

Adiponectin (total) ELISA Kit

Zur in vitro Bestimmung von humanem *Adiponectin* in
Serum und Plasma

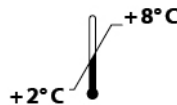
Adiponectin (total) ELISA Kit

For the in vitro determination of human *adiponectin* in
serum and plasmal

Gültig ab / Valid from 26.05.2011



K 6250



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

Tel.: +49 (0) 62 51/70 19 00
info@immundiagnostik.com

Fax: +49 (0) 62 51/84 94 30
www.immundiagnostik.com

Inhalt

Content	14
1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENVORBEREITUNG	4
Serum und Plasma	4
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
Testprinzip	5
8. ERGEBNISSE	6
9. EINSCHRÄNKUNGEN	7
10. QUALITÄTSKONTROLLE	7
Erwartete Ergebnisse	7
11. TESTCHARAKTERISTIKA	8
Präzision und Reproduzierbarkeit	8
Wiederfindung	8
Analytische Sensitivität	9
Linearität	9
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	10
13. TECHNISCHE MERKMALE	10
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
15. LITERATUR	11

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) ist für die quantitative Bestimmung von humanem Adiponectin in Serum und Plasma geeignet. Nur zur in vitro Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Adiponektin besteht aus 244 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 30 kDa. Die Adiponektin-Konzentration im Blut beträgt 5-30 µg/ml, entsprechend ca. 0.01% der Proteine im Serum. Adiponektin besteht aus vier Domänen: Signalpeptid, einer variablen Domäne, einer Kollagen-ähnlichen N-terminalen und einer globulären C-terminalen Domäne. Adiponektin tritt in unterschiedlichen Oligomeren in vivo auf. Neben dem Trimer und dem Ditrimer existieren hochmolekulare Multimere. Die Synthese des Proteins erfolgt hauptsächlich durch Adipocyten, aber auch Muskel- bzw. Leberzellen können Adiponectin exprimieren. Der einzige bisher bekannte natürliche Induktor der Adiponektin-Synthese ist IGF-I.

Zwei verschiedene Adiponektin-Rezeptoren sind bekannt, die ubiquitär exprimiert werden. Die Verteilung der Adiponektin-Rezeptoren in den Geweben ist jedoch unterschiedlich: Adiponektin Rezeptor 1 (AdipoR1) wird im Muskel- und AdipoR2 im Lebergewebe synthetisiert.

Die Adiponektin-Bedeutung für den menschlichen Organismus ist noch nicht völlig aufgeklärt. Studien zeigen, dass Adiponektin negativ mit dem BMI korreliert und somit an dem Energiestoffwechsel über die Regulation der Fettsäureoxidation beteiligt ist. Adiponektin beeinflusst weitere physiologische Prozesse wie Angiogenese. Es besteht auch ein Zusammenhang zwischen der Adiponektin-Konzentration und der Insulin-Resistenz und damit eine Verknüpfung zum Typ II Diabetes. Auch stellt Adiponektin eine Verbindung zwischen Glucose- und Fettstoffwechsel dar. Des Weiteren ist Adiponektin an inflammatorischen Prozessen beteiligt und von Bedeutung für die Entstehung von Arteriosklerose und Koronarenentzündungen.

Blüher et al. (2007) berichten über Korrelation zwischen totalem Serum-Adiponektin und Insulinsensitivität und über die Möglichkeit zur Vorhersage von Insulinresistenz und gestörter Glukosetoleranz auf Grund der Spiegel von totalem Adiponektin in Serum. Erniedrigte Adiponektin-Konzentrationen führen zur Hemmung der Oxidation von Fettsäuren und sind assoziiert mit Insulinresistenz und metabolischem Syndrom sowie Atherosklerose.

Indikation

- Energie-Metabolismus und Körpergewicht-Regulation
- Metabolisches Syndrom
- Typ 2 Diabetes
- Koronarerkrankungen
- Atherosklerose

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 6250MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6250WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6250VP	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer	2 x 100 ml
K 6250ST	STD	Adiponectin Standards, lyophilisiert (0; 1.4; 5.5; 22; 88 ng/ml)	2 x 5 vials
K 6250KO1	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 6250KO2	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 6250K	CONJ	Konjugat, gebrauchsfertig	15 ml
K 6250TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml
K 6250AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	15 ml

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler mit Inkubator für 37 °C
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Der **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch 1:10 in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), 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.
- Die lyophilisierten **STD** (Standards) und die **CTRL** (Kontrollen) sind bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Rekonstitutionsvorgaben für Standards und Kontrollen sind dem Datenblatt zu entnehmen.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG

Serum und Plasma

Vor Gebrauch die Probe **1:1000 in SAMPLEBUF** (Probenverdünnungspuffer) verdünnen. Zum Beispiel:

Verdünnung I:

25 µl Probe + 975 µl **SAMPLEBUF** = **1:40**

Verdünnung II:

40 µl der Verdünnung I + 960 µl **SAMPLEBUF** = **1:25**

100 µl der Verdünnung II im Test pro Vertiefung einsetzen.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf der "Sandwich"-ELISA Technik. Es werden ein monoklonaler und ein polyklonaler Antikörper, die humanes Adiponectin erkennen, verwendet.

Teststandards, Kontrollen und verdünnte Patientenproben, die auf Adiponectin zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem hochaffinen monoklonalen anti-human Adiponectin Antikörper beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das Adiponectin aus der Probe von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Dann wird das Konjugat (Peroxidase markiert) zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper - humanes Adiponectin – Peroxidase Konjugat. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem Adiponectin-Gehalt direkt proportional. Parallel dazu wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

Pipettierschema

1. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (18-26°C) bringen, gut mischen
2. Positionen für STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Probe/Kontrollen) in Doppelbestimmung im Protokollblatt markieren
3. Benötigte Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen . Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden
4. Mikrotiterstreifen 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
5. 100 µl STD /SAMPLE/CTRL in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen pipettieren
6. Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren
7. 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

8. 100 µl CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren
9. Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren
10. 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
11. 100 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren
12. 10–20 min. bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren*
13. 50 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen
14. Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gelesen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden

* 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 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.001).
2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung
Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.
3. Gewichtete Spline-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 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.001). 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 ermittelte Adiponectin-Konzentration wird mit **1000** multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit hohen Adiponectin Konzentrationen, die außerhalb der Standardkurve liegen, werden mit SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer) verdünnt und nochmals bestimmt.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen Kontrollen bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen einer oder mehrere Werte außerhalb des angegebenen Bereichs, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Werte nicht gewährleisten.

Erwartete Ergebnisse

Normwerte

Über eine deutliche Abhängigkeit der Adiponektin-Serumwerte vom Alter sowie vom Geschlecht der Probanden wird berichtet; die Abhängigkeit vom jeweiligen BMI scheint dagegen wesentlich weniger signifikant zu sein.

Firma	Adiponectin Mittelwert* [µg/mL]		
Adiponectin total - Kit	Normale Glukose Toleranz	Gestörte Glukose Toleranz	Typ 2 Diabetes
LINCO	8.95 ± 0.55	3.38 ± 0.26	3.48 ± 0.42
Mediagnost	8.81 ± 3.43	3.51 ± 1.47	3.82 ± 2.16

*Werte aus Literaturstelle 1.

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben innerhalb einer Messserie wurde geprüft. Eine Normalprobe und eine pathologische Probe wurden 30 mal in einem Adiponectin ELISA von einer Person angesetzt.

Intra-Assay (n = 30)		
Probe	Adiponectin [µg/ml]	VK [%]
1	5.25	3.2
2	5.92	3.4

Inter-Assay (n = 12)		
Probe	Adiponectin [µg/ml]	VK [%]
1	6.9	6.3
2	8.4	6.1

Wiederfindung

Zwei Proben wurden mit 3 unterschiedlichen Adiponectin Standardmengen versetzt und gemessen.

Wiederfindung n=2

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Adiponectin erwartet [ng/ml]	Adiponectin gemessen [ng/ml]
3.8	2	5.8	6.1
3.8	4	7.8	7.6
3.8	6	9.8	9.2
2.1	5	7.1	8.1
2.1	7	9.1	9.6
2.1	9	11.1	10.8

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde als $B_0 + 2 \text{ SD}$ festgelegt. Gemessen wurde 20 mal der Standard null.

Probe	Adiponectin Mittelwert [OD]	Standardabweichung [SD]	Nachweisgrenze [ng/ml]
1	0.006	0.001	0.338

Linearität

Zwei Proben mit bekannter Adiponectin Konzentration wurden seriell verdünnt und vermessen. Gegenübergestellt sind die erwartete (berechnete) und die gemessene Adiponectin Konzentration.

n= 2

Probe	Verdünnung	Erwartet [µg/ml]	Gemessen [µg/ml]
A	1 : 600	7.65	7.65
	1 : 1200	3.83	4.14
	1 : 2400	1.91	2.33
	1 : 4800	0.96	1.23
B	1 : 300	7.60	7.60
	1 : 600	3.80	3.87
	1 : 1200	1.90	2.11
	1 : 2400	0.95	1.17

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur in vitro Diagnostik.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis 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. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (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, Schutzkleidung 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 während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur in vitro Diagnostik verwendet 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 AG 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 - der Immundiagnostik AG zurück zu senden.

15. LITERATUR

1. Blüher (Blueher), M., et al. (2007) Total and high-molecular weight adiponectin in relation to metabolic variables at baseline and in response to an exercise treatment program: comparative evaluation of three assays. *Diabetes Care* 30(2): p. 280-5
2. Duntas LH, Popovic V and Panotopoulos G (2004) Adiponectin: Novelty in Metabolism and Hormonal Regulation. *Nutr Neurosci* 7:195-200
3. Fernandez-Real, J.M., et al. (2004) Adiponectin is associated with vascular function independent of insulin sensitivity. *Diabetes Care* 27(3): p. 739-45
4. Halperin F, Beckman JA, Patti ME, Trijillo ME, Garvin M, Craeger MA, Scherer PE and Goldfine AB (2005) The role of total and high-molecular-weight complex of adiponectin in vascular function in offspring whose parents both had type 2 diabetes. *Diabetologia* 48:2147-2154
5. Higashiura, K., et al. (2004) Correlations of adiponectin level with insulin resistance and atherosclerosis in Japanese male populations. *Clin Endocrinol (Oxf)* 61(6): p. 753-9
6. Koenig W, Khuseynova N, Baumert J, Meisinger C and Löwel H (2006) Serum Concentrations of Adiponectin and Risk of Type 2 Diabetes Mellitus and Coronary Heart Disease in Apparently Healthy Middle-Aged Men: Results From the 18-Year Follow-Up of a Large Cohort From Southern Germany. *JACC* 48:1369-1377

7. Lara-Castro C, Luo N, Wallace P, Klein RL and Garvey T (2006) Adiponectin Multimeric Complexes and the Metabolic Syndrome Trait Cluster. Diabetes 55:249-259
8. Meier U and Gressner AM (2004) Endocrine Regulation of Energy Metabolism: Review of Pathobiochemical and Clinical Aspects of Leptin, Ghrelin, Adiponectin, and Resistin. Clin Chem 50:1511-1525
9. Nakamura, Y., et al. (2004) Implications of plasma concentrations of adiponectin in patients with coronary artery disease. Heart 90(5): p. 528-33
10. Pajvani, U.B., et al. (2003) Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. J Biol Chem 278(11): p. 9073-85
11. Shibata, R., et al. (2004) Adiponectin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of amp-activated protein kinase signaling. J Biol Chem 279(27): p. 28670-4

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

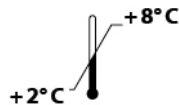
Adiponectin (total) ELISA Kit

For the in vitro determination of human *adiponectin* in
serum and plasma

Valid from 26.05.2011



K 6250



Content

1. INTENDED USE	15
2. INTRODUCTION	15
3. MATERIAL SUPPLIED	16
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	17
6. SAMPLE PREPARATION	17
Serum and Plasma	17
7. ASSAY PROCEDURE	18
Principle of the test	18
Test procedure	18
8. RESULTS	19
9. LIMITATIONS	20
10. QUALITY CONTROL	20
Expected values	20
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	21
Precision and reproducibility	21
Recovery	21
Analytical Sensitivity	22
Linearity	22
12. PRECAUTIONS	22
13. TECHNICAL HINTS	23
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	23
15. REFERENCES	24

1. INTENDED USE

The described Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) Kit is intended for the quantitative determination of human adiponectin in serum and plasma. It is for in vitro diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Adiponectin consists of 244 amino acids and has an approximate molecular weight of 30 kDa. The adiponectin concentration in blood is 5-30 µg/ml that accounts for about 0.01% of the total plasma proteins. Adiponectin has four domains: a signal peptide, a variable domain, a collagen-like N-terminal domain and a globular C-terminal domain. Adiponectin exists in different oligomer forms in vivo. Beside the trimer and dimer also high molecular multimers are present. Adiponectin is mainly expressed by adipocytes, but also muscle cells and hepatocytes can synthesize it. The only, until now known, natural inducer of the adiponectin synthesis is IGF-I. Two different adiponectin receptors are known. Both of them are ubiquitarily expressed, though their distribution in the tissues varies: Adiponectin Receptor 1 (AdipoR1) is synthesized in muscle and AdipoR2 in liver tissue. The adiponectin significance for the human organism is not completely clear until now. Studies show, that adiponectin correlates negatively with BMI and could participate at the energy metabolism through the regulation of fatty acid oxidation. Adiponectin influences further physiological processes like angiogenesis. It is also associated with glucose and lipid metabolism. Adiponectin levels are associated with insulin resistance and accordingly linked with Type II Diabetes. Furthermore, it is involved in inflammatory processes and therewith of importance for development of arteriosclerosis and coronary artery diseases. Blüher et al. (2007) showed a correlation of total serum adiponectin to insulin sensitivity and the ability of total serum adiponectin levels to predict insulin resistance and impaired glucose tolerance. Low adiponectin concentrations result in inhibition of fatty acid oxidation and are associated with insulin resistance and metabolic syndrome as well as arteriosclerosis.

Indications

- Energy metabolism and body weight regulation
- Metabolic syndrome
- Type 2 diabetes
- Coronary artery disease
- Atherosclerosis

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K 6250MTP	PLATE	Precoated microtiter plate	12 x 8 wells
K 6250WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 6250VP	SAMLEBUF	Sample dilution buffer	2 x 100 ml
K 6250ST	STD	Adiponectin standards, lyophilized (0; 1.4; 5.5; 22; 88 ng/ml)	2 x 5 vials
K 6250KO1	CTRL	Control, lyophilized (see specification for range)	2 x 1 vial
K 6250KO2	CTRL	Control, lyophilized (see specification for range)	2 x 1 vial
K 6250K	CONJ	Conjugate, ready to use	15 ml
K 6250TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	15 ml
K 6250AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	15 ml

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Laboratory balance
- Precision pipettors calibrated and tips to deliver 10-1000 µl
- Covering foil for the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker with 37 °C incubator
- 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 (reference wave length 620 or 690 nm)

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **ELISA WASHBUF** (wash buffer concentrate) must be diluted with aqua bidist. **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidist.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at 37°C in a water bath before dilution. The **buffer concentrate** is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** can be stored in a closed flask at **2–8°C for one month**.
- The lyophilized **STD** (standards) and **CTRL** (controls) are stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. Reconstitution details are given in the data sheet.
- All other test reagents are ready to use. The test reagents are stable until the expiry date given on the label when stored at **2–8°C**.

6. SAMPLE PREPARATION

Serum and Plasma

Samples are diluted **1:1000** in **SAMPLEBUF** (sample dilution buffer) before use. E. g.:

Dilution I:

25 µl sample + 975 µl **SAMPLEBUF** = **1:40**

Dilution II:

40 µl of dilution I + 960 µl **SAMPLEBUF** = **1:25**

For analysis, pipette **100 µl** of **dilution II** per well.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

The assay utilizes the two-site "sandwich" technique with one monoclonal and one polyclonal antibody that bind to human Adiponectin.

Standards, controls and diluted patient samples which are assayed for human Adiponectin are added to wells of microplate coated with a high affine monoclonal anti-human Adiponectin antibody. During the first incubation step, Adiponectin in the samples is bound by the immobilized antibody. Then a peroxidase labeled conjugate is added to each well and the following complex is formed: capture antibody - human Adiponectin – Peroxidase conjugate. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as a substrate for peroxidase. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The color changes from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the Adiponectin concentration of sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from standard. Adiponectin present in the patient samples, is determined directly from this curve.

Test procedure

1. Bring all reagents and samples to room temperature (18-26 °C) and mix well
2. Mark the positions of STD /SAMPLE/CTRL (Standards/Sample/Controls) in duplicate on a protocol sheet
3. Take as many microtiter strips as needed from kit. Store unused strips covered at 2-8° C. Strips are stable until expiry date stated on the label
4. Wash each well 5 times with 250 µl of diluted wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper
5. Add 100 µl of STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Controls) in duplicate into respective well
6. Cover plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26 °C) on a horizontal mixer
7. Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 times with 250 µl of diluted wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper
8. Add 100 µl CONJ (conjugate) into each well

9.	Cover plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26 °C) on a horizontal mixer
10.	Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 times with 250 µl of diluted wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper
11.	Add 100 µl of SUB (substrate) into each well
12.	Incubate for 10–20 minutes at room temperature (18-26°C) in the dark*
13.	Add 50 µl of STOP (stop solution) into each well, mix thoroughly
14.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference

* 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 to use the „4-Parameter-algorithm“.

1. 4-parameter-algorithm

It is recommended to use 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. 0.001).

2. Point-to-point-calculation

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

3. Spline-algorithm

We recommend 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. 0.001).

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

To obtain the final Adiponectin concentration of the samples, multiply the estimated value by the dilution factor of **1000**.

9. LIMITATIONS

Stool samples with Adiponectin levels greater than the highest standard value, should be diluted with SAMPLEBUF (sample dilution buffer), and re-assayed.

10. QUALITY CONTROL

Control samples should be analyzed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical 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.

Expected values

Normal ranges

A significant correlation between adiponectin serum values and age as well as gender of the probands is reported, in turn the correlation between the respective BMI seems to be less significant.

Company	Adiponectin mean value* [µg/mL]		
	Adiponectin total - Kit	Normal glucose tolerance	Impaired glucose tolerance
LINCO		8.95 ± 0.55	3.38 ± 0.26
Mediagnost		8.81 ± 3.43	3.51 ± 1.47
			Type 2 diabetes
			3.48 ± 0.42
			3.82 ± 2.16

*Values from Reference 1.

We recommend each laboratory to establish its own norm concentration range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

The precision (intra-assay variation) was calculated from 30 replicate determinations on each one of two samples.

Intra-Assay (n = 30)		
Sample	Adiponectin [µg/mL]	CV [%]
1	5.25	3.2
2	5.92	3.4

Inter-Assay (n = 12)		
Sample	Adiponectin [µg/ml]	CV [%]
1	6.9	6.3
2	8.4	6.1

Recovery

Two samples were spiked with 3 different Adiponectin standards and measured using this assay.

n=2

Sample [ng/mL]	Spike [ng/mL]	Adiponectin expected [ng/mL]	Adiponectin measured [ng/mL]
3.8	2	5.8	6.1
3.8	4	7.8	7.6
3.8	6	9.8	9.2
2.1	5	7.1	8.1
2.1	7	9.1	9.6
2.1	9	11.1	10.8

Analytical Sensitivity

The sensitivity was set as B0 + 2 SD. The zero-standard was measured 20 times.

Sample	Adiponectin mean value [OD]	Standard variation [SD]	Detection limit [ng/mL]
1	0.006	0.001	0.338

Linearity

Two patient samples were diluted with wash buffer and analyzed. The results are shown below:

n= 2

Sample	Dilution	Expected [µg/ml]	Measured [µg/ml]
A	1 : 600	7.65	7.65
	1 : 1200	3.83	4.14
	1 : 2400	1.91	2.33
	1 : 4800	0.96	1.23
B	1 : 300	7.60	7.60
	1 : 600	3.80	3.87
	1 : 1200	1.90	2.11
	1 : 2400	0.95	1.17

12. PRECAUTIONS

- For in vitro diagnostic use only.
- Quality control guidelines should be observed.
- Human materials used in kit components were 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.
- Kit reagents contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thi-

merosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.

- Stop solution contains sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills 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 colourless 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

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for in vitro diagnostic use only.
- 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 logged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Blüher (Blueher), M., et al. (2007) Total and high-molecular weight adiponectin in relation to metabolic variables at baseline and in response to an exercise treatment program: comparative evaluation of three assays. *Diabetes Care* 30(2): p. 280-5
2. Duntas LH, Popovic V and Panotopoulos G (2004) Adiponectin: Novelties in Metabolism and Hormonal Regulation. *Nutr Neurosci* 7:195-200
3. Fernandez-Real, J.M., et al. (2004) Adiponectin is associated with vascular function independent of insulin sensitivity. *Diabetes Care* 27(3): p. 739-45
4. Halperin F, Beckman JA, Patti ME, Trijillo ME, Garvin M, Craeger MA, Scherer PE and Goldfine AB (2005) The role of total and high-molecular-weight complex of adiponectin in vascular function in offspring whose parents both had type 2 diabetes. *Diabetologia* 48:2147-2154
5. Higashiura, K., et al. (2004) Correlations of adiponectin level with insulin resistance and atherosclerosis in Japanese male populations. *Clin Endocrinol (Oxf)* 61(6): p. 753-9
6. Koenig W, Khuseynova N, Baumert J, Meisinger C and Löwel H (2006) Serum Concentrations of Adiponectin and Risk of Type 2 Diabetes Mellitus and Coronary Heart Disease in Apparently Healthy Middle-Aged Men: Results From the 18-Year Follow-Up of a Large Cohort From Southern Germany. *JACC* 48:1369-1377
7. Lara-Castro C, Luo N, Wallace P, Klein RL and Garvey T (2006) Adiponectin Multimeric Complexes and the Metabolic Syndrome Trait Cluster. *Diabetes* 55:249-259
8. Meier U and Gressner AM (2004) Endocrine Regulation of Energy Metabolism: Review of Pathobiochemical and Clinical Aspects of Leptin, Ghrelin, Adiponectin, and Resistin. *Clin Chem* 50:1511-1525
9. Nakamura, Y., et al. (2004) Implications of plasma concentrations of adiponectin in patients with coronary artery disease. *Heart* 90(5): p. 528-33
10. Pajvani, U.B., et al. (2003) Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem* 278(11): p. 9073-85
11. Shibata, R., et al. (2004) Adiponectin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of amp-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 279(27): p. 28670-4

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number



Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
D-64625 Bensheim

Tel.: +49 (0) 62 51/70 19 00

Fax: +49 (0) 62 51/84 94 30

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com