

Arbeitsanleitung/Manual

Myostatin EIA Kit

*Zur in-vitro-Bestimmung von Myostatin in humanem Serum
und Plasma*

Myostatin EIA Kit

For the determination of Myostatin in human serum and plasma

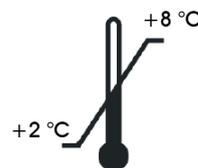
Gültig ab / Valid from 15.08.2011



K 1012



96



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim

Tel.: ++49 6251 70190-0

Fax: ++ 49 6251 849430

e.mail: Info@immundiagnostik.com

www.Immundiagnostik.com

Inhalt / Content

1. Deutsch
2. English

Weitere Informationen zu unseren Produkten finden Sie auf unserer
Homepage

Additional information about our products is available on our homepage

www.immundiagnostik.com

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene EIA ist für die quantitative Bestimmung von Myostatin aus humanem Serum und Plasma geeignet. Nur zu wissenschaftlichen Zwecken.

2. EINLEITUNG

Myostatin gehört zur Familie der sezernierten transformierenden Wachstumsfaktoren („transforming growth factor“ TGF) und ist ein negativer Regulator des Muskelwachstums, jedoch ist die genaue Wirkung des Myostatins noch nicht im Detail erforscht (Roth and Walsh, 2004).

Das Gen Myostatin wurde 1997 von McPherron et al. erstmals in der Maus entdeckt und beschrieben. Mäuse, deren Myostatin-Gen defekt ist, zeigen ein stärkeres Muskelwachstum als Wildtyp Tiere. Die Muskelmassenzunahme als Folge der Myostatinblockade wird durch eine Zunahme sowohl der „Hypertrophie“ (Faserdicke des Muskels) als auch der „Hyperplasie“ (Faserzahl) hervorgerufen. Andere Forschungsgruppen fanden heraus, dass der Ausfall des Myostatin-Gens bei der natürlich gezüchteten "Belgian Blue"-Rindrasse zu massivem Muskelwachstum führt.

Inzwischen wurde das Gen auch im Menschen gefunden. Eine erhöhte Myostatin-Immunoreaktivität oder -Expression wurde bei HIV-infizierten Männern mit Muskelschwäche (Gonzales-Cadavid et al. 1998), bei jungen bettlägerigen Männern (Zachwieja et al. 1999) sowie bei älteren Männern und Frauen mit Muskelschwund (Yarasheski KE et al. 2002) nachgewiesen.

Shi et al. (2007) und andere Forscher entdeckten, dass Myostatin-Mangel die Adipogenese *in vivo* inhibiert, sogar wenn die Mäuse mit stark-fetthaltiger Nahrung gefüttert werden. Transgene Überexpression des Myostatin-Propeptids, welches den Myostatinsignalweg hemmt, reduziert die Körperfettzunahme bei stark-fetthaltiger Nahrung (Zhao et al. 2005). Ähnliche Hemmung des Myostatinsignalwegs wurde auch mit Veränderung der Körperfettmasse beim Menschen in Verbindung gebracht.

Hittel et al. (2010) berichten, dass der Myostatin-Spiegel durch moderates Fitnesstraining reguliert wird. Ferner spielt Myostatin eine kausale Rolle bei der Entstehung der durch körperliche Inaktivität erworbenen Insulinresistenz.

Indikationen

- Regulation des Muskelwachstums
- Muskelatrophie
- Muskelschwund
- Erworbene Insulinresistenz

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 1012MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 1012WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 1012VP	ABBUF	Antikörperverdünnungspuffer	1 x 22 ml
K 1012PV	DIL	Verdünnungspuffer	1 x 22 ml
K 1012AK	AB	Anti-human Myostatin Antikörper (lyophilisiert)	2 x 10 ml
K 1012ST	STD	Standardkonzentrat (lyophilisiert)	2 x 1 vial
K 1012K	CONJ	Konjugat (Peroxidase markiert), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 1012TMB	SUB	TMB Substrat, gebrauchsfertig (Tetramethylbenzidin)	1 x 15 ml
K 1012AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm

*Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055µS/cm bei 25°C (≤18,2MΩ cm).

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **AB** (Antikörper) mit 10 ml **ABBUF** (Antikörperpuffer) rekonstituieren, 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen, gelegentlich leicht schwenken (nicht vortexen). Der restliche rekonstituierte Antikörper ist nach Gebrauch bei -20°C zu lagern und dann maximal 2 Wochen haltbar.
- Der lyophilisierte **STD** (Standard) ist bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Angaben zur Rekonstitution des Standards sind in der entsprechenden Produktspezifikation angegeben.
- Alle Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG UND LAGERUNG

Als Probenmatrix sollte EDTA Plasma oder Serum verwendet werden.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Bei dem hier verwendeten Testsystem handelt es sich um einen kompetitiven Immunoassay. Zunächst werden Standards mit definierten Myostatin Konzentrationen und Proben mit unbekanntem Konzentrationen an humanem Myostatin mit einem polyklonalen Antikörper gegen rekombinantes humanes Myostatin in Glasröhrchen inkubiert. (Von der Verwendung von Kunststoffröhrchen wird abgeraten!) Bei dieser Inkubation kann freies Myostatin vom Myostatin-Antikörper gebunden werden. Anschließend wird dieses Vorinkubat auf eine Mikrotiterplatte überführt, welche mit rekombinantem Myostatin beschichtet wurde. Die ungebundenen Antikörper aus dem Vorinkubat können nun an das immobilisierte Antigen binden und mithilfe eines Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper / TMB Systems detektiert werden.

Pipettierschema

1.	Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben vorsichtig mischen. Schaumbildung vermeiden
2.	Positionen für STD/PROBE im Protokollblatt markieren
3.	AB mit 10 ml ABBUF rekonstituieren
4.	STDKONZ mit Reinstwasser rekonstituieren (Volumen und Konzentration siehe entsprechende Produktspezifikation)
5.	Glasröhrchen beschriften
6.	Glasröhrchen mit der vorbereiteten Standardreihe zu anderen Glasröhrchen stellen
7.	120 µl DIL in neuen Glasröhrchen vorlegen und 30 µl PROBE darin verdünnen (ergibt Verdünnungsfaktor 5)
8.	In alle Glasröhrchen (auch Standardreihe) 150 µl verdünnten AB pipettieren und gut vortexen
9.	Alle Glasröhrchen abdecken und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren
10.	Benötigte Anzahl der MTP (Mikrotiterstreifen) aus Folie nehmen und 2x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
11.	Aus den Glasröhrchen 100 µl pro Vertiefung in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen pipettieren
12.	Mikrotiterplatte 2 Stunden schüttelnd (ca. 350 rpm) bei Raumtemperatur (18-26°C) inkubieren

13. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
14. 100 µl CONJ in alle Vertiefungen pipettieren
15. Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren
16. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
17. 100 µl SUB in alle Vertiefungen pipettieren
18. 10 - 20 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren*
19. 50 µl STOP in alle Vertiefungen pipettieren
20. Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer mit einer Messwellenlänge von 450 nm messen. Sofern die höchste Extinktion der Standards (STD) den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte die Messung sofort bei einer Messwellenlänge von 405 nm wiederholt und diese Ergebnisse für eine Auswertung herangezogen werden. Wenn möglich, sollten bei jeder Messung die Extinktionen der Messwellenlänge mit den Extinktionen einer Referenzwellenlänge verglichen werden. Zulässige Referenzwellenlängen sind z.B.: 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm und 690 nm.

*Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen, den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter Funktion.

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration von 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Serum- und Plasmaproben

Die ermittelten Werte werden mit dem Verdünnungsfaktor **5** multipliziert.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit hohen Myostatin Konzentrationen, die außerhalb des Messbereichs liegen, sollen mit DIL (Verdünnungspuffer) verdünnt und nochmals bestimmt werden.

Vollblut kann nicht verwendet werden. Lipämische Proben führen zu falschen Ergebnissen.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

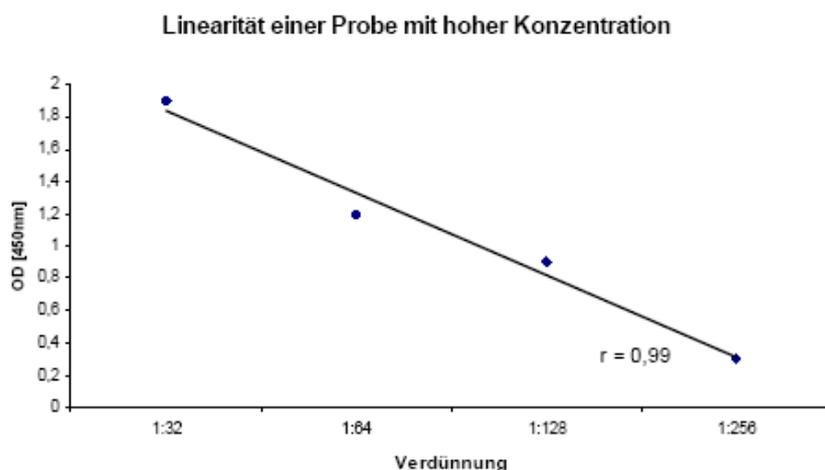
Immundiagnostik empfiehlt den Einsatz (wenn vorhanden) von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle.

Wir empfehlen die Kontrollen bei jedem Testansatz mit zumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Proben nicht gewährleisten.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Linearität

Eine Patientenprobe mit hoher Konzentration wurde in DIL (Verdünnungspuffer) verdünnt und die ermittelten Konzentrationen grafisch wiedergegeben.



Bei Verdünnungsstufen von 1:256, 1:128, 1:64 und 1:32 kann in diesem Fall eine lineare Verdünnbarkeit der Probe beobachtet werden.

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde als $B_0 + 3 \text{ SD}$ festgelegt. Gemessen wurde 22 mal der Standard null.

Probe	Calprotectin Mittelwert [OD]	Standardabweichung [SD]	Nachweisgrenze [ng/ml]
1	0.015	0.021	2.785

Kreuzreaktivität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu folgenden Plasmaproteinen gefunden:

Follistatin - < 1%

Follistatin-Related Gene (FLRG)-Protein - < 1%

GDF 11 - < 1%

Myoglobin - < 1%

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zu wissenschaftlichen Zwecken.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV und Hepatitis B und C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit der Haut oder der Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter H_2SO_4 . H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen bei den Inkubationen mit Abdeckfolie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettierolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller abgesprochen wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken eingesetzt werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller (Immundiagnostik) zurück zu senden.

15. LITERATUR

Mc Pherron et al. (1997) Nature 387:83-90

Turner CH (2000) Bone 27 : 339-340

Yarasheski KE et al. (2002) J Nutrition, Health & Aging 6 : 343-348

Gonzales-Cadavid NF et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95 : 14938-14943

Hamrick MW et al. (2006) International J Obesity.30(5):868–870

Zachwieja JJ et al. (1999) J Gravit Physiol 6:11-15

Yarasheski KE (2002) J Nutr Health Aging 6: 343-348

Roth SM and Walsh S (2004) Curr Opin Clin Nutr Metab Care 7: 259-263

Shi X et al. (2007) PPAR Res 92501

Zhao B et al. (2005) Biochem Biophys Res Comm 337(1):248–255

Hittel et al. (2010) Medicine & Science in Sports & Exercise

DOI: 10.1249/MSS.0b013e3181e0b9a8

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



Nur für Forschungszwecke

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

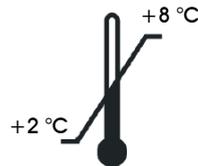
Myostatin EIA Kit

For the determination of Myostatin in human serum and plasma

Valid from 15.08.2011



K 1012



1. INTENDED USE

This enzyme immunoassay is intended for the quantitative determination of myostatin in human serum and plasma. It is for research use only.

2. SUMMARY

Myostatin belongs to the transforming growth differentiation factor- β (TGF- β) super family. The molecule is a negative regulator of muscle growth, but details about the actions of myostatin are uncertain (Roth and Walsh, 2004).

Myostatin was first identified in 1997 by McPherron et al. They found out that null-mutant knockout mice were significantly larger than wild-type animals and exhibited a large and widespread increase in skeletal muscle mass due to an increase of muscle fiber number (hyperplasia) and thickness (hypertrophy). Other groups identified mutations in the myostatin gene in naturally bred "double-muscles" cattle breeds.

Similar to the findings in animal models, increased myostatin immunoreactivity or expression has been observed in HIV-infected men with muscle wasting (Gonzales-Cadavid et al. 1998), after prolonged bed rest in young men (Zachwieja et al. 1999) and in older men and women with muscle wasting (Yarasheski KE et al. 2002).

Shi et al. (2007) and others have found that myostatin deficiency inhibits adipogenesis *in vivo*, even when mice are fed a high-fat diet. Transgenic overexpression of myostatin pro-peptide, which inhibits myostatin signaling, also inhibits body fat gain with a high-fat diet (Zhao et al. 2005). Similar alterations in myostatin signaling are associated with changes in body fat among humans.

Hittel et al. (2010) report that myostatin-levels are regulated by aerobic exercise. Moreover, myostatin is in the causal pathway of acquired insulin resistance with physical inactivity.

Indications

- Regulation of muscle growth
- Muscle atrophy
- Muscle wasting
- Acquired insulin resistance

4. MATERIAL SUPPLIED

Catalogue No	Content	Kit Components	Quantity
K 1012MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 1012WP	WASHBUF	ELISA wash concentrate 10x	2 x 100 ml
K 1012VP	ABBUF	Antibody dilution buffer	1 x 22 ml
K 1012PV	DIL	Dilution buffer	1 x 22 ml
K 1012AK	AB	Anti-human myostatin antibody (lyophilized)	2 x 10 ml
K 1012ST	STD	Standard concentrate (lyophilized)	2 x 1 vial
K 1012K	CONJ	Conjugate, peroxidase labeled, ready to use	1 x 15 ml
K 1012TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K 1012AC	STOP	EIA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Laboratory balance
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000 μ l
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 nm

*Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0,2 μ m) with an electrical conductivity of 0,055 μ S/cm at 25°C (\leq 18,2M Ω cm).

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- The **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be dissolved at 37°C using a water bath before dilution of the buffer solutions. The **buffer concentrate** is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** could be stored in a closed flask at **2-8°C for one month**.
- Reconstitute **AB** (antibody) with 10 ml of **ABBUF** (antibody dilution buffer) and incubate for 10 minutes at room temperature, mix gently from time to time (do not vortex). After use, freeze the remaining reconstituted antibody and store at -20 °C up to maximal 2 weeks.
- The lyophilized **STD** (standard) is stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label. Details for the reconstitution of the standard are given in the corresponding product specification.
- All other test reagents are ready for use. The test reagents are stable up to the date of expiry (see label of test package) when stored at **2-8 °C**.

6. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Either EDTA plasma or serum can be used for analysis.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

The test utilizes a competitive immunoassay technique. Standards with defined myostatin concentrations and patient samples which are assayed for myostatin are incubated with polyclonal antibodies against human recombinant myostatin in glass vials. (Do not use plastic vials, use glass vials!). During the incubation, free myostatin can be bound by the myostatin antibodies. The pre-incubates are then transferred into the microtiter wells coated with recombinant myostatin. The unbound antibodies in the pre-incubates can now bind to the immobilized antigen and are detected using a peroxidase-conjugated secondary antibody and TMB as a substrate.

Test procedure

1. Prior to use in the assay allow all reagents and samples to come to room temperature (18 - 26 °C) and mix gently, avoid foam formation
2. Mark the positions of STD/SAMPLE on a protocol sheet
3. Reconstitute AB with 10 ml of ABBUF
4. Reconstitute SDKONZ with ultra pure water (volume and concentration see product specification)
5. Label glass vials
6. Place glass vials containing the prepared standard series to the other glass vials
7. Pipette 120 µl DIL in a new glass vial and add 30 µl of the SAMPLE (results in a dilution factor of 5)
8. Pipette 150 µl of diluted AB (inclusive standard series) into each glass vial, vortex well
9. Cover all glass vials and incubate for 2 hours at room temperature
10. Take as many microtiter strips as needed from the kit. Wash each well 2 times with 250 µl of diluted wash buffer. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution
11. Transfer 100 µl from each glass vial into a respective well in duplicate

12. Incubate microtiter plate while shaking (ca. 350 rpm) for 2 hours at room temperature (18-26°C)
13. Aspirate and wash the wells 5x with 250 µl of diluted wash buffer. Remove remaining wash buffer by hitting the plate against paper towel after the last wash
14. Add 100 µl of CONJ into each well
15. Cover strips tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) under shaking
16. Aspirate and wash the wells 5x with 250 µl of diluted wash buffer. Remove remaining wash buffer by hitting the plate against paper towel after the last wash
17. Add 100 µl of SUB into each well
18. Incubate for 10 - 20 minutes at room temperature (18-26°C) in the dark*
19. Add 50 µl of STOP into each well
20. Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm . If the highest extinction of the standards (STD) is above the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm and the obtained results used for evaluation. If possible, the extinctions from each measurement should be compared with extinctions obtained at a reference wavelength, e. g. 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm and 690 nm can be used

*The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend to observe the procedure of the color change and to stop the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend the use of the "4-Parameter-algorithm".

1. 4-parameter-algorithm

It is recommended a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

2. Point-to-point-calculation

We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for concentration.

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

Serum and plasma samples

The estimated values are multiplied by a dilution factor of **5**.

9. LIMITATIONS

If the absorption of any sample is outside the measurement range, the sample should be diluted with DIL (dilution buffer) and re-assayed.

Whole blood is not suitable. Untreated lipemic samples may produce incorrect results.

10. QUALITY CONTROL

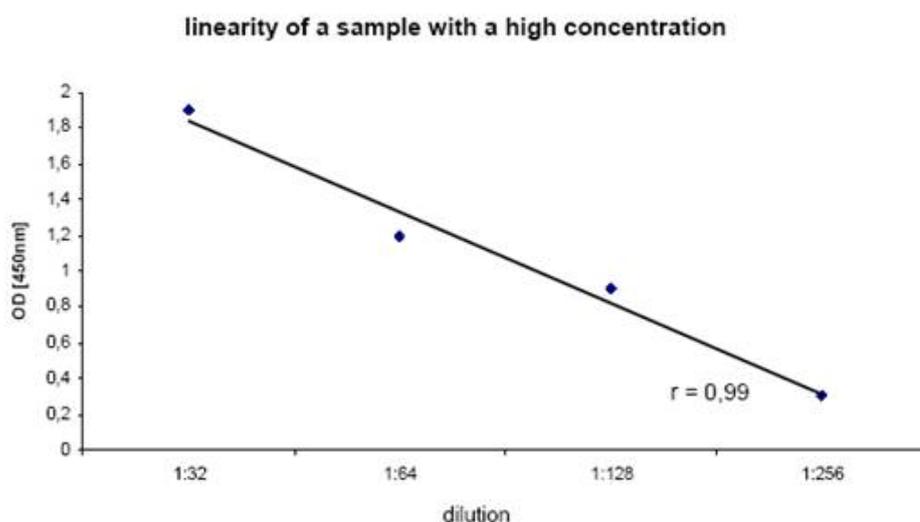
Immundiagnostik AG recommends the use of commercial control samples for internal quality control if available.

Control samples should be analyzed with each run. Results, generated from the analysis of control samples should be evaluated for acceptability using appropriate statistic methods. The results for the patient samples may not be valid, if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Linearity

One patient's sample with high myostatin concentration was diluted with DIL (dilution buffer) and analyzed. The obtained values are shown on the graph below.



A linear signal response was obtained at dilutions of 1:256, 1:128, 1:64 and 1:32.

Analytical Sensitivity

The sensitivity was set as $B_0 + 3SD$. The zero-standard was measured 22 times.

Sample	Mean value [$\mu\text{g/g}$]	Standard deviation [SD]	Detection limit [$\mu\text{g/g}$]
1	0.015	0.021	2.785

Cross-reactivity

No cross-reactivity was observed to the following plasma proteins:

Follistatin - < 1%

Follistatin-related gene (FLRG) protein – < 1%

GDF 11 - < 1%

Myoglobin - < 1%

12. PRECAUTIONS

- All kit reagents are for research use only.
- The quality control guidelines should be observed.
- Human material used in the kit components was tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Reagents of the kit package contain sodium azide and thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. The substrates for the enzymatic color reactions are described to be also toxic and carcinogenic. Contact with skin or mucous membranes has to be avoided.
- Stop solution consists of sulfuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped out immediately with copious quantities of water.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Substrate solution should remain colorless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- All reagents in the kit package are for research use only.
- The guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be lodged within 14 days of receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik together with the complaint in writing.

15. REFERENCES

Mc Pherron et al. (1997) Nature 387:83-90

Turner CH (2000) Bone 27 : 339-340

Yarasheski KE et al. (2002) J Nutrition, Health & Aging 6 : 343-348

Gonzales-Cadavid NF et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95 : 14938-14943

Hamrick MW et al. (2006) International J Obesity.30(5):868–870

Zachwieja JJ et al. (1999) J Gravit Physiol 6:11-15

Yarasheski KE (2002) J Nutr Health Aging 6: 343-348

Roth SM and Walsh S (2004) Curr Opin Clin Nutr Metab Care 7: 259-263

Shi X et al. (2007) PPAR Res 92501

Zhao B et al. (2005) Biochem Biophys Res Comm 337(1):248–255

Hittel et al. (2010) Medicine & Science in Sports & Exercise DOI:
10.1249/MSS.0b013e3181e0b9a8

Used symbols:

Temperature limitation



Catalogue Number



For research use only



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number