

Progranulin

ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von
humanem Progranulin

Deutsch

Enzymeimmunoassay for quantitative Determination of
human Progranulin

English

**Nur zu Forschungszwecken! /
For research use only!**



REF **E103**























Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH



: Aspenhastr. 25 • D-72770 Reutlingen / Germany
Telefon: + 49 - (0) 7121 51484-0 • Fax: + 49 - (0) 7121 51484-10
E-Mail: contact@mediagnost.de • <http://www.mediagnost.de>

Symbols/ Symbole /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ Symbolen/ Symboler/ Symboler/ Symbole/ Szimbólumok/ Symboly/ Symboly/ Символи/ Sümbolid/ Σύμβολα/ Simboluri/ Simboli/ Symbolit

according to DIN EN 980 and EDMA recommendations Standard News 6 2001

	Expiry date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Data di scadenza/ Fecha de caducidad/ Data de validade/ Uiterste gebruiksdatum/ Udløbsdato/ Bäst före-datum/ Termin ważności/ Lejárati idő/ Čas expirácie/ Doba expirace/ Срок на годност/ Αεγμίσκουπαέβ/ Ημερομηνία λήξης/ Data de expirare/ Rok uporabe/ Viimeinen käyttöpäivä
	Consider instructions for use/ Bitte Gebrauchsanweisung beachten/ Consultez la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las instrucciones de uso/ Respeitar as instruções de utilização/ A.u.b de gebruiksaanwijzing volgen/ Se brugsanvisningen/ Läs anvisningarna före användning/ Proszę przeczytać instrukcję obsługi/ Vegge figurembe a használati utasításban foglaltakat/ Postupujte podľa pokynov na použitie/ Dodržujte návod k použití/ Моля, спазвайте инструкцията за употреба/ Palun järgige kasutusjuhendit./ Λάβετε υπόψη σας τις οδηγίες χρήσης/ Vă rugăm să respectați instrucțiunile de utilizare/ Upošteвайте navodila za uporabo!/ Lue käyttöohje huolellisesti!
	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/ Partisatskod/ Numer serii/ Tétel-sarzs szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/Partii – partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-număr lot/ Številka serije/ erä
	Manufactured by/ Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/Fabricado por/ Fabricado por/ Vervaardigd doo/Fabrikation af /Tillverkad av/ Wyprodukowane przez/ Gyártotta / Vyrobené/ Vyrobeno v/ Производител/ Tootja/ Κατασκευάζεται από/ Produs de/ Proizvajalec/ Valmistaja
	Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referência/ Referentienummer/ Referencennummer/ Beställningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/Katalógové číslo/ Objednací číslo/Каталожен номер/Tellimisnumber/ Αρ. παραγγελίας/Număr comandă/ Številka naročila/ viite tai tilausnumero
	Store at between/ Lagerung bei zwischen/ Conserver à entre/ Conservare a tra/ Conservar a temp. Entre/ Armazenar entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevares mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezi/ Температурно ограничение/ Säilittä temperatura-uridel/ Φύλαξη σε θερμοκρασία/ Depozitare între/ Skladiščenje med/ Säilytys x-y Celsiustasteen lämpötilassa
	Contains sufficient for x tests/ Inhalt ausreichend für x Tests/ Contient suffisant pour x tests/ Contenuto sufficiente per x test/ Contenido suficiente para x pruebas/ Conteúdo 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 / Obsah dostačuje pro x testů/ Съдържание достатъчно за x тестове/ Sisust jätkub x katse jaoks/ Το περιεχόμενο επαρκεί για x δοκιμές/ Conținut suficient pentru x teste/ Vsebina zadostuje za x preizkusov/ Sisältö riittää x testille
	Keep away from sunlight/ Nicht dem Sonnenlicht aussetzen/ Conserver à l'abri de la lumière/ Conservare al riparo della luce solare/ No exponer a la luz solar/ Proteger da luz solar/ Niet aan zonlicht blootstellen/ Må ikke udsættes for sollys/ Utsatt inte för solljus/ Nie wystawiać na słońce/ Napfénytől távol tartandó/ Nevystavovat' slnečnému svetlu/ Nevystavovat' slunečnému světlu/ Да се предпазва от слънчева светлина/ Kaitsta otsese päikesekiirguse eest/ Κρατήστε το μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία/ Τηνετή departe de lumina soarelui/ Ne izpostavljajte sončni svetlobi/ suojaa auringonvalolta
	Incubation time/ Inkubationszeit/ Temps d'incubation/ Tempo d'incubazione/ Tiempo de incubación/ Tempo de incubação/ incubatietijd/Inkubationstid/ inkubationstid/ Czas inkubacji/ Inkubációs idő/ Inkubačná lehota/ Inkubačni doba/ Инкубационен период/ Inkubatsiooniaeg/ Χρόνος επώασης/ Timp de incubare/ Inkubacijska doba/ inkubaatioaika
	incubate at / Inkubation bei/ Incuber à/ Incubare a/incubar a/Incubar a/ incubatietemperatuur/ Inkubation ved/ inkubation vid/ Inkubacja przy/ Inkubáció hőmérséklete/Inkubácia pri/ Inkubace při/Инкубира се при/ Inkubatsioon temperatuuril/ Επώαση στους/ Incubare la/ Inkubacija pri/ inkubaatiolämpötila
	Shaking/ Schütteln/ Mélanger/ Agitare/ Agitar/ Agitação/ Schudden/ Ryster/ Skaka/ Wstrząsanie/ Rázás/ Pretrepat/ Protřepat/ Разклащане/ Raputada/ Ανακινήστε/ Vibrare/ Stresite/ Sekoita
	Mikrotiterplate/ Mikrotiterplatte/ plaque de microtitrage/ Piastra di microtitolazione/ Placa de microtitulación/ Placa de Microtitulação/ microtiterplaat/ Mikrotiterplade/ mikrotiterplatta/ microtiterplaat/ Plytka microtiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiiterplaat/ Τρυβλίο μικροτιτλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitrska plošča/ Mikrotittrauslevy
	Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituir en/ Reconstituir em/ reconstituieren in/ Rekonstituér i/ rekonstituera/ Rekonstytuować w/ Helyreállítás/ Znovu připravit' za/ Znovu připravit' za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti / Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ rekonstituo
	Sample/ Probe /Echantillon/ campione/ Muestra/ Amostra/ monster/ Prøve/ prov/ Próbka/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probă/ Vzorec/ Näyte
	AK Antibody and Enzyme Conjugate/ Antikörper und Enzym Konjugat/ anticorps conjugué et conjugué enzymatique/ Coniugato di anticorpo ed enzima/ Conjugado de anticuerpos y enzimas/ Conjugado Anticorpo-Enzima/ antilichaamen enzymconjugaat/ Antistoffer og enzym-konjugat/ antikropps- och enzymkonjugat (antikropp och enzym, konjugat)/ Koniugat antyciał i enzymów/ Antitest és enzim páros/ Protilátkový a enzymatický konjugát/ Protilátkový a enzymatický konjugát/ Антитяло и ензим конюгат/ Antikehad ja ensüümi konjugaat/ Σύμπλοκο αντι σώματος-ενζύμου/ Compuși din anticorpi și enzime/ Antitelesa in konjugat encima/ Vasta-aine ja entsymi konjugaati
	EK Dilute in Buffer X/ Verdünnen in Puffer X/ Diluer dans le tampon X/ Diluire nel tampone X/ Diluir en tampón X/ Diluir no Tampão X/ verdunnen in buffer X/ Fortyndes i buffer X/ spädi i buffert X/ Rozcieńczanie w buforze X/ Hígítás X pufferben/ Riedit' v pufrí X/ Ředit v pufru X/ Разреджәне в буфер X/ Lahjendata puhvrís X/ Αραιώστε σε ρυθμιστικό διάλυμα X/ Diluați în tamponul X/ Razredčiti v pufru X/ Iaimennetaan x puskuriin
	VP Standard X /Standard X/ Etalon X/ Standard X/ Estándar X/ Standard X/ standaard X/ Standard X/ standard X/ Standard X/ Standard X/ Štandard X/ Standard X/ Стандарт X/ Standard X/ Πρότυπο X/ Standard X/ Standardni X/ Kalibraattori X
	A-E Control Serum / Kontrollserum/ Contôle sérique/ Siero di controllo/ Suero de control/ Soro de Controlo/ controleserum/ Kontrolserum/ Kontrollserum/ Serum kontrolne/ Ellenőrző szérum/ Kontrolné sérum/ Kontrolní sérum/ Контролен серум/ Kontrollseerum/ Ορός ελέγχου/Ser de control/ Kontrolni serum/ Kontrolli seerumi
	KS1 Washing Buffer Concentrate/ Waschpufferkonzentrat/ Tampon de lavage conc./ Tampone di lavaggio concentrato/ Tampón de lavado concentrado/ Tampão de Lavagem Concentrado/ wasbuffer, geconcentreerd/ WP
	

20x	Vaskebufferkoncentrat/ Vaskebufferkoncentrat/ tvättbuffertkoncentrat/ Bufor plukania koncentrat/ Mosópuffer koncentrátum/ Koncentrát vymývacieho pufru/ Концентрат на промивен буфер/ Pesupuhvri konsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralnega pufru/ Pesuliuositiiviste
WASHBUF	Washing Buffer / Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón de lavado/Tampão de Lavagem/ wasbuffer/ Vaskebuffer/ tvättbuffert/ Bufor plukania/ Mosópuffer/ Vymývací pufer/ Vymývací pufr/ Промивен буфер/ Pesupuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare /Izpiralni pufer/ Pesuliuos
SUBST TMB	S Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ substraat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Szubsztrátum/ Substrát/ Substrát/ Субстрат Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraattiliuos
H₂SO₄	SL Stop Solution/ Stopp Lösung/ Stop Solution/ Soluzione di stop/ Stop Solución/ Solução Stop/ stopoplossing/ Stopopløsning/ Stopplösning/ Stop roztwór/ Megállító oldat/ Roztok na ukončenie/ Roztok pro ukončeni/ Стопиратив разтвор/ Stopp-lahus/ Διάλυμα διακοπής/ Soluție de oprire/ Stop raztopina/ Pysäytysliuos
TAPE	Cover Plate with sealing tape /Platte abkleben/ Recouvrir la microplaque avec bande adhésive/ Coprire la piastra con nastro adesivo/ Cubrir la placa con una cinta adhesiva/ Cobrir a Placa com fita adesiva/ plaatje met tape afdekken/ Afdækningsplade med tape/ maskera platta/ Odkleić płytke/ Tányér leragsztása/ Oblepit' podložku lepiacou páskou/ Olepit podložku lepící páskou/ Плака с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerikleepindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperiți placa cu o bandă adezivă/ Prelepiti ploščo/ Peitã mikrotitrauslevyn oheisella teipillä
MEASURE	Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590nm)/Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)./ Mesure l'absorbance en l'espace de 30 min à 450 nm avec ≥590nm longueur d'onde pour référence/Misurazione entro 30 min. a 450 nm (filtro di riferimento ≥ 590 nm)./ Medición de la placa dentro de los siguientes 30 min a 450 nm (filtro de referencia ≥ 590nm)/ Medir a placa dentro de 30 min a 450 nm (Filtro de referência ≥590nm)/ Binnen 30 minuten bij 450 nm meten (referentiefilter ≥ 590 nm)./ Mål plade i løbet af 30 min ved 450 nm (referencefilter ≥590nm)/ Mät inom 30 min vid 450 nm (referensfilter ≥ 590 nm)./ Pomiar w ciągu 30 min przy 450 nm (filtr odniesienia ≥ 590 nm)./ Ki mérése 30 percen belül 450 nm-nél (referenciaszűrő ≥ 590 nm)./ Merať 30 minút pri 450 nm/Měřit 30 minut při 450 nm/ Отчитане в рамките на 30 min при 450 nm (референтен филтър ≥ 590 nm)./ Mõõtmise 30 min jooksul 450 nm korral (võrdlusfilter ≥ 590 nm). Μέτρηση εντός 30 min στα 450 nm (φίλτρο αναφοράς ≥ 590 nm)./ Măsurare în decurs de 30 min la 450 nm (filtru de referință ≥ 590 nm)./ Izmerite ploščico v 30 min pri 450 nm (referenčni filter ≥590nm) / Mittaa 30 minuutin aikana 450 nm:ssä (referenssi suodatin ≥ 590 nm)
Literatur	Literature/ Literatur/ Bibliographie/ Letterario/ Bibliografía/ Literatura documentação/ literatuur/ Litteratur/ litteratur/ Literatura/ Irodalom/ Literatúra/ Literatura/ Литература// Kirjandus/ Βιβλιογραφία/ Bibliografie/ literatura/ Lähdeluettelo
International Test description	International test description/ internationale Testanleitung/ description internationale de test/ Istruzioni per il test internazionali/ Descripción de ensayo internacional/ Descrição internacional do teste/ internationale testbeschrijving/ internationell testbeskrivning/ Opis testu międzynarodowego/ nemzetközi teszt-útmutató/ Medzinárodný návod k testu/ Mezinárodní návod k testu/ rahvusvaheline katse kirjeldus/ Διεθνείς οδηγίες για εργαστηριακές δοκιμές/ instrucțiuni internaționale pentru testare/ mednarodna navodila za preizkus/ Kansainvälinen käyttöohje
End	in all required wells/ in allen benötigten Vertiefungen/ dans tous les godets requis/ in tutti i pozzetti richiesti/ en todos los pozos requeridos/ em todos os tubos necessários/ in alle nodige putjes/ i alle nødvendige brønde/ i alla nödvändiga brunnar/ we wszystkich potrzebnych wgłębieniach/ minden szükséges forrásban/ vo všetkých potrebných miestach/ ve všech potřebných místech/ във всички необходими ямки/ kõigis vajalikes süvendites/ σε όλες τις απαραίτητες κοιλότητες/ în toate cavitățile necesare/ v vseh zahtevanih vdolbinah /kaikkiin tarvittaviin mikrotitrauslevyn syvennyksiin

Nur zum In-vitro-Gebrauch.

Nur zum Gebrauch durch Fachpersonal.

Nur zu Forschungszwecken.

Nicht für humane oder tierische, therapeutische oder diagnostische Zwecke.

Vor Gebrauch ist die gesamte Packungsbeilage zu lesen!

For in vitro use only!

For Research Use Only!

For professional use only!

CAUTION: Not for human or animal therapeutic or diagnostic use.

Read entire protocol before use!

Symbols/ Symbole /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ Symbolen/ Symboler/ Symboler/ Symbole/
 Szimbólumok/ Symboly/ Symboly/ Символи/ Sümbolid/ Σύμβολα/ Simboluri/ Simboli/ Symbolit 2

Packungsbeilage

Deutsch

MEDIAGNOST PROGRAMULIN ELISA E103	5
ZUGELASSENER VERWENDUNGSZWECK	5
EINFÜHRUNG	5
MATERIALIEN	6
Inhalt der Testpackung	6
Zusätzlich benötigte Materialien	6
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	7
METHODE	8
GEEIGNETE PROBEN	8
Lagerung der Proben	8
Proben Vorbereitung	8
TECHNISCHE HINWEISE	9
TESTDURCHFÜHRUNG	10
AUSWERTUNG	11
Berechnung der Standardkurve	11
LEISTUNGSMERKMALE	12
Standard	12
Sensitivität	12
Spezifität	13
Wiederfindung	13
Matrix Effekte	13
Interferenz	13
Reproduzierbarkeit und Präzision	14
Die Verdünnungslinearität	14
ERWARTUNGSWERTE	14

Package Insert

English

INTENDED USE	15
INTRODUCTION	15
REAGENTS PROVIDED	17
MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	17
WARNINGS AND PRECAUTIONS	17
METHOD	18
SPECIMEN	18
Storage of the samples	18
Sample Preparation	19
TECHNICAL RECOMMENDATIONS	19
ASSAY PROCEDURE	20
ESTABLISHING THE STANDARD CURVE	21
PERFORMANCE CHARACTERISTICS	22
Standards	22
Sensitivity	22
Specificity	22
Recovery	23
Matix effects	22
Interference	23
Reproducibility and Precision	24
Linearity	24
EXPECTATION VALUES	24
LITERATUR / LITERATURE	25
KURZANLEITUNG MEDIAGNOST PROGRAMULIN ELISA E103	26
SUMMARY – MEDIAGNOST PROGRAMULIN ELISA E103	27
REF E103 International Test Description	28

PACKUNGSBEILAGE DEUTSCH

MEDIAGNOST PROGRANULIN ELISA E103

- ist geeignet für Progranulin Bestimmungen in **Serum-** und **Plasmaproben**
- ist durch die hohe **Sensitivität** (18 pg/ml) ebenfalls sehr geeignet für Messungen in Zellkultur-überständen und in Nicht-Serum-/ Plasmaproben (z.B. in Speichel, Urin, Muttermilch, Liquor, Amnionflüssigkeit)
- ist **schnell**: Inkubationszeit insgesamt nur **2 Stunden**
- ist kalibriert mit rekombinantem Progranulin:
Einzel-Standards mit **75, 250, 750, 1500** bzw. **2500 pg/ml** Progranulin sind im Kit enthalten
- Kontrollserum zur RiliBÄK-konformen **Qualitätssicherung**
- Testplatten enthalten **einzel** **abrechenbare Vertiefungen**, die Teste können genau an den individuellen Bedarf angepasst werden

ZUGELASSENER VERWENDUNGSZWECK

Messung von humanem Progranulin in menschlichem Serum und Plasma.

EINFÜHRUNG

Progranulin

Progranulin ist auch unter den Namen Granulin-Epithelin Vorläufer, Proepithelin oder Acrogranin bekannt. Es handelt sich um ein 68.5 kDa großes, 593 Aminosäuren (incl. Signalpeptid) umfassendes Protein, das stark glycosyliert vorliegt und daher in vivo eine Größe von ungefähr 90 kDa aufweist (1). Progranulin besitzt sieben konservierte Domänen, die durch Linker-Sequenzen getrennt werden. Mittels proteolytischer Spaltung, katalysiert durch Serine-Proteasen wie z.B. Elastase, entstehen 6-25 kDa große Fragmente, die als Granuline oder Epitheline bezeichnet werden. Progranulin wird in besonderem Maße in stark proliferierenden Geweben wie Lymphgewebe, Milz, Hautepithel, Magen-Darm-Schleimhaut aber auch hämatopoetischen Zellen oder Tumorzellen exprimiert und sekretiert. Rezeptoren, die die Wirkung von Progranulin oder den Granulinen vermitteln, sind bisher nicht bekannt (2, 3).

Progranulin scheint ein Faktor zu sein, der die Wundheilung positiv beeinflusst. Die Expression wird in Keratinozyten sowie Makrophagen und neutrophilen Zellen im Falle einer Verwundung gesteigert. Dabei beeinflusst Progranulin die Wundheilung indirekt über die Aktivierung von Makrophagen und Stimulation der Gefäßbildung im geschädigten Gewebe (4). Die physiologische Bedeutung von Progranulin und den Granulinen ist gegensätzlich. So kann Progranulin TNF- α vermittelte pro-inflammatorische Prozesse hemmen. Dagegen scheinen die Granuline die Sekretion pro-inflammatorischer Cytokine zu stimulieren. Der Einfluss von Progranulin auf entzündliche Prozesse konnte auch in arteriosklerotischen Plaques nachgewiesen werden. Hier wird Progranulin von glatten Muskelzellen exprimiert und beeinflusst die Migration von Monozyten und glatten Muskelzellen (5).

Im zentralen Nervensystem wird Progranulin von Mikroglia und Neuronen (neokortikale und hippocampale Pyramidenzellen sowie Purkinje-Zellen im Cerebellum) exprimiert. Auf mRNA Ebene konnte eine deutliche Steigerung der Expression bei Infektionen oder Verletzungen des ZNS gezeigt werden, beispielsweise in Mucopolysaccharidose Typ I und IIIB, bei viralen ZNS Entzündungen, im Falle von amyotropher lateraler Sklerose aber auch bei der Alzheimer Erkrankung. Darüber hinaus scheint Progranulin eine Bedeutung bei der Entwicklung geschlechtsspezifischer Unterschiede im Laufe der prä- und postnatalen Entwicklung zu besitzen und auch für die neuronale Plastizität im Erwachsenenalter von Bedeutung zu sein (6).

Progranulin und Frontotemporale Demenz (FTD)

Der Anteil der frontotemporalen Form der Demenz an der Gesamtheit aller Demenzerkrankungen liegt bei 5-10 %. Eine Mutation im Gen für Progranulin (PGRN) konnte bei 5-10 % der an FTD erkrankten Patienten nachgewiesen werden (2). Fast alle pathologischen Mutationen führen zu einem vorzeitigen Transkriptionsabbruch und dem schnellen Abbau der mutierten mRNA. Dies resultiert in einer PGRN Haploinsuffizienz mit deutlich erniedrigten Progranulinkonzentrationen im Serum. Aufgrund dieser

Ergebnisse wurde eine Reihe von Studien durchgeführt, um die Eignung von Progranulin als Marker für die PRGN abhängige frontotemporale Demenz abzuklären (7, 8).

Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass Progranulin schon prä-symptomatisch eine FTD detektieren kann. Aufgrund der fehlenden Standardisierung und die Nutzung unterschiedlicher Antikörper in den kommerziell verfügbaren Testsystemen, ist für jedes Testsystem ein eigener cut-off Wert zu definieren.

Progranulin und Adipositas

Im Falle von Adipositas und Typ 2 Diabetes laufen verstärkt Entzündungsprozesse ab, worauf der Anstieg an pro-inflammatorischen Cytokinen z.B. IL-6 oder der Konzentration des C-reaktiven Proteins hinweist. Youn et al. haben auf dieser Basis verschiedene Patientengruppen miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass bei Typ 2 Diabetikern die Plasmakonzentration von Progranulin im Vergleich zur Glukose-toleranten Gruppe signifikant (1.4fach) erhöht ist. Die Autoren weisen insbesondere auf die positive Korrelation der Progranulinkonzentration mit dem Volumen des viszeralen Fettgewebes hin. Dagegen konnte in dieser Studie kein Unterschied zwischen schlanken und subkutan adipösen Patienten gezeigt werden. Aus diesem Grund könnte eine Erhöhung der Progranulinkonzentration Rückschlüsse auf die Verteilung des Fettgewebes zulassen und damit ein Biomarker für viszerales Fettgewebe darstellen (9).

Der hier verfügbare Test basiert auf monoklonalen Antikörpern, die hochspezifisch nur Progranulin und nicht die einzelnen Granuline detektieren. Damit steht ein Werkzeug zur Verfügung, mit dem die Bedeutung von Progranulin als Biomarker für das viszerale Fettgewebe weiter untersucht und validiert werden kann. Das Testsystem wurde mit rekombinantem Progranulin (NS0-expressed) kalibriert. Test-spezifische Referenzwerte sind nicht verfügbar.

MATERIALIEN

Inhalt der Testpackung

1)	MTP	Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, mit 96 Vertiefungen , die in 12 abnehmbare Streifen á 8 Vertiefungen (einzeln abbrechbar) aufgeteilt ist. Die Platte ist mit einem Antikörper gegen humanes Progranulin beschichtet.
2)	CAL	Standards A-E , lyophilisiert, enthalten rekombinantes Progranulin. Die Verdünnungen der Standardkurve decken einen Bereich von 0,075 bis 2,5 ng/ml (75, 250, 750, 1500 und 2500 pg/ml) Progranulin ab und werden in je 1 ml Verdünnungspuffer VP rekonstituiert.
3)	DILU	Verdünnungspuffer VP, 50 ml , gebrauchsfertig, bitte zur Rekonstitution der Standards und Kontrollseren und zur Verdünnung der Proben und Kontrollseren verwenden.
4)	Control	Kontrollseren KS1 und KS2 lyophilisiert, enthalten humanes Serum und müssen in je 250 µl Verdünnungspuffer VP rekonstituiert werden. Die Progranulin Soll-Konzentration und Schwankungsbereiche sind auf den Etiketten angegeben. Sie sollten im Assay in den gleichen Verdünnungen (in Verdünnungspuffer VP) wie die jeweiligen Proben bestimmt werden.
5)	Ab	Antikörper-Konjugat AK, 6 ml , gebrauchsfertig, enthält biotinylierten anti-human Progranulin Antikörper. Für den Assay wird jeweils 50 µl pro Vertiefung eingesetzt.
6)	CONJ	Enzymkonjugat EK, 12 ml , gebrauchsfertig, enthält POD (Meerrettich-Peroxidase)-markiertes Streptavidin. Bitte 100 µl pro Vertiefung einsetzen.
6)	WASHBUF 20x	Waschpuffer WP, 50 ml, 20fach konzentrierte , Lösung, bitte vor Gebrauch 1:20 mit A. dest. oder entmineralisiertem Wasser verdünnen (z.B. den gesamten Flascheninhalt von 50 ml im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen). Achtung: endverdünnt ist der Waschpuffer nur 4 Wochen haltbar, bitte nur nach Bedarf ansetzen.
7)	SUBST	Substrat S, 12 ml , gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase-(POD)-Substrat, stabilisiertes H ₂ O ₂ -Tetramethylbenzidin
8)	H₂SO₄	Stopplösung SL, 12 ml , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure
9)		Abdeckfolie für Mikrotiterplatten, 2 Stück, selbstklebend

Zusätzlich benötigte Materialien

Destilliertes oder entmineralisiertes Wasser zum Verdünnen des Waschpuffers WP

Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen

Vortex-Mischgerät

Mikrotiterplattenschüttler (350 rpm)

Mikrotiterplattenwasher (empfohlen)

Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und ≥590 nm

Polyethylen PE/ Polypropylen PP Röhren zum Verdünnen der Proben

Progranulin ELISA E103

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Mediagnost E103 Kit ist nur zum In-vitro-Gebrauch und nicht zur inneren Anwendung bei Mensch und Tier geeignet. Dieses Produkt darf nur exakt, wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben, eingesetzt werden. Mediagnost kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht, soweit keine gesetzliche Regelung anderes besagt.

VORSICHT: Dieser Kit enthält Material humanen und/oder tierischen Ursprungs. Die Bestandteile des Kits sind so zu handhaben, als ob sie infektiös wären.

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

Die gemessenen Extinktionen sind u.a. stark abhängig von der Temperatur, aber die berechneten Werte werden durch die Temperatur nicht beeinflusst.

Bitte benutzen Sie separate Pipettenspitzen für jede Probe, Kontrolle und Reagenz, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Bitte verwenden Sie Behältnisse nur für jeweils einzelne Reagenzien. Gießen Sie die Reagenzien nicht zurück in die Originalgefäße. Mischen Sie den Inhalt der jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatten gründlich. Verwenden Sie die Mikrotiterplattenvertiefungen nur jeweils einmal. Lassen Sie keine Vertiefung während des Assay-Vorgangs völlig austrocknen, sondern fügen Sie die jeweils folgenden Reagenzien sofort nach dem Abschluss des Waschvorganges dazu.

Menschliches Serum

in folgenden Komponenten enthalten: **KS1 und KS2**

Das humane Material, das für die Präparation dieses Produktes verwendet wird, ist durch von der US-amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde FDA empfohlene Nachweisverfahren auf die Präsenz von Antikörpern gegen Humanes Immundefizienz-Virus (HIV I und II), gegen Hepatitis B-Oberflächenantigen und gegen Hepatitis C Virus geprüft und für negativ befunden worden. Da kein Test das Vorhandensein von infektiösen Erregern völlig ausschließen kann, sollten die Reagenzien gemäß der Vorgaben der Biosicherheitsstufe 2 gehandhabt werden.

2-Methyl-4-Isouthiazolin-3-one als Konservierungsmittel < 0.01% in folgenden Komponenten enthalten:

AK, EK, VP

R36/38	Reizend für Augen und Haut
R43	Kann bei Hautkontakt zur Sensibilisierung führen
S26	Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen
S28.1	Im Falle von Hautkontakt sofort mit viel Wasser waschen

5-Chloro-2-Methyl-2H-Isouthiazolin-3-one und 2-methyl-2H-Isouthiazol-3-one

als Konservierungsmittel < 0.01% in folgenden Komponenten enthalten: **AK, EK, VP, WP**

R36/38	Reizend für Augen und Haut
R43	Kann bei Hautkontakt zur Sensibilisierung führen
S26	Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen
S28.1	Im Falle von Hautkontakt sofort mit viel Wasser waschen

Substratlösung S

Das TMB-Substrat (S) enthält 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin.

R20/21/R22	Gesundheitsschädlich bei Inhalation, Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
R36/37/38	Reizend/Irritierend für Augen, Haut und Atmungssystem
S26	Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen
S36/37	Geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen

Stopplösung SL

Die Stopplösung enthält 0,2 M Schwefelsäure (H₂SO₄)

R36/38	Reizt die Augen und die Haut
S26	Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen
S36/37	Geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen

Erste-Hilfe Maßnahmen:

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

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

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

METHODE

Der Enzymimmunoassay für Progranulin E103 ist ein sogenannter Sandwich-Assay. Er verwendet spezifische, hochaffine monoklonale Antikörper. Der an die Mikrotiterplatte gekoppelte Antikörper bindet quantitativ das Progranulin aus der Probe, im nachfolgenden Schritt bindet ein Biotin-gekoppelte Antikörper am Progranulin. Danach kann das Streptavidin-Peroxidase-Enzymkonjugat hochspezifisch am Biotin des Antikörpers binden und in der anschließenden Substratreaktion den Farbumschlag quantitativ, abhängig vom Progranulingehalt der Proben, katalysieren.

GEEIGNETE PROBEN

Uneingeschränkt geeignet sind Serumproben. Des Weiteren zeigten 3.8 g/l Citrat, 5.4 mmol/l EDTA und 30 IE/ml Heparin keinen Einfluss auf die Progranulinmessung.

Lagerung der Proben

Lagerung bei RT	max. 3 Tage
Lagerung bei +4°C	max. 3 Tage
Lagerung bei -20°C	max. 2 Jahre

in fest verschließbaren Plastikgefäßen

Die Messwerte einer Serum- und einer Plasmaprobe zeigten bis zu 10 Auftau-/ Einfrierzyklen keine signifikanten Abweichungen, es wurden Werte im Bereich von 95 bis 101% des Sollwertes gefunden

Proben Vorbereitung

Die Proben müssen in **Verdünnungspuffer VP** verdünnt werden. Für die meisten Untersuchungen (Serum- oder Plasmaproben bei denen keine Extremwerte zu erwarten sind) sollten Serum- oder Plasmaverdünnungen von **1:41** in Verdünnungspuffer VP geeignet sein. Gegebenenfalls kann, je nach erwarteten Progranulinwerten, geringer oder stärker in Verdünnungspuffer VP verdünnt werden. Die gute Linearität des Testsystems (vgl. Tab. 6) ermöglicht eine Probenverdünnung von 1:20-1:320.

Die Progranulinkonzentration in anderen humanen Körperflüssigkeiten und in Kulturüberständen kann stark von den Serumwerten abweichen (s. Tab. 1).

Verdünnungsprotokoll:

400 µl Verdünnungspuffer VP in PE-/PP-Gefäße vorlegen (bei größeren Serien empfiehlt sich hierfür die Verwendung eines Multi-Steppers), dazu 10 µl Serum oder Plasma pipettieren (Verdünnung 1:41). Nach dem Mischen werden von dieser Lösung 50 µl pro Bestimmung im Assay eingesetzt.

TECHNISCHE HINWEISE

Reagenzien mit unterschiedlichen Lot-Nummern sollten nicht vermischt werden. Alle Reagenzien sind ungeöffnet, lichtgeschützt und bei 2° - 8°C gelagert mindestens haltbar bis zum Verfallsdatum (s. Etikett).

Bei sachgemäßer Handhabung ist die **Haltbarkeit der Reagenzien nach Öffnung** nicht beeinträchtigt. **Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.** Wenn mehrere unabhängige Messungen über eine längere Periode mit einem Kit geplant sind, wird vorherige Aliquotierung der Komponenten in passende Volumina empfohlen.

Alle Komponenten des Kits müssen **vor Gebrauch auf Raumtemperatur** gebracht werden, die eventuell in manchen Puffern vorhandenen Präzipitate müssen vor Gebrauch durch Mischen und Erwärmen wieder gelöst werden.

Inkubation bei Raumtemperatur bedeutet: Inkubation bei 20 - 25°C.

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

Korrektes Waschen ist von grundlegender Bedeutung für den sicheren, richtigen und präzisen Ablauf des Testes. Ungenügendes Waschen ist eine häufige Ursache für nicht valide Testdurchführungen. Mögliche Folgen sind unkontrollierte unspezifische Variationen der gemessenen optischen Dichten, die zu falschen Ergebnisberechnungen der Proben führen können. Mögliche Hinweise darauf sind z.B. hohe Leerwerte und variabel streuende Messwerte.

Zum Waschen muss der mitgelieferte und auf Gebrauchskonzentration verdünnte Waschpuffer verwendet werden. Das Waschvolumen pro Waschzyklus und Vertiefung muss mindestens 300 µl betragen.

Die mögliche Gefährdung durch den Umgang mit zumindest potentiell infektiösem Material muss beachtet werden.

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

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

Standards und Kontrollen

Für die **Rekonstitution** der lyophilisierten **Standards A-E** muss der im Kit erhaltene **Verdünnungspuffer VP** verwendet werden.

Für die **Rekonstitution** der lyophilisierten **Kontrollen KS1 und KS2** muss der **Verdünnungspuffer VP** verwendet werden. Sie sollten im Assay in der gleichen Verdünnung **in Verdünnungspuffer VP** wie die jeweiligen Proben bestimmt werden.

Es empfiehlt sich zum Rekonstituieren, die Reagenzien 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen zu lassen und sie anschließend kräftig mit einem Vortex-Mixer zu mischen. Schaumbildung muss vermieden werden.

Die rekonstituierten Standards und Kontrollen können bei -20°C für 2 Monate gelagert werden.

Waschpuffer

Das benötigte Volumen des Waschpuffers wird vorbereitet, indem das 20fache Konzentrat im Verhältnis 1:20 mit entionisiertem Wasser verdünnt wird. Der endverdünnte Waschpuffer kann 4 Wochen bei 4°C gelagert werden und ist vor Gebrauch auf Raumtemperatur zu bringen.

Testplatte

Nicht verwendete Streifen der Testplatte sind zusammen mit dem Trockenkissen luftdicht in dem wiederverschließbaren Klippbeutel bei 2° - 8°C zu lagern. Die Haltbarkeit ist bei sachgerechter Lagerung nicht eingeschränkt.

Substrat

Die Substratlösung S, stabilisiertes H₂O₂-Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich – Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

TESTDURCHFÜHRUNG

Bei der Testdurchführung sollten Standards A-E, Kontrollseren KS1&KS2 und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden (z.B. in 15 Minuten). Das Enzymkonjugat EK sowie nachfolgend die Substratlösung S sollten in der gleichen Reihenfolge und in dem gleichen Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Ebenso sollte die Stopplösung SL in der gleichen Reihenfolge und im gleichen Zeitintervall wie die Substratlösung auf die Testplatte gegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

Die Messungen (Standards, Kontrollen und Proben) sollten stets in Doppelbestimmung durchgeführt werden. Um optimale Ergebnisse zu erhalten, ist auf genaues Pipettieren und strikte Befolgung des Testprotokolls zu achten.

- 1) In **alle** Vertiefungen, die benutzt werden, bitte **50 µl Antikörperkonjugat AK** pipettieren.
- 2) In die Positionen A1/2 werden je **50 µl Verdünnungspuffer VP** gegeben, sowie
in die Positionen B1/2 werden je **50 µl Standard A (75 pg/ml)**,
in die Positionen C1/2 je **50 µl Standard B (250 pg/ml)**,
in die Positionen D1/2 je **50 µl Standard C (750 pg/ml)**,
in die Positionen E1/2 je **50 µl Standard D (1500 pg/ml)**,
in die Positionen F1/2 je **50 µl Standard E (2500 pg/ml)**.
Zur Kontrolle der korrekten Durchführung des Tests können je **50 µl** der 1:41 in Verdünnungspuffer VP (oder im jeweiligen Verdünnungsverhältnis der Proben) verdünnte **Kontrollen KS1 und KS2** in die Positionen G1/2 bzw. H1/2 gegeben werden.

In die restlichen Vertiefungen können je **50 µl der verdünnten Proben** (i.Allg. 1:41 in Verdünnungspuffer VP verdünnt) pipettiert werden.

- 3) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **1 Stunde** bei **Raumtemperatur** inkubiert (unter Schütteln 350 rpm).

- 4) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Lösungen abgesaugt und die Platte mit **300 µl Waschpuffer WP** / Vertiefung **fünfmal** gewaschen.
- 5) Nach dem letzten Waschschrift werden **100 µl Enzymkonjugat EK** in jede Vertiefung pipettiert.
- 6) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **30 Minuten** bei **Raumtemperatur** inkubiert (unter Schütteln 350 rpm).
- 7) Nach Abschluss dieser Inkubation wird die Platte wie in Schritt 4) beschrieben gewaschen.
- 8) In jede Vertiefung werden **100 µl der Substratlösung S** pipettiert.
- 9) Die Platte wird **30 Minuten im Dunkeln** bei **Raumtemperatur** inkubiert.
- 10) Nach Ablauf der Inkubationszeit wird in jede Vertiefung **100 µl Stopplösung SL** pipettiert.
- 11) Die Ausmessung der Farbreaktion erfolgt **innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)**.

AUSWERTUNG

Berechnung der Standardkurve

Zur Auswertung des Testes sollte gewährleistet sein, dass die Extinktionen des Leerwertes 0,3 Einheiten nicht überschreiten, Standard E sollte dagegen Extinktionen über 0,8 Einheiten erreichen. Proben, die höhere Extinktionen als der Standard E erzielen, liegen außerhalb der Standardkurve, zur sicheren Bestimmung sollten diese Proben in einer zweiten Testdurchführung bei höherer Verdünnung nochmals bestimmt werden.

Die bereitgestellten Standards enthalten folgende Progranulinkonzentrationen:

Standard	A	B	C	D	E
ng/ml	0,075	0,25	0,75	1,5	2,5
pg/ml	75	250	750	1500	2500

- 1) Ermittlung des Mittelwerts der optischen Dichte des Leerwertes aus den Doppelbestimmungen (Vertiefung A1/A2).
- 2) Von den Mittelwerten der optischen Dichte der Standardkonzentrationen und der Proben wird der mittlere Leerwert abgezogen.
- 3) Die Standardkonzentrationen (x-Achse) werden gegen die gemessene optische Dichte (y-Achse) aufgetragen.
- 4) Die Berechnung der Standardkurve sollte durch ein statistisches Programm erfolgen, da die Kurve i. Allg. nicht ideal durch eine lineare Regression beschrieben wird. **Ein höhergradiges Polynom, 4-Parameter-Anpassungen** oder **nicht-lineare Regression** sind zur Auswertung geeignet, in manchen Fällen kann eine Spline oder Punkt-zu-Punkt Anpassung angebracht sein.
- 5) Die **Multiplikation** des jeweiligen für die Proben berechneten Progranulingehaltes mit dem entsprechenden **Verdünnungsfaktor** der Proben ergibt die Progranulinkonzentration in ng/ml (oder pg/ml, je nach gewählter Einheit der Standards).

Die beispielhafte Standardkurve

Grp. 1: $y = -0.0033673 + 0.0010631 \cdot x - 1.0125e-007 \cdot x^2 + 2.8552e-011 \cdot x^3$ $d = 0.00220$

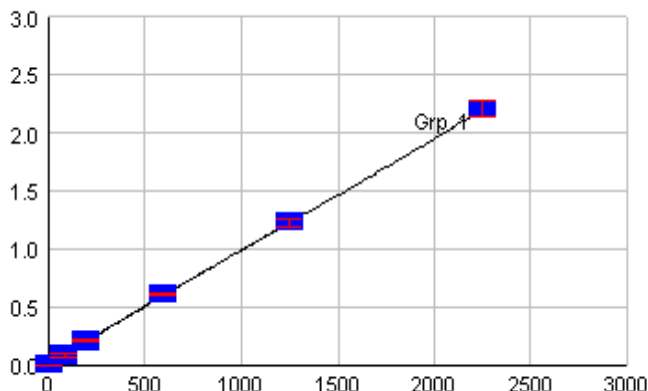


Abb. 1: Typische Standardkurve mit einem Polynom 3. Grades zur Berechnung der Standardkurve

Die hier beispielhaft gezeigte Standardkurve (Abbildung 1) darf **nicht für die Auswertung** Ihres Testes genutzt werden. Für jeden Test ist eine eigene Standardkurve anzufertigen.

Beispielhafte Berechnung der Progranulinkonzentration einer 1:41 verdünnten Probe:

Gemessene Extinktion der Probe: 0,56
 Gemessene Extinktion des Nullwertes: 0,03

Aus der Differenz der Probenextinktion und der Extinktion des Leerwertes (0,03) berechnet Ihr Auswertungsprogramm mit der entsprechenden Kurvenanpassung (hier: Polynom 3. Grades) die Progranulinkonzentration der verdünnten Probe durch Auflösen der Gleichung aus Abb. 1 nach x. In diesem Fall ergibt sich eine Progranulinkonzentration in der verdünnten Probe von

$$0,53 = -0,0033673 + 0,0010631x - 1,0125 \times 10^{-7} x^2 + 2,8552 \times 10^{-11} x^3$$

$$0,5146 = x$$

und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (**1:41**) somit eine Progranulinkonzentration in der unverdünnten Probe von

$$0,5146 \times 41 = 21,10 \text{ ng/ml}$$

LEISTUNGSMERKMALE

Standard

Die Standards des ELISA E103 bestehen aus **rekombinantem humanem** Progranulin in Konzentrationen von **75, 250, 750, 1500 bis 2500** pg/ml (pico Gramm/ml, entspricht 0,075 bis 2,5 nano Gramm/ml).

Sensitivität

Die analytische Sensitivität des Assays beträgt **0,018 ng/ml** (18 pg/ml; zweifache Standardabweichung des Null-Standards in 19facher Bestimmung).

Spezifität

Handelsübliche Seren von Rind, Katze, Huhn, Hund, Esel, Ziege, Meerschweinchen, Pferd, Maus, Schwein, Kaninchen, Ratte und Schaf wurden 1:5 und 1:41 verdünnt im Test eingesetzt und die Signalintensität wurde gemessen. Es konnte keine Kreuzreaktivität nachgewiesen werden.

Wiederfindung

Die Wiederfindung von rekombinantem Progranulin in Serum und Plasmaproben variierte zwischen 91% und 101%.

Matrixeffekte

Tabelle 1: Matrixeffekte: % Wiederfindung von rekombinantem Progranulin in verschiedenen Körperflüssigkeiten.

Matrixeffekte						
Verdünnung [1:x]	2	5	10	20	40	100
Speichel	> max.	> max.	102 %	-	-	-
Urin	106 %	102 %	107 %	-	-	-
Muttermilch	> max.	> max.	> max.	> max.	> max.	108 %
Zellkulturmedium	69 %	81 %	91 %	104 %	-	-
Liquor	73 %	88 %	93 %	-	-	-
Amnionflüssigkeit	> max.	> max.	> max.	> max.	100 %	100 %

- = nicht bestimmt

Interferenz

Die Interferenz physiologisch auftretender Substanzen wurde durch Zugabe unterschiedlicher Mengen dieser Substanzen zu Serumproben getestet. In Tabelle 2 ist die relative Wiederfindung im Vergleich zum Serum ohne Zusätze für die maximal zugegebene Menge der potentiell interferierenden Substanz dargestellt.

Tabelle 2: %-Wiederfindung von Progranulin im Vergleich zum Normalserum

	Triglyceride [100 mg/ml]	Bilirubin [200 µg/ml]	Hämoglobin [1 mg/ml]
%	104	104	117

Keine der untersuchten Substanzen beeinflussten das Ergebnis des Testes signifikant.

Die Einflüsse der Koagulationshemmstoffe wurden durch Zugabe der angegebenen Konzentrationen der jeweiligen Hemmstoffe in Verdünnungspuffer VP bzw. in PBS, die mit 1250 pg/ml Progranulin angereichert wurden, untersucht. Die relativen Werte von Progranulin gemessen im Koagulationshemmstoff angereicherten Proben im Vergleich zu Proben ohne Koagulationshemmstoffe werden gezeigt.

Tabelle 3: Die Einflüsse der Koagulationshemmstoffe.

		Wiederfindung in %
[3,8 g/l]	Citrat	95
[5,4 mmol/l]	EDTA	93
[30 IE/ml]	Heparin	98

Keine der untersuchten Substanzen beeinflussten das Ergebnis des Testes signifikant.

Reproduzierbarkeit und Präzision

Die **Inter-** und **Intra-Assay** Variationskoeffizienten sind **kleiner als 8,0 bzw. 4,4 %**. Beispielhafte Bestimmungen sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 4: Inter-Assay-Varianz (angegeben sind Werte aus je 14 unabhängigen Durchführungen)

	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	VK (%)
Probe 1	36,78	2,49	6,76
Probe 2	23,40	1,87	7,99
Probe 3	21,52	1,37	6,36

Tabelle 5: Intra-Assay-Varianz

	Anzahl der Bestimmungen	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	VK (%)
Probe 1	19	25,61	0,87	3,38
Probe 2	19	49,74	2,17	4,35

Verdünnungslinearität

Die Linearität der Probenverdünnungen ist gegeben bei Verdünnungen von 1:20 bis 1:320.

Tabelle 6: Verdünnungslinearität (hier: typische Ergebnisse dreier verschiedener Seren).

Verdünnung:	Probe 1 [ng/ml]	Probe 2 [ng/ml]	Probe 3 [ng/ml]
1:20	21,12	14,34	40,56
1:40	23,58	14,08	45,95
1:80	22,17	15,14	46,17
1:160	20,64	16,08	46,89
1:320	19,53	15,59	47,65
MW / 1SA / VK%	21,41 / 1,54 / 7,20	15,05 / 0,84 / 5,57	45,44 / 2,81 / 6,18

MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient

ERWARTUNGSWERTE

Die Progranulin Konzentrationen in humanen Serumproben von gesunden Probanden im Alter zwischen 20 und 65 wurden mit dem Mediagnost E103 Kit gemessen. Die Konzentration aller Proben lagen im Bereich von 21,85 ng/ml bis 53,22 ng/ml (s. Tabelle 7).

Tabelle 7: Erwartungswerte in Serum gesunder Erwachsener.

Geschlecht	Anzahl der Proben	Median [ng/ml]	Mittelwert [ng/ml]	Standardabweichung [ng/ml]	Min. – Max.: [ng/ml]
weiblich	20	32,22	31,60	5,62	21,85-40,57
männlich	20	30,71	33,06	8,11	22,27-53,22
gesamt	40	31,32	32,33	17,35	21,85-53,22

PACKAGE INSERT ENGLISH

Mediagnost Progranulin ELISA E103

- is suited for Progranulin determination in **Serum** and **Plasma** samples
- is extremely **sensitive (18 pg/ml)** and, thus allows measurements in cell culture media too and in specimens others than serum e.g. in Cerebrospinal fluid, Amnion fluid, Saliva, Urine, Breast milk
- is **fast**: incubation time a total of 2 hours
- Single Standards with **75, 250, 750, 1500, 2500 pg/ml** human Progranulin are provided in the Kit
- 2 Control Sera are provided for quality control purposes according GLP
- is calibrated with **recombinant Progranulin**
- Microtiter plates are separately breakapart, tests can be adapted to individual requirements

INTENDED USE

Measurement of human Progranulin in human Serum and Plasma Sample

INTRODUCTION

Progranulin is also known as Granulin Epithelin Precursor, Proepithelin or Acrogranin. It is a 68.5 kDa protein, consisting of 593 amino acids (inclusive Signalpeptid), which appears in vivo in strongly glycosylated form and therefore has a size of approximately 90 kDa (1).

Progranulin has seven conserved domains, which are separated by linker sequences. By means of proteolytic cleavage, catalyzed by serine proteases like e.g. elastase, 6-25 kDa large fragments result, that are called Granulines or Epithelines. Progranulin is expressed and secreted in particular in strongly proliferating tissues such as adenoid tissue, spleen, skin epithelium, gastrointestinal mucous membranes, haematopoietic cells and in tumor cells. Until now no specific receptors, which would obtain the effect of Progranulin or the Granulines are known (2, 3).

Progranulin seems to be a factor, which affects the wound healing positively. In case of skin lesions the expression is increased in ceratinocytes, in macrophages and in neutrophile cells. Progranulin affects the wound healing indirectly by activation of macrophages and stimulation of angiogenesis in the damaged tissue (4). The physiological effects of Progranulin and Granulines are oppositional. Progranulin can restrain TNF α mediated pro-inflammatory processes. On the other hand the Granulines seem to stimulate the secretion of pro-inflammatory cytokines. The influence of Progranulin on inflammatory processes could be shown also in arteriosclerotic plaques. Here Progranulin is expressed by smooth muscle cells and affects the migration of monocytes and smooth muscle cells (5). In the central nervous system Progranulin is expressed in microglia and neurons (in neocortical and hippocampal pyramid cells as well as in purkinje cells in the cerebellum).

On mRNA level a clear increase of Progranulin expression could be shown during infections or injuries of the CNS, for example in mucopolysaccharidosis type I and IIIB, in viral inflammations of CNS, in amyotrophic lateral sclerosis and in Alzheimer's disease. Beyond that Progranulin seems to be of relevance in the development of sex specific differences during pre- and postnatal development and also for the neural plasticity in adults (6).

Progranulin and Frontotemporal Dementia (FTD)

5-10 % of all dementias are of the frontotemporal form. A mutation in the gene for Progranulin (PGRN) could be shown in 5-10 % of the patients suffering FTD (2). Nearly all

pathological mutations lead to a premature transcription interruption and to rapid degradation of the mutated mRNA. This results in a PGRN haploinsufficiency with clearly decreased Progranulin concentrations in serum. Due to these results several studies were accomplished, in order to clarify the suitability of Progranulin as marker for the PRGN dependent frontotemporal dementia (7, 8).

The results of these studies show that Progranulin can detect already presymptomatically a FTD. Due to the missing standardisation and the use of different antibodies in the commercially available test systems cut off value must be evaluated for each assay separately.

Progranulin and Adiposity

Inflammatory processes are often increased in case of adiposity and type 2 diabetes, which is reflected by e.g. in the increase of the C-reactive Protein and pro-inflammatory cytokines e.g. IL-6. Youn et al. compared different groups of patients and have shown that the plasma concentration of Progranulin is significantly (1.4-fold) increased in type 2 diabetics compared to glucose-tolerant patients. The authors refer in particular to the positive correlation of the Progranulin concentration to the volume of the visceral adipose tissue. On the other hand no difference between slim and subcutaneous adipose patients has been detected in this study. For this reason the increase of the Progranulin concentration may reflect the body distribution of adipose tissue and thus represent a biomarker for visceral adipose tissue (9).

The Mediagnost Progranulin ELISA E103 is based on monoclonal antibodies, which detect with high specificity only Progranulin and not the single Granulines. Thus, a tool is available for the further investigation and validation of Progranulin as a biomarker for the visceral adipose tissue.

REAGENTS PROVIDED

1)	MTP	Microtiter plate , ready for use, with 96 wells, dived up in 12 stripes à 8 wells (separately breakapart), coated with human Progranulin antibody.
2)	CAL	Standards A-E, lyophilised , contain recombinant Progranulin . Standard values are between 0.075 – 2.5 ng/ml (75, 250, 750, 1500 und 2500 pg/ml) Progranulin and have to be reconstituted with 1 ml (each) Dilution Buffer VP . Use 50 µl pro well in the assay.
3)	DILU	Dilution buffer VP, 50 ml , ready for use, after shaking. Please use this for the reconstitution of Standards and Control Sera and for the dilution of Control Sera and Samples .
4)	Control	Control Sera KS1 and KS2, 250 µl , lyophilised, contain human Serum and should be reconstituted in each 250 µl Dilution Buffer VP . The Progranulin target values and the respective ranges are given on the vial labels. The dilution should be according to the dilution of the respected samples. Use 50 µl pro well in the assay.
5)	Ab	Antibody Conjugate AK, 6 ml , ready for use, contains the biotinylated anti-Progranulin antibody. Use 50 µl for each well in the assay.
6)	CONJ	Enzyme Conjugate EK, 12 ml , ready for use, contains horseradisch-peroxidase conjugate to streptavidin, Use 100 µl for each well in the assay.
7)	WASHBUF 20x	Washing Buffer (WP), 50 ml, 20-fold concentrated solution . Washing Buffer (WP) has to be diluted 1:20 with distilled or demineralised water before use (e.g. add the complete contents of the flask (50 ml) into a graduated flask and fill up with A. dest. to 1000 ml). Attention: After dilution the Washing Buffer is only 4 weeks stable, dilute only according to requirements.
8)	SUBST	Substrate (S), 12 ml , ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP)-substrate, stabilised H ₂ O ₂ Tetramethylbendidine.
9)	H ₂ SO ₄	Stopping Solution (SL), 12 ml , ready for use, 0.2 M sulphuric acid, Caution acid!
10)		Sealing tape for covering of the microtiter plate, 2 x, adhesive.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Precision pipettes and multichannel pipettes with disposable plastic tips
 Distilled or deionized water for dilution of the Washing Buffer (WP)
 Vortex-mixer
 Microtiter plate shaker (350 rpm)
 Microtiter plate washer (recommended)
 Micro plate reader ("ELISA-Reader") with filter for 450 and ≥590 nm
 Polyethylen PE/Polypropylen PP tubes for dilution of samples

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For in-vitro use only. For professional use only.

Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.

Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.

Caution: This kit contains material of human and/or animal origin. Source human serum for the Control Serum provided in this kit was tested by FDA recommended methods and found non-reactive for Hepatitis-B surface antigen (HBsAg), Hepatitis C virus (HCV), and Human Immunodeficiency Virus 1 and 2 (HIV) antibodies. No known test methods can offer total assurance of the absence of infectious agents; therefore all components and patient's specimens should be treated as potentially infectious.

Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step. Use separate pipette tips for each sample, control and reagent to avoid cross contamination. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps. Do not use expired reagents.

2-Methyl-4-Isothiazolin-3-one

Following components contain < 0.01% **2-Methyl-4-isothiazolin-3-one** solution as preservative **A-E, AK, EK, VP**
< 0.01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one Solution

R36/38	Irritating to eyes and skin
R43	Sensibilisation through skin contact possible
S26	In case of contact with eyes rinse immediately with plenty of water and seek medical advice
S28.1	After contact with skin wash immediately with plenty of water

5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-Isothiazol-3-one

Following components contain < 0.01%(w/w) 5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one as preservative: **A-E, AK, EK, VP, WP**

R36/38	Irritating to eyes and skin
R43	Sensibilisation through skin contact possible
S26	In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice S28.1
S28.1	After contact with skin, wash immediately with plenty of water

Stop solution contains 0.2 M Sulfuric Acid (H₂SO₄)

R36/38	Irritating to eyes and skin
S26	In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice
S28.1	After contact with skin, wash immediately with plenty of water
S36/37	Wear suitable protective clothing and gloves.

TMB-Substrate (S) contains 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine. Store and incubate in the dark.

R20/21/R22	Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed
R36/37/38	Irritating to eyes, respiratory system and skin
S26	In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice
S28.1	After contact with skin, wash immediately with plenty of water
S36/37	Wear suitable protective clothing and gloves

General first aid procedures:

Skin contact: Wash affected area thoroughly with water. Discard contaminated cloths and shoes.

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

Ingestion: If swallowed, wash out mouth thoroughly with water. Immediately see a physician.

Do not eat, drink or smoke in these areas.

Never pipette the materials with the mouth.

Spilled material must be wiped off immediately and should become disinfected. Clean contaminated areas and equipment with a suitable detergent.

METHOD

The enzyme immunoassay for Progranulin E103 is a so-called Sandwich-Assay. It utilizes specific and high affinity monoclonal antibodies for this protein. The Progranulin in the samples binds to the immobilized first antibody on the microtiter plate. In the following step, the biotinylated antibody binds in turn to Progranulin. After washing, Streptavidin-Peroxidase-Enzyme conjugate will be added, which will bind highly specific to the biotin and will catalyse the enzymatic reaction, which turns the colour of the substrate, quantitatively depending on the Progranulin level of the samples.

SPECIMEN

Serum and plasma samples can be used in this assay. No influence of 3.8 g/l Citrate, 5.4 mmol/l EDTA nor 30 IE/ml Heparin were shown on the measurement of Progranulin by the recovery experiments.

Storage of the samples

Storage at RT max. 3 days

Storage at +4°C max. 3 days

Storage at -20°C max. 2 years

in tightly closable plastic tubes.

The measured values of serum and plasma samples did not show significant deviations up to 10 thaw/freezing cycles, values within the range of 95 to 101% of the target value were found.

Sample Preparation

Samples have to be diluted in Dilution Buffer (VP). For most of the determinations (serum or plasma samples, and no extreme values are expected) a serum or plasma dilution **of 1:41 with Dilution Buffer VP** should be suitable. According to expected Progranulin levels the dilution with VP can be higher or lower. The excellent linearity of this test system allows sample dilution of 1:20 to 1:320 (see table 6).

Progranulin concentrations may be completely different in body fluids of human origin other than serum or cell culture supernatants (see table 1).

Suggestion for dilution protocol:

Pipette **400 µl Dilution Buffer VP** in PE-/PP-Tubes (application of a multi-stepper is recommended in larger series), add **10 µl Serum- or Plasma** (dilution 1:41). After mixing use 50 µl per determination of this dilution in the assay.

TECHNICAL NOTES

Reagents with different lot numbers cannot be mixed. All reagents are stable until the indicated expiry, if stored unopened and protected from sunlight at 2 – 8°C.

The shelf life of the components after opening is not affected, if used appropriately.

Bring all reagents to room temperature (20 - 25°C) before use. Possible precipitations in the buffers have to be resolved before usage by mixing and / or warming.

Incubation at room temperature means: Incubation at 20-25°C

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

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

All washing must be performed with the provided washing buffer diluted to usage concentration. Washing volume per washing cycle and well must be 300 µl at least.

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

When using an automatic microtiter plate washer, the respective instructions for use must be carefully followed. Device adjustments, e.g. for plate geometry and the provided washing parameters, must be performed. Dispensing and aspirating manifold must not scratch the inside well surface. Provisions must be made that the remaining fluid volume of every aspiration step is minimized. Following the last aspiration step of each washing cycle, this could be controlled, and possible remaining fluid could then be removed, by inverting the plate and repeatedly tapping it dry on non fuzzy absorbent tissue.

Manual washing is an adequate alternative option. Washing Buffer may be dispensed via a multistepper device, a multichannel pipette, or a squirt bottle. The fluid may be removed by dynamically swinging out the microtiter plate over a basin. If aspirating devices are used, care has to be taken that the inside well surface is not scratched. Subsequent to every single washing step, the remaining fluid should be removed by inverting the plate and repeatedly tapping it dry on non fuzzy absorbent tissue.

Standards and Controls

For the reconstitution of the lyophilised **Standards A - E Dilution Buffer VP** has to be used.

The lyophilised **Control Sera KS1 and KS2** must be **reconstituted** with the **Dilution Buffer VP**. The dilution should be according to the dilution of the respected samples. It is recommended to keep reconstituted reagents at room temperature for 15 minutes and then to mix them thoroughly but gently (no foam!) with a Vortex mixer.

The reconstituted standards and controls can be stored for 2 months at -20°C . Repeated freeze/thaw cycles have to be avoided.

Washing Buffer

The required volume of Washing Buffer is prepared by 1:20 dilution of the provided 20-fold concentrate with deionised water. The diluted Washing Buffer is stable for 4 weeks at $2-8^{\circ}\text{C}$. It has to be at room temperature for usage!

Microtiter plate

Store the once unused microtiter strips and wells together with the desiccant in the tightly closed clip lock bag at $2-8^{\circ}\text{C}$ use in the frame provided. The labelled expiry is not influenced in case of proper storage.

Substrate Solution

The Substrate Solution (S), stabilised H_2O_2 -Tetramethylbencidine, is photosensitive – store and incubate in the dark.

ASSAY PROCEDURE

When performing the assay, the Standards **A-E**, Control Sera **KS1& KS2** and the samples should be pipetted as fast as possible (e.g., 15 minutes). To avoid distortions due to differences in incubation times, the Enzyme Conjugate **EK** as well as the succeeding **Substrate Solution S** should be added to the plate in the same order and in the same time interval as the samples. **Stop Solution SL** should be added to the plate in the same order as the Substrate Solution **S**.

All determinations (Standards, Control Sera and samples) should be assayed in duplicate.

For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

- 1) Add **50 μl Antibody Conjugate AK** in **all** wells used.
- 2) Pipette in positions A1/2 **50 μl Dilution Buffer VP**
- 3) Pipette in positions B1/2 **50 μl of the Standard A (75 pg/ml)**,
pipette in positions C1/2 **50 μl of the Standard B (250 pg/ml)**,
pipette in positions D1/2 **50 μl of the Standard C (750 pg/ml)**,
pipette in positions E1/2 **50 μl of the Standard D (1500 pg/ml)**,
pipette in positions F1/2 **50 μl of the Standard E (2500 pg/ml)**.

To control the correct accomplishment of the assay **50 μl** of the 1:41 (or in respective dilution ratio of the samples) in Dilution Buffer VP diluted **Control Sera KS1/KS2** can be pipetted in positions G1/2 and H1/2.

Pipette **50 μl** each of the diluted samples (e.g. dilute 1:41 with **Dilution Buffer VP**) in the rest of wells, according to your requirements.

- 4) Cover the wells with sealing tape and incubate the plate for **1 hour at room temperature** (shake at ≥ 350 rpm)
- 5) After incubation aspirate the contents of the wells and wash the wells **5 times 300 μl Washing Buffer WP** / well.
- 6) Following the last washing step pipette **100 μl** of the **Enzyme Conjugate EK** in each well.

- 7) Cover the wells with sealing tape and incubate the plate for **30 Minutes** at **room temperature** (shake 350 rpm).
- 8) After incubation wash the wells **5 times** with Washing Buffer **WP** as described in step 5.
- 9) Pipette **100 µl** of the **Substrate Solution S** in each well.
- 10) Incubate the microtiter plate for **30 minutes** in the **dark** at **room temperature**.
- 11) Stop the reaction by adding **100 µl Stopping Solution SL** to all wells.
- 12) Measure the absorbance within **30 minutes** at **450 nm (Reference filter ≥ 590 nm)**

ESTABLISHING THE STANDARD CURVE

For the evaluation of the assay it is preconditioned that the absorbance values of the blank should be below 0.3, these of standard E should exceed 0.8.

Samples, which yield higher absorbance values than Standard E are beyond the standard curve, for reliable determinations these samples should be tested anew with a higher dilution.

The standards provided contain the following concentrations of Progranulin:

Standard	A	B	C	D	E
ng/ml	0.075	0.25	0.75	1.5	2.5
pg/ml	75	250	750	1500	2500

- 1) Calculate the mean absorbance (MA) value for the blank from the duplicated determination (well A1/A2).
- 2) Subtract the mean absorbance (MA) of the blank from the mean absorbances of all other values.
- 3) Plot the standard concentrations on the x-axis versus the mean value of the absorbance of the standards on the y-axis.
- 4) Recommendation: Calculation of the standard curve should be done by using a computer program because the curve is in general (without respective transformation) not ideally described by linear regression. **A higher-grade polynomial, or four parametric logistic (4-PL) curve fit or non-linear regression** are usually suitable for the evaluation (as might be spline or point-to-point alignment in individual cases).
- 5) The **Progranulin concentration** of the diluted sample or the diluted control sera in pg/ml (or ng/ml according the chosen unit for the standards) is calculated in this way, the Progranulin concentrations of the **undiluted samples** and of control sera are calculated **by multiplication with the respective dilution factor**.

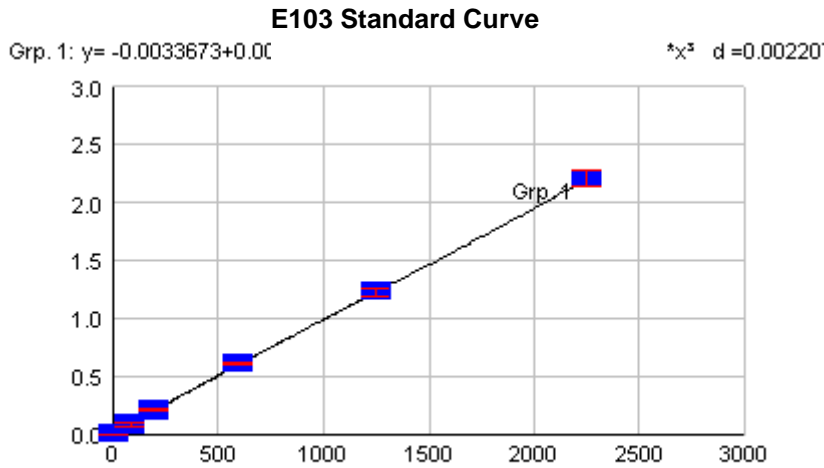


Fig. 1. Exemplary Standard Curve with a polynomial 3 as curve fit.

The exemplary shown standard curve in Fig.1 **cannot** be used for calculation of your test results. You have to establish a standard curve for each test you conduct!

Exemplary calculation of the Progranulin concentration of a 1:41 diluted sample:

Measured extinction of your sample	0.56
Measured extinction of the blank	0.03

Your measurement program will calculate the Progranulin concentration of the diluted sample automatically by using the difference of sample and blank (0.03) for the calculation. You only have to determine the most suitable curve fit (here: polynomial 3 degree).

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

$$0.53 = -0.0033673 + 0.0010631x - 1.0125 \times 10^{-7}x^2 + 2.8552 \times 10^{-11}x^3$$

$$0.5145 = x$$

if the dilution factor (1:41) is taken into account, the Progranulin concentration of the undiluted sample is

$$0.5145 \times 41 = 21.10 \text{ ng/ml}$$

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Standards

The standards are prepared from recombinant human Progranulin in concentrations of 75, 250, 750, 1500 and 2500 pg/ml (pico gram/ml, equal to 0.075 -2.5 nano gram/ml).

Sensitivity

The **analytical sensitivity** of the assay yields **0.018 ng/ml** (pg/ml; as 2x SD of zero standard in 19fold determination).

Specificity

Commercially available sera from bovine, cat, chicken, dog, donkey, goat, guinea pig, horse, mouse, pig, rabbit, rat and sheep were diluted 1:5 und 1:41 and used as samples in this assay system and the signal intensity was measured. No cross reactivity was detected.

Recovery

The recovery of recombinant Progranulin in serum and plasma samples varied from 91 to 101%.

Matrix effects

Table 1: Matrix effects: % Recovery of recombinant Progranulin in different body fluids

Matrix effects						
Dilution [1:x]	2	5	10	20	40	100
Saliva	> max.	> max.	102 %	-	-	-
Urine	106 %	102 %	107 %	-	-	-
Breast milk	> max.	> max.	> max.	> max.	> max.	108 %
Cell culture media	69 %	81 %	91 %	104 %	-	-
Cerebrospinal fluid	73 %	88 %	93 %	-	-	-
Amnion fluid	> max.	> max.	> max.	> max.	102 %	100 %

- = not determined

Interference

Interference of physiological appearing substance with the Progranulin measurement was investigated. Serum samples have been enriched with different concentrations of possibly interfering substances and the amount of Progranulin was measured and compared with the Progranulin concentration in the same sample without any enrichment. In table 2 the relative results are shown. None of the tested substances interfered significantly with Progranulin measurement.

Table 2: %- Recovery compared to non-enriched serum.

	Triglycerides [100 mg/ml]	Bilirubin [200 µg/ml]	Haemoglobin [1 mg/ml]
%	104	104	117

Effects of coagulation inhibitors were investigating by adding indicated amounts of inhibitors to VP or PBS enriched with 1250 pg/ml Progranulin. Relative amounts of Progranulin determined in inhibitor containing samples in comparison to inhibitor free samples are shown. None of the tested substances interfered significantly with Progranulin measurement.

Table 3: Effects of coagulation inhibitors.

		Recovery %
[3.8 g/l]	Citrate	95
[5.4 mmol/l]	EDTA	93
[30 IE/ml]	Heparin	98

None of the tested substances interfered significantly with Progranulin measurement.

Reproducibility and Precision

The inter and intra assay coefficients of variability are **below 8.0 and 4.4 %**, respectively. Exemplary determinations are shown in table 4 and table 5.

Table 4: Inter-Assay-Variation (results of 14 independent determinations)

	Mean (ng/ml)	Standard deviation (ng/ml)	VC (%)
Sample 1	36.78	2.49	6.76
Sample 2	23.40	1.87	7.99
Sample 3	21.52	1.37	6.36

Table 5: Intra-Assay-Variation

	Number of determinations	Mean value (ng/ml)	Standard deviation (ng/ml)	VC (%)
Sample 1	19	25.61	0.87	3.38
Sample 2	19	49.74	2.17	4.35

Linearity

The Mediagnost Progranulin ELISA E103 is over a very wide range dilution authentic. The linearity of serum dilutions is over a very wide range excellent (see table 6).

Table 6: Linearity of the sample dilution (characteristic result of three different sera)

Dilution	Sample 1 [ng/ml]	Sample 2 [ng/ml]	Sample 3 [ng/ml]
1:20	21.12	14.34	40.56
1:40	23.58	14.08	45.95
1:80	22.17	15.14	46.17
1:160	20.64	16.08	46.89
1:320	19.53	15.59	47.65
AV / 1SD / VC%	21.41 / 1.54 / 7.20	15.05 / 0.84 / 5.57	45.44 / 2.81 / 6.18

AV = Average Value, **SD**=Standard Deviation **VC** = Coefficient of Variation

EXPECTATION VALUES

Concentrations of Progranulin human sera of 40 healthy adult donors, at the age of 20 to 65 were determined with the Mediagnost ELISA E103. The concentrations of all samples varied from minimal 21.85 ng/ml to maximal 53.22 ng/ml (see table 7).

Table 7: Expectation values for adults in serum

Gender	Number of samples	Median [ng/ml]	Average value [ng/ml]	Standard Deviation [ng/ml]	Min. – Max.: [ng/ml]
female	20	32.22	31.60	5.62	21.85-40.57
male	20	30.71	33.06	8.11	22.27-53.22
total	40	31.32	32.33	17.35	21.85-53.22

LITERATUR / LITERATURE

1. Daniel R, Daniels E, He Z, Bateman A. Progranulin (acroganin/PC cell-derived growth factor/granulin-epithelin precursor) is expressed in the placenta, epidermis, microvasculature, and brain during murine development. *Dev Dyn* 2003;227:593-9.
2. Eriksen JL, Mackenzie IR. Progranulin: normal function and role in neurodegeneration. *J Neurochem* 2008;104:287-97.
3. Daniel R, He Z, Carmichael KP, Halper J, Bateman A. Cellular localization of gene expression for progranulin. *J Histochem Cytochem* 2000;48:999-1009.
4. Zhu J, Nathan C, Jin W, Sim D, Ashcroft GS, Wahl SM, et al. Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair. *Cell* 2002;111:867-78.
5. Kojima Y, Ono K, Inoue K, Takagi Y, Kikuta K, Nishimura M, et al. Progranulin expression in advanced human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis* 2009;206:102-8.
6. Suzuki M, Lee HC, Kayasuga Y, Chiba S, Nedachi T, Matsuwaki T, et al. Roles of progranulin in sexual differentiation of the developing brain and adult neurogenesis. *J Reprod Dev* 2009;55:351-5.
7. Finch N, Baker M, Crook R, Swanson K, Kuntz K, Surtees R, et al. Plasma progranulin levels predict progranulin mutation status in frontotemporal dementia patients and asymptomatic family members. *Brain* 2009;132:583-91.
8. Ghidoni R, Benussi L, Glionna M, Franzoni M, Binetti G. Low plasma progranulin levels predict progranulin mutations in frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 2008;71:1235-9.
9. Youn BS, Bang SI, Kloting N, Park JW, Lee N, Oh JE, et al. Serum progranulin concentrations may be associated with macrophage infiltration into omental adipose tissue. *Diabetes* 2009;58:627-36.

KURZANLEITUNG MEDIAGNOST PROGRANULIN ELISA E103

Rekonstitution / Verdünnung von Reagenzien		
Standards A-E	Rekonstitution in Verdünnungspuffer VP	je 1 ml
Kontrollseren KS1 & KS2	Rekonstitution in Verdünnungspuffer VP	je 250 µl
Waschpuffer WP	verdünnen in A. dest. (z.B. die gesamte Menge von 50 ml im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen)	1:20
Probenverdünnung bzw. Kontrollserumverdünnungen KS1&KS2: 1:41 in Verdünnungspuffer VP, sofort mischen und in max. 60 min. verwenden. Davon 50 µl pro Bestimmung einsetzen.		
Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.		

Tesdurchführung Doppelbestimmung (Vorschlag):

Pipettieren	Reagenzien	Position
50 µl	Antikörperkonjugat AK	in <u>alle</u> benötigten Vertiefungen pipettieren
50 µl	Verdünnungspuffer VP als Leerwert	A1 und A2
50 µl	Standard A (75 pg/ml)	B1 und B2
50 µl	Standard B (250 pg/ml)	C1 und C2
50 µl	Standard C (750 pg/ml)	D1 und D2
50 µl	Standard D (1500 pg/ml)	E1 und E2
50 µl	Standard E (2500 pg/ml)	F1 und F2
50 µl	Kontrollserum KS1	G1 und G2
50 µl	Kontrollserum KS2	H1 und H2
50 µl	Proben	in Vertiefungen nach Bedarf pipettieren
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.		

Inkubation: 1 h bei RT, 350 rpm

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

Inkubation: 30 min bei RT, 350 rpm

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

Inkubation: 30 min im Dunklen bei RT

100 µl	Stopplösung SL	In jede Vertiefung
Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (≥590 nm Referenz)		

SUMMARY – MEDIAGNOST PROGRANULIN ELISA E103

Reconstitution / Dilution of Reagents		
Standards A-E	Reconstitution in Dilution Buffer VP	1 ml each
Control Serum KS1 & KS2	Reconstitution in Dilution Buffer VP	250 µl each
Washing Buffer WP	dilute in A. dest. (e.g. add the complete contents of the flask 50 ml into a graduated flask and fill with A.dest. to 1000 ml)	1:20
Sample Dilution + Control Sera KS1 & KS2: 1:41 in Dilution Buffer VP, mix directly and use within max. 60 min.		
Use 50 µl per determination		
Before assay procedure bring all reagents to room temperature		

Assay Procedure for Double Determinations:

Pipette	Reagent	Position
50 µl	Antibody Conjugate AK	in all wells used
50 µl	Dilution Buffer VP (blank)	A1 and A2
50 µl	Standard A (75 pg/ml)	B1 and B2
50 µl	Standard B (250 pg/ml)	C1 and C2
50 µl	Standard C (750 pg/ml)	D1 and D2
50 µl	Standard D (1500 pg/ml)	E1 and E2
50 µl	Standard E (2500 pg/ml)	F1 and F2
50 µl	Control Serum KS1	G1 and G2
50 µl	Control Serum KS2	H1 and H2
50 µl	Samples	following wells
Cover the wells with the sealing tape.		

Incubation: 1 h at RT, 350 rpm

5 x 300 µl	Aspirate the contents of the wells and wash 5x with 300 µl Wash Buffer WP	each well
100 µl	Enzyme Conjugate EK	each well

Incubation: 30 min at RT, 350 rpm

5 x 300 µl	Aspirate the contents of the wells and wash 5x with 300 µl Wash Buffer WP	each well
100 µl	Substrate S	each well

Incubation: 30 min in the dark RT

100 µl	Stop Solution SL	each well
Measure the absorbance within 30 min at 450 nm with ≥ 590 nm as reference wavelength.		



CAL A-E	A -E	Rec in 1 ml VP	
Control	KS1&KS2	Rec in 250 µl VP	
WASHBUF 20x	WP		1:20 DILU A. dest.

Control	1:41 DILU VP
SPE	1:41 DILU VP
°C 20-25 °C	

50 µl	Ab	A1 - End
50 µl	BUF VP	A1/2
50 µl	CAL A (75 pg/ml)	B1/2
50 µl	CAL B (250 pg/ml)	C1/2
50 µl	CAL C (750 pg/ml)	D1/2
50 µl	CAL D (1500 pg/ml)	E1/2
50 µl	CAL E (2500 pg/ml)	F1/2
50 µl	CONTROL KS 1 1:41 DILU VP	G1/2
50 µl	CONTROL KS 2 1:41 DILU VP	H1/2
50 µl	SPE 1:41 DILU VP	
TAPE		

1 h **°C** 20-25 350 rpm

5 x 300 µl	5 x WASHBUF WP
100 µl	CONJ
TAPE	

0.5 h **°C** 20-25 350 rpm

5 x 300 µl	5 x WASHBUF WP
100 µl	SUBST TMB S

30 min **°C** 20-25

100 µl	H₂SO₄ SL
MEASURE	