

Product information

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



User's Manual

IGF-I mouse/rat ELISA

*Enzyme Immunoassay for the Quantitative Determination of Mouse-
/Rat- Insulin-like Growth Factor-I (IGFBP-blocked)*

RUO

REF

DEE025



96 wells

INHALTSVERZEICHNIS / TABLE OF CONTENTS

DEUTSCH	Gebrauchsanweisung	3
1	ZWECKBESTIMMUNG	3
2	EINFÜHRUNG	3
3	TESTPRINZIP	4
4	WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	5
5	PROBEN	6
6	MATERIALIEN	7
7	TECHNISCHE HINWEISE	7
8	TESTDURCHFÜHRUNG	9
9	AUSWERTUNG	10
10	ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG	11
ENGLISH	INSTRUCTIONS FOR USE.....	13
1	INTENDED USE.....	13
2	INTRODUCTION.....	13
3	PRINCIPLE	14
4	WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	15
5	SAMPLES	16
6	MATERIALS	17
7	TECHNICAL NOTES.....	18
8	ASSAY PROCEDURE	19
9	EVALUATION OF RESULTS	20
10	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	21
11	LITREATURE / LITERATUR.....	23

DEUTSCH Gebrauchsanweisung

IGF-I mouse/rat ELISA (DEE025)	96 Bestimmungen
Regulatorischer Status	Für Forschungsanwendungen
Testprinzip	Enzymimmunoassay
Dauer (Inkubationszeit)	2 h
Probenpuffer	gebrauchsfertig
Waschpuffer	20fach Konzentrat
Standard	5 Einzel-Standards mit 0,5 - 18 ng/ml rekombinantes IGF-I
Kalibration	Die Kalibration des Assays erfolgte mittels rekombinantem IGF-I
Assay Bereich	0,315 ng/mL – 1800 ng/mL
Kontrolle	2 Serumkontrollen, niedrige bzw. hohe Konzentration, lyophilisiert
Probe	Maus- und Rattenserum und Plasmen.
Erforderliches Probenvolumen	10 µL empfohlen, mindestens 5 µL
Proben Verdünnung	1:100
Analytische Sensitivität	Ø 0,315 ng/mL
Intra- / Interassay Variation	Ø < 10 %

1 ZWECKBESTIMMUNG

Messung von IGF-I in Maus- und Rattenserum und Plasmen.

2 EINFÜHRUNG

Neben unterschiedlichen Zellkulturmodellen sowie Studien am Menschen stellen Maus und Ratte einen geeigneten Modellorganismus für präklinische Studien dar. Aus diesem Grund wurde der vorliegende Testkit entwickelt. Er soll als **Werkzeug für die Messung von IGF-I im Maus-/Rattenmodell** im Rahmen der Grundlagenforschung und präklinischer Studien dienen.

Im Folgenden wird, auch wenn ein Vergleich von Mensch und Maus-/Ratte nur begrenzt möglich ist, als Hintergrundinformation das IGF-I System *beim Menschen* kurz dargestellt:

Insulin-like growth factors (IGF)-I und-II spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Proliferation, Differenzierung und spezifischer Funktionen vieler Zelltypen (1-3). IGF-I ist identisch mit Somatomedin C (Sm-C) (4) und hat ein Molekulargewicht von 7649 Dalton (5). Seine wichtigsten Regulatoren sind das Wachstumshormon (WH) und die Ernährung.

Im Gegensatz zu vielen anderen Hormonen sind IGFs mit hoher Affinität an spezifische Bindungsproteine (IGFBP) gebunden. Sieben verschiedene Bindungsproteinen sind derzeit bekannt (7,8,22). Sie binden entweder IGF-I und IGF-II mit ähnlicher Affinität oder weisen eine Präferenz für IGF-II auf (9,10). Ein Hauptproblem bei der Messung von IGF-I resultiert aus der Interferenz mit IGFBPs im Assay. Die direkte Bestimmung in unbehandelten Serumproben (11) führt zu falschen Ergebnissen, weil auf Grund der extrem langsamen Dissoziation des IGF-I/IGFBP-3-Komplexes während der Assay-Inkubationszeit nur ein Teil des IGF-I der Messung zur Verfügung steht. In Abhängigkeit vom Verhältnis von IGF-I zu IGFBPs in der Probe kommt es zu Interferenzen: (s. beispielhaft in Abb.1)

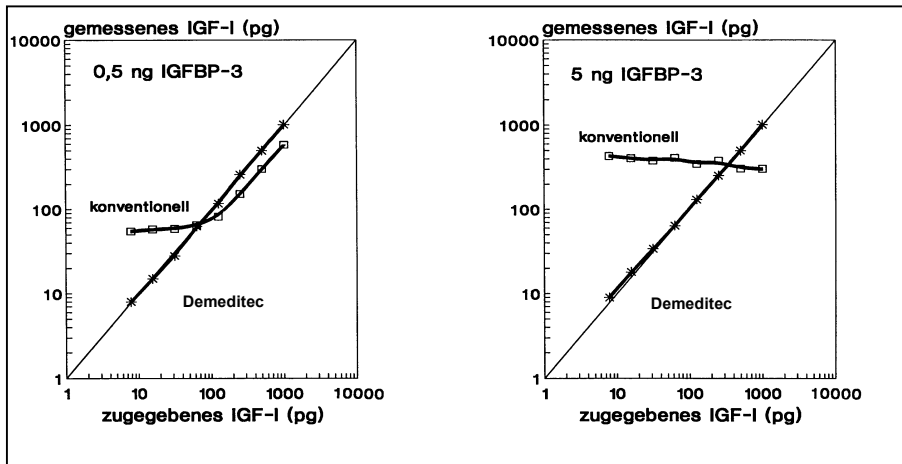


Abb. 1: Interferenz von IGFBP bei IGF-I-Messungen. Bekannte IGF-I-Konzentrationen wurden in Gegenwart von 0,5 ng (links) bzw. 5 ng (rechts) hIGFBP-3 mit einem konventionellen Assay (□) bzw. einem IGFBP-blockierten Demeditec Assay gemessen.

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurde ein einfacher Assay entwickelt, der vor der eigentlichen Messung keine besondere Probenvorbereitung erfordert, abgesehen von einer Ansäuerung oder Verdünnung in einem speziell zusammengesetzten Puffersystem.

3 TESTPRINZIP

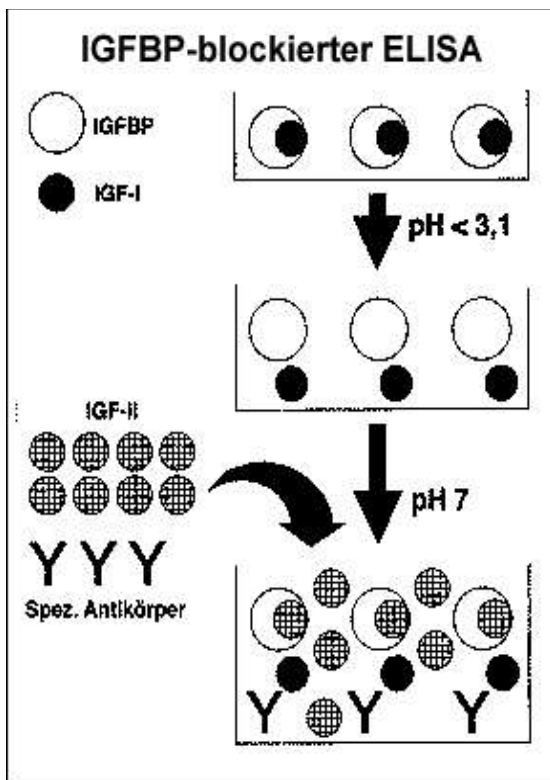


Abb. 2. Prinzip des IGFBP-blockierten ELISA.

Um IGF-I von den IGFBPs zu dissoziieren, müssen die Proben in einem sauren Puffer verdünnt werden (Abb. 2). Die verdünnten Proben werden dann in die Vertiefungen pipettiert, der pH wird dabei neutralisiert. Nach Neutralisation der Probe besetzt das in hohem Überschuss vorhandene IGF-II die IGF-Bindungsstellen der Bindungsproteine. Dies erlaubt die problemlose Messung des nun freien IGF-I. 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-I-Antikörpers mit IGF-II stört der hohe Überschuss an IGF-II die Interaktion mit IGF-I nicht.

Im weiteren Verlauf wird der Assay wie ein konventioneller ELISA unter Verwendung eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugates fortgeführt.

4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Nur zum In-vitro Gebrauch. Nur zum Gebrauch durch Fachpersonal.

Nur für Forschungsanwendungen

Der DEE025 Kit ist nur zum In-vitro Gebrauch für Forschungszwecke 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 Test enthält Material humanen und/oder tierischen Ursprungs. Die Bestandteile des Tests sind so zu handhaben, als ob sie infektiös wären.

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

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

Ratten/ Mausserum:

in folgenden Komponenten enthalten: Kontrollserum KS1 und Kontrollserum KS2

Reagenzien

A-E, AK, EK, PP, WP

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

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

Substratlösung (S)

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

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

Stopplösung (SL)

Die Stopplösung enthält 0,2 M Schwefelsäure (H₂SO₄)

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

4.1 Erste-Hilfe Maßnahmen:

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

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

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

5 PROBEN

5.1 Probenmaterial

Geeignet sind Seren und Heparin,- EDTA und Citratplasmen von Ratten und Mäusen. Eine eventuelle Verdünnung der Proben durch das Antikoagulans muss berücksichtigt werden.

Der Einfluss von Heparin (30 IE/mL), EDTA (6,8 mM) und NaCitrat (0,015 M) auf die Messung wurde bestimmt. Pufferlösung wurde mit entsprechenden Mengen der Substanzen sowie rekombinatem Maus-/Ratten IGF-I versetzt und die Wiederfindung bestimmt. Es konnten keine signifikanten Auswirkungen auf die Wiederfindung detektiert werden: Die durchschnittliche Wiederfindung betrug 108%.

Zellkulturmedium ist nach Vorverdünnung von 1:2 mit Probenpuffer PP als Probenmatrix geeignet.

5.2 Probenentnahme

Hämolytische Reaktionen sind zu vermeiden.

Das Blut koagulieren lassen und das Serum durch Zentrifugation abtrennen.

5.3 Erforderliches Probenvolumen: 10 µL empfohlen, (Mindestvolumen 5 µL)

5.4 Probenstabilität

In fest verschlossenen, geeigneten Probengefäßen

- Lagerung bei 20-25°C max. 2 Tag
- Lagerung bei -20°C max. 2 Jahre
- Gefrier-Auftau-Zyklen max. 2

Die Proben sollten nicht öfter als zweimal eingefroren/aufgetaut werden. IGF-I erwies sich nach mehrfachen Frier/Tauzyklen in Proben als instabil, entsprechend wurden Messwerte tiefer bestimmt.

5.5 Probenverdünnung

- Verdünnung: **1:100** mit Probenpuffer **PP**
- Beispiel: **10 µL** Probe werden zu **990 µL Probenpuffer PP** gegeben (Verdünnungsfaktor 100). Nach dem Mischen werden von dieser Lösung 50 µl pro Bestimmung im Assay eingesetzt. mindestens 15 min, max. 120 min inkubieren. Davon **50 µL** pro Bestimmung einsetzen.
- Individuell können Werte aber stark variieren, es empfiehlt sich dies zu prüfen und eventuell die Probenverdünnung anzupassen.
- Gegebenenfalls kann, je nach erwarteten **IGF-I-Werten**, stärker oder geringer in **Probenpuffer PP** verdünnt werden.
- Achtung: Serum- und Plasmaproben müssen mind. **1:10** in **Probenpuffer PP** verdünnt werden, um eine ausreichende Ansäuerung der Proben zu erreichen.

6 MATERIALIEN

6.1 Inhalt der Testpackung

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

SORB MT	Mikrotiterplatte, MTP gebrauchsfertig, beschichtet mit Hamster-anti-m/r-IGF-I-Antikörper. Die Vertiefungen sind einzeln abbrechbar.	(8x12) Vertiefungen
CAL A-E	Standards, A-E lyophilisiert (rekombinantes IGF-I), die Konzentrationen sind auf dem Qualitätszertifikat angegeben.	5 x 1 mL
CONTROL 1	Kontrollserum 1, KS1 lyophilisiert, (Maus-/Rattenserum), die Konzentration ist auf dem Qualitätszertifikat in ng/mL angegeben.	1 x 500 µL
CONTROL 2	Kontrollserum 2, KS2 lyophilisiert, (Maus-/Rattenserum), die Konzentration ist auf dem Qualitätszertifikat in ng/mL angegeben.	1 x 500 µL
Ab CONJ	Antikörperkonjugat, AK gebrauchsfertig, Ziegen-anti-m/rIGF-I-Antikörper biotinyliert.	1 x 7 mL
ENZ CONJ	Enzymkonjugat (POD), EK gebrauchsfertig, Streptavidin-Peroxidase-Konjugat.	1 x 12 mL
SAM DIL	Probenpuffer, PP gebrauchsfertig	1 x 125 mL
WASH SOLN 20x	Waschpuffer WP , 20fach konzentrierte Lösung	1 x 50 mL
SUB TMB	Substrat S , gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase (POD)-Substrat, stabilisiertes Tetramethylbenzidin.	1 x 12 mL
STOP SOLN	Stopplösung SL , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure.	1 x 12 mL
-	Abdeckfolie für die Mikrotiterplatte	2 x
-	Packungsbeilage	1 x
-	Qualitätszertifikat	1 x

6.2 Nicht mitgelieferte, benötigte Materialien

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

7 TECHNISCHE HINWEISE

Lagerbedingungen

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

Haltbarkeit

Nicht verwendete Streifen **der Testplatte** sind zusammen mit dem Trockenkissen **luftdicht** in dem wiederverschließbaren Klippbeutel bei 2° - 8°C zu lagern. Die Streifen bitte nur in dem mitgelieferten Rahmen verwenden. **Rekonstituierte Komponenten** (Standard und Kontrollserum) können bei -20°C für 2 Monate gelagert werden. Zur weiteren Verwendung schnell aber schonend Auftauen (keine Temperaturerhöhung über Raumtemperatur und kein übermäßiges Vortexen), bis zu 1 dieser Einfrier-Auftauzyklen zeigten keinen signifikanten Einfluss auf den Test. **Achtung:** die Standards dürfen nur einmal aufgetaut werden – gegebenenfalls aliquotieren. Der 1:20 gebrauchsfertig verdünnte Waschpuffer **WP** ist nur **4 Wochen** haltbar.

Vorbereitung der Reagenzien

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

Rekonstitution

Die Standards und Kontrollserum 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.

Verdünnung

Nach der Rekonstitution werden die Kontrollseren im gleichen Verhältnis wie die Proben mit dem Verdünnungspuffer **VP** verdünnt.

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

Inkubation

Inkubation bei Raumtemperatur bedeutet: **Inkubation bei 20 - 25°C**. Die Substratlösung **S**, stabilisiertes H₂O₂-Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich–Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

Testdurchführung

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

Schütteln

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

Waschen

Korrektes Waschen ist von grundlegender Bedeutung für den sicheren, richtigen und präzisen Ablauf des Testes. Ungenügendes Waschen ist eine häufige Ursache für nicht valide Testdurchführungen. Mögliche Folgen sind unkontrollierte unspezifische Variationen der gemessenen optischen Dichten, die zu falschen Ergebnisberechnungen der Proben führen können. Mögliche Hinweise darauf sind z.B. hohe Leerwerte und variabel streuende Messwerte. Zum Waschen muss der mitgelieferte und auf Gebrauchskonzentration verdünnte Waschpuffer verwendet werden. Das Waschvolumen pro Waschzyklus und Vertiefung muss mindestens 300 µL betragen.

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

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

8 TESTDURCHFÜHRUNG**Vorbereitung der Reagenzien**

Reagenzpräparation:		Rekonstitution:	Verdünnung:
A-E	Standards	in 1 mL Probenpuffer PP	-
KS1	Kontrollserum 1	in 500 µL Probenpuffer PP	1:100 mit PP
KS2	Kontrollserum 2	in 500 µL Probenpuffer PP	1:100 mit PP
WP	Waschpuffer	-	1:20 mit Aqua dest.

Proben mit Probenpuffer **PP 1:100** verdünnen, **sofort mischen**, mindestens 15 min, **max. 120 min inkubieren**. Davon **50 µl pro Bestimmung** einsetzen

Vor der Testdurchführung alle **Reagenzien** auf **Raumtemperatur (20-25°C)** bringen.

Testdurchführung in Doppelbestimmung:

Pipettieren	Reagenzien	Position
50 µL	Antikörper-Konjugat AK	in alle benötigten Vertiefungen pipettieren
50 µL	Probenpuffer PP (Leerwert)	A1/A2
50 µL	Standard A (0,5 ng/mL)	B1/B2
50 µL	Standard B (2,5 ng/mL)	C1/C2
50 µL	Standard C (6 ng/mL)	D1/D2
50 µL	Standard D (12 ng/mL)	E1/E2
50 µL	Standard E (18 ng/mL)	F1/F2
50 µL	Kontrollserum KS1 (1:100 verdünnt)	G1/G2
50 µL	Kontrollserum KS2 (1:100 verdünnt)	H1/H2
50 µL	Probe (1:100 verdünnt)	in die restlichen Vertiefungen nach Bedarf pipettieren

Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.

Proben-Inkubation: 1 h bei 20 - 25°C, 350 rpm

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

Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.

Inkubation: 30 Minuten bei 20-25°C, 350 rpm

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

Substrat S Inkubation: 30 Minuten im Dunklen bei 20 - 25°C

100 µL	Stopplösung SL	In jede Vertiefung
--------	-----------------------	--------------------

Messung der Absorption innerhalb von 30 min bei **450 nm** (Referenzfilter ≥ 590 nm).

9 AUSWERTUNG

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.

9.1 Erstellung der Standardkurve

Die bereitgestellten Standards enthalten folgende IGF-I-Konzentrationen:

Standard	A	B	C	D	E
ng/mL	0,5	2,5	6	12	18

- 1) Ermittlung des **Mittelwertes** der optischen Dichte des Leerwertes aus den Doppelbestimmungen (Vertiefung A1/A2).
- 2) Von den Mittelwerten der optischen Dichte der Standardkonzentrationen und der Proben wird der mittlere Leerwert abgezogen.
- 3) Die Standardkonzentrationen (x-Achse) werden gegen die gemessene optische Dichte (y-Achse) aufgetragen.
- 4) Die Berechnung der Standardkurve sollte durch ein statistisches Programm erfolgen, da die Kurve i. Allg. nicht ideal durch eine lineare Regression beschrieben wird. **Ein höhergradiges Polynom, 4-Parameter-Anpassungen** oder **nicht-lineare Regression** sind zur Auswertung geeignet, in manchen Fällen kann eine Spline oder Punkt-zu-Punkt Anpassung angebracht sein.
- 5) Aus der Standardkurve erhält man derart die IGF-I-Konzentration der verdünnten Kontrollen KS1 & KS2 bzw. der verdünnten Proben (mit der individuellen Verdünnung, allgemein für Serum- und Plasma empfohlen 1:100). Die **Multiplikation** des jeweiligen berechneten IGF-I-Gehaltes **mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor** ergibt dann die IGF-I-Konzentration der unverdünnten Ausgangslösungen

9.2 Beispiel einer typischen Standardkurve

Die exemplarischen Daten und die Standardkurve in der Abbildung 3 können **nicht** für die Berechnung der Testergebnisse genutzt werden! Für jeden Test muss eine eigene Standardkurve mitgeführt werden.

	Leerwert	A	B	C	D	E
ng/mL	0	0,5	2,5	6	12	18
OD (450-620 nm)	0,07	0,114	0,614	1,283	1,690	1,923

Die hier beispielhaft gezeigte Standardkurve (Abbildung 3) darf **nicht für die Auswertung** Ihres Testes genutzt werden. Für jeden Test ist eine eigene Standardkurve anzufertigen.

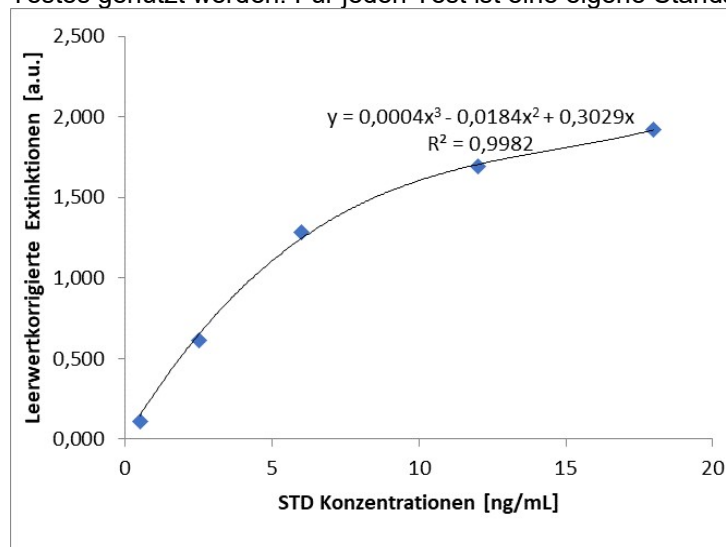


Abb. 3 Typische Standardkurve mit einem Polynom 3. Grades zur Berechnung der Standardkurve

Beispielhafte Berechnung der IGF-I – Konzentration einer unverdünnten Probe:

9.3 Beispielhafte Berechnung der m/rIGF-I-Konzentration

Gemessene Extinktion der Probe: 1,3525
 Gemessene Extinktion des Nullwertes: 0,07

Aus der Differenz der Probenextinktion und der Extinktion des Leerwertes **berechnet Ihr Auswertungsprogramm** mit der entsprechenden Kurvenanpassung (hier: Polynom 3. Grades) die IGF-I Konzentration der verdünnten Probe durch Auflösen der Gleichung aus Abb. 3 nach x. In diesem Fall ergibt sich eine IGF-I Konzentration in der verdünnten Probe von

$$1,283 = 0,0004x^3 - 0,0184x^2 + 0,3029x \quad 6,107 = x$$

und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (**1:100**) somit eine IGF-I Konzentration in der unverdünnten Probe von 610,7 ng/mL

$$6,107 \times 100 = 610,7 \text{ ng/mL}$$

10 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG

10.1 Sensitivity

Die Sensitivität wurde durch Messen des Leerwertes und der Berechnung der theoretischen Konzentration des Leerwertes +2 SA bestimmt. Die analytische Sensitivität des DEE025 beträgt als Mittelwert $\bar{\emptyset}$ 0,315 ng/mL (Bereich 0,262-0,405).

10.2 Präzision

Intra-Assay-Varianz

Mehrere Proben wurden 16 in dem gleichen Assay gemessen. Beispielhafte Ergebnisse sind in der Tabelle 1 gezeigt, im Durchschnitt betrug der Variationskoeffizient $\bar{\emptyset}$ < 10%.

Tabelle 1 Intra-Assay Variabilität. Die IGF-I Konzentrationen wurden innerhalb eines Tests in Doppelbestimmung ermittelt und die Variabilität als Variationskoeffizient (VK) berechnet.

	Anzahl Bestimmungen	Mittelwert (µg/L)	Standardabweichung (µg/L)	VK (%)
Probe 1	16	246	13,09	5,32
Probe 2	16	684	52,27	7,64
Probe 3	16	679	93,61	13,79

Inter-Assay-Varianz

Serumproben wurden in unabhängigen Assays gemessen. Im Durchschnitt betrug der Variationskoeffizient $\bar{\emptyset}$ < 10%. Beispielhafte Ergebnisse sind in Tabelle 2 detailliert dargestellt.

Tabelle 2 Inter-Assay Variabilität Die IGF-I Konzentrationen wurden in unabhängigen Tests in Doppelbestimmung ermittelt und die Variabilität als Variationskoeffizient (VK) berechnet.

	Anzahl Bestimmungen	Mittelwert (µg/L)	Standardabweichung (µg/L)	VK (%)
Probe 1	24	291	20	7
Probe 2	26	695	51	7
Probe 3	23	773	76	10
Probe 4	23	256	15	6
Probe 5	26	151	21	14
Probe 6	26	444	37	8
Probe 7	26	127	12	9
Probe 8	26	686	59	9
Probe 9	26	581	50	9
Probe 10	26	178	12	7

10.3 Methoden Vergleich

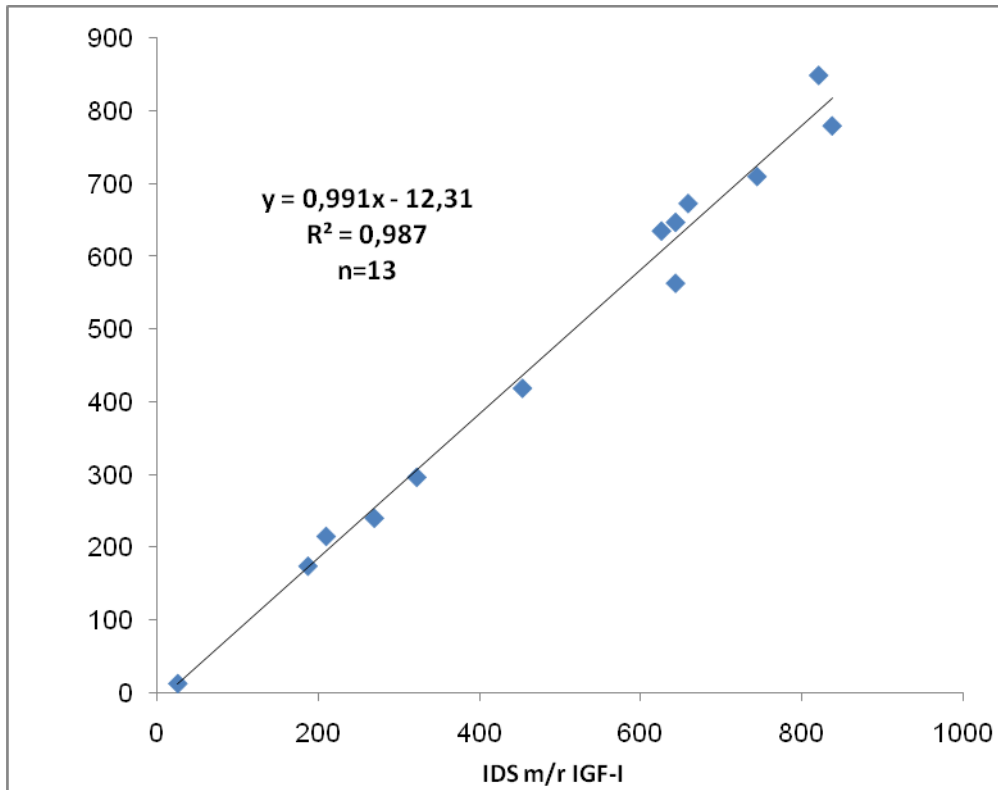


Abbildung 4: Methoden Vergleich des Demeditec DEE025 m/r IGF-I ELISA dem IDS m/r IGF-I ELISA.

10.4 Linearität

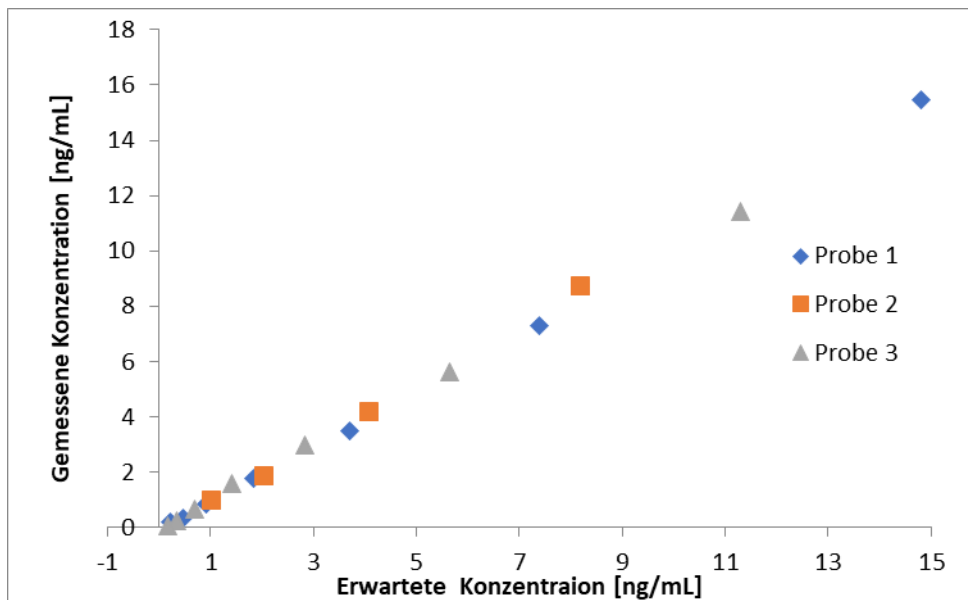


Abbildung 5 Linearität. Vergleich der theoretisch erwarteten und der gemessenen IGF-I Konzentration in den jeweiligen Verdünnungen. Von einer 1:10 Verdünnung bis zu einer Konzentration von 0,5 ng/mL ist die Linearität der Probenverdünnung gegeben.

ENGLISH INSTRUCTIONS FOR USE

IGF-I rat/mouse (DEE025)	96 Determinations
Regulatory Status	For Research Use Only.
Principle of the test	Enzyme Immunoassay
Duration (incubation period)	2 h
Sample Buffer	Ready for use
Washing Buffer	20fold concentrated
Standard	Single Standards 0.5 - 18 ng/ml
Calibration	The assay is calibrated against recombinant IGF-I
Assay Range	0.315 ng/mL – 1800 ng/mL
Control	2 Serum Controls, low and high concentrations, lyophilised
Sample	mouse / rat serum and plasma
Required sample volume	10 µL recommended, at least 5 µL
Sample dilution	1:100
Analytical Sensitivity	Ø 0.315 ng/mL
Intra- / Interassay Variance	Ø < 10 %

1 INTENDED USE

Measurement of IGF-I in mouse / rat serum and plasma.

2 INTRODUCTION

Beside different cell culture models and studies with human material, mice and rats are suitable model organisms for basic research and pre-clinical studies. Thus, we developed this test system as a tool for IGF-I measurements in mice and rat for usage in research and pre-clinical studies. Even if the comparability of mice and humans is limited, we offer some background information on the human IGF-I system in the following section:

Insulin-like growth factors (IGF) I and II play a pivotal role in regulating the proliferation and differentiation of many cell types (1-3). IGF-I is identical with Somatomedin C (Sm-C) (4) and has a molecular weight of 7649 daltons (5). Its major regulators are growth hormone (GH) and nutrition (6). In contrast to many other peptide hormones, IGFs are avidly bound to specific binding proteins (IGFBP). The seven IGFBPs which are known at present (7,8,22) either bind IGF-I and IGF-II with similar affinities or show a preference for IGF-II (9,10).

A major problem of IGF-I measurement results from the interference of IGFBPs in the assay. Direct determinations in untreated serum samples (11) give false values because of the extremely slow dissociation of the IGF-I/IGFBP-3 complexes during the assay incubation. Depending on the ratio IGF-I to IGFBP in the sample interference comes up (see example Figure 1)

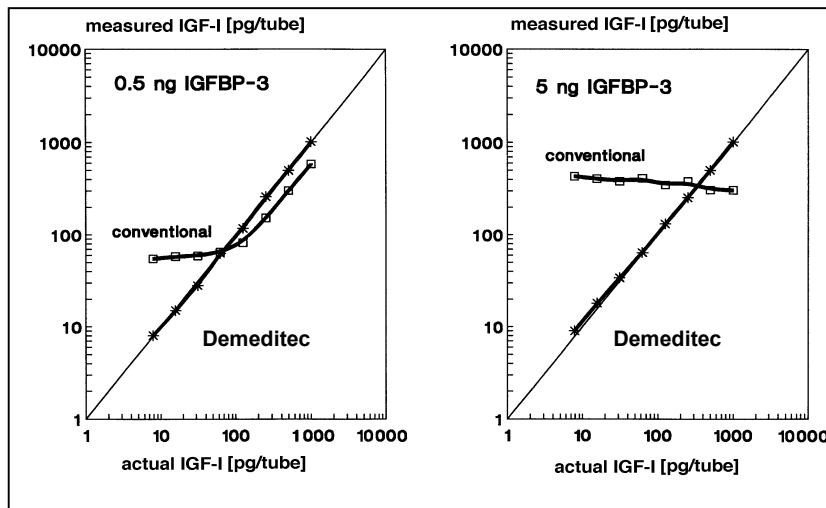


Figure 1. Interference of IGFBP in IGF-I measurements. Known concentrations of IGF-I were assayed in the presence of 0.5 ng (left) or 5 ng (right) hIGFBP-3 by a conventional (□) and by the IGFBP-blocked assay (*).

To avoid these difficulties, an uncomplicated assay was developed, in which special sample preparation, except acidification or dilution in a specially designed buffer system, is not required before measurement.

3 PRINCIPLE

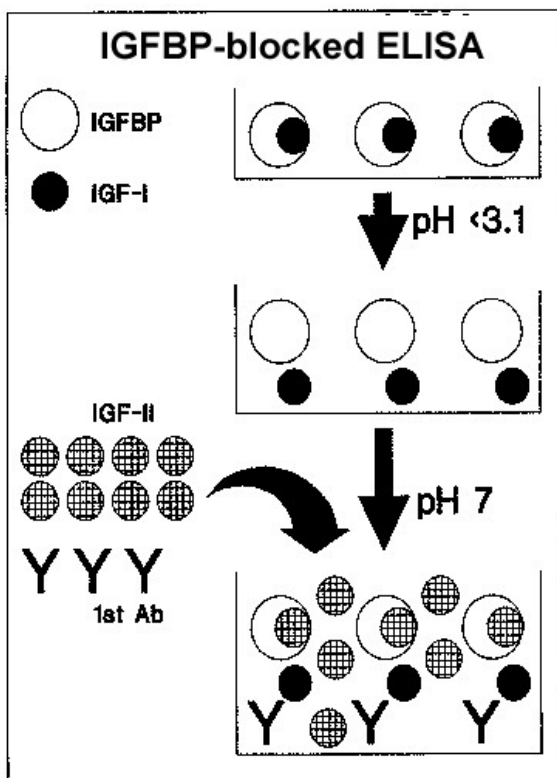


Figure 2 Principle of the IGFBP blocked IGF-I ELISA

The Demeditec ELISA for m/r IGF-I DEE025 is a so-called Sandwich-Assay. It utilizes two specific and high affinity antibodies for this protein. The IGF-I in the sample binds to the immobilized first antibody on the microtiter plate, the biotinylated and Streptavidin-Peroxidase conjugated second specific anti-IGF-I-Antibody binds in turn to the immobilized IGF-I. In the closing substrate reaction, the turn of the colour will be high specific catalysed, quantitatively depending on the IGF-I-level of the samples.

In order to dissociate IGF-I from the IGFBPs, the samples must be diluted in an acidic buffer (Figure 2). The diluted samples are then pipetted into the wells, by this the pH-value will be neutralized. After neutralization of the samples, the excess IGF-II occupies the IGF-binding sites of the binding proteins, thus allowing the measurement of resulting free IGF-I. With this method, the IGFBPs are not removed, but their function and therefore their interference in the assay is neutralized. Due to the extremely low cross-reactivity of the IGF-I antibody with IGF-II, the excess of IGF-II does not disturb the interaction with IGF-I. The test runs like a conventional ELISA using a Streptavidin-Peroxidase-Enzyme Conjugate.

4 WARNINGS AND PRECAUTIONS

For In Vitro Use only. For Professional use only. For Research Use Only.

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

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

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

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

Mouse / Rat Serum

Following components contain Mouse or Rat serum: Control Serum KS1 and KS2

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

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

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

Substrate Solution (S)

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

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

Stopping Solution (SL)

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

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

4.1 General first aid procedures:

Skin contact: Wash affected area rinse immediately with plenty of water at least 15 minutes. Remove contaminated cloths and shoes.

Eye contact: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water at least 15 minutes. In order to assure an effectual rinsing spread the eyelids.

Ingestion: After swallowing the product, if the affected person is conscious, rinse out the mouth with plenty of water: seek medical advice immediately.

5 SAMPLES

5.1 Sample type

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

Influence of Heparin (30IE/mL), EDTA (6,8mM) and NaCitrat (0,015M) on the measurement of IGF-I has been investigated in recovery experiments. Buffer solution was enriched with recombinant IGF-I and the above-mentioned substances. No significant influence on the recovery of IGF-I was detected, on average the recovery of recombinant material in comparison to enriched PBS was 108%.

Cell culture medium is suitable as sample matrix after predilution of 1:2 with **Sample Buffer PP**.

5.2 Specimen collection

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

Required sample volume: recommended 10 µL, min. 5 µL

5.3 Sample stability

In firmly closed sample vials:

- Storage at 20-25°C: max. 2 days
- Storage at -20° C: max. 2 years
- Freeze-thaw cycles max. 2

The storage of samples over a period of 2 years at -20°C, showed no influence on the reading. Therefore, it is recommended to keep sample refrigerated or frozen as soon as possible after separation of coagulated and corpuscular blood components and to avoid more than 2 freeze-thaw cycles.

5.4 Sample dilution

- Dilution: **1:100** with **Sample Buffer PP**
- Pipette **990 µL Sample Buffer PP** in PE-/PP-Tube (application of a multi-stepper is recommended in larger series); add **10 µL sample** (dilution 1:100). After mixing use 50 µL of this dilution in the assay.
- Attention: serum and plasma samples must be diluted at least 1:10 in **Sample Buffer PP** in order to achieve sufficient acidification of the samples.
- Depending on the expected IGF-I values the samples can be diluted higher or lower in **Sample Buffer PP**.

6 MATERIALS

6.1 Materials provided

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

SORB MT	Microtiter plate, MTP ready for use, coated with hamster-anti-m/r-IGF-I-antibody. Wells are separately breakable.	(8x12) wells
CAL A – E	Standards, A-E lyophilized, (recombinant IGF-I), concentrations are given on quality certificate.	5 x 1 mL
CONTROL 1	Control Serum 1, KS1 lyophilised, (Mouse/ Rat Serum), concentration is given on quality certificate in ng/mL.	1 x 500 µL
CONTROL 2	Control Serum 2, KS2 lyophilised, (Mouse/ Rat Serum), concentration is given on quality certificate in ng/mL.	1 x 500 µL
Ab CONJ	Antibody Conjugate, AK ready for use, contains goat biotinylated anti-m/rIGF-I antibody.	1 x 7 mL
ENZ CONJ	Enzyme Conjugate, EK ready for use, contains HRP (Horseradish-Peroxidase)-labelled Streptavidin.	1 x 12 mL
SAM DIL	Sample Buffer, PP ready for use	1 x 125 mL
WASH SOLN 20x	Washing Buffer, WP 20-fold concentrated solution	1 x 50 mL
SUB TMB	Substrate, S ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP) substrate, stabilised Tetramethylbencidine.	1 x 12 mL
STOP SOLN	Stopping Solution, SL ready for use, 0.2 M sulphuric acid.	1 x 12 mL
-	Sealing Tape , for covering the microtiter plate .	2 x
-	Instructions for use	1 x
--	Quality Certificate	1 x

6.2 Materials required, but not provided

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

7 TECHNICAL NOTES

Storage Conditions

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

Storage Life

Store the unused strips and microtiter wells **airtight** together with the desiccant at 2-8°C in the clip-lock bag, use in the frame provided. The **reconstituted components** standards **A-E** and Control Sera **KS1** and **KS2** must be stored at -20°C (max. 2 Months). **Attention:** Standards should be thawed only once- where required please store aliquoted in adequate volumens. For further use, thaw quickly but gently (avoid temperature increase above room temperature and avoid excessive vortexing). One of these freeze-thaw cycles showed no significant effect on the test

The 1:20 diluted Washing Buffer **WP** is 4 weeks stable at 2-8°C

Preparation of reagents

Bring all reagents to room temperature (20 - 25°C) before use. Possible precipitations in the buffers have to be resolved before usage by mixing and / or warming. Reagents with different lot numbers cannot be mixed.

Reconstitution

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

Dilution

After reconstitution dilute the Control **KS1** and **KS2** with the Sample Buffer **PP** in the same ratio as the sample.

The required volume of Washing Buffer **WP** is prepared by 1:20 dilution of the provided 20 fold concentrate with Aqua dest.

Assay Procedure

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

Incubation

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

Shaking

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

Washing

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

All washing must be performed with the provided Washing Buffer **WP** diluted to usage concentration. Washing volume per washing cycle and well must be 300 µL at least.

The danger of handling with potentially infectious material must be taken into account.

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

8 ASSAY PROCEDURE

Preparation of reagents		Reconstitution:	Dilution
A-E	Standards	in 1 mL Sample Buffer PP	-
KS1	Control Serum 1	in 500 µL Sample Buffer PP	1:100 with Sample Buffer PP
KS2	Control Serum 2	in 500 µL Sample Buffer PP	1:100 with Sample Buffer PP
WP	Washing Buffer	-	1:20 with Aqua dest.

Dilute samples 1:100 in Sample Buffer PP, mix immediately, incubate at least 15 min, max 2 h, incubate max. 2h.
Use 50 µl for each well in the assay.
Before assay procedure bring all reagents to room temperature 20-25°C.

Assay procedure in double determination

Pipette	Reagents	Position
50 µL	Antibody Conjugate AK	in <u>all</u> wells used
50 µL	Sample Buffer PP (Blank)	A1/A2
50 µL	Standard A (0.5 ng/mL)	B1/B2
50 µL	Standard B (2.5 ng/mL)	C1/C2
50 µL	Standard C (6 ng/mL)	D1/D2
50 µL	Standard D (12 ng/mL)	E1/E2
50 µL	Standard E (18 ng/mL)	F1/F2
50 µL	Control Serum KS1 (1:100 diluted)	G1/G2
50 µL	Control Serum KS2 (1:100 diluted)	H1/H2
50 µL	Sample (1:100 diluted)	in the rest of the wells according the requirements

Cover the wells with the sealing tape.

Sample-Incubation: 1 h at 20-25°C, 350 rpm

5x 300 µL	Decant the contents of the wells and wash 5 x with 300 µL each Washing Buffer WP/ well	In each well
100 µL	Enzyme Conjugate EK	In each well

Cover the wells with the sealing tape.

Incubation: 30 Minutes at 20-25°C, 350 rpm

5x 300 µL	Decant the contents of the wells and wash 5 x with 300 µL each Washing Buffer WP/ well	In each well
100 µL	Substrate Solution S	In each well

Incubation: 30 Minutes in the Dark at 20-25°C

100 µL	Stopping Solution SL	In each well
--------	-----------------------------	--------------

Measure the absorbance within 30 min at **450 nm** with ≥ 590 nm as reference wavelength.

9 EVALUATION 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**, should be re-tested with a higher dilution.

9.1 Establishing of the standard curve

Standards are provided in the following concentrations:

Standard	A	B	C	D	E
ng/mL	0.5	2.5	6	12	18

- 1) Calculate the **mean absorbance** value for the blank from the duplicated determination (well A1/A2).
- 2) Subtract the mean absorbance of the blank from the mean absorbances of all other samples and standards
- 3) Plot the standard concentrations on the x-axis versus the mean value of the absorbance of the standards on the y-axis.
- 4) Calculation of the standard curve should be done by using a computer program, because the curve is in general (without respective transformation) not ideally described by linear regression. A four parametric logistic (4-PL) curve fit should be used for recalculation of IGF-I concentrations.
- 5) The IGF-I concentration of the diluted sample or the diluted control sera KS1&2 in ng/ml (or µg/ml according the chosen unit for the standards) is calculated in this way, the IGF-I concentration of the **undiluted sample** and of KS1 & KS2 is calculated **by multiplication** with the respective dilution factor.

9.2 Example of a typical standard curve

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

	Blank	A	B	C	D	E
ng/mL	0	0.5	2.5	6	12	18
OD (450-620 nm)	0.07	0.114	0.614	1.283	1.690	1.923

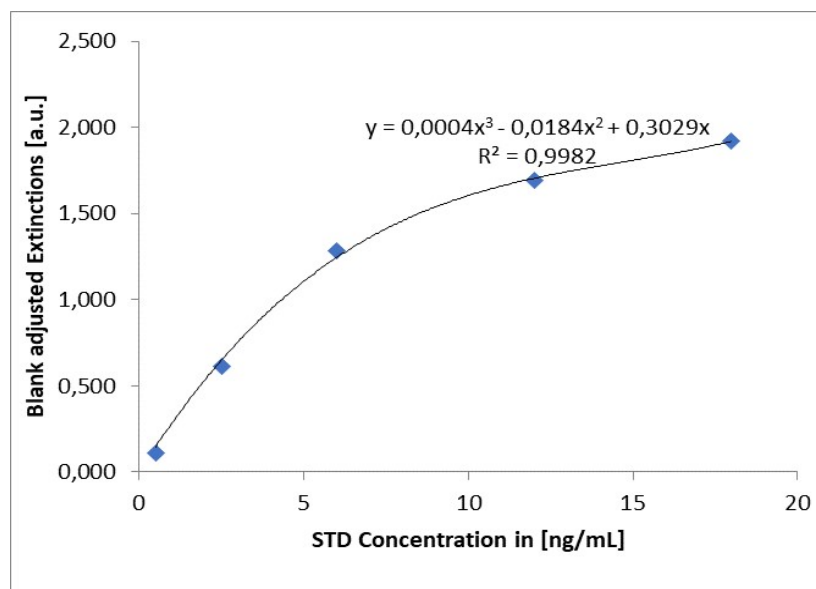


Figure 3 Exemplary standard curve

The exemplary shown standard curve in Figure 3 **cannot** be used for calculation of your test results. You have to establish a standard curve for each test you conduct!

9.3 Exemplary calculation of IGF-I concentrations

Sample dilution: 1:100

Measured extinction of your sample: 1.3525

Measured extinction of the blank 0.07

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

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

$$1.283 = 0.0004x^3 - 0.0184x^2 + 0.3029x \quad 6.107 = x$$

If the dilution factor (1:100) is taken into account the IGF-I concentration of the undiluted sample is

$$6.107 \times 100 = 610.7 \text{ ng/mL}$$

10 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

10.1 Sensitivity

The sensitivity was determined by measuring the blank value and calculating the theoretical concentration of the blank value +2 SA. The analytical sensitivity of the DEE025 is as an average \emptyset 0.315 ng/mL (range 0,262-0,405).

10.2 Precision

Intra-Assay Variance

Several samples were measured 16 in the same assay. Exemplary results are shown in Table 1. On average, the variation coefficient was \emptyset <10%.

Table 1 The Intra-assay variability. The IGF-I concentrations were determined in a duplicate assay and variability was calculated as the coefficient of variation (CV).

	Number of Determinations	Mean Value (µg/L)	Standard Deviation (µg/L)	VC (%)
Sample 1	16	246	13.09	5.32
Sample 2	16	684	52.27	7.64
Sample 3	16	679	93.61	13.79

Inter-Assay-Variability

Serum samples were measured in independent assays. On average, the coefficient of variation was \emptyset <10%. Exemplary results are detailed in Table 2.

Table 2 Inter-Assay Variability IGF-I concentrations were determined in duplicate in independent assays and variability was calculated as the coefficient of variation (CV).

	Number of Determinations	Mean Value (µg/L)	Standard Deviation (µg/L)	VC (%)
Sample 1	24	291	20	7
Sample 2	26	695	51	7
Sample 3	23	773	76	10
Sample 4	23	256	15	6
Sample 5	26	151	21	14
Sample 6	26	444	37	8
Sample 7	26	127	12	9
Sample 8	26	686	59	9
Sample 9	26	581	50	9
Sample 10	26	178	12	7

10.3 The Comparison of Methodes

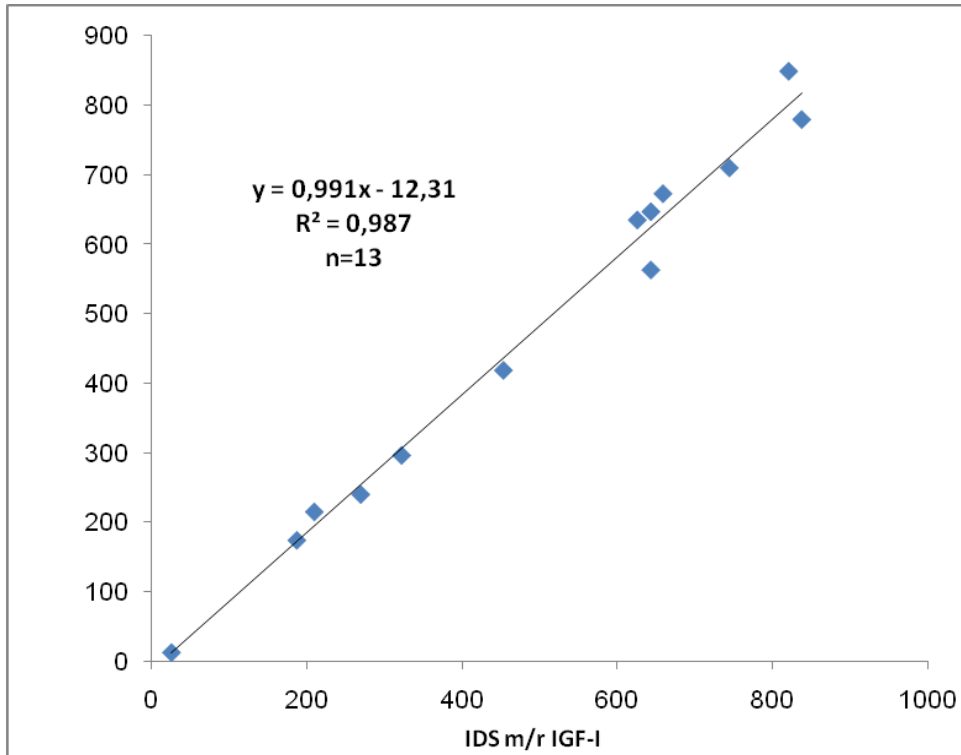


Figure 4 Method comparison of the Demeditec DEE025 m/r IGF-I ELISA and the IDS m/r IGF-I ELISA.

10.4 Linearity

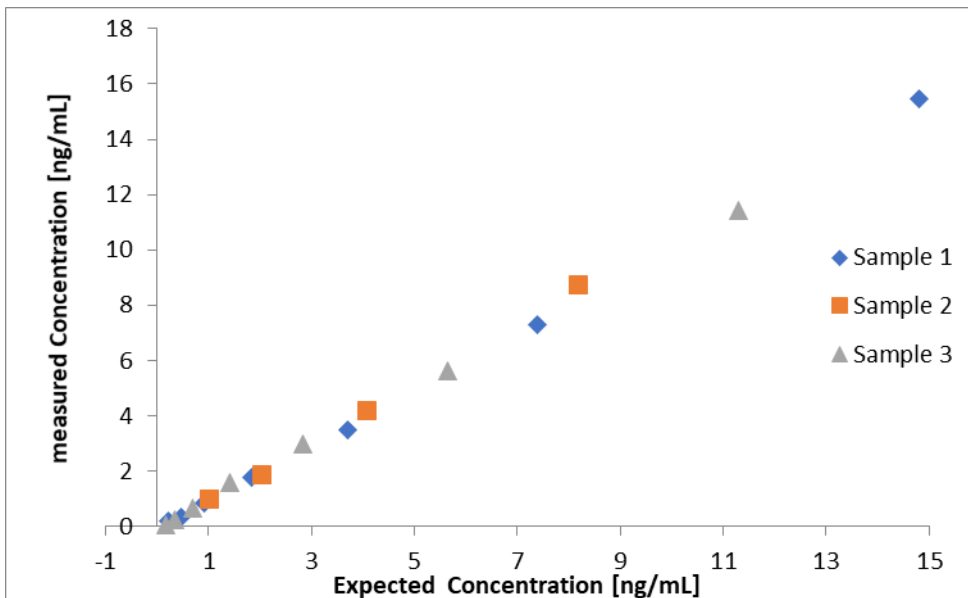












Figure 5 Linearity. Comparison of the theoretically expected and the measured IGF-I concentration in the respective dilutions. From a 1:10 dilution to a concentration of 0.5 ng/mL, the linearity of the sample dilution is given

11 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. *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) Wilson EM, Oh Y, Rosenfeld RG (1997) Generation and characterization of an IGFBP-7 antibody: Identification of 31 kD IGFBP-7 in human biological fluids and Hs578T human breast cancer conditioned media. J Clin Endocrinol Metab Vol 82, 4:1301-1303
- 23) 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. Horm Res 54:60-68
- 24) 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. Horm Res 55:155-124

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore