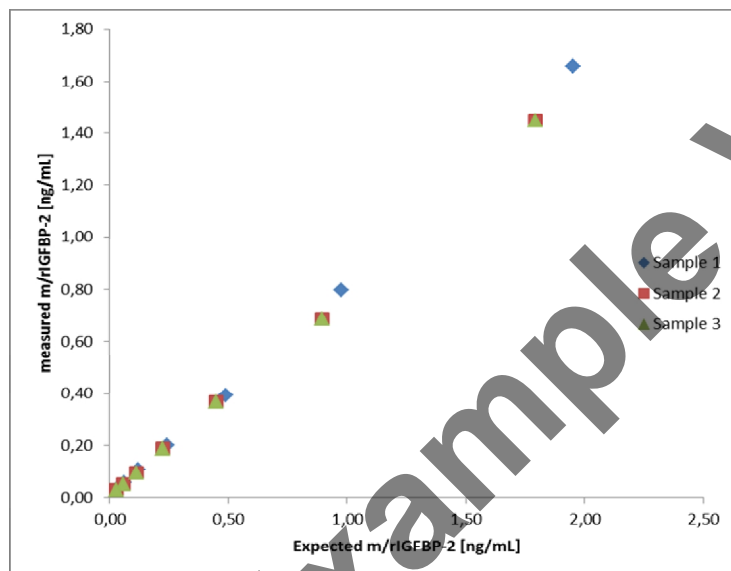


Figure 2: Linearity of the sample dilution: Shown are the measured concentrations in different dilutions of a) mouse serum and b) rat serum samples.

12.6 Species Cross-Reactivity

Species Cross-Reactivity

Several commercially available animal sera have been used as samples (1:10/1:100) in this assay. A signal was detected in the serum of the following species:

Horse, guinea pig, dog, cat, donkey, goat

No signal was detected in:

Pig, bovine, rabbit, chicken, sheep samples

LITERATUR / LITERATURE

1. Elmlinger MW, Wimmer K, Biemer E, Blum WF, Ranke MB, Dannecker GE, (1996) Insulin-like growth factor binding protein 2 is differentially expressed in leukaemic T-and B-cell lines. *Growth Regulation* 6, 152-157
2. Hoeflich A, Nedbal S, Blum WF, Erhard M, Lahm H, Brem G, Kolb HJ, Wanke R, Wolf E. (2001) Growth inhibition in giant growth hormone transgenic mice by overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2. *Endocrinology* 142:1889-98
3. Ranke MB, Schweizer R, Elmlinger MW, Weber K, Binder G, Schwarze CP, Wollmann HA (2000) Significance of basal IGF-I, IGFBP-3 and IGFBP-2 measurements in the diagnostics of short stature in children. *Hormone Research* 54: 60-68
4. Ranke MB, Schweizer R, Elmlinger MW, Weber K, Binder G, Schwarze CP, Wollmann HA (2001). Relevance of IGF-I, IGFBP-3, and IGFBP-2 measurements during GH treatment of GH-deficient and non-GH-deficient children and adolescents. *Hormone Research* 55: 115-124
5. Crofton PM, Ahmed SF, Wade JC, Elmlinger MW, Ranke MB, Kelnar CJH, Wallace WHB (1999) Effects of a third intensification block of chemotherapy on bone and collagen turnover, insulin-like growth factor I, its binding proteins and short term growth in children with acute lymphoblastic leukemia. *European Journal of Cancer* 35: 960-967
6. Muller HL, Oh Y, Lehrnbecher T, Blum WF, Rosenfeld RG. (1994) Insulin-like growth factor-binding protein-2 concentrations in cerebrospinal fluid and serum of children with malignant solid tumors or acute leukemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 79: 428-34
7. Martin W, Elmlinger, Martin H, Deininger, Burkhardt S, Schuett, Richard, Meyermann, Frank, Duffner, Ernst H, Grote, and Michael B, Ranke (2001) In vivo expression of the insulin-like growth factor binding protein-2 in human gliomas increases with the tumor grade. *Endocrinology* 142: 1652-1658
8. Cohen P, Peehl DM, Stamey TA, Wilson KF, Clemmons DR, Rosenfeld RG (1993) Elevated levels of insulin-like growth factor-binding protein-2 in the serum of prostate cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 76: 1031-1035
9. Boulle N, Baudin E, Gicquel C, Logie A, Bertherat J, Penfornis A, Bertagna X, Luton JP, Schlumberger M, Le Bouc Y. (2001) Evaluation of plasma insulin-like growth factor binding protein-2 as a marker for adrenocortical tumors. *Eur J Endocrinol.* 144: 29-36
10. Ranke MB, Maier KP, Schweizer R, Stadler B, Schleicher s, Elmlinger MW, Flehmig B (2003), Pilot study of elevated levels of insulin-like growth factor-binding protein-2 as indicators of hepatocellular carcinoma. *Horm Res* 60:174-180
11. Rosenfeld RG, Roberts CT Jr. (eds.) (1999) *The IGF system: Contemporary Endocrinology Series*; Humana Press
12. Jones JI, Clemmons DR. (1995) Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev.* 16: 3-34
13. Chard T (1994) Insulin-like growth factors and their binding proteins in normal and abnormal foetal growth. *Growth Reg* 4: 91-100
14. Ranke MB, Elmlinger MW (1997) Functional role of insulin-like growth factor binding proteins. *Hormone Research* 48 (suppl 4): 9-15
15. Elmlinger MW, Bell M, Schütt, BS, Langkamp M, Kutoh E, Ranke MB (2001) Transactivation of the IGFBP-2 promoter in human tumor cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology* 175: 211-218
16. Hoeflich A, Reisinger R, Lahm H, Kiess W, Blum WF, Kolb HJ, Weber MM, Wolf E. (2001) Insulin-like growth factor-binding protein 2 in tumorigenesis: protector or promoter? *Cancer Res.* 15: 8601-8610
17. Miell JP, Langford KS, Jones JS, Noble P, Westwood M, White A, Nicolaidis KH. (1997) The maternal insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein response to trisomic pregnancy during the first trimester: a possible diagnostic tool for trisomy 18 pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab.* 82: 287-292
18. Hoeflich A, Wu M, Mohan S, Foll J, Wanke R, Froehlich T, Arnold GJ, Lahm H, Kolb HJ, Wolf E. (1999) Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in transgenic mice reduces postnatal body weight gain. *Endocrinology* 140(12):5488-5496.
19. Hoeflich A, Fettscher O, Preta G, Lahm H, Kolb HJ, Wolf E, Weber MM (2003) Increased activity of catalase in tumor cells overexpressing IGFBP-2. *Horm Metab Res* 35(11-12):816-821.
20. Song SW, Fuller GN, Khan A, Kong S, Shen W, Taylor E, Ramdas L, Lang FF, Zhang W. (2003) lip45, an insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) binding protein, antagonizes IGFBP-2 stimulation of glioma cell invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(24):13970-13975.

Example Version

Internationale Assay Description

A-G	STD	Rec in 1 mL	BUF VP	-
KS	Control	Rec in 250 µL	BUF VP	1:100 DILU BUF VP
AK	Ab	-	-	1:100 DILU BUF VP
EK	CONJ	-	-	1:100 DILU BUF VP
WP	WASHBUF 20x	-	-	1:20 DILU A. dest.
SPE				1:100 DILU BUF VP
°C 20-25 °C				
100 µL	BUF VP			A1/A2
100 µL	STD A	(31.25 pg/mL)		B1/B2
100 µL	STD B	(62.5 pg/ mL)		C1/C2
100 µL	STD C	(125 pg/ mL)		D1/D2
100 µL	STD D	(250 pg/ mL)		E1/E2
100 µL	STD E	(500 pg/ mL)		F1/F2
100 µL	STD F	(1000 pg/ mL)		G1/G2
100 µL	STD G	(2000 pg/ mL)		H1/H2
100 µL	CONTROL KS	1:100 DILU	BUF VP	A3/A4
100 µL	SPE	1:100 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 ☀				
100 µL	H ₂ SO ₄ SL			
MEASURE				