

# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)



## User's Manual

# m/rIGFBP-2 ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von  
**Maus- und Ratten-**  
**Insulin-like Growth Factor Binding Protein-2**  
Deutsch

# m/rIGFBP-2 ELISA

Enzyme Immunoassay for Quantitative Determination of  
**Mouse- and Rat-**  
**Insulin-like Growth Factor Binding Protein-2**  
English

IVD



REF

DEE008




























96

für in vitro Diagnostik / for in vitro diagnostics

## Symbols / Symbole

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 / Utgångsdatum / Termin Ważności / Lejárati idő / Doba expirácie / Doba expirace
	Consider instructions for use / Bitte Gebrauchsanweisung beachten / Consultez la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las instrucciones de utilización / Consulte as instruções de utilização / Raadpleeg de gebruiksaanwijzing / Se brugsanvisningen / Läs anvisningarna före användning / Proszę przeczytać instrukcję wykonania / Vegyük figyelembe a használati utasításban foglaltakat / Postupujte podľa pokynov na použitie / Postupujte dle návodu k použití
	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 / Lot-Satskod / Numer serii / Lot-Batch szám / Číslo šarže / Číslo šarže
	Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por / Vervaardigd door / Fabrikation af / Tillverkad av / Wyprodukowane pr / Gyártotta / Vyrobené / Vyrobeno
	Catalogue Number / Bestellnummer / Numéro de référence / Numero di riferimento / Número de referencia / Número de referência / Referentienummer / Referencenummer / Katalognummer / Numer katalogowy / Katalógusszám / Katalógové číslo / Katalogové číslo
	Store at between / Lagerung bei zwischen / Conserver à entre / Conservare a tra / Conservar a temp. entre / Armazene a entre / Bewaar bij tussen / Opbevares mellem / Förvaras vid / Przechowywać w / Tároljuk ő ő között / Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí
	Contains sufficient for x tests / Inhalt ausreichend für x Tests / Contient suffisant pour x tests / Contenuto sufficiente per x test / Contiene suficiente para x pruebas / Contém 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 / Obsahuje materiál pro x testů
	Keep away from sunlight / Nicht dem Sonnenlicht aussetzen
	Incubation time / Inkubationszeit
	Incubate at / Inkubation bei
	Shaking / schütteln
	Mikrotiterplate/Mikrotiterplatte
	Reconstitute in / Rekonstituieren in
	Sample / Probe
	AK Antibody Conjugate / Antikörper Konjugat
	EK Enzyme Conjugate / Enzym Konjugat
	VP Dilute in Buffer X / Verdünnen in Puffer X
	A-G Standard X / Standard X
	KS Control Serum / Kontrollserum
	WP Washing Buffer Concentrate / Waschpufferkonzentrat
	Washing Buffer / Waschpuffer
	S Substrate
	SL Stop Solution / Stopp Lösung
	Cover Plate with sealing tape / Platte abkleben
	Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590nm) / Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm).

**Packungsbeilage****Deutsch**

Symbols / Symbole	1
KLINISCHE BEDEUTUNG	4
TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN + EINSATZMÖGLICHKEITEN	4
EINFÜHRUNG	4
EINSATZMÖGLICHKEITEN	5
METHODIK	5
Assay Eigenschaften und Validierung	5
Kalibrierung	6
Erwartungswerte	6
Probenvorbereitung und -lagerung	6
MATERIALIEN	7
Inhalt der Testpackung	7
Zusätzlich benötigte Materialien	7
TECHNISCHE HINWEISE	7
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	8
TESTDURCHFÜHRUNG	9
AUSWERTUNG	10
Package Insert	
Englisch	
INTRODUCTION	11
PHYSIOLOGICAL MEANING	11
INTENDED USE	12
METHODOLOGY	12
Assay Characteristics and Validation	12
Calibration	13
Expectation Values	13
Sample Preparation and Storage	13
REAGENTS PROVIDED	14
MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	14
TECHNICAL RECOMMENDATIONS	14
STORAGE CONDITIONS	15
WARNINGS AND PRECAUTIONS	15
ASSAY PROCEDURE	16
EVALUATION OF RESULTS	17
Establishing the Standard Curve	17
LITERATUR / LITERATURE	18
KURZANLEITUNG	19
Summary of the Assay	20
International test description	20

## PACKUNGSBEILAGE DEUTSCH

### KLINISCHE BEDEUTUNG

- Hoch sensitiver und spezifischer Test zur quantitativen Bestimmung von IGFBP-2 in Maus- und Ratten Serum.
- Rekombinanter Maus IGFBP-2 Standard
- Enthält Antikörper gegen komplettes Maus- und Ratten-IGFBP-2
- Nachweisgrenze bei 0,01 ng/ml
- Proben-Extraktion nicht nötig

### TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN + EINSATZMÖGLICHKEITEN

#### EINFÜHRUNG

Im **humanen System** regulieren die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGFs) die Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Zelladhäsion und den Metabolismus in verschiedensten Geweben und Zelltypen. Das unter Wachstumshormon (WH)-Einfluss vorwiegend in der Leber gebildete IGF-I steuert als Hormon das Längenwachstum der Knochen und die geschlechtliche Reifung. IGF-II ist vorwiegend ein Wachstumsfaktor embryonaler Gewebe (11-13).

Die IGF-Wirkungen über den IGF-Typ-I Rezeptor werden durch die IGF-Bindungsproteine (IGFBP-1 bis -6) unterschiedlich moduliert (14). IGFBP-2 ist nach IGFBP-3 das zweithäufigste IGFBP im menschlichen Blut. IGFs, v.a. tumortypische pro-IGF-Formen und Hormone regulieren die Expression des IGFBP-2, WH wirkt dabei inhibierend. Auf Zellebene scheint IGFBP-2 über einen IGF-unabhängigen Mechanismus IGFBP-2 die Proliferation und Dissemination solider Tumore zu fördern (15,16).

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). Auch interagiert IGFBP-2 über das RGD-Aminosäuremotiv mit Tumorzellen und kann bspw. die Invasion vom Gliomazellen stimulieren (20).

## EINSATZMÖGLICHKEITEN

Der Maus-/Ratten-IGFBP-2 Enzymimmunoassay-Kit ist für die quantitative Messung der IGFBP-2 Konzentration in Maus- und Ratten- Serum in wissenschaftlichen Untersuchungen einsetzbar.

## METHODIK

### Assay Eigenschaften und Validierung

Der Enzymimmunoassay für Maus-/ Ratten-IGFBP-2 verwendet zwei verschiedene hochaffine polyklonale Antikörper für dieses Protein. Der Test erkennt quantitativ Maus- und Ratten-IGFBP-2 und wird von erhöhten IGF-I bzw. IGF-II Werten nicht beeinflusst. Verwandte Moleküle wie z.B. IGFBP-3 zeigen keine Kreuzreaktion im Test.

Die Standards bestehen aus rekombinantem Maus-IGFBP-2 in Konzentrationen von 0,03125 bis 2 ng/ml.

Die theoretische Sensitivität des Assays beträgt 0,01 ng/ml (zweifache Standardabweichung des Null-Standards). Die Inter- und Intraassay Variationskoeffizienten liegen beide unter 10%. Beispielhafte Bestimmungen sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 1 : Interassay-Varianz**

<b>Probe 1</b>	24,9 ng/ml	n= 6	VK = 6,4 %
<b>Probe 2</b>	105,7 ng/ml	n= 6	VK = 2,4 %
<b>Probe 3</b>	171,0 ng/ml	n= 8	VK = 5,3 %

**Tabelle 2: Intraassay-Varianz**

<b>Probe</b>	67,87 ng/ml	n = 9	VK = 4,6 %
--------------	-------------	-------	------------

Die Linearität von Serenverdünnungen ist über einen sehr weiten Bereich hervorragend (s.Tab.: 3).

**Tabelle 3: Linearität der Probenverdünnung:**

<b>Verdünnung</b>	<b>Maus Serum (ng/ml)</b>	<b>Ratten Serum (ng/ml)</b>
1:20	>max.	23,06
1:40	>max.	23,81
1:80	109,08	24,10
1:160	118,30	25,73
1:320	125,42	27,73
1:640	127,48	32,14

## Kalibrierung

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

## Erwartungswerte

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

	n	Median	min.	max.
Maus Serum	5	<b>81.0 ng/ml</b>	59.7 ng/ml	105.7 ng/ml
Ratten Serum	4	<b>24.2 ng/ml</b>	10.7 ng/ml	38.1 ng/ml

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

## Probenvorbereitung und -lagerung

IGFBP-2 Werte werden durch unachtsame Probenbehandlung und -lagerung beeinflusst, daher sollte die Aufbewahrung der Proben mindestens gekühlt, also bei 4°C bzw. auf Eis, erfolgen. Unverdünnte Proben sollten bei -20°C in dicht verschließbaren Plastikschraubgefäßen aufbewahrt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Serum/Plasma wirkt sich bereits bei sehr wenigen Zyklen auf die messbare IGFBP-2 Konzentration aus, daher sollten **wiederholte Gefrier-Tau-Zyklen unbedingt vermieden werden!**

Die hohe Sensitivität des Assays erlaubt IGFBP-2-Messungen in kleinen Probenvolumina, deren Wert eher durch die Pipettiergenauigkeit als durch die Menge von IGFBP-2 begrenzt wird. Die Serumproben müssen vor der Messung verdünnt werden. Ein Extraktionsschritt ist nicht erforderlich.

Serumproben sollten vor der Messung 1: 20 - 500-fach mit Verdünnungspuffer VP verdünnt werden, je nach erwarteten IGFBP-2-Werten (s. Kapitel: Erwartungswerte). Im allgemeinen ist eine 1:100 Verdünnung geeignet. (Die empfohlene mindest Probemenge ist 10 µl Serum).

### Vorgeschlagenes Verdünnungsprotokoll für eine Doppelbestimmung:

10 µl Serum werden mit der Hand oder mit Hilfe eines Dilutors mit 990µl Verdünnungspuffer VP verdünnt (Verdünnung 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.

2 x 100 µl von der verdünnten Probe werden im Assay eingesetzt.

**MATERIALIEN****Inhalt der Testpackung**

1)	MTP	<b>Mikrotiterplatte</b> , gebrauchsfertig: Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen, die in 12 abnehmbare Streifen à 8 Vertiefungen (einzeln abbrechbar) aufgeteilt ist. Die Platte ist mit polyklonalen anti-IGFBP-2 Antikörpern beschichtet.
2)	CAL	<b>Standards A-G</b> , 1 ml, lyophilisiert, enthalten rekombinantes IGFBP-2: Die Verdünnungen der Standardkurve decken einen Bereich von 31,25 - 2000 pg/ml (31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000; 2000 pg/ml) IGFBP-2 ab und werden mit je <b>1 ml Verdünnungspuffer VP</b> rekonstituiert.
3)	Control	<b>Kontrollserum KS</b> , 100 µl, lyophilisiert: Enthält Mausserum und muss in 100 µl Verdünnungspuffer VP rekonstituiert werden. Die IGFBP-2 Konzentration ist auf dem Etikett angegeben.
4)	DILU	<b>Verdünnungspuffer VP</b> , 120 ml, gebrauchsfertig
5)	Ab	<b>Antikörperkonjugat AK</b> , 120 µl, 100fach konzentriert: Enthält biotinylierten anti-IGFBP-2 spezifischen Antikörper. Kurz vor Gebrauch 1:100 mit Verdünnungspuffer VP verdünnen.
6)	CONJ	<b>Enzymkonjugat EK</b> , 120 µl, 100fach konzentriert: Enthält POD-markiertes Streptavidin und muss kurz vor Gebrauch 1:100 mit Verdünnungspuffer VP verdünnt werden.
7)	WASHBUF 20x	<b>Waschpuffer WP</b> , 50 ml, 20fach konzentriert: Vor Gebrauch 1:20 mit A.dest. verdünnen. Der 1:20 gebrauchsfertig verdünnte Waschpuffer WP ist nur begrenzt haltbar, bitte nur nach Bedarf ansetzen.
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	<b>Stopplösung SL</b> , 0,2 M Schwefelsäure, 12 ml, gebrauchsfertig
8)	SUBST	<b>TMB-Substratlösung S</b> , 12 ml, gebrauchsfertig
9)		<b>Abdeckfolie</b> für Mikrotiterplatten, 2 Stück, selbstklebend

**Zusätzlich benötigte Materialien**

- Destilliertes oder entmineralisiertes Wasser zum Verdünnen des Waschpuffers WP
- Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen
- Vortex-Mischgerät
- Vorrichtung zum Absaugen der Proben-Lösungen aus den Vertiefungen der Platte (empfohlen wegen potentieller Infektionsgefahr bei humanen Proben)
- Mikrotiterplatten-Waschgerät (empfohlen)
- Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und 620 nm (bzw. ≥590 nm).
- Folienschweißgerät für Alubeutel (empfohlen)

**TECHNISCHE HINWEISE**

Der Assay ist strikt nach dem Testprotokoll durchzuführen.

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

Für die **Rekonstitution** der lyophilisierten Komponenten (Standards A-G, KS) muss der im Kit erhaltene **Verdünnungspuffer VP** verwendet 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 sollte jedoch vermieden werden.

Bei sachgemäßer Handhabung ist die **Haltbarkeit der Reagenzien nach Öffnung** nicht beeinträchtigt. Nicht verwendete Streifen der Testplatte sind zusammen mit dem Trockenkissen luftdicht bei 2° - 8°C zu lagern. Rekonstituierte Komponenten (Standards A – G und Kontrollserum KS) sollten bei -20°C (oder kälter) bis zu höchstens 2 Monaten gelagert werden. **Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.** Wenn mehrere unabhängige m/rIGFBP-2-Messungen über eine längere Periode mit einem Kit geplant sind, wird vorherige Aliquotierung der Komponenten in passende Volumina empfohlen.

Der 1:20 gebrauchsfertig verdünnte Waschpuffer WP ist nur begrenzt haltbar, bitte nur nach Bedarf ansetzen.

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 Substratlösung S, stabilisiertes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich – Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

Bei der **Testdurchführung** sollten Standards, Kontrollserum und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden z.B. in 15 Minuten).

Das Antikörper-Konjugat AK und Enzym-Konjugat 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 Testplatte gegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

## WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Demeditec DEE008 Kit ist nur zu 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. Demeditec Diagnostics GmbH kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht, soweit keine gesetzliche Regelung anderes besagt.

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

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

Die Reagenzien **AK, EK, VP** enthalten als Konservierungsmittel verdünnt (0,01%) **2-Methyl-4-isothiazolin-3-one Solution**

R34	Verursacht Verätzungen
R43	Kann bei Hautkontakt zur Sensibilisierung führen
S26	Im Falle von Augenkontakt, sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen
S36/37	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung und –handschuhe tragen.
S45	Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen

Die Reagenzien **AK, EK, VP, WP** enthalten als Konservierungsmittel verdünnt (0,01%) **(w/w) 5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one und 2-methyl-2H-isothiazol-3-one**

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

### Substratlösung (S)

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

R20/21/R22	Gesundheitsschädlich bei Inhalation, Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
R36/37/38	Reizend/Irritierend für Augen, Haut und Atmungssystem
S26	Im Falle von Augenkontakt, sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen
S36/37	Geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.



**Stopplösung (SL)**

Die Stopplösung enthält 0,2 M Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

R36/38 Reizt die Augen und die Haut

S26 Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.

S36/37 Geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

Erste-Hilfe Maßnahmen:

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

*Nach Augenkontakt:* Nach Berührung mit den Augen während mindestens 15 Minuten mit genügend Wasser spülen. Ausreichende Spülung durch Spreizung der Augenlider sicherstellen.

*Nach Verschlucken:* Mund mit Wasser ausspülen, vorausgesetzt die Person ist bei Bewusstsein. Sofort einen Arzt zuziehen.

**TESTDURCHFÜHRUNG**

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** gegeben, sowie in die Positionen C1/2 je **100 µl Standard B**, in die Positionen D1/2 je **100 µl Standard C**, in die Positionen E1/2 je **100 µl Standard D**, in die Positionen F1/2 je **100 µl Standard E**, in die Positionen G1/2 je **100 µl Standard F**, in die Positionen H1/2 je **100 µl Standard G**.  
Zur Kontrolle der korrekten Durchführung des Tests können **100 µl** der **(1:100)** verdünnten Kontroll-Lösung **KS** in die Vertiefung A3/4 gegeben werden. In die restlichen Vertiefungen können je **100 µl** der **verdünnten Probe** pipettiert werden.
- 3) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie abgedeckt und **1 Stunde** bei **Raumtemperatur** und Schütteln (mind. 350 upm) inkubiert.
- 4) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Lösungen abgesaugt und die Platte mit **250 µl Waschpuffer WP** / Vertiefung dreimal gewaschen.
- 5) Im Anschluss an den letzten Waschschrift werden **100 µl** des **(1:100)** verdünnten **Antikörperkonjugates AK** in jede Vertiefung pipettiert und der Ansatz **1 Stunde** bei **Raumtemperatur** und Schütteln (mind. 350 upm) inkubiert.
- 6) Nach Abschluss dieser Inkubation wird die Platte wie in Schritt 4) beschrieben gewaschen
- 7) In jede Vertiefung werden **100 µl** des **(1:100)** verdünnten **Enzymkonjugates EK** gegeben und der Ansatz **30 Minuten** bei **Raumtemperatur** und Schütteln (mind. 350 upm) inkubiert.
- 8) Nach Abschluss dieser Inkubation wird die Platte wie in Schritt 4) beschrieben gewaschen
- 9) In jede Vertiefung werden **100 µl** der **Substratlösung S** pipettiert und **30 Minuten** im Dunkeln bei **Raumtemperatur** inkubiert.
- 10) Nach Ablauf der Inkubationszeit wird in jede Vertiefung **100 µl Stopplösung SL** pipettiert.

Die Ausmessung der Farbreaktion erfolgt **innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm (Referenzfilter 620)**.

**AUSWERTUNG****Berechnung der Standardkurve**

Die bereitgestellten Standards enthalten folgende rekombinante mIGFBP-2 Konzentrationen:

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

- 1) Ermittlung des Mittelwerts (MW) 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 entsprechend bestimmte optische Dichte (y-Achse) aufgetragen.
- 4) Die Berechnung der Standardkurve sollte durch ein Computerprogramm erfolgen, da die Kurve im allgemeinen durch nicht lineare Regression bzw. ein höhergradiges Polynom bzw. die vier Parameter Logistik (4PL) Kurve beschrieben wird.
- 5) Aus den gemessenen Extinktionen der Proben wird mit Hilfe der Gradengleichung der Standardkurve der Gehalt der Probe an Maus-IGFBP-2 in ng/ml bestimmt.

## PACKAGE INSERT ENGLISH

### TECHNICAL FEATURES

- Highly specific and sensitive assay for quantitative detection of IGFBP-2 in mouse and rat serum
- Recombinant mouse IGFBP-2 as standard
- Uses antibodies against complete mouse and rat IGFBP-2
- No sample extraction is required
- Detection limit: 0.01 ng/ml

### INTRODUCTION

Insulin-like growth factors (IGFs) regulate the proliferation, differentiation, apoptosis, cell adhesion and metabolism in various tissues and cell types. The IGF-I, which is produced mainly in liver under the influence of Growth Hormone (GH), regulates as hormone the linear growth of the bones and the process of sexual maturity, while IGF-II is mainly a growth factor of foetal tissue (11-13). The biological actions of IGF over the IGF-Type-I receptor are modulated variably through the IGF binding proteins (IGFBP-1 to-6) (14). IGFBP-2 is, after IGFBP-3, the second most frequent IGFBP in the human blood. IGFs, especially tumor typical pro-IGF-forms and hormones regulate the expression of IGFBP-2, GH effect is thereby inhibiting. At cellular level IGFBP-2 seems to stimulate the proliferation and dissemination of solid tumors via an IGF-independent mechanism (15,16).

### PHYSIOLOGICAL MEANING

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).

## INTENDED USE

This IGFBP-2 Enzyme Immunoassay-Kit is suited for quantitative determination of IGFBP-2 in mouse and rat serum for scientific purposes.

## METHODOLOGY

### Assay Characteristics and Validation

The ELISA for IGFBP-2 utilizes two different specific high affinity polyclonal antibodies for this protein. The ELISA recognizes quantitatively mouse and rat IGFBP-2 and is unaffected by an excess of IGF-I or IGF-II levels. Related molecules such as IGFBP-3 show no cross-reactions in the assay.

The standards are prepared of recombinant mouse-IGFBP-2 in the range of 0.03125 to 2 ng/ml.

The theoretical sensitivity of the assay is approx. 0.01 ng/ml (2 x SD of zero standard). Intra-assay and inter-assay variation coefficients were found both < 10%. Exemplary determinations are shown in the tables 1 and 2.

**Table 1 :** Inter-Assay-Variation

<b>Sample 1</b>	24.9 ng/ml	n= 6	CV = 6.4 %
<b>Sample 2</b>	105.7 ng/ml	n= 6	CV = 2.4 %
<b>Sample 3</b>	171.0 ng/ml	n= 8	CV = 5.3 %

**Table 2:** Intra-Assay-Variation

<b>Sample</b>	67.87 ng/ml	n = 9	CV = 4.6 %
---------------	-------------	-------	------------

Dilution of samples has been found over a wide range with very good linearity (see table 3).

**Table 3:** Linearity of the sample dilution:

<b>Dilution</b>	<b>Mouse Serum (ng/ml)</b>	<b>Rat Serum (ng/ml)</b>
1:20	>max.	23.06
1:40	>max.	23.81
1:80	109.08	24.10
1:160	118.30	25.73
1:320	125.42	27.73
1:640	127.48	32.14

## Calibration

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

## Expectation Values

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

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

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

## Sample Preparation and Storage

The samples should be stored frozen until measurement. IGFBP-2 levels are influenced by improper handling or storage and do not remain stable over several days at elevated temperatures. Store undiluted samples frozen in a tightly closed plastic vial. **Repeated freezing and thawing of serum/plasma should be avoided**, it seems to have a measurable effect on IGFBP-2 levels.

The high sensitivity of the assay allows measurement of IGFBP-2 in small sample volumes, which is limited by pipetting accuracy rather than the amount of IGFBP-2.

Serum samples should be diluted prior to measurement 1:20 – 1:500-fold with **Dilution Buffer VP**, depending on the expected values (see chapter Expectation Values). In general a dilution of 1:100 should be appropriate ( the recommended minimal essential sample volume is: 10 µl serum).

Sample extraction is not required.

### Suggestion for dilution protocol (double determination):

Mix 10 µl serum manually or with the aid of a dilutor with 990µl **Dilution Buffer VP** (1:100), or, more simple for larger series with 1000 µl Dilution Buffer VP (1:101).

If sample size is limiting, a minimum of 2.5 µl sample might be used alternatively, dilution in 250 µl VP yields a dilution of 1:101 (care should be taken to accuracy of pipetting such low volumes !).

Use 2 x 100 µl of this dilution in the assay.

**REAGENTS PROVIDED**

1)	MTP	<b>Microtiter Plate</b> with 96 wells, divided up in 12 strips with 8 wells separately breakable, coated with polyclonal anti-IGFBP-2 antibodies and packed in a laminate bag.
2)	CAL	<b>Standards A-G</b> , 1 ml, lyophilized: Contain recombinant mouse IGFBP-2: Standard values are between 31.25 - 2000 pg/ml (31.25; 62.5; 125; 250; 500; 1000; 2000 pg/ml) IGFBP-2 and have to be reconstituted with <b>1 ml Dilution Buffer VP</b> each.
3)	DILU	<b>Dilution Buffer VP, 120 ml</b> , ready for use.
4)	Control	<b>Control Serum KS, 100 µl</b> , lyophilized: Contains mouse serum and has to be reconstituted with <b>100 µl Dilution Buffer VP</b> . The exact concentration is given on the vial label.
5)	Ab	<b>Antibody Conjugate AK</b> , 120 µl, 100fold concentrated: Contains biotinylated anti-IGFBP-2 antibody and has to be diluted immediately before use <b>1:100 with Dilution Buffer VP</b> .
6)	CONJ	<b>Enzyme Conjugate EK</b> , 120 µl, 100fold concentrated: Contains HRP-labelled Streptavidin and has to be diluted immediately before use <b>1:100 with Dilution Buffer VP</b> .
7)	WASHBUF 20x	<b>Washing Buffer (WP)</b> , 50 ml, 20 X concentrated solution. <b>Washing Buffer (WP)</b> has to be diluted <b>1:20</b> with <b>distilled or demineralised water</b> 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 limited stable, dilute only according to requirements.
8)	SUBST	<b>Substrate (S)</b> , 12 ml, ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP)-substrate, stabilised H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Tetramethylbendidine.
9)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	<b>Stopping Solution (SL)</b> , 12 ml, ready for use, 0.2 M sulphuric acid, Caution acid!
10)		Sealing tape for covering of the microtiter plate, 2 x, adhesive.

**MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED**

- Precision pipettes (100 and 200µl) Micropipettes and multichannel pipettes with disposable plastic tips
- Distilled or Deionized water for dilution of the Washing Buffer (WP)
- Vortex-mixer
- Device to aspirate the standards and the samples from the wells (recommended because of the potential danger of infection by human samples)
- Timer (120 min. range)
- Reservoirs (disposable)
- Plate washer and plate shaker (recommended)
- Calibrated Micro plate reader ("ELISA-Reader") with filter for 450 and 620nm (or ≥590 nm)
- Foil welding device for laminate bags (recommended)

**TECHNICAL RECOMMENDATIONS**

**Bring all reagents to room temperature (20 - 25°C) before use.**

For the **reconstitution** of the lyophilised components (**Standards A - G** and **Control Serum KS**) the kit **Dilution Buffer VP** should be used. 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.

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

## STORAGE CONDITIONS

The microtiter plate wells and all undiluted reagents are stable until the expiry date if stored in the dark at 2-8°C.

Store the unused seal strips and microtiter wells together with the desiccant at 2° to 8°C.

The Substrate Solution (S), stabilised H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Tetramethylbencidine, is photosensitive – store and incubate in the dark.

Reconstituted components (Standards A – G and Control Serum KS) should be stored at -20°C (or below) for up to 2 months. **Avoid repeated freeze-thaw cycles.**

In case you plan to perform multiple independent m/r-IGFBP-2 determinations over a longer period with one kit, you should aliquote the components prior to freezing into suitable smaller volumes. This is strongly recommended. The 1:20 diluted **Washing Buffer WP** is only limited stable. Please dilute only according to requirements.

## WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

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

Before use, all kit components should be brought to **room temperature at 20 - 25°C**. Precipitates in buffers should be dissolved before use by thorough mixing and warming. **Temperature WILL affect the absorbance** readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.

Do not mix reagents of different lots. Do not use expired reagents.

The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 - 8°C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.

Caution: This kit contains material of animal origin, therefore all components and specimens should be treated as potentially infectious.

Following components contain **0.01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one Solution** as preservative: AK, EK, VP

R34	Irritating to eyes and skin
R43	Sensibilisation through skin contact possible
S26	In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice
S36/37	Wear suitable protective clothing and gloves
S45	In case of accident or if you feel unwell seek medical advice

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

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

### Stop solution contains 0.2 M Sulfuric Acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

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.

Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step. Use separate pipette tips for each sample, control and reagent to avoid cross contamination. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.

**TMB-Substrate (S) contains 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine.** Store and Incubate in tge dark.

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

#### General first aid procedures:

- Skin contact: Wash affected area thoroughly with water. Discard contaminated cloths and shoes.
- Eye contact: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water at least 15 minutes. In order to assure an effectual rinsing spread the eyelids.
- Ingestion: If swallowed, wash out mouth thoroughly with water. Immediately see a physician.
- Do not eat, drink or smoke in these areas.
- Never pipette the materials with the mouth.
- Spilled material must be wiped off immediately and should become disinfected. Clean contaminated areas and equipment with a suitable detergent.

### ASSAY PROCEDURE

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

When performing the assay, the Standards, Control Serum and the samples should be pipette as fast as possible (e.g., <15 minutes). To avoid distortions due to differences in incubation times, **Antibody- Conjugate AK, Enzyme Conjugate** as well as the following **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.

- 1) add **100 µl Dilution Buffer VP** in wells A1/2 (blank) and
- 2) pipette in positions B1/2           **100 µl Standard A,**  
     pipette in positions C1/2           **100 µl Standard B,**  
     pipette in positions D1/2           **100 µl Standard C,**  
     pipette in positions E1/2           **100 µl Standard D,**  
     pipette in positions F1/2           **100 µl Standard E,**  
     pipette in positions G1/2           **100 µl Standard F,**  
     pipette in positions H1/2           **100 µl Standard G.**

To control correct accomplishment **100 µl** of the **(1:100)** diluted **Control Serum KS** can be pipetted in positions A3/4.

Pipette **100 µl** of the **diluted sample** in the rest of the wells, according to 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 3 times with **250 µl** of **Washing Buffer WP** / well respectively.
- 5) Following the last washing step pipette **100 µl** of the of the **(1:100)** diluted **Antibody Conjugate AK** in each well, and incubate **1 hour** at **room temperature** (shake at 350 rpm).
- 6) After incubation wash the wells 3 times with **Washing Buffer WP** as described above.
- 7) Following the last washing step pipette **100 µl** of the **(1:100)** diluted **Enzyme Conjugate EK** in each well, and incubate **30 min** at **room temperature** (shake at 350 rpm).
- 8) After incubation wash the wells 3 times with **Washing Buffer WP** as described above.
- 9) Pipette **100 µl** of the **TMB-Substrate Solution S** in each well.
- 10) Incubate the plate for **30 minutes** in the dark at **room temperature**.
- 11) Stop the reaction by adding **100 µl** of **Stopping Solution SL** to all wells.  
     Measure the absorbance within **30 minutes** at **450 nm** (reference filter: 620 nm).



## EVALUATION OF RESULTS

### Establishing the Standard Curve

The standards provided contain the following concentrations of recombinant 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 (MA) value for the blank from the duplicated determination (well A1/A2).
- 2) Subtract the mean absorbance (MA) of the blank from the mean absorbancies of all other values.
- 3) Plot the **Standard** concentrations **A-G** on the x-axis versus the mean value of the absorbancies of the **Standards** on the y-axis. By using the mean absorbancies of the samples herewith the sample concentrations can be received.
- 4) Recommendation: Calculation of standard curve and sample concentrations should be done by using a computer programme, because the standard curve is in general best described by a non-linear regression or a higher-grade polynom or four parametric (4PL) curve fits.
- 5) The m/rIGFBP-2 concentration of the samples can be calculated with the standard curve equation and by multiplication with the respective dilution factor.

**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 JL, 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.

**KURZANLEITUNG**

Reagenzpräparation:	Rekonstitution:	Verdünnung:
<b>Standards A-G</b>	in <b>1 ml</b> Verdünnungspuffer <b>VP</b>	
<b>Kontrollserum KS</b>	in <b>100 µl</b> Verdünnungspuffer <b>VP</b>	<b>1:100</b> mit Verdünnungspuffer <b>VP</b>
<b>Antikörperkonjugat AK</b>		<b>1:100</b> mit Verdünnungspuffer <b>VP</b>
<b>Enzymkonjugate EK</b>		<b>1:100</b> mit Verdünnungspuffer <b>VP</b>
<b>Waschpuffer WP</b>		<b>1:20</b> mit <b>Aqua. dest.</b> (z.B. den gesamten Flascheninhalt von 50 ml im Standzylinder auf 1000 ml mit A.dest auffüllen).
<b>Probenverdünnung:</b> z.B. 1:100 (z.B. <b>10 µl</b> Serum mit <b>990 µl</b> Verdünnungspuffer <b>VP</b> mischen) .		

## Testdurchführung in Doppelbestimmung

Pipetieren	Reagenzien	Position
100 µl	Verdünnungspuffer <b>VP</b> (Leerwert)	A1/2
100 µl	Standard <b>A</b> (31,25 pg/ml)	B1/2
100 µl	Standard <b>B</b> (62,5 pg/ml)	C1/2
100 µl	Standard <b>C</b> (125 pg/ml)	D1/2
100 µl	Standard <b>D</b> (250 pg/ml)	E1/2
100 µl	Standard <b>E</b> (500 pg/ml)	F1/2
100 µl	Standard <b>F</b> (1000 pg/ml)	G1/2
100 µl	Standard <b>G</b> (2000 pg/ml)	H1/2
100 µl	Kontrollserum <b>KS</b>	A3/4
100 µl	Probenverdünnung	nachfolgende Vertiefungen
Mit Klebefolie die Vertiefungen abdecken.		
<b>Inkubation: 1 h bei RT, ≥ 350 upm</b>		
3x 250 µl	Absaugen und die Platte mit <b>250 µl</b> Waschpuffer <b>WP</b> / Vertiefung <b>dreimal</b> waschen.	in jede Vertiefung
100 µl	1:100 verdünntes Antikörperkonjugat <b>AK</b>	in jede Vertiefung
<b>Inkubation: 1 h bei RT, ≥350 upm</b>		
3x 250 µl	Absaugen und die Platte mit <b>250 µl</b> Waschpuffer <b>WP</b> / Vertiefung <b>dreimal</b> waschen.	in jede Vertiefung
100 µl	1:100 verdünntes Enzymkonjugat <b>EK</b>	in jede Vertiefung
<b>Inkubation: 30 min bei RT, ≥350 upm</b>		
3x 250 µl	Absaugen und die Platte mit <b>250 µl</b> Waschpuffer <b>WP</b> / Vertiefung <b>dreimal</b> waschen.	in jede Vertiefung
100 µl	Substratlösung <b>S</b>	in jede Vertiefung
<b>Inkubation: 30 min im Dunkeln bei RT</b>		
100 µl	Stopplösung <b>SL</b>	in jede Vertiefung
Messung innerhalb von 30 min bei <b>450 nm (Referenzfilter 620)</b> .		

## Summary of the Assay

Reagent preparation:	Reconstitution:	Dilution:
Standards A-G	in 1 ml Dilution Buffer VP	
Control Serum KS	in 100 µl Dilution Buffer VP	1:100 with Dilution Buffer VP
Antibody Conjugate AK		1:100 with Dilution Buffer VP
Enzyme Conjugate EK		1:100 with Dilution Buffer VP
Washing Buffer WP		1:20 with Aqua. dest. (e.g., add the complete contents of the flask (50 ml) into a graduated flask and fill with A.dest. to 1000 ml).
<b>Sample dilution:</b> e.g. 1:100 (e.g. Mix 10 µl Serum with 990 µl Dilution Buffer VP).		

## Assay Procedure for double determination

Pipette	Reagents	Well positions
100 µl	Dilution Buffer VP (Blank)	A1/2
100 µl	Standard A (31.25 pg/ml)	B1/2
100 µl	Standard B (62.5 pg/ml)	C1/2
100 µl	Standard C (125 pg/ml)	D1/2
100 µl	Standard D (250 pg/ml)	E1/2
100 µl	Standard E (500 pg/ml)	F1/2
100 µl	Standard F (1000 pg/ml)	G1/2
100 µl	Standard G (2000 pg/ml)	H1/2
100 µl	Control Serum KS	A3/4
100 µl	Sample dilution	following wells
Cover the wells with the sealing tape.		
<b>Incubation: 1 h</b> at RT, ≥350 rpm		
3x 250 µl	Aspirate the contents of the wells and <b>wash</b> 3x with <b>250 µl Wash Buffer WP</b>	each well
100 µl	1:100 diluted Antibody Conjugate AK	each well
<b>Incubation: 1 h</b> at RT, ≥350 rpm		
3x 250 µl	Aspirate the contents of the wells and <b>wash</b> 3x with <b>250 µl Wash Buffer WP</b>	each well
100 µl	1:100 diluted Enzyme Conjugate EK	each well
<b>Incubation: 30 min</b> at RT, ≥350 rpm		
3x 250 µl	Aspirate the contents of the wells and <b>wash</b> 3x with <b>250 µl Wash Buffer WP</b>	each well
100 µl	Substrate Solution S	each well
<b>Incubation: 30 min</b> in the <b>dark</b> at RT		
100 µl	Stop Solution SL	each well
Measure the absorbance within 30 min at <b>450 nm</b> with <b>620 nm</b> as reference wavelength.		

REF DEE008



## International Test description

<b>CAL</b> <b>A-G</b>	A-G	<b>Rec in</b> 1 ml <b>VP</b>	
<b>Control</b>	KS	<b>Rec in</b> 100 µl <b>VP</b>	1:100 <b>DILU</b> <b>VP</b>
<b>Ab</b>	AK		1:100 <b>DILU</b> <b>VP</b>
<b>CONJ</b>	EK		1:100 <b>DILU</b> <b>VP</b>
<b>WASHBUF</b> <b>20x</b>	WP		1:20 <b>DILU</b> <b>A. dest.</b>
<b>SPE</b>			1:100 <b>DILU</b> <b>VP</b>
<b>°C</b> 20-28 °C			

100 µl	<b>VP</b>	A1/2
100 µl	<b>CAL</b> <b>A</b> (31.25 pg/ml)	B1/2
100 µl	<b>CAL</b> <b>B</b> (62.5 pg/ml)	C1/2
100 µl	<b>CAL</b> <b>C</b> (125 pg/ml)	D1/2
100 µl	<b>CAL</b> <b>D</b> (250 pg/ml)	E1/2
100 µl	<b>CAL</b> <b>E</b> (500 pg/ml)	F1/2
100 µl	<b>CAL</b> <b>F</b> (1000 pg/ml)	G1/2
100 µl	<b>CAL</b> <b>G</b> (2000 pg/ml)	H1/2
100 µl	<b>CONTROL</b> <b>KS</b> 1:100 <b>DILU</b> <b>VP</b>	A3/4
100 µl	<b>SPE</b> 1:100 <b>DILU</b> <b>VP</b>	B3/4...
<b>TAPE</b>		

1 h **°C** 20-25 ≥ 350 rpm

3x 250 µl	3x <b>WASHBUF</b> <b>WP</b>
100 µl	<b>Ab</b> <b>AK</b>
<b>TAPE</b>	

1 h **°C** 20-25 ≥ 350 rpm

3x 250 µl	3x <b>WASHBUF</b> <b>WP</b>
100 µl	<b>CONJ</b> <b>EK</b>
<b>TAPE</b>	

0.5 h **°C** 20-25 ≥ 350 rpm

3x 250 µl	3x <b>WASHBUF</b> <b>WP</b>
100 µl	<b>SUBST</b> <b>TMB</b> <b>S</b>

0.5 h **°C** 20-25

100 µl	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b> <b>SL</b>
<b>MEASURE</b>	