

VANIN-1 MOUSE/RAT

(EN) ELISA FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF MOUSE OR RAT
VANIN-1 IN SERUM, PLASMA OR URINE

Cat. No. BI-VAN1MR . 12 x 8 TESTS

(DE) ELISA ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON MAUS ODER RATTEN
VANIN-1 IN SERUM, PLASMA ODER URIN

Cat. No. BI-VAN1MR . 12 x 8 TESTE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES

rev.no. 191009

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@bmgpp.com



CONTENT / INHALT

ENGLISH	Page 3
DEUTSCH	Seite 9

www.bmgrp.com

1) INTRODUCTION

Vanin- (VAN1) is a GPI-anchored glycoprotein of 513 amino acids consisting of a base domain and an enzymatic nitrilase domain (Boersma et al., 2014). The ectoenzyme catalyzes the hydrolysis of pantetheine to pantothenic acid (vitamin B5) and cyteamine and thus, is involved in the regulation of oxidative stress and inflammation (Maras et al., 1999). Vanin-1 has a broad tissue expression with the highest levels being observed in kidney tubular epithelial cells (Pitari et al., 2000). The GPI anchor of Vanin-1 can be cleaved by a yet unknown mechanism, resulting in Vanin-1 being shed into the extracellular space.

Function: Vanin-1 is an epithelial ectoenzyme activating the conversion of pantetheine into pantothenic acid (vitamin B5) and cysteamine (Pitari et al., 2000). It has been suggested that the release of cysteamine by Vanin-1 promotes oxidative tissue damage and inflammation by inhibiting the activity of antioxidants like superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) (Hosohata et al., 2011; Saghaei et al., 2012). Indeed, Vanin-1 knockout mice have elevated stores of GSH and are more resistant to oxidative injury induced by whole-body gamma irradiation (Berruyer et al., 2004). On the other hand, several reports indicate that Vanin-1 might also act as tissue sensor for oxidative stress. In mice, antioxidant response-like elements could be identified in the promotor region of Vanin-1, which enhance the expression of Vanin-1 in the presence of oxidative stress (Berruyer et al., 2004). Similarly, Vanin-1 expression was shown to be upregulated in a human proximal tubular cell line after exposure to organic solvents (Hosohata et al., 2011). After renal ischemia-reperfusion in rats, a model involving oxidative tissue damage, renal Vanin-1 expression was also found to be upregulated (Yoshida et al., 2002). The highest levels of Vanin-1 expression could be assigned to renal tubular epithelial cells, while no expression is detectable in glomeruli (Hosohata et al., 2011; Pitari et al., 2000). Hence, Vanin-1 released from renal cells could be detectable in urine. In a study aimed to identify biomarkers for renal tubular injury, Hosohata and colleagues could indeed show in a rat model of nephrotoxicant-induced injury that Vanin-1 is upregulated in renal tubules earlier than other markers and shed into urine (Hosohata et al., 2011). Subsequent studies further verified the validity of Vanin-1 as an early biomarker of renal tubular damage in drug-induced acute kidney injury (Hosohata et al., 2012, 2016a), obstructive nephropathy (Washino et al., 2019) and hydronephrosis (Hosohata et al., 2018), diabetic nephropathy (Fugmann et al., 2011), renal injury in experimental colitis (Hosohata et al., 2014) and spontaneously hypertensive rats under high salt intake (Hosohata et al., 2016b; Washino et al., 2018). Of note, Vanin-1 seems to have superior predictive value for acute kidney injury than established markers KIM-1, NGAL, or NAG (Fugmann et al., 2011; Hosohata, 2016; Hosohata et al., 2011).

Areas of interest:

- Acute kidney injury (Hosohata et al., 2016a)
- Diabetic nephropathy (Fugmann et al., 2011)
- Drug-induced acute kidney injury (Hosohata et al., 2016a)
- Hydronephrosis (Hosohata et al., 2018), obstructive nephropathy (Washino et al., 2019)

2) CONTENTS OF THE KIT

CONT	KIT COMPONENTS	QUANTITY
PLATE	Detachable microtiter strips pre-coated with anti-mouse Vanin-1 antibody	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 7 ml
STOCK STD	Stock standard containing 200 pmol/l of recombinant mouse Vanin-1, red cap, lyophilised	1 vial
CTRL	Control, yellow cap, lyophilised (exact concentration after reconstitution see label)	1 vial
CONJ	Polyclonal sheep anti-mouse Vanin-1 antibody-HRPO, amber cap, ready to use	1 x 6ml
SUB	Substrate (TMB solution), 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

- 2 self-adhesive plastic films
- Quality control protocol
- Protocol sheet
- Instruction for use

4) MATERIAL AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Precision pipettes calibrated to deliver 5 µl, 50 µl, 100 µl, and 1000 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 at least four freeze-thaw cycles.

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

Lipemic or haemolysed samples may give erroneous results. We recommend duplicate measurements for all samples, standards and controls.

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 or aliquot and store at -25°C or lower. Collect urine of the day, voided directly into a sterile container. Assay immediately or aliquot and store at -25°C or lower.

Before use in the assay bring samples to room temperature and mix samples gently to ensure the samples are homogenous. Samples with values above STD7 (200 pmol/l) can be diluted with ASYBUF (assay buffer).

Mouse samples

Mouse samples must be diluted 1+7 with assay buffer (ASYBUF), eg. 5 µl sample + 35 µl ASYBUF.

Diluted samples are stable at 4°C (2-8°C) overnight. Thus dilutions can be prepared one day before analysis.

Rat samples

Rat samples are used undiluted.

B. Preparation of CTRL (control):

Reconstitute the CTRL (control) in 200 µl distilled or deionised water . Leave at room temperature (18-26°C) for 10 min and vortex gently prior to use. The exact concentration is stated on the label.

C. Preparation of STOCK STD (stock standard):

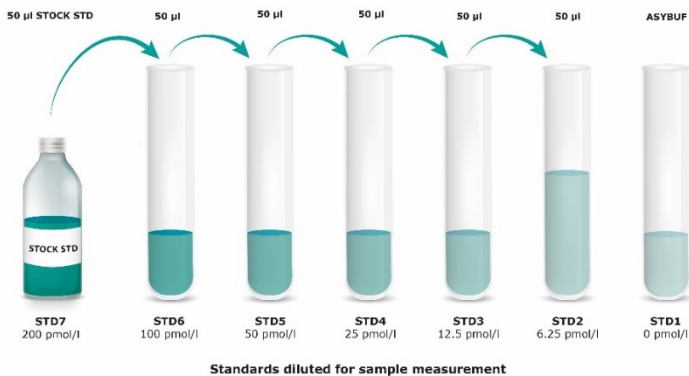
Reconstitute the mouse/rat Vanin-1 STOCK STD (stock standard) in 200 µl distilled water. Leave at room temperature (18-26°C) for 10 min and vortex gently prior to use.

D. Preparation of the standard curve:

- | |
|--|
| 1) Use polypropylene tubes and mark them as STD6 to STD1 (see Graph 1). |
| 2) Mark STOCK STD as STD7. |
| 3) Pipette 50 µl of ASYBUF (assay buffer) into each tube marked as STD6 to STD1. |
| 4) Prepare a two-fold serial dilution to obtain STD6 to STD2: Pipette 50 µl of the reconstituted STOCK STD = STD7 into the tube labelled STD6. Mix thoroughly. Continue serial dilutions for STD5, STD4, STD3, STD2. |
| 5) ASYBUF serves as the zero standard (=STD1, 0 pmol/l). |

Note: Always mix each tube thoroughly before the next step!

Graph 1: Preparation of STD7 to STD1

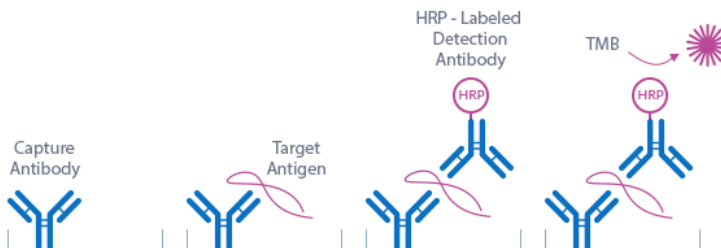


Preparation of WASHBUF (wash buffer):

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 undiluted WASHBUF is stable at 4°C (2-8°C) until expiry date stated on label. The diluted WASHBUF is stable up to one month at 4°C (2-8°C). Only use diluted WASHBUF when performing the assay.

6) PRINCIPLE OF THE ASSAY

The Vanin-1 mouse/rat ELISA kit is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative determination of mouse/rat Vanin-1 in serum, plasma or urine samples.



In a first step, assay buffer is pipetted into the wells of the microtiter strips. Thereafter, standard/control/sample and detection antibody (polyclonal sheep anti-mouse Vanin-1-HRPO) are pipetted into the wells, which are pre-coated with anti-mouse Vanin-1 antibody. Vanin-1 present in the standard/control/sample binds to the pre-coated antibody in the well and forms a sandwich with the detection antibody. In the washing step, all non-specific unbound material is removed. In a next step, the substrate (TMB, tetramethylbenzidine) is pipetted into the wells. The enzyme-catalyzed color change of the substrate is directly proportional to the amount of Vanin-1 present in the sample. This color change is detectable with a standard microplate reader. A dose response curve of the absorbance (optical density, OD at 450 nm) versus standard concentration is generated using the values obtained from the standards. The concentration of Vanin-1 in the sample is determined directly from the dose response curve

The kit utilizes recombinant mouse Vanin-1 as a calibrator. The VNN1 gene is conserved in chimpanzee, rhesus monkey, dog, cow, mouse, rat, and chicken <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/32130>.

7) ASSAY PROTOCOL

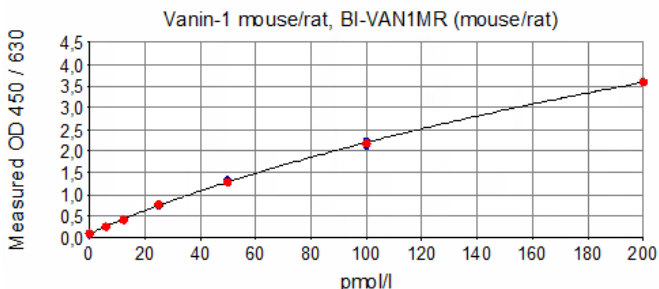
All reagents and samples must be at room temperature (18-26°C) before use in the assay.
Mark position for STD/CTRL/SAMPLE (Standard/Control/Sample) on the protocol sheet.
Take microtiter strips out of the aluminium bag. Store unused strips with desiccant at 4°C (2-8°C) in the aluminium bag. Strips are stable until expiry date stated on the label.
1) Pipette 50 µl ASYBUF (assay buffer, red cap) into each well.
2) Pipette 5 µl STD/CTRL/SAMPLE (standard/control/sample) into respective wells. Use mouse samples 1+7 pre-diluted. Use rat samples undiluted.
3) Add 50 µl CONJ (conjugate, amber cap) into each well. Swirl gently.
4) Cover tightly and incubate for 4 hours at room temperature (18-26°C), in the dark.
5) 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.
6) Add 100 µl SUB (substrate, blue cap) into each well. Swirl gently.
7) Cover tightly and incubate for 30 min at room temperature (18-26°C) in the dark.
8) Add 50 µl STOP (stop solution, white cap) into each well. Swirl gently.
9) 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 (reference wavelength 630 nm). Construct a standard curve from the absorbance read-outs of the standards using commercially available software capable of generating a four-parameter logistic (4-PL) fit. Alternatively, plot the standards' concentration on the x-axis against the mean absorbance for each standard on the y-axis and draw a best fit curve through the points on the graph. Curve fitting algorithms other than 4-PL have not been validated and will need to be evaluated by the user.

Obtain sample concentrations from the standard curve. If required, pmol/l can be converted into pg/ml by applying a conversion factor (1 pg/ml = 19.2 pmol/l; Vanin-1 mouse/rat MW: 52.07 kDa). Respective dilution factors have to be considered when calculating the final concentration of the sample.

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 label).

9) ASSAY CHARACTERISTICS

Method	Sandwich ELISA, HRP/TMB, 12x8-well detachable strips			
Sample type(s)	Serum, plasma and urine			
Sample volume	5 µl / well			
Assay time	4 hours / 30 mins			
Standard range	0 – 200 pmol/l (0 – 10.6 ng/ml)			
Conversion factor	1 ng/ml = 19.2 pmol/l (MW: 52.07 kDa)			
Sensitivity	LOD: 2.31 pmol/l; LLOQ: 6.25 pmol/l			
Precision		n	Average % CV	
	Within-run	6	≤8	
	In-between-run	5	≤8	
Accuracy (Spike/recovery of rec. Vanin-1)		n	Average % recovery	
	Mouse	7	93	
	Rat	4	94	
Dilution linearity of endogenous Vanin-1		n	Average % of expected dilution	
			1+1	1+3
	Mouse	4	97	84
	Rat	3	92	-
Specificity	Endogenous and recombinant mouse/rat Vanin-1 .			
Use	Research use only			
Vanin-1 reference values		n	Median Vanin-1 c[pmol/l]	
	Mouse serum	5	22	
	Mouse plasma	5	24	
	Mouse urine	6	21	
	Rat serum	7	7	
	Rat plasma	8	7	

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

10) PRECISION

Within-run / intra-assay precision was assessed by measuring 2 samples of known concentrations 6 times within 1 Vanin-1 Mouse/Rat ELISA kit lot by 1 operator.

In-between-run /intra-assay precision was assessed by measuring 2 samples 5 times within 2 Vanin-1 Mouse/Rat ELISA kit lots by 2 different operators.

Intra-assay (n= 6)	Sample 1	Sample 2
Mean (pmol/l)	8	20
SD (pmol/l)	0.6	1.6
CV (%)	8	8

Inter-assay (n= 5)	Sample 1	Sample 2
Mean (pmol/l)	63	41
SD (pmol/l)	4.0	3.1
CV (%)	6	8

Detailed information on the Vanin-1 Mouse/Rat ELISA, e.g. assay performance characteristics, matrix comparisons, and stability data is available on our website www.bmgrp.com.

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 $\leq 0.1\%$ 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) LITERATURE

1. Boersma YL et al. „The Structure of Vanin 1: A Key Enzyme Linking Metabolic Disease and Inflammation“. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 70, Nr. Pt 12 (December 2014): 3320–29. <https://doi.org/10.1107/S1399004714022767>
2. Maras B et al. „Is pantetheinase the actual identity of mouse and human vanin-1 proteins?“ *FEBS Letters* 461, Nr. 3 (November 1999): 149–52. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01439-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01439-8)
3. Pitari G et al. „Pantetheinase activity of membrane-bound Vanin-1: lack of free cysteamine in tissues of Vanin-1 deficient mice“. *FEBS Letters* 483, Nr. 2 (October 2000): 149–54. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02110-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02110-4)
4. Hosohata K et al. „Vanin-1: A Potential Biomarker for Nephrotoxicant-Induced Renal Injury“. *Toxicology* 290, Nr. 1 (November 2011): 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.08.019>
5. Saghaei F et al. „Effects of Captopril on the Cysteamine-Induced Duodenal Ulcer in the Rat“. *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie* 64, Nr. 4 (May 2012): 373–77. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.10.001>
6. Berruyer C et al. „Vanin-1/- Mice Exhibit a Glutathione-Mediated Tissue Resistance to Oxidative Stress“. *Molecular and Cellular Biology* 24, Nr. 16 (August 2004): 7214–24. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.16.7214-7224.2004>
7. Yoshida T et al. „Monitoring Changes in Gene Expression in Renal Ischemia-Reperfusion in the Rat“. *Kidney International* 61, Nr. 5 (May 2002): 1646–54. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00341.x>
8. Hosohata K et al. „Urinary Vanin-1 As a Novel Biomarker for Early Detection of Drug-Induced Acute Kidney Injury“. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 341, Nr. 3 (June 2012): 656–62. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.192807>
9. Hosohata K et al. „Early Urinary Biomarkers for Renal Tubular Damage in Spontaneously Hypertensive Rats on a High Salt Intake“. *Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension* 39, Nr. 1 (January 2016 a): 19–26. <https://doi.org/10.1038/hr.2015.103>
10. Washino S et al. „A Novel Biomarker for Acute Kidney Injury, Vanin-1, for Obstructive Nephropathy: A Prospective Cohort Pilot Study“. *International Journal of Molecular Sciences* 20, Nr. 4 (February 2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20040899>
11. Hosohata K et al. „Vanin-1 in Renal Pelvic Urine Reflects Kidney Injury in a Rat Model of Hydronephrosis“. *International Journal of Molecular Sciences* 19, Nr. 10 (October 2018). <https://doi.org/10.3390/ijms19103186>
12. Fugmann T et al. „Proteomic Identification of Vanin-1 as a Marker of Kidney Damage in a Rat Model of Type 1 Diabetic Nephropathy“. *Kidney International* 80, Nr. 3 (August 2011): 272–81. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.116>

13. Hosohata K et al. „Early Detection of Renal Injury Using Urinary Vanin-1 in Rats with Experimental Colitis“. *Journal of Applied Toxicology: JAT* 34, Nr. 2 (February 2014): 184–90. <https://doi.org/10.1002/jat.2849>
14. Hosohata K „Role of Oxidative Stress in Drug-Induced Kidney Injury“. *International Journal of Molecular Sciences* 17, Nr. 11 (November 2016 b). <https://doi.org/10.3390/ijms17111826>
15. Washino S et al. „Early Urinary Biomarkers of Renal Tubular Damage by a High-Salt Intake Independent of Blood Pressure in Normotensive Rats“. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 45, Nr. 3 (2018): 261–68. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12871>

1) EINLEITUNG

Vanin- (VAN1) ist ein GPI-verankertes Glykoprotein mit 513 Aminosäuren, das aus einer Basisdomäne und einer enzymatischen Nitrilasedomäne besteht (Boersma et al., 2014). Das Ektoenzym katalysiert die Hydrolyse von Pantethein zu Pantothenensäure (Vitamin B5) und Cysteamin und ist somit an der Regulation von oxidativem Stress und Entzündungen beteiligt (Maras et al., 1999). Vanin-1 weist eine breite Gewebeexpression auf, wobei die höchsten Konzentrationen in tubulären Nierenepithelzellen beobachtet werden (Pitari et al., 2000). Der GPI-Anker von Vanin-1 kann durch einen noch unbekanntem Mechanismus gespalten werden, was dazu führt, dass Vanin-1 in den extrazellulären Raum abgegeben wird.

Funktion: Vanin-1 ist ein epitheliales Ektoenzym, das die Umwandlung von Pantethein in Pantothenensäure (Vitamin B5) und Cysteamin aktiviert (Pitari et al., 2000). Es wurde vermutet, dass die Freisetzung von Cysteamin durch Vanin-1 die Schädigung und Entzündung des oxidativen Gewebes fördert, indem die Aktivität von Antioxidantien wie Superoxiddismutase (SOD) und Glutathion (GSH) gehemmt wird (Hosohata et al., 2011; Saghaei et al., 2012). In der Tat haben Vanin-1-Knockout-Mäuse erhöhte GSH-Speicher und sind resistenter gegenüber oxidativen Verletzungen, die durch Ganzkörper-Gammastrahlung hervorgerufen werden (Berruyer et al., 2004). Andererseits weisen mehrere Berichte darauf hin, dass Vanin-1 auch als Gewebesensor für oxidativen Stress fungieren könnte. Bei Mäusen konnten im Promotorbereich von Vanin-1 antioxidativ wirkende Elemente identifiziert werden, die die Expression von Vanin-1 in Gegenwart von oxidativem Stress verstärken (Berruyer et al., 2004). In ähnlicher Weise wurde gezeigt, dass die Vanin-1-Expression in einer humanen proximalen tubulären Zelllinie nach Exposition gegenüber organischen Lösungsmitteln hochreguliert ist (Hosohata et al., 2011). Nach renaler Ischämie-Reperfusion bei Ratten, einem Modell mit oxidativem Gewebeschaden, wurde auch eine hochregulierte renale Vanin-1-Expression festgestellt (Yoshida et al., 2002). Die höchsten Niveaus der Vanin-1-Expression konnten renalen tubulären Epithelzellen zugeordnet werden, während bei Glomeruli keine Expression nachweisbar ist (Hosohata et al., 2011; Pitari et al., 2000). Aus Nierenzellen freigesetztes Vanin-1 könnte daher im Urin nachweisbar sein. In einer Studie zur Identifizierung von Biomarkern für Nierentubulusverletzungen konnten Hosohata und Kollegen in einem Rattenmodell für durch Nephrotoxika verursachte Verletzungen tatsächlich zeigen, dass Vanin-1 in Nierentubuli früher als andere Marker hochreguliert und in den Urin abgegeben wird (Hosohata et al., 2011). Nachfolgende Studien bestätigten die Gültigkeit von Vanin-1 als frühem Biomarker für Nierentubulusschäden bei arzneimittelinduzierten akuten Nierenschäden (Hosohata et al., 2012, 2016a), obstruktiver Nephropathie (Washino et al., 2019) und Hydronephrose (Hosohata et al., 2018), diabetische Nephropathie (Fugmann et al., 2011), Nierenverletzung bei experimenteller Kolitis (Hosohata et al., 2014) und spontan hypertensiven Ratten bei hoher Salzaufnahme (Hosohata et al., 2016b; Washino et al 2018). Bemerkenswerterweise scheint Vanin-1 einen überlegenen prädiktiven Wert für eine akute Nierenschädigung zu haben als die etablierten Marker KIM-1, NGAL oder NAG (Fugmann et al., 2011; Hosohata, 2016; Hosohata et al., 2011).

Interessengebiete:

- Akutes Nierenversagen (Hosohata et al., 2016a)
- Diabetische Nephropathie (Fugmann et al., 2011)
- Arzneimittelinduziertes akutes Nierenversagen (Hosohata et al., 2016a)
- Hydronephrose (Hosohata et al., 2018), obstruktive Nephropathie (Washino et al., 2019)

2) INHALT DES KITS

CONTENTS	KIT KOMPONENTEN	MENGE
PLATE	Anti-Maus Vanin-1 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 7ml
STOCK STD	STOCK Standard (200 pmol/l), rekombinantes Maus Vanin-1, roter Schraubverschluss, lyophilisiert	1 Fläschchen
CTRL	Kontrolle, gelber Schraubverschluss, lyophilisiert (genaue Konzentrationen siehe Etiketten)	1 Fläschchen
CONJ	Polyklonaler Schaf anti-Maus Vanin-1 Antikörper-HRPO, braune Flasche, brauner Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 6 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

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

4) ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL UND GERÄTE

- Kalibrierte Präzisionspipetten für 5 µl, 50 µl, 100 µl, 1000 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°C). Rekonstituierter STOCK STD und CTRL sind bei -25°C oder tiefer bis zum Ablaufdatum haltbar. Rekonstituierter STOCK STD und CTRL sind für 4 Frier/Tau-Zyklen stabil.

Serum- Plasma- und Urinproben sind für diesen Test geeignet. Innerhalb einer Studie sollte der Probentyp nicht geändert werden. Lipämische und hämolytische Proben können falsche Ergebnisse liefern. Proben vor Verwendung gut mischen. Wir empfehlen Doppelbestimmung für alle Werte.

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 4 Frier/Tau-Zyklen verändern die Messwerte nicht. Auftaute Proben so bald wie möglich abarbeiten. Sammeln Sie den Urin des Tages. Proben sollten sobald als möglich gemessen werden oder bei -25°C oder niedriger gelagert werden.

Proben vor der Verwendung im Assay auf Raumtemperatur bringen und vorsichtig mischen, um sicherzustellen, dass die Proben homogen sind. Proben mit Werten über STD7 (200 pmol/l) können mit ASYBUF (Assay-Puffer) verdünnt werden.

Mausproben

Maus Proben müssen 1+7 mit Assay-Puffer (ASYBUF) verdünnt werden, z. 5 µl Probe + 35 µl ASYBUF. Verdünnte Proben sind über Nacht bei 4°C (2-8°C) stabil. Somit können Verdünnungen einen Tag vor der Analyse hergestellt werden.

Rattenproben

Ratten Proben werden unverdünnt verwendet.

B. Vorbereitung der CTRL (Kontrolle):

Lösen Sie das Lyophilisat des Fläschchen CTRL (Kontrolle) in 200 µl destilliertem Wasser 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.

C. Vorbereitung des STOCK STD (Stock Standard):

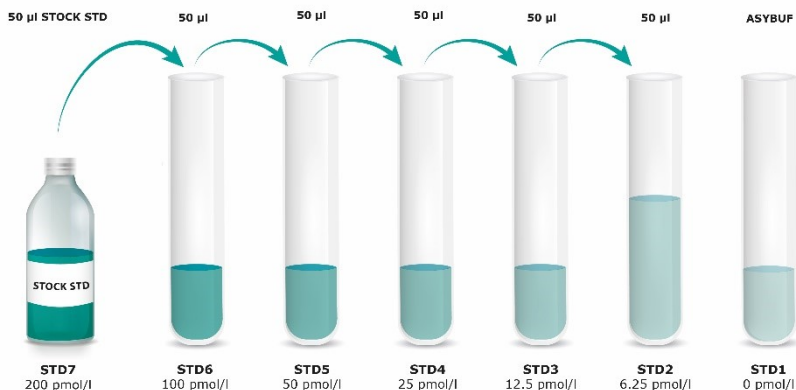
Lösen Sie das Lyophilisat des Fläschchen STOCK STD (Stock Standard) in 200 µl destilliertem Wasser und lassen Sie es bei Raumtemperatur (18-26°C) für 15 min stehen. Vor den weiteren Verdünnungen gut mischen.

D. Vorbereitung der Standardkurve:

1. Verwenden Sie Röhren aus Polypropylen und beschriften diese mit STD6 bis STD1 (s. Graph 1)
2. Markieren Sie den STOCK STD als STD7.
3. Pipettieren Sie je 50 μ l ASYBUF (Assay Puffer) in die Röhren STD6 bis STD1.
4. Stellen Sie eine Verdünnungsreihe mit einer 2-fach Verdünnung her (s. Graphik 1) um STD6-STD2 zu erhalten: Pipettieren Sie 50 μ l des rekonstituierten STOCK STD=STD7 in das Röhren STD6. Gut mischen. Danach führen Sie die weiteren Verdünnungen für STD5, STD4, STD3 und STD 2 durch.
5. ASYBUF (Assay Puffer) dient als 0-Standard (=STD1, 0 pmol/l).

Mischen Sie jedes Röhren gründlich vor dem nächsten Schritt!

Graphik 1: Vorbereitung der Standardkurve



Standards diluted for sample measurement

5. 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 Waschpuffer 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 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 Vanin-1 in Maus Serum, Plasma- oder Urinproben. Der Kit verwendet rekombinantes Maus-Vanin-1 als Kalibrator. Das VNN-1-Gen ist in Schimpansen, Rhesusaffen, Hunden, Kühen, Mäusen, Ratten und Hühnern konserviert (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/32130>).

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 ASYBUF (Assay buffer, roter Schraubverschluss) in alle Wells.
- 2) Pipettieren Sie 5 µl STD/CTRL/PROBE in Doppelbestimmung in die Wells, gut mischen.
Maus Proben werden 1+7 verdünnt. Ratten Proben werden unverdünnt eingesetzt.
- 3) Pipettieren Sie 50 µl CONJ (Konjugat, naturfarbener Schraubverschluss) in alle Wells, gut mischen.
- 4) **Streifen abdecken und 4 Stunden bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren.**
- 5) 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.
- 6) Pipettieren Sie 100 µl SUB (Substrat, blauer Schraubverschluss) in alle Wells, gut mischen
- 7) **30 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren.**
- 8) Pipettieren Sie 50 µl STOP (Stopplösung, weißer Schraubverschluss) in alle Wells, gut mischen.
- 9) 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.

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	Serum, Plasma und Urin		
Probenvolumen	5 µl / well		
Inkubationszeiten	4 h / 30 mins		
Standardbereich	0 – 200 pmol/l (0 – 10,6 ng/ml)		
Umrechnungsfaktor	1 ng/ml = 19,2 pmol/l (MW: 52,07 kDa)		
Sensitivität	LOD: 2,31 pmol/l; LLOQ: 6,25 pmol/l		
Präzision		n	Durchschnitt % CV
	Within-run	6	≤8
	In-between-run	5	≤8
Wiederfindung (Spike von rek. Vanin-1)		n	Durchschnitt % Wiederfindung
	Mouse	7	93
	Rat	4	94

Verdünnungslinearität vom endogenen Vanin-1		n	Durchschnitt % erwarteter Verdünnung	
			1+1	1+3
	Maus	4	97	84
	Ratte	3	92	-
Spezifität	Endogenous and recombinant Vanin-1.			
Verwendung	Nur für Forschungszwecke.			
Vanin-1 Referenz Werte		n	Median Vanin-1 c[pmol/l]	
	Maus Serum	5	22	
	Maus Plasma	5	24	
	Maus Urin	6	21	
	Ratten Serum	7	7	
	Ratten Plasma	8	7	

Nähere Informationen zu den Testmerkmalen finden Sie auf unserer Website unter www.bmgrp.com 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 6mal in 1 Test von 1 Operator getestet.

Inter-assay: 2 Proben bekannter Konzentration wurden 5mal in 2 Tests von 2 verschiedenen Operatoren getestet.

Intra-assay (n= 6)	Probe 1	Probe 2	Inter-assay (n= 5)	Probe 1	Probe 2
Durchschnitt (pmol/l)	8	20	Durchschnitt (pmol/l)	63	41
SD (pmol/l)	0,6	1,6	SD (pmol/l)	4,0	3,1
VK (%)	8	8	VK (%)	6	8

Detaillierte Informationen zum Vanin-1 Mouse/Rat ELISA, z.B. Testmerkmale finden Sie auf unserer Homepage www.bmgrp.com.

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 950 als Konservierungsmittel. Vermeiden Sie Kontakt mit Augen, Haut und Schleimhaut. Proclin 950 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 / Udløbsdato / Utgångsdatum / Termin Wažnosti /
Lejáratí 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 / Vegyűk 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 / Opbevaars 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-VAN1MR VANIN-1 MOUSE/RAT ELISA

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 ASYBUF (assay buffer, red cap) into each well.
- Step 2) Add 5 µl STD/CTRL/SAMPLE in duplicates into the respective wells. Swirl gently.
- Step 3) Add 50 µl CONJ (conjugate, amber cap) into each well. Swirl gently
- Step 4) Cover the plate tightly and incubate for 4 hours at room temperature (18-26°C) in the dark.**
- Step 5) Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF. After the final wash, remove the remaining WASHBUF by strongly tapping plate against a paper towel.
- Step 6) Add 100 µl SUB (Substrate, blue cap) into each well. Swirl gently.
- Step 7) **Incubate for 30 min at room temperature (18-26°C) in the dark.**
- Step 8) Add 50 µl STOP (stop solution, white cap) into each well. Swirl gently.
- Step 9) Measure absorbance immediately at 450 nm with reference 630 nm, if available.