

ENDOSTATIN MOUSE/RAT

(EN) ELISA FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF MOUSE/RAT
ENDOSTATIN IN SERUM AND PLASMA
Cat. No. BI-20742MR . 12 x 8 TESTS

(DE) ELISA ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON MAUS/RATTE
ENDOSTATIN IN SERUM UND PLASMA
Kat. Nr. BI-20742MR . 12 x 8 TESTE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES

rev.no. 190111 (replacing 170424)

This kit was developed and manufactured by:
Biomedica Medizinprodukte GmbH, A-1210 Wien, Divischgasse 4
Tel. +43/1/291 07 45, Fax +43/1/291 07 6389, E-mail info@bmgrp.com



CONTENT / INHALT

ENGLISH	Page 3
DEUTSCH	Seite 9

Detailed information on the Endostatin mouse/rat ELISA, e.g. assay validation data, sample matrix comparisons, and stability data is available on our website.

www.bmgrp.com

1) INTRODUCTION

Endostatin, a 20-kDa C-terminal proteolytic fragment of collagen XVIII, is an endogenous angiogenesis inhibitor localized in the vascular basement membrane in various organs (<http://www.uniprot.org/uniprot/P39060>). The biological functions of the endostatin-network involve SPARC, thrombospondin-1, glycosaminoglycans, collagens, and integrins.

In animal studies, renal Endostatin expression preceded deteriorating kidney function and induced renal fibrosis in aging mice. In humans, Endostatin is expressed during the progression of renal fibrosis in tubular cells of injured tissue. In renal micro-vascular disease, observed in late stages of patients with chronic kidney disease, increased endostatin levels are possibly the consequence of enhanced extracellular matrix degradation. Thus endostatin may become an important marker for progressive microvascular renal disease in patients with chronic kidney disease. Endostatin levels in blood are also likely to increase in patients with other microvascular tissue injuries, including atherosclerosis, myocardial- and brain ischemia. In ischemic stroke patients, high endostatin plasma levels predict a worse long-term clinical outcome. In a cohort of critically ill patients, plasma endostatin improved AKI prediction based on clinical risk factors. Endostatin has evolved as a molecular target and is currently under investigation in clinical trials.

Areas of interest:

- Micro-vascular injury
- Atherosclerosis
- Sepsis
- Chronic kidney disease
- Ischemia
- Preeclampsia

2) CONTENTS OF THE KIT

CONTENTS	KIT COMPONENTS	QUANTITY
PLATE	Anti mouse endostatin pre-coated microtiter strips in a strip holder, packed in an aluminium bag with desiccant	12 x 8 tests
WASHBUF	Wash buffer concentrate 20x, natural cap	1 x 50 ml
ASYBUF	Assay buffer, red cap, ready to use	1 x 30 ml
STOCK STD	Stock standard (32 nmol/l), recombinant mouse endostatin, red cap, lyophilized	1 vial
CTRL	Control, yellow cap, lyophilized (exact concentration after reconstitution see label)	1 vial
CONJ	Conjugate, (goat anti-endostatin-HRPO), amber bottle, amber cap, ready to use	1 x 7 ml
SUB	Substrate (TMB solution), amber bottle, blue cap, ready to use	1 x 13 ml
STOP	Stop solution, white cap, ready to use	1 x 7 ml

3) ADDITIONAL MATERIAL IN THE KIT

- 1 self-adhesive plastic film
- Quality control protocol
- Protocol sheet
- Instruction for use

4) MATERIAL AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Precision pipettes calibrated to deliver 5 µl, 10 µl, 50 µl, 150 µl, 250 µl, 500 µl and disposable tips
- Distilled or deionised water
- Plate washer is recommended for washing, alternative multichannel pipette or manifold dispenser
- Refrigerator with 4°C (2-8°C)
- ELISA reader capable of measuring absorbance at 450 nm (with correction wavelength at 630 nm)
- Graph paper or software for calculation of results

5) REAGENTS AND SAMPLE PREPARATION

All reagents as supplied in the kit are stable at 4°C (2-8°C) until expiry date stated on the label of each reagent. Bring all reagents to room temperature before use.

Reconstituted STOCK STD and CTRL are stable at -25°C or lower until expiry date on label. STOCK STD and CTRL can undergo 3 freeze-thaw cycles.

Serum and plasma are suitable for use in this assay. Do not change sample type during studies.

A. Sample preparation:

Collect venous blood samples by using standardized blood collection tubes for serum or plasma. Perform serum and plasma separation by centrifugation according to supplier's instructions of the blood collection devices and measure the acquired serum or plasma samples as soon as possible. For longer storage aliquot and store at -25°C or lower. Samples are stable for 3 freeze-thaw cycles. Thawed samples should be assayed as soon as possible. Lipemic or haemolysed samples may give erroneous results. Samples should be mixed well before assaying. We recommend duplicates for all values.

Samples must be diluted 1+50 with ASYBUF (assay buffer) prior to the assay, e.g. 5 µl sample + 250 µl ASYBUF (or 10 µl sample + 500 µl ASYBUF). *Note: 50 µl pre-diluted sample is required / well.*

B. Preparation of CTRL (control):

Reconstitute the CTRL (control) in 200 µl ASYBUF (assay buffer), leave at room temperature (18-26°C) for 15 min and mix well prior to making dilution. The exact concentration is stated on the label.

CTRL must be diluted 1+50 with ASYBUF prior to the assay, e.g. 5 µl CTRL + 250 µl ASYBUF (or 10 µl CTRL + 500 µl ASYBUF). *Note: 50 µl pre-diluted CTRL is required / well.*

C. Preparation of STOCK STD (stock standard):

Reconstitute the Endostatin STOCK STD (stock standard) in 200 µl ASYBUF (assay buffer). Leave at room temperature (18-26°C) for 15 min and mix well prior to making dilutions.

D. Preparation of the standard curve:

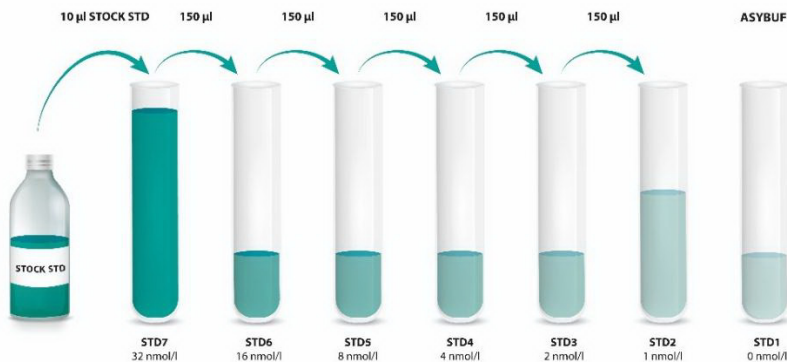
Use polypropylene tubes

- Mark tubes as shown below (Graph1).
- Pipette 500 µl of ASYBUF (assay buffer) into tube marked as STD7.
- Pipette 150 µl of ASYBUF each into tubes marked as STD6 to STD1.
- Pipette 10 µl of the reconstituted STOCK STD into tube marked as STD7. Mix thoroughly.
- Prepare a two-fold serial dilution to obtain STD6 to STD2 (Graph1).
- ASYBUF serves as the zero standard (=STD1, 0 nmol/l).

Note: 50 µl pre-diluted STD is required / well.

Always mix each tube thoroughly before the next step!

Graph1: preparation of the standard curve



Standards diluted for sample measurement

Established standard curve already includes the 1+50 assay pre-dilution, thus the sample results can be read directly from the standard curve (also see chapter calculation of results).

Pre-diluted STDs, CTRLs and samples should be measured as soon as possible (do not store or freeze).

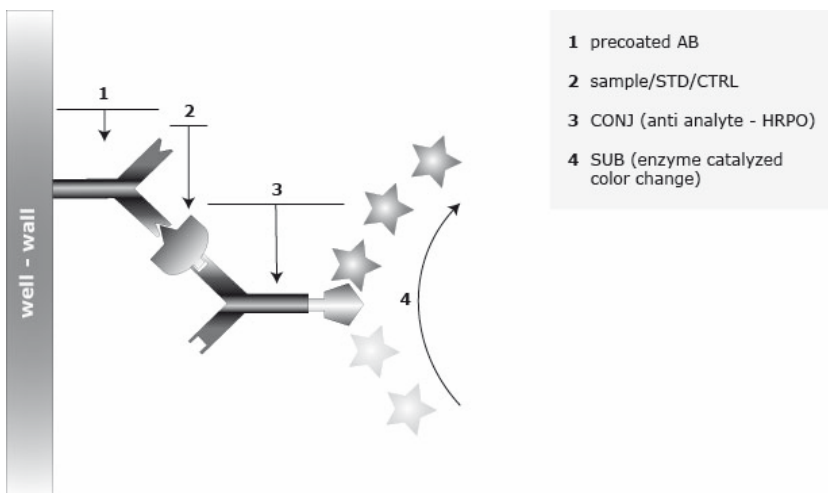
Preparation of WASHBUF (wash buffer):

Dilute the concentrate 1:20 (e.g. 50 ml WASHBUF + 950 ml distilled water). Crystals in the buffer concentrate will dissolve at room temperature (18-26°C). The diluted wash buffer is stable at 4°C (2-8°C) for one month. Use only diluted wash buffer for the assay performance.

For further information on sample stability please visit our website www.bmgrp.com (see Validation Data) or contact our customer service by e-mail info@bmgrp.com or by phone +43/ 1/ 29107-45.

6) PRINCIPLE OF THE ASSAY

This kit is a sandwich enzyme immunoassay for the direct determination of endostatin in mouse/rat serum and plasma samples. In a first step, 1+50 pre-diluted STD/sample/CTRL and conjugate (goat anti-endostatin-HRPO) are pipetted into the wells of the microtiter strips, which are pre-coated with anti mouse endostatin antibody. Endostatin present in the STD/sample/CTRL binds to the pre-coated antibody in the well and forms a sandwich with the detection antibody in the conjugate. In the washing step all non-specific unbound material is removed. In a second step, the substrate (TMB Tetramethylbenzidine) is pipetted into the wells. The enzyme catalysed colour change of the substrate is directly proportional to the amount of endostatin. This colour change is detectable with a standard microtiter plate ELISA reader. A dose response curve of the absorbance (optical density, OD at 450 nm) vs. standard concentration is generated, using the values obtained from the standard. The concentration of mouse/rat endostatin in the sample is determined directly from the dose response curve.



7) ASSAY PROTOCOL

All reagents and samples must be at room temperature (18-26°C) before use in the assay.

Mark position for STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) on the protocol sheet.

Take microtiter strips out of the aluminium bag. Store unused strips with desiccant at 4°C (2-8°C) in the aluminium bag. Strips are stable until expiry date stated on the label.

1. Pipette 50 µl of pre-diluted (1+50) STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) (see reagents and sample preparation) in duplicate into respective well.

2. Add 50 µl CONJ (Conjugate, amber cap) into each well, swirl gently.

3. **Cover tightly and incubate for 2 hours at room temperature (18-26°C).**
4. Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer, natural cap). Remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel after the last wash.
5. Add 100 µl SUB (Substrate, blue cap) into each well, swirl gently.
6. **Incubate for 30 minutes at room temperature (18-26°C) in the dark.**
7. Add 50 µl STOP (Stop solution, white cap) into each well, swirl gently.
8. Measure absorbance immediately at 450 nm (with reference 630 nm, if available).

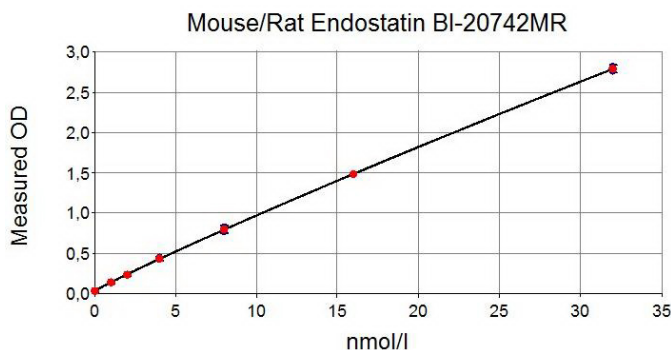
8) CALCULATION OF RESULTS

Read the optical density (OD) of all wells on a plate reader using 450 nm wavelength (correction wavelength 630 nm). Construct the standard curve from the OD values of the STD. Use commercially available software or graph paper. Obtain sample concentration from this standard curve. The assay was evaluated with logit-log and 4PL algorithm curve fitting. Different curve fitting methods need to be evaluated by the user.

Samples, control, and standards are all diluted 1+50 prior to the assay, so there is no need to take this dilution factor into account. Sample results can be read directly from the standard curve.

Note: Sample dilutions above 1+50 have to be considered when calculating the final sample concentration.

Example typical STD-curve:



The quality control (QC) protocol supplied with the kit shows the results of the final release QC for each kit lot. Data for OD obtained by customers may differ due to various influences and/or due to the normal decrease of signal intensity during shelf life. However, this does not affect validity of results as long as an OD of 1.00 or more is obtained for the STD with the highest concentration and the value of the CTRL is in range (target range see labels).

9) ASSAY CHARACTERISTICS

Method:	Sandwich ELISA, HRP/TMB, 12x8-well strips
Sample type:	Mouse or rat serum, plasma
Standard range:	0-32 nmol/l (0 / 1 / 2 / 4 / 8 / 16 / 32)
Conversion factor:	1 ng/ml = 0.049 nmol/l or 1 nmol/l=20.376 ng/ml (MW: 20.4 kDa)
Sample volume:	5 µl / sample
Incubation time:	2 h / 30 min – room temperature
Sensitivity:	LOD (0 nmol/l + 3 SD): 0.24 nmol/l; LLOQ: 0.5 nmol/l
Specificity:	This assay detects recombinant and endogenous mouse and rat Endostatin. Mouse and rat Endostatin share a 95.7% homology.

Precision:	Intra-assay (n=5) ≤ 9%, Inter-assay (n=15) ≤ 10%			
Spike/Recovery (average recovery spiked with 25 nmol/l recombinant mouse Endostatin):	Mouse serum (n=7): 95%	Rat serum (n=4): 97%		
	Mouse plasma (n=5): 91%	Rat plasma: n.a.		
Dilution linearity of recombinant and endogenous Endostatin (average recovery of expected) Endostatin values after a 1+1; 1+3; 1+7 dilution in ASYBUF):	Recovery (%):	Endostatin recombinant / endogenous		
	Dilution:	1+1	1+3	1+7
	Mouse serum (n=6)	108 / 101	117 / 88	114 / *
	Mouse plasma (n=5)	101 / 107	104 / 109	103 / *
	Rat serum (n=7)	99 / 96	n.a. / 89	n.a. / *
	Rat plasma (n=4)	n.a. / 89	n.a. / 80	n.a. / *
Values from various mouse and rat samples:	Mouse sera C57BL6.J0laHsd, 12 weeks (n=11): 6.7 ± 0.8 nmol/l Wildtype normal mice sera, 12 weeks, male (n=10): 5.4 ± 1.2 nmol/l Wildtype normal rat sera, 12 weeks, male (n=8): 2.5 ± 0.4 nmol/l <i>Each laboratory should establish its own reference range for the samples under investigation.</i>			

*not detectable, n.a.: not analysed

For further information on assay characteristics please visit our website www.bmgrp.com (see Validation Data) or contact our customer service by e-mail info@bmgrp.com or by phone +43/ 1/ 29107-45.

10) PRECISION

Intra-assay: 2 samples of known concentration were tested 5 times in 1 kit lot by 1 operator.

Inter-assay: 2 samples of known concentration were tested 15 times in 3 different assays in 3 days by 2 different operators.

Intra-assay (n= 5)	Sample 1	Sample 2	Inter-assay (n= 15)	Sample 1	Sample 2
Mean (nmol/l)	0.98	31.98	Mean (npmol/l)	1.01	31.99
SD (nmol/l)	0.09	0.55	SD (nmol/l)	0.10	0.48
CV (%)	9	2	CV (%)	10	2

Detailed information on the mouse/rat Endostatin ELISA, e.g. assay performance characteristics, matrix comparisons, and stability data is available on our website www.bmgrp.com (see Validation Data).

11) TECHNICAL HINTS

- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- Do not mix stoppers and caps from different reagents or use reagents between lots.
- Do not use reagents beyond expiration date.
- Protect reagents from direct sunlight.
- Substrate solution should remain colourless until added to the plate.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.

12) PRECAUTIONS

All liquid reagents contain ≤ 0.1% Proclin 950 as preservative. Avoid contact with skin and mucous membrane. Proclin 950 is not toxic in concentrations used in this kit. It may cause allergic skin reactions – avoid contact with skin or eyes.

- Do not pipette by mouth.
- Do not eat, drink, smoke, or apply cosmetics where reagents are used.
- Wear gloves, glasses, and lab coat while performing this assay.
- Sulfuric acid is irritating to the eyes and skin. Avoid contact with skin and mucous. Irritations are possible. Flush with water if contact occurs!

13) LITERATUR

1. Endostatin expression in the murine model of ischaemia/reperfusion-induced acute renal failure. *Bellini MH et al., Nephrology 2007; 12(5):459–65.*
2. Endostatin and kidney fibrosis in aging: a case for antagonistic pleiotropy? *Lin CHS et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol 2014; 306:H1692–9.*
3. Plasma endostatin may improve acute kidney injury risk prediction in critically ill patients. *Mårtensson J et al., Ann Intensive Care 2016; 6:6.*
4. Endostatin in chronic kidney disease: Associations with inflammation, vascular abnormalities, cardiovascular events and survival. *Kanbay et al., European Journal of Internal Medicine 2016; 63: 81-87.*
5. The association between endostatin and kidney disease and mortality in patients with type 2 diabetes. *Carlsson AC et al., Diabetes & Metabolism 2016 ; 42(5) 351-357.*
6. Elevated plasma levels of endostatin are associated with chronic kidney disease. *Chen et al., Am J Nephrol 2012; 35(4): 335-340.*
7. Early-onset coronary artery disease after pediatric kidney transplantation: implicating the angiogenesis inhibitor, endostatin. *Igbal CW et al., Am Surg 2011; 77(6): 731-735.*
8. A large screening of angiogenesis biomarkers and their association with neurological outcome after ischemic stroke. *Navarro-Sobrinho M et al., Atherosclerosis 2011; 16(1): 205-211.*

1) EINLEITUNG

Endostatin, ein 20-kDa C-terminales proteolytisches Fragment von Kollagen XVIII, ist ein endogener Angiogenese-Hemmer, welches in der vaskulären Basalmembran in verschiedenen Organen lokalisiert ist (<http://www.uniprot.org/uniprot/P39060>). Die biologische Funktion des Endostatin-Netzwerkes involviert SPARC, Thrombospondin-1, Glycosaminoglycane, Kollagene und Integrine.

In Tierstudien ging die Nieren-Endostatin-Expression einer Verschlechterung der Nierenfunktion voraus und induzierte Nierenfibrose bei alternden Mäusen. Im Menschen wird Endostatin während der Progression bei Nierenfibrose in Tubuluszellen verletzter Gewebe exprimiert. Bei renalen mikrovaskulären Erkrankungen, die bei Patienten in späten Stadien chronischer Nierenerkrankung auftreten, sind erhöhte Endostatin Werte möglicherweise die Folge eines verstärkten Abbaus der extrazellulären Matrix. Demzufolge könnte Endostatin ein wichtiger Marker für die progressive mikrovaskuläre Erkrankung bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen sein. Erhöhte Endostatin Werte im Blut sind demnach auch bei Patienten mit anderen mikrovaskulären Gewebe Verletzungen, einschließlich Arteriosklerose, Herzinfarkt und Gehirnschämie, wahrscheinlich. In Patienten mit ischämischem Schlaganfall sind hohe Endostatin Plasma Werte ein Prädiktor für eine Verschlechterung des klinischen Verlaufs. In einer Kohorte von kritisch kranken Patienten verbesserte Plasma-Endostatin die AKI-Vorhersage auf der Grundlage klinischer Risikofaktoren. Endostatin als Angiogenese Hemmer wird derzeit in klinischen Studien untersucht.

Interessensgebiete:

- Mikrovaskuläre Verletzungen
- Atherosklerose
- Sepsis
- Chronische Nierenerkrankungen
- Ischämie
- Präeklampsie

2) INHALT DES KITS

CONTENTS	KIT KOMPONENTEN	MENGE
PLATE	Anti Endostatin Antikörper beschichtet auf Mikrotiterplattenstreifen im Streifenhalter. Verpackt im Aluminium Beutel mit Trockenmittel.	12 x 8 Tests
WASHBUF	Waschpuffer, 20fach Konzentrat, durchsichtiger Schraubverschluss	1 x 50 ml
ASYBUF	Assay Puffer, roter Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 30 ml
AB	Polyklonaler Kaninchen Anti Endostatin Antikörper, biotinyliert, grün gefärbt, grüner Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 7 ml
STD	STOCK Standard (32 nmol/l), rekombinantes Maus Endostatin, roter Schraubverschluss, lyophilisiert	1 Fläschchen
CTRL	Kontrolle, gelber Schraubverschluss, lyophilisiert (genaue Konzentrationen siehe Etiketten)	1 Fläschchen
CONJ	Konjugat (Ziege-Anti-Endostatin-HRPO), braune Flasche, brauner Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 7 ml
SUB	Substrat (TMB Lösung), braune Flasche, blauer Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 13 ml
STOP	Stopp Lösung, weißer Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 7 ml

3) ZUSÄTZLICHES MATERIAL IM KIT

- 1 selbstklebende Abdeckfolien
- QC Protokoll
- Protokoll Blatt
- Arbeitsanleitung (Beipacktext)

4) ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL UND GERÄTE

- Kalibrierte Präzisionspipetten für 5 µl, 10 µl, 50 µl, 150 µl, 250 µl, 500 µl, inkl. Pipettenspitzen
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Mikrotiterplatten Wascher wird empfohlen, Alternativen: Mehrkanalpipetten oder Dispenser
- Kühlschrank mit 4°C (2-8°C)
- Mikrotiterplattenphotometer mit 450 nm Filter (630 nm Referenz)
- Millimeterpapier oder Software

5) REAGENZIEN UND PROBENVORBEREITUNG

Alle Reagenzien des Kits sind vor Verwendung bei 4°C (2-8°C) bis zum Ablaufdatum (siehe Etikett des Reagenz) haltbar. Bringen Sie alle Reagenzien vor Verwendung im Test auf Raumtemperatur (18-26). Rekonstituierter STOCK STD und CTRL sind bei -25°C oder tiefer bis zum Ablaufdatum haltbar. Rekonstituierter STOCK STD und CTRL sind für 3 Frier/Tau-Zyklen stabil.

Serum und Plasma sind für diesen Assay geeignet. Innerhalb einer Studie sollte der Probentyp nicht geändert werden.

A. Probenvorbereitung:

Abnahme von venösem Blut mittels standardisierter Blutabnahmeröhrchen zur Gewinnung von Serum oder Plasma. Durchführung der Zentrifugation des Blutes laut Herstellerangaben der Probenentnahmebehälter, so schnell wie möglich. Das gewonnene Serum oder Plasma soll so schnell wie möglich gemessen werden. Für Langzeit Lagerung sollen die Proben aliquotiert und bei -25°C oder tiefer gelagert werden. Bis zu 3 Frier/Tau-Zyklen verändern die Messwerte nicht. Aufgetaute Proben so bald wie möglich abarbeiten. Lipämische und hämolytische Proben können falsche Ergebnisse liefern. Proben vor Verwendung gut mischen. Wir empfehlen Doppelbestimmung für alle Werte.

Vor der Durchführung des Assays müssen die Proben 1+50 mit ASYBUF (Assay Puffer) verdünnt werden, z.B. 5 µl Probe + 250 µl ASYBUF (oder 10 µl Probe + 500 µl ASYBUF). *Hinweis: pro Näpfchen werden 50 µl vorverdünnte Probe eingesetzt.*

B. Vorbereitung der CTRL (Kontrolle):

Lösen Sie das Lyophilisat des Fläschchen CTRL (Kontrolle) in 200 µl ASYBUF (Assay Puffer) und lassen Sie es bei Raumtemperatur (18-26°C) für 15 min stehen. Vor der Verdünnung gut mischen. Die genaue Konzentration ist am Etikett vermerkt.

Vor der Durchführung des Assays muss die Kontrolle (CTRL) 1+50 mit ASYBUF (Assay Puffer) verdünnt werden, z.B. 5 µl CTRL + 250 µl ASYBUF (oder 10 µl CTRL + 500 µl ASYBUF). *Hinweis: pro Näpfchen werden 50 µl vorverdünnte CTRL eingesetzt.*

C. Vorbereitung des STOCK STD (Stock Standard):

Lösen Sie das Lyophilisat des Fläschchen STOCK STD (Stock Standard) in 200 µl ASYBUF (Assay Puffer) und lassen Sie es bei Raumtemperatur (18-26°C) für 15 min stehen. Vor den weiteren Verdünnungen gut mischen.

D. Vorbereitung der Standard Kurve:

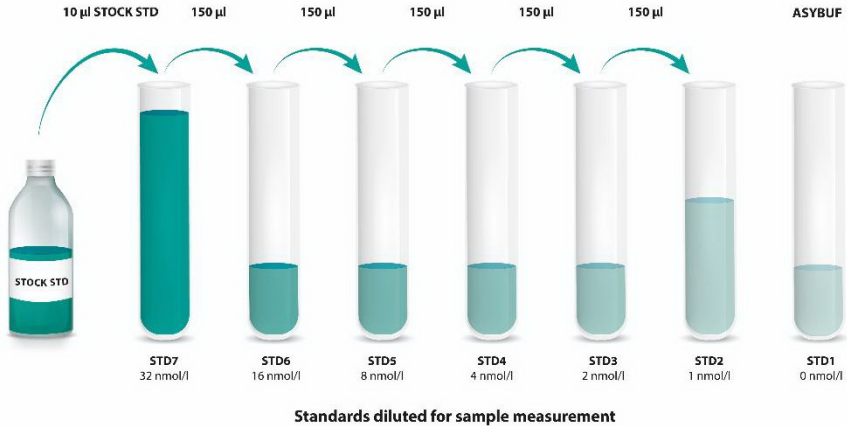
Verwenden Sie Röhrchen aus Polypropylen.

- Röhrchen wie in Graphik 1 beschriften.
- Pipettieren Sie 500 µl ASYBUF (Assay Puffer) in das Röhrchen STD7.
- Pipettieren Sie je 150 µl ASYBUF (Assay Puffer) in die Röhrchen STD6 bis STD1.
- Pipettieren Sie 10 µl des rekonstituierten STOCK STD in das Röhrchen STD7. Gut mischen.
- Für die Herstellung der restlichen Standards STD6 bis STD2 stellen Sie eine Verdünnungsreihe mit einer 2-fach Verdünnung her (s. Graphik 1).
- ASYBUF (Assay Puffer) dient als 0-Standard (=STD1, 0 nmol/l).

Hinweis: pro Näpfchen sind 50 µl vorverdünnter STD erforderlich.

Mischen Sie jedes Röhrchen gründlich vor dem nächsten Verdünnungsschritt!

Graphik 1: Vorbereitung der Standardkurve



Die etablierte Standardkurve umfasst bereits eine 1+50 Assay-Vorverdünnung, so dass die Probenergebnisse direkt abgelesen werden können, siehe auch Kapitel 8) Berechnung der Ergebnisse. Vorverdünnte STDs, CTRL und Proben sollten so schnell wie möglich gemessen werden (nicht lagern oder einfrieren).

Vorbereitung des WASHBUF (Waschpuffer):

Das mitgelieferte Konzentrat 1:20 verdünnen, zB. 50 ml WASHBUF + 950 ml destilliertes Wasser. Kristalle im Pufferkonzentrat lösen sich bei Raumtemperatur (18-26°C) auf. Das Konzentrat ist bei 4°C (2-8°C) bis zum Ablaufdatum haltbar. Der verdünnte Puffer ist bei 4°C (2-8°C) bis zu einem Monat haltbar. Im Testsystem darf nur verdünnter WASHBUF (Waschpuffer) verwendet werden.

Nähere Informationen zur Probenstabilität finden Sie auf unserer Website unter www.bmgrp.com (s. Validation Data) oder kontaktieren Sie unseren Kundenservice per Email an info@bmgrp.com oder telefonisch unter +43/ 1/ 29107-45.

6) TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der Methode eines Sandwich ELISA und dient zur quantitativen Bestimmung von Endostatin in Maus bzw Ratten Serum- oder Plasmaproben. Im ersten Schritt werden STD/Probe/CTRL (alle 1+50 vorverdünnt) und CONJ (Ziege-anti-Endostatin-HRPO) in die entsprechenden Näpfchen, welche mit anti-Maus-Endostatin-Antikörper beschichtet sind, pipettiert. Das in den STD/Probe/CTRL vorhandene Endostatin bildet mit beiden Antikörper einen stabilen Komplex. Durch Waschen werden die unspezifischen und nicht gebundenen Anteile entfernt. Im zweiten Schritt wird mit Substrat (TMB Tetramethylbenzidine) inkubiert. Die dadurch enzymatisch bedingte Farbentwicklung ist direkt proportional mit der Endostatin Konzentration in den Proben und kann mittels eines Mikrotiterplatten ELISA Reader bei 450 nm gemessen werden. Aus dem jeweiligen Farbsignal und den Konzentrationen der STD wird eine Kalibrationskurve erstellt, von der die Endostatin Konzentration der Proben direkt ablesbar ist.

Schema siehe Kapitel 6) *PRINCIPLE OF THE ASSAY* im englischen Teil des Beipacktextes.

7) TESTPROTOKOLL

- | |
|--|
| Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen. |
| Markieren Sie die Positionen für STD/PROBE/CTRL (Standard/Probe/Kontrolle) am Protokoll Blatt. |
| Nehmen Sie die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Aluminium Beutel. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können mit Trockenmittel im Aluminium Beutel auf 4°C (2-8°C) bis zum angegebenen Ablaufdatum gelagert werden. |

1) Pipettieren Sie 50 µl der bereits 1+50 vorverdünnten STD /PROBE/CTRL(Standard/Probe/Kontrolle) (s. Reagenzien und Probenvorbereitung) in Doppelbestimmung in die Näpfchen (Wells) der Mikrotiterstreifen.
2) Pipettieren Sie 50 µl CONJ (Konjugat, brauner Schraubverschluss) in alle Wells, gut mischen.
3) Streifen abdecken und 2 Stunden bei Raumtemperatur (18-26°C) inkubieren.
4) Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5) Pipettieren Sie 100 µl SUB (Substrat, blauer Schraubverschluss) in alle Wells, gut mischen.
6) 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren.
7) Pipettieren Sie 50 µl STOP (Stopplösung, weißer Schraubverschluss) in alle Wells, gut mischen.
8) Extinktion unmittelbar bei 450 nm messen, mit 630 nm als Referenz, falls möglich.

8) BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Messen Sie die optische Dichte (OD) von allen Wells mit einem Mikrotiterplattenphotometer mit einem 450 nm Filter (Referenz 630 nm). Konstruieren Sie eine Standardkurve aus den OD Werten der STD unter Verwendung von kommerziell erhältlichem Millimeterpapier oder einer geeigneten Software. Das Testsystem wurde mittels Logit-Log sowie einem 4 Parameter Algorithmus evaluiert. Andere Auswerte Algorithmen müssen vom Verwender evaluiert werden.

Vor der Messung wurden Proben, Kontrollen und Standards 1+50 verdünnt. Der Verdünnungsfaktor muss daher nicht berücksichtigt werden. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Hinweis: Probenverdünnungen über 1+50 müssen bei der Berechnung der finalen Probenkonzentration berücksichtigt werden.

Typische STD-Kurve:

Siehe Kapitel 8) CALCULATION OF RESULTS im englischen Teil des Beipacktextes.

In dem beige packten QC Protokoll sind die Resultate der QC Freigabe der entsprechenden Kit Lot vermerkt. Vom Verwender erhaltene Daten der OD können abweichend sein, bedingt durch verschiedene Einflüsse und/oder dem normalen Signalverlust des Kits während der Laufzeit. Dieser mögliche Signalverlust hat keinen Einfluss auf die Gültigkeit der Resultate, so lange die OD von STD7 den Wert 1,00 oder höher erreicht und der Wert der CTRL im gültigen Bereich ist (Bereich siehe Etikett).

9) TESTMERKMALE

Methode:	Sandwich ELISA, HRP/TMB, 12x8-well Streifen
Probentyp:	Maus bzw Ratte Serum oder Plasma
Standardbereich:	0-32 nmol/l (0 / 1 / 2 / 4 / 8 / 16 / 32)
Umrechnungsfaktor pg/ml zu pmol/l:	1 ng/ml = 0,049 nmol/l oder 1 nmol/l=20,376 ng/ml (MW: 20,4 kDa)
Probenvolumen:	5 µl / Probe
Inkubationszeiten:	2 h / 30 min – Raumtemperatur
Sensitivität:	LOD (0 nmol/l + 3 SD): 0,24 nmol/l; LLOQ: 0,5 nmol/l
Spezifität:	Dieser Assay erkennt rekombinantes und endogenes Maus und Ratten Endostatin. Die Homologie zwischen Maus und Ratten Endostatin beträgt 95,7%.
Präzision:	Intra-assay (n=5) ≤ 9%, Inter-assay (n=15) ≤ 10%

Wiederfindung (durchschnittliche Wiederfindung nach spike mit 25 nmol/l rekombinantes Maus Endostatin:	Maus Serum (n=7): 95%	Ratten Serum (n=4): 97%		
	Maus Plasma (n=5): 91%	Ratten Plasma: n.a.		
Verdünnungslinearität von rekombinanten und endogenem Endostatin (durchschnittliche Werte nach Verdünnung 1+1, 1+3, 1+7 mit ASYBUF):	Wiederfindung (%):	Endostatin rekombinant / endogen		
	Verdünnung:	1+1	1+3	1+7
	Maus Serum (n=6)	108 / 101	117 / 88	114 / *
	Maus Plasma (n=6)	101 / 107	104 / 109	103 / *
	Ratten Serum (n=7)	99 / 96	n.a. / 89	n.a. / *
	Ratten Plasma (n=4)	n.a. / 89	n.a. / 80	n.a. / *
Messwerte verschiedener Mäuse und Ratten Proben:	Mäuse Seren C57BL6JOLA ^{Hsd} , 12 Wo (n=11): 6,7 ± 0,8 nmol/l Wildtyp normale Mäuse Seren, 12 Wo, männlich (n=10): 5,4 ± 1,2 nmol/l Wildtyp normale Ratten Seren, 12 Wo, männlich (n=8): 2,5 ± 0,4 nmol/l <i>Jedes Labor sollte eigene Referenzwerte etablieren.</i>			

* nicht detektierbar, n.a.: nicht analysiert

Nähere Informationen zu den Testmerkmalen finden Sie auf unserer Website unter www.bmgrp.com (s. Validation Data) oder kontaktieren Sie unseren Kundenservice per Email an info@bmgrp.com oder telefonisch unter +43/ 1/ 29107-45.

10) PRÄZISION

Intra-assay: 2 Proben bekannter Konzentration wurden 5mal in 1 Test von 1 Operator getestet.

Inter-assay: 2 Proben bekannter Konzentration wurden 15mal in 3 Tests an 3 Tagen von 2 verschiedenen Operatoren getestet.

Intra-assay (n=5)	Probe 1	Probe 2
Durchschnitt (nmol/l)	0.98	31.98
SD (nmol/l)	0.09	0.55
VK (%)	9	2

Inter-assay (n=15)	Probe 1	Probe 2
Durchschnitt (nmol/l)	1.01	31.99
SD (nmol/l)	0.10	0.48
VK (%)	10	2

Detaillierte Informationen zum Maus/Ratten Endostatin ELISA, z.B. Testmarkmale, Matrix Vergleiche und Stabilitätsdaten, finden Sie auf unserer Homepage www.bmgrp.com (s. Validation Data).

11) TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien von verschiedenen Lots oder Tests dürfen nicht gemischt werden.
- Stöpsel und Verschlüsse von verschiedenen Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Abgelaufene Reagenzien dürfen nicht verwendet werden.
- Reagenzien sind vor direktem Sonnenlicht zu schützen.
- Substratlösung muss vor Verwendung farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen bei den Inkubationen mit Abdeckfolie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.

12) VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle flüssigen Reagenzien enthalten 0,01% Proclin 300 als Konservierungsmittel. Vermeiden Sie Kontakt mit Augen, Haut und Schleimhaut. Proclin 300 ist in der verwendeten Konzentration nicht toxisch. Allergische Reaktionen sind möglich.

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Nicht Rauchen, Essen, Trinken oder Kosmetika benutzen während der Verwendung der Testreagenzien.
- Verwenden Sie Handschuhe, Schutzbrillen und Laborkleidung während der Testdurchführung.
- Schwefelsäure reizt Augen und Haut. Bei Berührung gründlich mit Wasser spülen.

13) LITERATUR

Siehe Kapitel 13) *LITERATURE* im englischen Teil des Beipacktextes.

SYMBOLS



Expiry date / Verfallsdatum / Date de péremption / Data di scadenza / Fecha de caducidad /
Data de validade / Uiterste gebruiksdatum / Utløbsdato / Utgångsdatum / Termin Wažności /
Lejárati idő / Doba expirácie / Doba expirace



Consider instructions for use / Bitte Gebrauchsanweisung beachten / Consultez la notice
d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las instrucciones de utilización /
Consulte as instruções de utilização / Raadpleeg de gebruiksaanwijzing / Se
brugsanvisningen / Läs anvisningarna före användning / Proszę przeczytać instrukcję
wykonania / Vegyük figyelembe a használati utasításban foglaltakat / Postupujte podľa
pokynov na použitie / Postupujte dle návodu k použití



Lot-Batch Number / Charge-Chargennummer / Lot-Code du lot / Lotto-Numero di lotto / Lote-
Código de lote / Lote-Código do lote / Lot-Partijnummer / Lot-Batchkode / Lot-Satskod /
Numer serii / Lot-Batch szám / Číslo šarže / Číslo šarže



Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado
por / Vervaardigd door / Fabrikation af / Tillverkad av / Wyprodukowane pr / Gyártotta /
Vyrobéné / Vyrobeno



Catalogue Number / Bestellnummer / Numéro de référence / Numero di riferimento / Número
de referencia / Número de referência / Referentienummer / Referencenummer /
Katalognummer / Numer katalogowy / Katalógusszám / Katalógové číslo / Katalógové číslo



Store at between / Lagerung bei zwischen / Conserver à entre / Conservare a tra / Conservar
a temp. entre / Armazene a entre / Bewaar bij tussen / Opbevares mellem / Förvaras vid /
Przechowywać w / Tároljuk között / Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí



Contains sufficient for x tests / Inhalt ausreichend für x Tests / Contient suffisant pour x tests /
Contenuto sufficiente per x test / Contiene suficiente para x pruebas / Contém suficiente para
x testes / Bevat voldoende voor x bepalingen / Indeholder tilstrækkeligt til x prøver / Innehållet
räcker till x analyser / Zawartość na x testów / Tartalma X teszt elvégzésére elegendő /
Obsahuje materiál pre x testov / Obsahuje materiál pro x testů

BI-20742MR ENDOSTATIN MOUSE/RAT

PREPARATION OF REAGENTS:

- Bring all reagents to room temperature (18-26°C).
- Prepare reagents and samples as instructed.
- Bring unused and prepared components to the storage temperature mentioned in the package insert.
- Take microtiter strips out of the aluminium bag and mark positions on the protocol sheet.

TEST PROCEDURE:

- Step 1) Pipette 50 µl of pre-diluted (1+50) STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) (see reagents and sample preparation) in duplicate into respective well.
- Step 2) Add 50 µl CONJ (Conjugate, amber cap) into each well, swirl gently.
- Step 3) Cover tightly and incubate for 2 hours at room temperature (18-26°C).**
- Step 4) Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer, natural cap). Remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel after the last wash.
- Step 5) Add 100 µl SUB (Substrate, blue cap) into each well, swirl gently.
- Step 6) Incubate for 30 minutes at room temperature (18-26°C) in the dark**
- Step 7) Add 50 µl STOP (Stop solution, white cap) into each well, swirl gently.
- Step 8) Measure absorbance immediately at 450 nm with reference 630 nm, if available.