

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

IGF-II - ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von
Human Insulin-like Growth Factor-II
(IGFBP-blockiert)
Deutsch

Enzyme Immunoassay for Quantitative Determination of
Human Insulin-like Growth Factor-II
(IGFBP-blocked)
English



DEE030



96

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

according to DIN EN 980 and EDMA recommendations Standard News 6 2001



Expiry date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Data di scadenza/ Fecha de caducidad/ Data de validade/ Uiterste gebruiksdatum/ Udløbsdato/ Bäst före-datum/ Termin ważności/ Lejárati idő/ Čas expirácie/ Doba expirace/ Срок годности/ 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/ Vă rugăm să respectați instrucțiunile de utilizare/ Upošteвайте navodila za uporabo/ Lue käyttöohje huolellisesti!



Lot-Batch Number/ Charge-Chargennummer/ Lot-Code du lot/ Lotto-Numero di lotto/ Lote-Código de lote/ Lote-Código do Lote/Lot-Partijnummer/ Lot-Batchkode/ Partisatskod/ Numer serii/ Tétel-sarzs szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/Partii – partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-număr lot/ Številka serije/ erä



Manufactured by/ Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/Fabricado por/ Fabricado por/ Vervaardigd doo/Fabrikation af /Tillverkad av/ Wyprodukowane przez/ Gyártotta / Vyrobené/ Vyrobeno v/ Производител/ Tootja/ Κατασκευάζεται από/ Produs de/ Proizvajalec/ Valmistaja



Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referência/ Referentienummer/ Referencenummer/Beställningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/Katalógovő číslo/ Objednací číslo/Καταλογος номер/Tellimisnumber/ Αρ. παραγγελίας/Număr comandă/ Številka naročila/ viite tai tilausnumero



Store at between/ Lagerung bei zwischen/ Conserver à entre/ Conservare a tra/ Conservar a temp. Entre/ Armazena entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevares mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí/ Температурно ограничение/ Säilätä 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/ Contenido suficiente per x test/ Contenido suficiente para x pruebas/ Conteúdo suficiente para x testes/ Bevat voldoende voor x bepalingen/ Indeholder tilstrækkeligt til x prøver/ Innehållet räcker till x analyser/ Zawartość na x testów/ Tartalma x teszt elvégzésére elegendő/ Obsahuje materiál pre x testov / Obsah dostačuje pro x testů/ Съдържание достатъчно за x тестове/ Sisust jätkub x katse jaoks/ Το περιεχόμενο επαρκεί για x δοκιμές/ Conținut suficient pentru x teste/ Vsebina zadostuje za x preizkusov/ Sisältö riittää x testille



Keep away from sunlight/ Nicht dem Sonnenlicht aussetzen/ Conserver à l'abri de la lumière/ Conservare al riparo della luce solare/ No exponer a la luz solar/ Proteger da luz solar/ Niet aan zonlicht blootstellen/ Må ikke udsættes for sollys/ Utsätt inte för solljus/ Nie wystawiać na słońce/ Napfénytől távol tartandó/ Nevystavovat' slnečnému svetlu/ Nevystavovat slunečnímu světlu/ Да се предпазва от слънчева светлина/ Kaitsa otsese päikesekiirguse eest/ Κρατήστε το μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία/ Τηνετή 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/ Inkubační lehota/ Inkubační doba/ Инкубационен период/ Inkubatsiooniaeg/ Χρόνος επώασης/ Timp de incubare/ Inkubacijska doba/ inkubaatioaika



incubate at / Inkubation bei/ Incuber à/ Incubare a/incubar a/Incubar a/ incubatietemperatuur/ Inkubation ved/ inkubation vid/ Inkubacja przy/ Inkubáció hőmérséklete/Inkubácia pri/ Inkubace při/Инкубира се при/ Inkubatsioon temperatuuril/ Επώαση στους/ Incubare la/ Inkubacija pri/ inkubaatiolämpötila



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



Mikrotiterplate/ Mikrotiterplatte/ plaque de microtitrage/ Piastra di microtitolazione/ Placa de microtitulación/ Placa de Microtitulação/ microtiterplaat/ Mikrotiterplade/ mikrotiterplatta/ microtiterplaat/ Płytká microtiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiterplaat/ Τρυβλίο μικροπιλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitrska plošča/ Mikrotitruslevy



Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituier en/ Reconstituier em/ reconstituieren in/ Rekonstituier i/ rekonstituera/ Rekonstytuować w/ Helyreállítás/ Znovu pripravit za/ Znovu připravit za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti / Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ rekonstituoi



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



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



EK Koniugat antyciał i enzymów/ Antitest és enzim páros/ Protílátkový a enzymatický konjugát/ Protílátkový a enzymatický konjugát/ Антицјало и ензим конюгат/ Antikehad ja ensüümi konjugaat/ Σύμπλοκο αντισώματος-ενζύμου/ Compuși din anticorpi și enzime/ Antitelesa in konjugat encima/ Vasta-aine ja entsymi konjugaatti

DILU X	PP	Dilute in Buffer X/ Verdünnen in Puffer X/ Diluer dans le tampon X/ Diluire nel tampone X/ Diluir en tampón X/ Diluir no Tampão X/ verdunnen in buffer X/ Fortyndes i buffer X/ späd i buffert X/ Rozcieńczanie w buforze X/ Hígítás X pufferben/ Riedit' v pufru X/ Ředit v pufru X/ Разреждане в буфер X/ Lahjendada puhvis X/ Αραιώστε σε ρυθμιστικό διάλυμα X/ Diluați în tamponul X/ Razredčiti v pufru X/ laimennetaan x puskuriin
CAL X	A-E	Standard X /Standard X/ Etalon X/ Standard X/ Estándar X/ Standard X/ standaard X/ Standard X/ standard X/ Standard X/ Standard X/ Štandard X/ Standard X/ Стандарт X/ Standard X/ Πρότυπο X/ Standard X/ Standardni X/ Kalibraattori X
Control	KS1/ KS2	Control Serum / Kontrollserum/ Contôle sérique/ Siero di controllo/ Suero de control/ Soro de Controlo/ controleserum/ Kontrolserum/ Kontrollserum/ Serum kontrolne/ Ellenőrző szérum/ Kontrollné sérum/ Kontrolní sérum/ Контролен серум/ Kontrollseerum/ Ορός ελέγχου/Ser de control/ Kontrolni serum/ Kontrollii seerumi
WASHBUF 20x	WP	Washing Buffer Concentrate/ Waschpufferkonzentrat/ Tampon de lavage conc./ Tampone di lavaggio concentrato/ Tampón de lavado concentrado/ Tampão de Lavagem Concentrado/ wasbuffer, geconcentreerd/ Vaskebufferkonzentrat/ Vaskebufferkonzentrat/ tvättbuffertkoncentrat/ Bufor plukania koncentrat/ Mosópuffer koncentrátum/ Koncentrát vymývacieho pufru/ Концентрат на промивен буфер/ Pesupuhvri kontsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralnega pufra/ Pesuliuositiiviste
WASHBUF		Washing Buffer / Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón de lavado/Tampão de Lavagem/ wasbuffer/ Vaskebuffer/ tvättbuffert/ Bufor plukania/ Mosópuffer/ Vymývací pufer/ Vymývací pufr/ Προμивен буфер/ Pesupuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare /Izpiralni pufer/ Pesuliuos
SUBST TMB	S	Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ substraat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Szubsztrátum/ Substrát/ Substrát/ Субстрат Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraattiliuos
STOP SOLN	SL	Stop Solution/ Stopp Lösung/ Stop Solution/ Soluzione di stop/ Stop Solución/ Solução Stop/ stopoplossing/ Stoporløsning/ Stoppløsning/ Stop roztwór/ Megállító oldat/ Roztok na ukončenie/ Roztok pro ukončeni/ Стопираци 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/ Odkleic plytkę/ Tányér leragasztása/ Oblepit' podložku lepiacou páskou/ Olepit podložku lepicí páskou/ Плака с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerikleerplindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperiți placa cu o bandă adezivă/ Prelepiti ploščo/ Peitã mikrotitrauslevy oheisella teipillä
MEASURE		Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590nm)/Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)./ Measure lábsorbance en l'espacce de 30 min à450 nm avec ≥590nm longueur d'onde pour référence/Misurazione entro 30 min. a 450 nm (filtro di riferimento ≥ 590 nm)./ Medición de la placa dentro de los siguientes 30 min a 450 nm (filtro de referencia ≥ 590nm)/ Medir a placa dentro de 30 min a 450 nm (Filtro de referència ≥590nm)/ Binnen 30 minuten bij 450 nm meten (referentiefilter ≥ 590 nm)./ Mål plade i løbet af 30 min ved nm (referencefilter ≥590nm)/ Mät inom 30 min vid 450 nm (referensfilter ≥ 590 nm)./ Pomiar w ciągu 30 min przy 450 nm (filtr odniesienia ≥ 590 nm)./ Ki mérés 30 percen belül 450 nm-nél (referenciaszűrő ≥ 590 nm)./ Merať 30 minút pri 450 nm/Měřit 30 minut při 450 nm/ Отчитане в рамките на 30 min при 450 nm (референтен филтър ≥ 590 nm)./ Mõõtmise 30 min jooksul 450 nm korral (võrdlusfilter ≥ 590 nm). Μέτρηση εντός 30 min στα 450 nm (φίλτρο αναφοράς ≥ 590 nm)./ Măsurare în decurs de 30 min la 450 nm (filtru de referință ≥ 590 nm)./ Izmerite ploščico v 30 min pri 450 nm (referenčni filter ≥590nm) / Mittaa 30 minuutin aikana 450 nm:ssä (referenssi suodatin ≥ 590 nm)
Literatur		Literature/ Literatur/ Bibliographie/ Letterario/ Bibliografía/ Literatura documentação/ literatuur/ Litteratur/ litteratur/ Literatura/ Irodalom/ Literatúra/ Literatura/ Литература// Kirjandus/ Βιβλιογραφία/ Bibliografie/ literatura/ Lähdeluettelo
International Test description		International test description/ internationale Testanleitung/ description internationale de test/ Istruzioni per il test internazionali/ Descripción de ensayo internacional/ Descrição internacional do teste/ internationale testbeschrijving/ internationell testbeskrivning/ Opis testu międzynarodowego/ nemzetközi teszt-útmutató/ Medzinárodný návod k testu/ Mezinárodní návod k testu/ rahvusvaheline katse kirjeldus/ Διεθνείς οδηγίες για εργαστηριακές δοκιμές/ instrucțiuni internaționale pentru testare/ mednarodna navodila za preizkus/ Kansainvälinen käyttöohje
End		in all required wells/ in allen benötigten Vertiefungen/ dans tous les godets requis/ in tutti i pozzetti richiesti/ en todos los pozos requeridos/ em todos os tubos necessários/ in alle nodige putjes/ i alle nødvendige brønde/ i alla nödvändiga brunnar/ we wszystkich potrzebnych wgłębieniach/ minden szükséges forrásban/ vo všetkých potrebných miestach/ ve všech potřebných místech/ във всички необходими ямки/ kõigis vajalikes süvendites/ σε όλες τις απαραίτητες κοιλότητες/ în toate cavitățile necesare/ v vseh zahtevanih vdolbinah /kaikkiin tarvittaviin mikrotitrauslevyn syvennyksiin

Vor Gebrauch ist die gesamte Packungsbeilage zu lesen!

Read entire protocol before use!

PACKUNGSBEILAGE DEUTSCH

TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN + EINSATZMÖGLICHKEITEN

- ◆ Messung von IGF-II in Serum- und Plasmaproben **ohne Extraktion**
- ◆ Kalibriert am **Internationalen Standard** der **WHO NIBSC 96/538**
- ◆ **Keine Interferenz mit IGF-Bindungsproteinen** durch IGF-I Überschuss
- ◆ **Hohe Sensitivität** von **0,02 ng/ml**
- ◆ Inter-Assay Varianz von maximal 7,2% und Intra-Assay Varianz von maximal 6,6%.

Zugelassener Verwendungszweck

Messung von humanem IGF-II in menschlichem Serum und Plasma.

EINLEITUNG

Die Insulin-like growth factors (IGF)-I und-II spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Proliferation und Differenzierung verschiedener Gewebe (1-3). IGF-II ist mit Somatomedin C (Inspektion-c) (4) identisch und hat ein Molekulargewicht von 7469 Dalton (5). Die wichtigsten Einflussfaktoren auf die IGF-II Expression im gesunden Menschen sind das Wachstumshormon (WH) und die Ernährung. Aber die IGF-II Synthese in spezifischen Geweben wird durch eine Vielzahl von Hormonen und anderer Peptid-Wachstumsfaktoren beeinflusst. Im Gegensatz zu vielen anderen Peptidhormonen sind IGFs mit hoher Affinität an spezifische Bindungsproteine (IGFBP) gebunden, neben den IGFBP 1-6 noch die IGFBP-related Proteins (7, 8). Sie binden entweder IGF-I und IGF-II mit ähnlicher Affinität oder weisen eine Präferenz für IGF-II auf (9,10). Die direkte Bestimmung von IGF-II in unbehandelten Serumproben (11) führt zu falschen Ergebnissen, da auf Grund der extrem langsamen Dissoziation des IGF/IGFBP Komplexes während der Assay-Inkubationszeit nur ein Teil des vorhandenen IGF-II an die Antikörper bindet und damit detektiert werden kann.

Daher wurden verschiedene Verfahren entwickelt, um vor der eigentlichen Messung IGF-II von seinen Bindungsproteinen abzutrennen: (a) Ausschlusschromatographie unter sauren Bedingungen, (b) Festphasenextraktion und (c) Säure-Alkohol-Extraktion (2,12,13). Diese Methoden sind jedoch entweder umständlich und zeitaufwendig oder führen zu unvollständiger und vor allem nicht reproduzierbarer Wiederfindung.

Der vorliegende Assay ist einfach und schnell durchzuführen und weist keine Abhängigkeit von der IGFBP-Konzentration auf. Er basiert auf der hohen Spezifität der Antikörper für IGF-II. Diese ermöglicht es, durch die Ansäuerung der Probe natives IGF-II aus dem Bindungsproteinkomplex zu lösen und die freiwordenen Bindungsproteine mit IGF-I zu komplexieren, so dass das IGF-II aus der Probe frei in der Lösung vorliegt (15, 21, 23).

Indikation

Wissenschaftliche Untersuchungen im Rahmen neonataler Hypertrophie oder Hypotrophie (IGF-II ist ein fetaler Wachstumsfaktor) und Malignomkrankungen (IGF-II ist ein onkogener Wachstumsfaktor). Altersabhängige Referenzwerte sind in Tabelle 4 dargestellt.

IGF-II scheint zur Differentialdiagnostik bei verschiedenen malignen Erkrankungen geeignet zu sein. Beispielsweise kann an Hand von IGF-II zwischen adrenocorticalen Tumoren und Adenomen differenziert werden. Auch beim Prostatakarzinom kann durch die Messung von IGF-II im Serum das Tumorstaging sowie die Differenzierung zwischen Karzinom und Hyperplasie verbessert werden (24,25). Neuere Ergebnisse aus der Neurologie zeigen, dass das IGF-System auch bei der Entwicklung vom Morbus Alzheimer und Parkinson von Bedeutung ist (26).

Assay Eigenschaften und Validierung

Der Demeditec ELISA IGF-II, DEE030, ist ein sogenannter Sandwich-Assay unter Verwendung zweier spezifischer und hochaffiner Antikörper. Der an die Mikrotiterplatte gekoppelte erste Antikörper und der zugesetzte biotinylierte zweite Antikörper binden das IGF-II aus der Probe, im nachfolgenden Schritt bindet

ein Streptavidin-Peroxidase-Enzymkonjugat. In der abschließenden Substratreaktion wird hochspezifisch der Farbumschlag katalysiert, quantitativ abhängig vom IGF-II-Gehalt der Proben.

IGF-II-IGFBP Komplexe werden durch die Verdünnung im saurem Puffer dissoziiert und dann die IGFBPs durch IGF-I Überschuss blockiert. Dies erlaubt die problemlose Messung des nun freien Gesamt-IGF-II. Bei diesem Verfahren werden also nicht die IGFBP-Moleküle per se entfernt, sondern lediglich deren Funktion, und damit ihre Interferenz im Assay, neutralisiert. Wegen der extrem niedrigen Kreuzreaktivität des IGF-II-Antikörpers mit IGF-I stört der hohe Überschuss an IGF-I die spezifische Interaktion mit IGF-II nicht.

Der IGF-II ELISA DEE030 ist gegen den Internationalen Standard WHO NIBSC 96/538 kalibriert.

Die Standards des ELISA DEE030 bestehen aus **humanem IGF-II** in Konzentrationen von **0,45; 1,5; 3; 5,63 und 9 ng/ml**, entsprechend umfasst der Messbereich des Testes bei der empfohlenen Normal-Probenverdünnung den Bereich **bis 2400 ng/ml**. Durch Variation der Probenverdünnung kann dieser natürlich an spezielle individuelle Bedürfnisse angepasst werden.

Die **analytische Sensitivität** des ELISA DEE030 beträgt **0,02 ng/ml** (zweifache Standardabweichung des Null-Standards in 20facher Bestimmung).

Die **Inter- und Intra-Assay** Variationskoeffizienten sind **kleiner als 7,2% bzw. 6.6%**. Beispielhafte Bestimmungen sind in Tabelle 1 und 2 dargestellt.

Tabelle 1 : Inter-Assay-Varianz (n=12)

	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	Variationskoeffizient (%)
Probe 1	381,53	27,54	7,22
Probe 2	817,81	57,70	7,06
Probe 3	639,41	45,47	7,11

Tabelle 2: Intra-Assay-Varianz (n=16)

	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	Variationskoeffizient (%)
Probe 1	666,38	20,45	3,07
Probe 2	875,22	57,89	6,61

Durch die hohe Spezifität der verwendeten Antikörper beeinflusst das in variabler Konzentration in den Proben vorhandene endogene und strukturell sehr ähnliche IGF-I die Richtigkeit der IGF-II Bestimmung bis zu 1000 ng/ml nicht (s.Tabelle 3).

Tabelle 3: Abhängigkeit der IGF-II Konzentrationsbestimmungen vom IGF-I Gehalt der Proben

Zusatz IGF-I (ng/ml)	Serum Probe (ng/ml)	NIBSC 96/538 in Probenpuffer (ng/ml)
0	603	3,49
100	630	3,39
250	605	3,44
500	614	3,59
1000	604	3,68

Einsatzmöglichkeiten

Dieser ELISA-Kit ist für die wissenschaftliche und diagnostische Messung von IGF-II in humanem Serum oder Plasma geeignet.

Proben: Eignung, Vorbereitung und Lagerung

Geeignet sind Serumproben sowie Heparin-, EDTA- und Citrat-Plasmaproben. Eine eventuelle Verdünnung der Probe durch das Antikoagulans muss berücksichtigt werden. Eine spezielle externe Probenvorbehandlung ist nicht nötig. Darüber hinaus sind als Proben geeignet: Urin; Speichel (geringer Gehalt, mind. 1:10 verdünnt) Liquor (CSF; mind. 1:10 verdünnt) und Zellkulturmedium (mit 5% FCS, mind. 1:5 verdünnt).

Die IGF-II Konzentrationen in anderen humanen Körperflüssigkeiten und in Kulturüberständen können stark von den Serumwerten abweichen.

Generell sollten Proben so schnell wie möglich nach der Abnahme gekühlt werden. Falls zwischen Abnahme und Bestimmung ein längerer Zeitraum liegt, sollten die unverdünnten Proben bei -20°C oder kälter in fest verschließbaren Plastikgefäßen aufbewahrt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Serum/Plasma sollte prinzipiell vermieden werden (gegebenenfalls subaliquotieren) einige Zyklen haben in unseren Versuchen jedoch auf die messbare IGF-II Konzentration keine Auswirkungen gehabt.

Der IGF-II ELISA DEE030 ermöglicht die korrekte Bestimmung der Proben ab einer Verdünnung von 1:401 über einen weiten Konzentrationsbereich.

Die hohe Sensitivität des Assays erlaubt IGF-II Messungen in kleinen Probenvolumina, deren Größe eher durch die Pipettiergenauigkeit als durch die Menge von IGF-II begrenzt wird.

Im Allgemeinen ist eine Serum- oder Plasma-**Verdünnung von 1:401 geeignet**. Die jeweilige geeignete Verdünnung sollte jedoch vorab geprüft werden.

Vorschlag Verdünnungsprotokoll:

2000 µl **Probenpuffer PP** in PE-/PP-Gefäße vorlegen (bei größeren Serien empfiehlt sich hierfür die Verwendung eines Multi-Steppers), dazu 5 µl Serum- oder Plasma pipettieren (Proben sind 1:401 verdünnt). Nach dem Mischen werden von dieser Lösung **50 µl pro Bestimmung** im Assay eingesetzt.

Da die Pipettiergenauigkeit bei Einsatz von 10 µl Probe ansteigen kann, ist eine 2-stufige Verdünnung alternativ möglich; dafür 1000 µl vorlegen dazu 10 µl Probe pipettieren (Proben sind 1:101 verdünnt), von dieser Lösung 50 µl mit 150 µl weiter verdünnen (Proben sind 1:404 verdünnt).

Nach dem Mischen werden von dieser Lösung **50 µl pro Bestimmung** im Assay eingesetzt.

MATERIALIEN

Inhalt der Testpackung

1)	MTP	Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen, die in 12 abnehmbare Streifen à 8 Vertiefungen (einzeln abbrechbar) aufgeteilt ist. Die Platte ist mit einem Antikörper gegen humanes IGF-II beschichtet.
2)	CAL	Standards A-E , lyophilisiert, enthalten humanes IGF-II. Die Standardkurve deckt einen Bereich von 0,45 bis 9 ng/ml (0,45; 1,5; 3; 5,63; 9 ng/ml) IGF-II ab, die einzelnen Standards werden mit je 500 µl Probenpuffer PP rekonstituiert. Nach Einsatz im Test müssen die rekonstituierten Standards schnellstmöglich bei -20°C in den Originalgefäßen gelagert werden. Zur weiteren Verwendung dann bitte schnell aber schonend Auftauen (keine Temperaturerhöhung über Raumtemperatur und kein übermäßiges Vortexen), bis zu 3 dieser Einfrier-Auftauzyklen zeigten keinen Einfluss auf den Test. Für den Assay werden jeweils 50 µl pro Vertiefung eingesetzt.
4)	BUF PP	Probenpuffer PP, 125 ml , gebrauchsfertig, bitte für Rekonstitution von Standards und Kontrollseren KS1 und KS2, sowie für Verdünnung von Proben und Kontrollseren verwenden.
5)	Control	Kontrollseren KS1/KS2, 250 µl , lyophilisiert, enthalten humanes Serum und müssen in je 250 µl Probenpuffer PP rekonstituiert werden. Nach Einsatz im Test müssen die rekonstituierten Kontrollseren schnellstmöglich bei -20°C im Originalgefäß gelagert werden. Zur weiteren Verwendung dann bitte schnell aber schonend Auftauen (keine Temperaturerhöhung über Raumtemperatur und kein übermäßiges Vortexen), bis zu 3 dieser Einfrier-Auftauzyklen zeigten keinen Einfluss auf den Test. Die IGF-II Soll-Konzentrationen und die Schwankungsbereiche sind auf dem QC-Datenblatt angegeben. Sie sollten im Assay in der gleichen Verdünnung wie die jeweiligen Proben bestimmt werden.
6)	Ab	Antikörperkonjugat AK, 6 ml , gebrauchsfertig, enthält biotinylierten anti-human IGF-II Antikörper. Bitte 50 µl pro Vertiefung einsetzen.
7)	CONJ	Enzymkonjugat EK, 12 ml , gebrauchsfertig, enthält POD (Meerettich-Peroxidase)-markiertes Streptavidin. Bitte 100 µl pro Vertiefung einsetzen.
8)	WASHBUF 20x	Waschpuffer WP, 50 ml , 20fach konzentrierte Lösung, bitte vor Gebrauch 1:20 mit A.dest. oder entmineralisiertem Wasser verdünnen (z.B. den gesamten Flascheninhalt von 50 ml im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen). Achtung: endverdünnt ist der Waschpuffer nur 4 Wochen haltbar, bitte nur nach Bedarf ansetzen.
9)	SUBST	Substrat S, 12 ml , gebrauchsfertig, Meerettich-Peroxidase-(POD)-Substrat, stabilisiertes H ₂ O ₂ -Tetramethylbenzidin
10)	STOP SOLN	Stopplösung SL, 12 ml , gebrauchsfertig, 0,4 N saure Lösung
11)		Abdeckfolie für Mikrotiterplatten, 2 Stück, selbstklebend

Zusätzlich benötigte Materialien

Destilliertes oder entmineralisiertes Wasser zum Verdünnen des Waschpuffers WP
 Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen
 Vortex-Mischgerät
 Mikrotiterplattenschüttler (350 rpm)
 Mikrotiterplattenwasher (empfohlen)
 Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und ≥590 nm.
 Polyethylen PE/ Polypropylen PP Röhrchen zum Verdünnen der Proben

TECHNISCHE HINWEISE

Reagenzien mit unterschiedlichen Lot-Nummern sollten nicht vermischt werden. Alle Reagenzien sind ungeöffnet, lichtgeschützt und bei 2° - 8°C gelagert mindestens haltbar bis zum Verfallsdatum (s. Etikett). Bei sachgemäßer Handhabung ist die **Haltbarkeit der Reagenzien nach Öffnung** nicht beeinträchtigt. **Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.** Wenn mehrere unabhängige Messungen über eine längere Periode mit einem Kit geplant sind, wird vorherige Aliquotierung der Komponenten in passende Volumina empfohlen.

Demeditec Diagnostics GmbH • Lise-Meitner-Straße 2 • D-24145 Kiel (Germany)

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

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

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

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

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

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

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

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

Standards und Kontrollen

Die Standards **A – E** und Kontrollseren **KS1 & KS2** werden mit dem im Kit enthaltenen Probenpuffer **PP** 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.

Die rekonstituierten Komponenten sollten bei -20°C (oder kälter) aufbewahrt werden, dies verlängert die Haltbarkeit auf mind. 3 Monate. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden. 3 Einfrier-/Auftauzyklen haben keinen messbaren Einfluss auf den Test. Wenn mehrere unabhängige IGF-II-Messungen über eine längere Periode mit einem Kit geplant sind, wird vorherige Aliquotierung der Komponenten in passende Volumina empfohlen.

Waschpuffer

Der 1:20 gebrauchsfertig verdünnte Waschpuffer WP ist max. 4 Wochen bei 4°C haltbar, bitte nur nach Bedarf ansetzen.

Testplatte

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

Substrat

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

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

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

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

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

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

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

Menschliches Serum:

In folgenden Komponenten enthalten: **KS1 & KS2**

Die humanen Materialien, die für die Präparation der Kontrollseren verwendet wurden, sind durch von der US-amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde FDA empfohlene Nachweisverfahren auf die Präsenz von Antikörpern gegen Humanes Immundefizienz-Virus (HIV I und II), gegen Hepatitis B-Oberflächenantigen und gegen Hepatitis C Virus geprüft und für negativ befunden worden. Da kein Test das Vorhandensein von infektiösen Erregern völlig ausschließen kann, sollten die Reagenzien gemäß den Vorgaben der Biosicherheitsstufe 2 gehandhabt werden.

2-Methyl-4-Isothiazolin-3-one

als Konservierungsmittel <0.01% in folgenden Komponenten enthalten: **AK, EK, VP, PP**

- 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

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

als Konservierungsmittel <0.01% in folgenden Komponenten enthalten: **AK, EK, VP, PP, WP**

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

Substratlösung (S)

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

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

Stopplösung (SL)

Die Stopplösung enthält 0,4 saure Lösung

- 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

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

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

- 1) In **alle** Vertiefungen, die benutzt werden, bitte **50 µl des Antikörperkonjugates AK** pipettieren.
- 2) In die Positionen A1/2 werden je **50 µl Probenpuffer PP** gegeben sowie
in die Positionen B1/2 werden je **50 µl Standard A (0,45 ng/ml)**
in die Positionen C1/2 je **50 µl Standard B (1,5 ng/ml)**,
in die Positionen D1/2 je **50 µl Standard C (3 ng/ml)**,
in die Positionen E1/2 je **50 µl Standard D (5,63 ng/ml)**,
in die Positionen F1/2 je **50 µl Standard E (9 ng/ml)**,
Zur Kontrolle der korrekten Durchführung des Tests können je **50 µl** der 1:401 in Probenpuffer **PP** (oder im jeweiligen Verdünnungsverhältnis der Proben) verdünnte **Kontrollen KS1 und KS2** in die Positionen G1/2 bzw. H1/2 gegeben werden.

In die restlichen Vertiefungen können je **50 µl der verdünnten Proben** (i.Allg. 1:401 in Probenpuffer **PP** verdünnt) pipettiert werden.
- 3) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **2 Stunden** bei **Raumtemperatur** inkubiert (unter Schütteln 350 rpm).
- 4) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Lösungen abgesaugt und die Platte mit **300 µl Waschpuffer WP** / Vertiefung **fünfmal** gewaschen.
- 5) Nach dem letzten Waschschrift werden **100 µl Enzymkonjugat EK** in jede Vertiefung pipettiert.
- 6) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **30 Minuten** bei **Raumtemperatur** inkubiert (unter Schütteln 350 rpm).
- 7) Nach Abschluss dieser Inkubation wird die Platte wie in Schritt 4) beschrieben 5x gewaschen.
- 8) In jede Vertiefung werden **100 µl der Substratlösung S** pipettiert.
- 9) Die Platte wird **30 Minuten im Dunkeln** bei **Raumtemperatur** inkubiert.
- 10) Nach Ablauf der Inkubationszeit wird in jede Vertiefung **100 µl Stopplösung SL** pipettiert.
- 11) Die Ausmessung der Farbreaktion erfolgt **innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm (Referenzfilter ≥590 nm)**.

AUSWERTUNG

Berechnung der Standardkurve

Zur Auswertung des Testes sollte gewährleistet sein, dass die Extinktionen des Leerwertes 0,25 Einheiten nicht überschreiten, Standard E sollte dagegen Extinktionen über 1,0 Einheiten erreichen. Proben, die höhere Extinktionen als der Standard E erzielen, liegen außerhalb der Standardkurve, zur sicheren Bestimmung sollten diese Proben in einer zweiten Testdurchführung bei höherer Verdünnung nochmals bestimmt werden.

Die bereitgestellten Standards enthalten folgende hIGF-II-Konzentrationen:

Standard	A	B	C	D	E
ng/ml	0.45	1.5	3	5.63	9

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

ERWARTUNGSWERTE

Tabelle 4: IGF-II Serumkonzentrationen in ng/ml von gesunden Personen verschiedenen Alters

Alters Gruppe	Perzentile		
	5.	50.	95.
Neugeborene	158	284	516
1-4 Wochen	350	486	673
1-6 Monate	348	551	871
6-12 Monate	388	582	876
1-3 Jahre	384	596	926
3-5 Jahre	397	617	920
5-7 Jahre	419	638	973
7-9 Jahre	433	656	997
9-11 Jahre	442	662	994
11-13 Jahre	448	671	1006
13-15 Jahre	455	679	1014
15-17 Jahre	452	686	1042
20-30 Jahre	436	679	1058
30-40 Jahre	442	680	1049
40-50 Jahre	407	650	1039
50-60 Jahre	396	644	1049
60-70 Jahre	373	611	1000

* Die Messungen wurden nach einer Säure-Alkohol-Extraktion durchgeführt und die Messwerte wurden entsprechend der Wiederfindungsrate korrigiert (Korrekturfaktor 1,2).

(Blum W., Schweizer R.,: Insulin-like growth factors and their binding proteins; in Ranke MB (ed):
Diagnostics of endocrine function in children and adolescents. Basel, Karger, 2003, pp 166-199 (22).

PACKAGE INSERT ENGLISH

TECHNICAL FEATURES+APPLICATIONS

- Measurement of IGF-II in **non-extracted** serum and plasma samples
- Calibrated against the **International Standard: WHO NIBSC 96/538**
- No interference by IGF-binding proteins through excess IGF-I
- Precise measurement of very low IGF-II levels: **high sensitivity** of **0.02 ng/ml**
- Inter- and Intra-Assay variance: maximal 7.2 and 6.6%

INTRODUCTION

The insulin-like growth factors (IGF)-I and –II play a pivotal role in the regulation of proliferation and differentiation of several tissue types (1-3). IGF-I also called Somatomedin C (4) has a molecular weight of 7.469 kDa (5). Its expression is mainly regulated by Growth Hormone and nutrition (6). But several hormones and peptide factors are known to influence IGF-II synthesis in different tissues. Bioavailability of the IGFs is regulated by specific binding proteins (IGFBP). Beside the high affinity Insulin-like Growth Factor Binding Proteins 1-6, IGFs are also bound by IGFBP-related Proteins (7, 8, 22). These binding proteins bind IGF-I and IGF-II with the same affinity or prefer IGF-II (9, 10). Direct measurement of IGFs in serum samples without pretreatment results in false values because of the extremely slow dissociation of the IGF/IGFBP complexes during the assay incubation only a part of the IGF-II in the specimen can bind to the antibodies and be detected.

Therefore, various techniques were applied to physically separate IGF-II from its binding proteins before measurement, including (a) size exclusion chromatography under acidic conditions, (b) solid-phase extraction and (c) acid-ethanol extraction (2, 12, 13) These techniques, however, are either inconvenient or time-consuming or give incomplete and not-reproducible recoveries.

This assay is easy, fast and results do not depend on the binding protein concentration of the sample. It is based on the high specificity of the employed antibodies for IGF-II. There is virtually no cross-reactivity with IGF-I. This allows the separation of IGF-II from the binding proteins by acidification and blocking of the free binding proteins with IGF-I. Thus, the endogenous IGF-II is free in solution.

INTENDED USE

Scientific investigations in the field of neonatal hypertrophy (IGF-II is a foetal growth factor) and malignancies (IGF-II is a monogenic growth factor). Age dependent reference values are shown in Table 4.

IGF-II seems to be of use in differential diagnostics of malignancies. Thus, it is possible to differentiate by IGF-II between adrenocortical carcinomas and adenomas (24). Further tumor staging and differentiation between hyperplasia and carcinoma can be improved by IGF-II measurements in prostate tumors (25). The IGF-System seem to be of relevance in neurodegeneration as well, e.g. Alzheimer's and Parkinson's diseases (26).

PRINCIPLE

The Demeditec ELISA for IGF-II DEE030 is a so-called Sandwich-Assay. It utilizes two specific and high affinity antibodies for this protein. The first antibody, immobilized on the microtiter plate, and the added second biotinylated antibody are binding the IGF-II in the sample. The Streptavidin-Peroxidase Enzyme Conjugate subsequently binds to the complex. In the closing substrate reaction the turn of the colour will be high specific catalysed, quantitatively depending on the IGF-II-level of the samples.

IGF-II-IGFBP complex is dissociated by dilution in an acidic buffer. IGFBPs are blocked by IGF-I excess, thus allowing the measurement of free IGF-II. With this method, the IGFBPs are not removed, but their function and therefore their interference in the assay is neutralized.

Due to the low cross-reactivity of the IGF-II antibody with IGF-I, excess IGF-I does not disturb the interaction of the first antibody with IGF-II

PERFORMANCE CHARACTERISTICS AND VALIDATION

The IGF-II ELISA DEE030 is calibrated against the **International Standard: WHO NIBSC 96/538**

The standards of the ELISA DEE030 are **human IGF-II** in concentrations **0.45; 1.5; 3; 5.63 and 9 ng/ml**, respectively the assay range covers –at recommended normal sample dilution- the **range to 2400 ng/ml**. By varying the sample dilution this can be adapted to the special individual requirements.

Sensitivity

The **analytical sensitivity** of the ELISA DEE030 yields **0.02 ng/ml** (2 SD of zero standard in 20fold determination).

The **Inter-** and **Intra-Assay variation** coefficients are less than 7.2% and 6.6 % respectively. Exemplary determinations are represented in the Table 1 and 2.

Table 1: Inter-Assay-Variation (n=12)

	Mean value (ng/ml)	Standard deviation (ng/ml)	Variation Coefficient (%)
Sample 1	381.53	27.54	7.22
Sample 2	817.81	57.70	7.06
Sample 3	639.41	45.47	7.11

Table 2: Intra-Assay-Variation (n=16)

	Mean value (ng/ml) (ng/ml)	Standard deviation (ng/ml)	Variation Coefficient (%)
Sample 1	666.38	20.45	3.07
Sample 2	875.22	57.89	6.61

Because of the high specificity of the used antibodies the endogenous and structurally very similar IGF-I existing in variable concentration in the samples does not affect the correctness of the IGF-II determination up to 1000 ng/ml (s. Table 3).

Table 3: Dependence of the determined IGF-II concentration on the IGF-I content of the samples

Addition IGF-I (ng/ml)	Serum Sample (ng/ml)	NIBSC 96/538 in Samplebuffer (ng/ml)
0	603	3,49
100	630	3,39
250	605	3,44
500	614	3,59
1000	604	3,68

SPECIMEN COLLECTION, PREPARATION AND STORAGE

Serum samples as well as Heparin-, EDTA- and Citrat-Plasma samples are suited. Possible dilution of the sample by the anticoagulant must be considered.

Furthermore suitable samples are: urine, saliva (low concentration, at least 1:10 dilution), cerebrospinal fluid (at least 1:10 dilution) and cell culture medium (inc. 5% FCS, at least 1:5 dilution). IGF-II concentration in other body fluids or cell culture supernatants can deviate strongly from the serum values.

Samples should be handled as recommended in general: as fast as possible and chilled as soon as possible. In case there will be a longer period between the sample withdrawal and determination store the undiluted samples frozen -20°C or below in tightly closable plastic tubes. Avoid on principal repeated freeze-thaw cycles of serum/plasma (if required, please subaliquote) although IGF-II levels were found to be unaffected by few cycles in our experiments.

The IGF-II ELISA DEE030 makes the correct determination possible of the samples starting from a dilution of 1:401 over a far concentration range.

The high sensitivity of the assays allows IGF-II determinations in small sample volumes, which is limited by pipetting accuracy rather than the amount of IGF-II. Generally a serum or plasma dilution of **1:401 is very well suited**. However, the respective suitable dilution should be examined first.

Suggestion for dilution protocol:

Please pipette 2000 µl **Sample Buffer PP** in PE/PP-Tubes (application of a multi-stepper is recommended in larger series); subsequently add 5 µl serum or plasma samples (dilution 1:401). After mixing **use 50 µl of this dilution per determination**.

Because the pipetting accuracy can rise by the use of 10 µl sample, a 2-step dilution is alternatively possible, for this place 1000 µl Sample Buffer PP in in PE/PP-Tubes, add 10 µl sample (samples are 1:101 diluted), mix from this solution 50 µl with 150 µl Sample Buffer (samples are 1:404 diluted). After mixing **use 50 µl of this dilution per determination**.

REAGENTS PROVIDED

1)	MTP	Microtiter plate , ready for use: Microtiter plate with 96 wells, divided up in 12 strips with 8 wells separately breakable, coated with anti-human IGF-II Antibody, packed in a laminate bag.
2)	CAL	Standards A-E , lyophilised, contain human IGF-II. Standard values are between 0.45 and 9 ng/ml (0,45; 1,5; 3; 5,63; 9 ng/ml) IGF-II and have to be reconstituted in 500 µl (each) in Sample Buffer PP . After using store the reconstituted standards in the original flasks as soon as possible at -20°C. When using the standards anew, please thaw them rapidly but gently (no temperature rise over the room temperature and no powerful vortexing), 3 of these freezing-thawing cycles showed no influence on the assay. 50 µl per well are used in the assay
4)	BUF PP	Sample Buffer PP , 125 ml, ready for use, please use for reconstitution of Standards and Controls and for dilution of samples and Controls
5)	Control	Control Serum KS1, KS2 , 250 µl, lyophilised, contain human serum and has to be reconstituted in 250 µl Sample Buffer PP . The reconstituted Control Sera must be stored in the original flask as soon as possible at -20°C after using. When using anew, please thaw them rapidly but gently (no temperature rise over the room temperature and no powerful vortexing), 3 of these freezing-thawing cycles showed no influence on the assay. The IGF-II target value concentrations and the respective ranges are given on the QC-Certificate. The dilution of the Control Sera should be according to the dilution of the respective samples.
6)	Ab	Antibody Conjugate AK , 6 ml, ready for use, contains the biotinylated anti-IGF-II antibody. Use 50 µl for each well in the assay.
7)	CONJ	Enzyme Conjugate EK , 12 ml, ready for use, contains horseradisch-peroxidase conjugate to streptavidin, use 100 µl for each well in the assay.
8)	WASHBUF 20x	Washing Buffer (WP) , 50 ml, 20X concentrated solution. Washing Buffer (WP) has to be diluted 1:20 with distilled or demineralised water before use (e.g. add the complete contents of the flask (50 ml) into a graduated flask and fill up with A.dest. to 1000 ml). Attention: After dilution the Washing Buffer is only 4 weeks stable, dilute only according to requirements.
9)	SUBST	Substrate (S) , 12 ml, ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP)-substrate, stabilised H ₂ O ₂ Tetramethylbencidine.
10)	STOP	Stopping Solution (SL) , 12 ml, ready for use, 0.4 N acidic solution, Caution acid!
11)		Sealing tape for covering of the microtiter plate, 2 x, adhesive.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

Technical Notes

The assay has to be conducted strictly according the test protocol herein.

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

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

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

Incubation at room temperature means: 20-25°C

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

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

All washing must be performed with the provided washing buffer diluted to usage concentration. Washing volume per washing cycle and well must be 300 μ l 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 multistep device, a multichannel pipette, or a squirt bottle. The fluid may be removed by dynamically swinging out the microtiter plate over a basin. If aspirating devices are used, care has to be taken that the inside well surface is not scratched. Subsequent to every single washing step, the remaining fluid should be removed by inverting the plate and repeatedly tapping it dry on non fuzzy absorbent tissue.

Standards and Controls

For the reconstitution of the lyophilised components (Standards A - E and Control Sera KS1 & KS2) the kit Sample Buffer PP has to 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.

The reconstituted standards and controls can be stored for 3 months at -20°C. Repeated freeze/thaw cycles have to be avoided. When using the standards anew, please thaw them rapidly but gently (no temperature rise over the room temperature and no powerful vortexing), 3 of these freezing-thawing cycles showed no influence on the assay.

Washing Buffer

The required volume of washing buffer is prepared by 1:20 dilution of the provided 20-fold concentrate with deionised water. The diluted Washing Buffer is stable for max. 4 weeks at 2-8°C.

Substrate Solution

The **Substrate Solution S**, stabilised H₂O₂-Tetramethylbenzidine, is photosensitive – store and incubate in the dark.

Microtiter plate

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

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. The Demeditec Diagnostics GmbH is not liable for any loss or harm caused by non-observance of the instructions, as far as no law withstands.

Temperature WILL affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.

Do not use expired reagents.

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.

Caution: This kit contains material of human and/or animal origin.

Human Serum

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

The sources of human sera were tested by FDA recommended methods and found non-reactive for Hepatitis-B surface antigen (HBsAg), Hepatitis C virus (HCV), and Human Immunodeficiency Virus 1 and 2 (HIV) antibody. No known test methods can offer total assurance of the absence of infectious agents; therefore all components and patient's specimens should be treated as potentially infectious.

Stop solution contains 0.4 N acidic solution

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

2-Methyl-4-Isothiazolin-3-one

contained in following components: **AK, EK, VP, PP**

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

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

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

contained in following components: **AK, EK, VP, WP, PP**

< 0.01% (w/w) 5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-Isothiazol-3-one Solution

R36/38 Irritating to eyes and skin

R43 Sensibilisation through skin contact possible

S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice

S28.1 After contact with skin, wash immediately with plenty of water

TMB-Substrate (S) contains 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine.

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 Sera and samples) should be assayed in duplicate. For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

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

- 1) Add **50 µl Antibody Conjugate AK** in **all** wells used
- 2) Pipette in positions A1/2 **50 µl Sample Buffer PP**
- 3) Pipette in positions B1/2 **50 µl of the Standard A (0.45 ng/ml)**,
pipette in positions C1/2 **50 µl of the Standard B (1.5 ng/ml)**,
pipette in positions D1/2 **50 µl of the Standard C (3 ng/ml)**,
pipette in positions E1/2 **50 µl of the Standard D (5.63 ng/ml)**,
pipette in positions F1/2 **50 µl of the Standard E (9 ng/ml)**.

To control the correct accomplishment of the assay **50 µl** of the 1:401 (or in respective dilution ratio of the samples) in Sample Buffer diluted **Control Sera KS1/KS2** can be pipetted in positions G1/2 and H1/2 .

Pipette **50 µl** each of the diluted samples (e.g. dilute 1:401 with Sample Buffer **PP**) In the rest of wells, according to your requirements.
- 4) Cover the wells with sealing tape and incubate the plate for **2 hours** at **room temperature** (shake at 350 rpm)
- 5) After incubation aspirate the contents of the wells and wash the wells **5 times 300 µl Washing Buffer WP** / well.
- 6) Following the last washing step pipette **100 µl** of the **Enzyme Conjugate EK** in each well.
- 7) Cover the wells with sealing tape and incubate the plate for **30 Minutes** at **room temperature** (shake at 350 rpm).
- 8) After incubation wash the wells **5 times** with Washing Buffer **WP** as described in step 5.
- 9) Pipette **100 µl** of the **Substrate Solution S** in each well.
- 10) Incubate the microtiter plate for **30 minutes in the dark** at **room temperature**.
- 11) Stop the reaction by adding **100 µl Stopping Solution SL** to all wells.
- 12) Measure the absorbance within **30 minutes at 450 nm (Reference filter ≥ 590 nm)**

CALCULATION OF RESULTS

For the evaluation of the assay it is required that the absorbance values of the blank should be below 0.25, and the absorbance of standard E should be above 1.00.

Samples, which yield higher absorbance values than **Standard E**, are beyond the standard curve, for reliable determinations such samples should be retested at a higher dilution.

Establishing the Standard Curve

The standards provided contain the following concentration of recombinant hIGF-II:

Standard	A	B	C	D	E
ng/ml	0.45	1.5	3	5.63	9

- 1) Calculate the **mean absorbance** value for the blank from the duplicated determination (well A1/A2).
- 2) Subtract the mean absorbance of the blank from the mean absorbances of all other values.
- 3) Plot the standard concentrations on the x-axis versus the mean value of the absorbance of the standards on the y-axis.
- 4) Recommendation: Calculation of the standard curve should be done by using a computer program because the curve is in general (without respective transformation) not ideally described by linear regression. **A higher-grade polynomial, or four parametric logistic (4-PL) curve fit or non-linear regression** are usually suitable for the evaluation (as might be spline or point-to-point alignment in individual cases).
- 5) The **IGF-II concentration in ng/ml** of the samples can be calculated **by multiplication** with the **respective dilution factor**.

EXPECTED VALUES

Table 4: Serum levels of IGF-II in ng/ml in healthy persons at various ages*

Age group	Percentile		
	5th	50th	95th
Newborns	158	284	516
1-4 weeks	350	486	673
1-6 months	348	551	871
6-12 months	388	582	876
1-3 years	384	596	926
3-5 years	397	617	920
5-7 years	419	638	973
7-9 years	433	656	997
9-11 years	442	662	994
11-13 years	448	671	1006
13-15 years	455	679	1014
15-17 years	452	686	1042
20-30 years	436	679	1058
30-40 years	442	680	1049
40-50 years	407	650	1039
50-60 years	396	644	1049
60-70 years	373	611	1000

* Measurement was performed after acid-ethanol extraction, and values were corrected for recovery (correction factor 1.2). Blum W., Schweizer R.,: Insulin-like growth factors and their binding proteins; in Ranke MB (ed): Diagnostics of endocrine function in children and adolescents. Basel, Karger, 2003, pp 166-199 (22).

LITREATURE / LITERATUR

- 1) Baxter RC. 1986 The somatomedins:insulin-like growth factors. *Adv Clin Chem.*25:49-115
- 2) Daughaday WH, Rotwein P. 1989 Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev.* 10:68-91
- 3) Spencer EM (Ed.) 1991 *Modern Concepts of Insulin-Like Growth Factors.* New York: Elsevier.
- 4) Klapper DG, Svoboda ME, Van Wyk JJ. 1983 Sequence analysis of somatomedin-C: confirmation of identity with insulin-like growth factor-I. *Endocrinology.* 112:2215-2217.
- 5) Rinderknecht E, Humbel RE. 1978 The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem.* 253:2769-2276.
- 6) Clemmons DR, Van Wyk JJ. 1984 Factors controlling blood concentration of somatomedin C. *Clin Endocrinol Metab.* 13:113-143.
- 7) Ballard J, Baxter R, Binoux M, et al. 1989 On the nomenclature of the IGF binding proteins. *Acta Endocrinol (Copenh).* 121:751-752.
- 8) Drop SLS. 1992 Report on the nomenclature of the IGF binding pro-teins. *J. Clin Endocrinol Metab.* 74:1215-1216.
- 9) Martin JL, Baxter RC. 1986 Insulin-like growth factor binding protein from human plasma. Purification and characterization. *J Biol Chem.* 261:8754-8760.
- 10) Binkert C, Landwehr J, Mary JL, Schwander J, Heinrich G. 1989 Cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding a novel insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-2). *EMBO J.* 8:2497-2502.
- 11) Furlanetto RW, Underwood LE, Van Wyk JJ, D'Ercole AJ. 1977 Estimation of somatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay. *J. Clin Invest.* 60:648-657.
- 12) Daughaday WH, Kapadia M, Mariz I. 1987 Serum somatomedin binding proteins: physiologic significance and interference in radioligand assay. *J Lab Clin Med.* 109:355-363.
- 13) Breier BH, Gallaher BW, Gluckman PD. 1991 Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I: solutions to some potential problems and pitfalls. *J Endocrinol.* 128:347-357.
- 14) Daughaday WH, Mariz IK, Blethen SL. 1980 Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites: a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol-extracted serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 51:781-788.
- 15) Blum WF, Gallaher B, Ranke MB. 1992 An IGFBP-blocked IGF-I RIA that measures what it pretends to measure: IGF-I. 74th Annual Meeting of the American Endocrine Society. 293.
- 16) Rosenfeld RG, Wilson DM, Lee PDK, Hintz RL. 1986 Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation. *J Pediatr.* 109:428-433.
- 17) Clemmons DR, Van-Wyk JJ, Ridgway EC, Kliman B, Kjellberg RN, Underwood LE. 1979 Evaluation of acromegaly by radioimmunoassay of somatomedin-C. *N. Engl J Med.* 301:1138-1142
- 18) Zapf J, Walter H, Froesch ER. 1981 Radioimmunological determination of insulin-like growth factors I and II in normal subjects and in patients with growth disorders and extrapancreatic tumor hypoglycemia. *J Clin Invest.* 68:1321-1330.
- 19) Blum WF. 1992 Insulin-like growth factors and their binding proteins. In: Ranke MB, ed. *Functional Endocrinologic Diagnostics in Children and Adolescence.* Mannheim: J + J Verlag; 102-117.
- 20) Rieu M, Girard F, Bricaire H, Binoux M. 1982 The importance of insulin-like growth factor (somatomedin) measurements in the diagnosis and surveillance of acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 55:147-153.
- 21) Blum WF, Ranke MB, Bierich JR. 1988 A specific radioimmunoassay for insulin-like growth factor II: the interference of IGF binding proteins can be blocked by excess IGF-I. *Acta Endocrinol (Copenh).*118:374-380.
- 22) Blum W., Schweizer R.,: *Insulin-like growth factors and their binding proteins;* in Ranke MB (ed): *Diagnostics of endocrine function in children and adolescents.* Basel, Karger, 2003, pp 166-199.
- 24) Blum WH, Breier BH (1994) Radioimmunoassays for IGFs and IGFBPs. *Growth Regulation* 4 (Suppl. 1):11-19
- 25) Trojan L, Bode C, Weiss C, Mayer D, Grobholz R, Alken P, Michel MS: IGF-II serum levels increase discrimination between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer and improve the predictive value of PSA in clinical staging. *Eur Urol* (2006), 49(2):286-292
- 26) Soon PS, Gill AJ, Benn DE, Clarkson A, Robinson BG, McDonald KC, Sidhu SB: Microarray gene expression and immunohisto chemistry analyses of adrenocortical tumors identify IGF2 and Ki-67 as useful in differentiating carcinomas from adenomas. *Endocr Relat Cancer* (2009), 16(2):573-583
- 27) Freude S et al: Neuronal IGF-1 resistance reduces Abeta accumulation and protects against premature death in a model of Alzheimer's disease. *FASEB J* (2009) Jun1 Epub ahead of print.

KURZANLEITUNG – Demeditec IGF-II-ELISA DEE030

Rekonstitution/ Verdünnung von Reagenzien		
Standards A-E	Rekonstitution in Probenpuffer PP	500 µl
Kontrollserum KS1	Rekonstitution in Probenpuffer PP	250 µl
Kontrollserum KS2	Rekonstitution in Probenpuffer PP	250 µl
Waschpuffer WP	verdünnen in A. dest. (z.B. die gesamte Menge von 50 ml im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen)	1:20
Proben und Kontrollseren KS1 & KS2: 1:401 in Probenpuffer PP verdünnen, sofort mischen, mind. 15 min, max. 120 min inkubieren. Davon 50 µl pro Bestimmung einsetzen		
Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.		

Testdurchführung in Doppelbestimmung

Pipettieren	Reagenzien	Position
50 µl	Antikörperkonjugat AK	in <u>alle</u> benötigten Vertiefungen pipettieren
50 µl	Probenpuffer PP als Leerwert	A1 und A2
50 µl	Standard A (0,45 ng/ml)	B1 und B2
50 µl	Standard B (1,5 ng/ml)	C1 und C2
50 µl	Standard C (3 ng/ml)	D1 und D2
50 µl	Standard D (5,63 ng/ml)	E1 und E2
50 µl	Standard E (9 ng/ml)	F1 und F2
50 µl	Kontrollserum KS1	G1 und G2
50 µl	Kontrollserum KS2	H1 und H2
50 µl	Proben	in Vertiefungen nach Bedarf pipettieren
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.		

Inkubation: 2 h bei RT, 350 rpm

5x 300 µl	Absaugen und die Platte 5x mit je 300 µl Waschpuffer WP / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µl	Enzymkonjugat EK	In jede Vertiefung

Inkubation: 30 min bei RT, 350 rpm

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

Inkubation: 30 min im Dunklen bei RT

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

SUMMARY – DEMEDITEC IGF-II ELISA DEE030

Reconstitution / Dilution of Reagents		
Standards A-E	Reconstitution in Sample Buffer PP	500 µl
Control Serum KS1	Reconstitution in Sample Buffer PP	250 µl
Control Serum KS2	Reconstitution in Sample Buffer PP	250 µl
Wash Buffer WP	dilute in A. dest. (eg. total volume of 50 ml in a graduated flask and fill up to 1000 ml)	1:20
Sample + Control Sera KS1 and KS2: dilute 1:401 in Sample Buffer PP, mix immediately, incubate at least for 15 min, max. 2h. Use 50 µl for each well in the assay.		
Before conducting the assay equilibrate all reagents to room temperature.		

Assay Procedure for Double Determinations:

Pipette	Reagent	Position
50 µl	Antibody Conjugate AK	in all wells used
50 µl	Sample Buffer PP (blank)	A1 and A2
50 µl	Standard A (0.45 ng/ml)	B1 and B2
50 µl	Standard B (1.5 ng/ml)	C1 and C2
50 µl	Standard C (3 ng/ml)	D1 and D2
50 µl	Standard D (5.63 ng/ml)	E1 and E2
50 µl	Standard E (9 ng/ml)	F1 and F2
50 µl	Control Serum KS1	G1 and G2
50 µl	Control Serum KS2	H1 and H2
50 µl	Samples	following wells
Cover the wells with the sealing tape.		

Incubation: 2 h at RT, 350 rpm

5x 300 µl	Aspirate the contents of the wells and wash 5x with 300 µl Wash Buffer WP	each well
100 µl	Enzyme Conjugate EK	each well

Incubation: 30 min at RT, 350 rpm

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

Incubation: 30 min in the dark RT

100 µl	Stop Solution SL	each well
Measure the absorbance within 30 min at 450 nm with ≥ 590 nm as reference wavelength.		



CAL A-E	A -E	Rec in 500 µl BUF PP	
Control	KS1&KS2	Rec in 250 µl BUF PP	
WASHBUF 20x	WP		1:20 DILU A. dest.

SPE + Control 1:401 DILU BUF PP	↔	0.25 h
°C 20-25 °C		

50 µl	Ab	A1 - End
50 µl	BUF PP	A1/2
50 µl	CAL A Std A (0.45 ng/ml)	B1/2
50 µl	CAL B Std B (1.5 ng/ml)	C1/2
50 µl	CAL C Std C (3 ng/ml)	D1/2
50 µl	CAL D Std D (5.63 ng/ml)	E1/2
50 µl	CAL E Std E (9 ng/ml)	F1/2
50 µl	CONTROL KS 1	G1/2
50 µl	CONTROL KS 2	H1/2
50 µl	SPE	
TAPE		

🕒 2 h °C 20-25 ↔ 350 rpm

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

🕒 0.5 h °C 20-25 ↔ 350 rpm

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

🕒 30 min °C 20-25

100 µl	STOP SOLN SL
MEASURE	