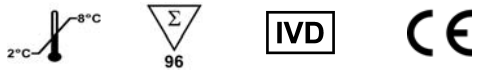
LDN®
IMMUNOASSAYS AND SERVICES
BIOGENIC AMINES & NEUROSCIENCE | ENDOCRINOLOGY | FOOD SAFETY
LABOR DIAGNOSTIKA NORD GmbH & Co.KG | Am Eichenhain 1 | 48531 Nordhorn | Germany | Tel. +49 5921 8197-0 | Fax +49 5921 8197-222 | info@ldn.de | www.ldn.de

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

Instructions for use

Leptin ELISA

REF **ME E-0300**



Leptin ELISA

English

INTENDED USE

For the quantitative determination of Leptin in human serum by an enzyme immunoassay method.

PRINCIPLE OF THE TEST

The principle of the following enzyme immunoassay test follows a typical two-step capture or 'sandwich' type assay. The assay makes use of two highly specific monoclonal antibodies: A monoclonal antibody specific for leptin is immobilized onto the microplate and another monoclonal antibody specific for a different epitope of leptin is conjugated to biotin. During the first step, leptin present in the samples and standards is bound to the immobilized antibody and to the biotinylated antibody, thus forming a sandwich complex. Excess and unbound biotinylated antibody is removed by a washing step. In the second step, streptavidin-HRP is added, which binds specifically to any bound biotinylated antibody. Again, unbound streptavidin-HRP is removed by a washing step. Next, the enzyme substrate is added (TMB), forming a blue coloured product that is directly proportional to the amount of leptin present. The enzymatic reaction is terminated by the addition of the stopping solution, converting the blue colour to a yellow colour. The absorbance is measured on a microtiterplate reader at 450 nm. A set of standards is used to plot a standard curve from which the amount of leptin in patient samples and controls can be directly read.

CLINICAL APPLICATIONS

Human Leptin is a 16 kDa, 146 amino acid residue, non-glycosylated polypeptide. Leptin is encoded by the OB gene. Its major source is the adipose tissue, and its circulating concentrations indirectly reflect body fat stores. Plasma or serum concentrations of leptin are increased in obese humans and strongly correlate with the degree of adiposity as expressed by percentage of body fat or body mass index.

The recently discovered hormone leptin contributes to the regulation of energy balance by informing the brain of the amount of adipose tissue in the body. The brain may then make the appropriate adjustments in either energy intake or expenditure.

Many areas of leptin physiology remain to be investigated. The roles of leptin in metabolism, insulin sensitivity, as a potential therapeutic modality for weight loss as well as involvement in endocrine function are active areas of research. While the future for leptin as a therapeutic agent is not clear, its involvement in many areas of physiology undoubtedly makes this a new hormone which requires extensive study in the future to understand its physiology.

PROCEDURAL CAUTIONS AND WARNINGS

1. This kit is intended for in vitro use only.
2. Practice the following good laboratory practices when handling kit reagents:
   - Do not pipette by mouth.
   - Do not smoke, drink, or eat in areas where specimens or kit reagents are being handled.
   - Wear protective clothing and disposable gloves when handling the specimens and kit reagents.
   - Wash hands thoroughly after performing the test.
   - Avoid contact with eyes; use safety glasses; in case of contact, flush with water immediately and contact a doctor.
3. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
4. Avoid microbial contamination of reagents.
5. A standard curve must be established for every run.
6. It is recommended to all customers to prepare their own control materials or serum pools which should be included in every run at a high and low level for assessing the reliability of results.
7. The controls (included in kit) should be included in every run and fall within established confidence limits.
8. When the use of water is specified for dilution or reconstitution, use deionized or distilled water.
9. All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
10. Improper procedural techniques, imprecise pipetting, incomplete washing as well as improper reagent storage may be indicated when assay values for the control do not reflect established ranges.
11. When reading the microplate, the presence of bubbles in the wells will affect the optical densities (ODs). Carefully remove any bubbles before performing the reading step.
12. The substrate solution (TMB) is sensitive to light and should remain colourless if properly stored. Instability or contamination may be indicated by the development of a blue colour, in which case it should not be used.
13. When dispensing the substrate and stopping solution, do not use pipettes in which these liquids will come into contact with any metal parts.
14. To prevent contamination of reagents, use a new disposable pipette tip for dispensing each reagent, sample, standard and control.
15. Do not mix various lot numbers of kit components within a test and do not use any component beyond the expiration date printed on the label.

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

16. Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to local and/or national regulations.

LIMITATIONS

1. All the reagents within the kit are calibrated for the direct determination of leptin in human serum. The kit is not calibrated for the determination of leptin in saliva, plasma or other specimens of human or animal origin.
2. Do not use grossly hemolyzed, grossly lipemic, icteric or improperly stored serum.
3. Any samples or control sera containing azide or thimerosal are not compatible with this kit, as they may lead to false results.
4. Only assay buffer may be used to dilute any high serum samples. The use of any other reagent may lead to false results.
5. The results obtained with this kit should never be used as the sole basis for a clinical diagnosis. For example, the occurrence of heterophilic antibodies in patients regularly exposed to animals or animal products has the potential of causing interferences in immunological tests. Consequently, the clinical diagnosis should include all aspects of a patient's background including the frequency of exposure to animals/products if false results are suspected.

SAFETY CAUTIONS AND WARNINGS

POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL

All serum samples should be considered a potential biohazard and handled with the appropriate precautions.

CHEMICAL HAZARDS

Avoid contact with reagents containing TMB, hydrogen peroxide and sulfuric acid. If contacted with any of these reagents, wash with plenty of water. TMB is a suspected carcinogen.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Approximately 0.1 ml of serum is required per duplicate determination. Collect 4 - 5 ml of blood into an appropriately labelled tube and allow it to clot. Centrifuge and carefully remove the serum layer. Store at 4 °C for up to 24 hours or at-10 °C or lower if the analyses are to be done at a later date. Consider all human specimens as possible biohazardous materials and take appropriate precautions when handling.

REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED

1. Precision pipette to deliver 20 - 100 µl
2. Disposable pipette tips
3. Distilled or deionized water
4. Plate shaker
5. Microplate washer (recommended)
6. Microplate reader with a filter set at 450 nm and an upper OD limit of 3.0 or greater

REAGENTS PROVIDED

1. AA E-0030 WASH-CONC 10x **Wash Buffer Concentrate –** Requires Preparation **X10**

Contents:	One bottle containing buffer with a non-ionic detergent and a non-mercury preservative.
Volume:	50 ml/bottle
Storage:	Refrigerate at 2 - 8 ˚C
Stability:	12 months or as indicated on label
Preparation:	Dilute 1:10 in distilled or deionized water before use. If the whole plate is to be used dilute 50 ml of the wash buffer concentrate in 450 ml of water.

2. AA E-0055 SUBSTRATE **TMB Substrate**

Contents:	One bottle containing tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide in a non-DMF or DMSO containing buffer.
Volume:	16 ml/bottle
Storage:	Refrigerate at 2 - 8 ˚C
Stability:	Unopened at 2 - 8 °C until expiration date on label.

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

3. AA E-0080 STOP-SOLN **Stopping Solution**

Contents: One vial containing 1M sulfuric acid.

Volume: 6 ml/bottle

Storage: Refrigerate at 2 - 8 ˚C

Stability: Unopened at 2 - 8 °C until expiration date on label.

Hazards identification:

H290 May be corrosive to metals.
H314 Causes severe skin burns and eye damage.

4. Standards and **Controls**

Listed below are approximate concentrations, please refer to vial labels for exact concentrations:

Cat. no.	Symbol	Standard	Concentration	Volume/Vial
ME E-0301	STANDARD A	Standard A	0 ng/ml	0.5 ml
ME E-0302	STANDARD B	Standard B	1 ng/ml	0.5 ml
ME E-0303	STANDARD C	Standard C	5 ng/ml	0.5 ml
ME E-0304	STANDARD D	Standard D	10 ng/ml	0.5 ml
ME E-0305	STANDARD E	Standard E	20 ng/ml	0.5 ml
ME E-0306	STANDARD F	Standard F	50 ng/ml	0.5 ml
ME E-0307	STANDARD G	Standard G	100 ng/ml	0.5 ml
ME E-0351	CONTROL 1	Control 1	Refer to vial labels for expected value and acceptable range!	0.5 ml
ME E-0352	CONTROL 2	Control 2		0.5 ml

Contents: Leptin in a protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking buffer with a defined quantity of leptin.

Storage: Refrigerate at 2 - 8 ˚C

Stability: Unopened at 2 - 8 °C until expiration date on label.

5. ME E-0313 ASSAY-BUFF **Assay Buffer**

Contents: One vial containing a protein-based buffer with a non-mercury preservative.

Volume: 20 ml/bottle

Storage: Refrigerate at 2 - 8 ˚C

Stability: Unopened at 2 - 8 °C until expiration date on label.

6. ME E-0331 96 **Anti-Leptin Monoclonal Antibody-Coated Break Apart Well Microplate**

Contents: One 96 well (12x8) monoclonal antibody-coated microplate in a resealable pouch with desiccant.

Storage: Refrigerate at 2 - 8 ˚C

Stability: 12 months or as indicated on label.

7. ME E-0341 BIOTIN-AB **Monoclonal Anti-Leptin-Biotin Conjugate**

Contents: One bottle containing a monoclonal anti-leptin antibody conjugated to biotin in a protein-based buffer with a non-mercury preservative.

Volume: 10 ml/bottle

Storage: Refrigerate at 2 - 8 ˚C

Stability: 12 months or as indicated on label.

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

8. ME E-0340 CONJUGATE-CONC 50x **Streptavidin-HRP Conjugate Concentrate** – Requires Preparation **X50**

Contents:	One vial containing streptavidin conjugated to horseradish peroxidase in a protein-based buffer with a non-mercury preservative.
Volume:	0.4 ml/vial
Storage:	Refrigerate at 2 - 8 ˚C
Stability:	Unopened at 2 - 8 °C until expiration date on label.
Preparation:	Dilute 1:50 in assay buffer before use (eg. 40 µl of concentrate in 2 ml of assay buffer). If the whole plate is to be used dilute 240 µl of concentrate in 12 ml of assay buffer. Discard any that is left over.

ASSAY PROCEDURE

All reagents must reach room temperature before use. Standards, controls and specimen samples should be assayed in duplicate. Once the procedure has been started, all steps should be completed without interruption.

1.	Prepare **working solutions** of the **streptavidin-HRP - conjugate** and **wash buffer.**
2.	Pipette **20 µl** of each **standard, control** and **serum samples** into correspondingly labelled wells in duplicate.
3.	Pipette **80 µl** of the **monoclonal anti-leptin-biotin conjugate** into each well.
4.	Incubate on a plate shaker (approximately 200 rpm) for **1 hour** at **room temperature**.
5.	Wash the wells **3 times** with prepared wash buffer (**300 µl**/well for each wash) and tap the plate firmly against absorbent paper to ensure that it is dry. (The use of a washer is highly recommended).
6.	Pipette **100 µl** of prepared **streptavidin-HRP** - **conjugate** into each well.
7.	Incubate on a plate shaker (approximately 200 rpm) for **30 minutes** at **room temperature**.
8.	Wash the wells **3 times** with prepared wash buffer (**300 µl**/well for each wash) and tap the plate firmly against absorbent paper to ensure that it is dry. (The use of a washer is highly recommended).
9.	Pipette **100 µl** of **TMB substrate** into each well at timed intervals.
10.	Incubate on a plate shaker for **10 - 15** minutes at **room temperature**.
11.	Pipette **50 µl** of **stopping solution** into each well at the same timed intervals as in step 9.
12.	Read the plate on a micro plate reader at **450 nm** within 20 minutes after addition of the stopping solution.

CALCULATIONS

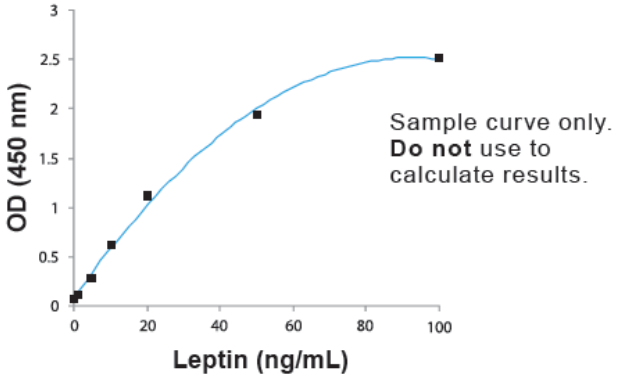
1. Calculate the mean optical density of each standard duplicate.
2. Draw a standard curve on semi-log paper with the mean optical densities on the Y-axis and the standard concentrations on the X-axis. If immunoassay software is being used, a 4-parameter or 5-parameter curve is recommended.
3. Calculate the mean optical density of each unknown duplicate.
4. Read the values of the unknowns directly off the standard curve.
5. If a sample reads more than 100 ng/ml then dilute it with assay buffer at a dilution of no more than 1:8. The result obtained should be multiplied by the dilution factor.

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

TYPICAL TABULATED DATA:
Sample data only. **Do not** use to calculate results.

Standard	OD 1	OD 2	Mean OD	Value (ng/ml)
A	0.073	0.070	0.072	0
B	0.102	0.100	0.101	1
C	0.290	0.293	0.292	5
D	0.620	0.630	0.625	10
E	1.140	1.086	1.113	20
F	1.947	1.919	1.933	50
G	2.518	2.514	2.516	100
Unknown	0.275	0.273	0.274	4.22

TYPICAL STANDARD CURVE



PERFORMANCE CHARACTERISTICS

SENSITIVITY
The limit of detection (LoD) for Leptin is 0.50 ng/ml, as determined by use of a NCCLS protocol and with proportions of false positives (α) less than 5 % and false negatives (β) less than 5 %; based on 82 blank determinations; LoB=0.42 ng/ml.

SPECIFICITY (CROSS-REACTIVITY)
The following substances were tested at 1000 ng/ml and exhibited no cross-reactivity:
Mouse Leptin, TNF-α, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9,IL-10, IL-12, IL-16, GM-CSF, CSF and EGF.

INTRA-ASSAY PRECISION
Four serum samples were assayed twenty times each on the same standard curve. The results (in ng/ml) are tabulated below:

Sample	Mean	SD	CV%
1	2.45	0.09	3.7
2	7.94	0.34	4.3
3	11.67	0.64	5.5
4	27.51	1.37	5.0

INTER-ASSAY PRECISION
Four samples were assayed ten times over a period of ten days. The results (in ng/ml) are tabulated below:

Sample	Mean	SD	CV%
1	2.71	0.16	5.9
2	8.24	0.48	5.8
3	12.01	0.82	6.8
4	24.98	1.45	5.8

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

RECOVERY
Spiked samples were prepared by adding defined amounts of leptin to three patient serum samples. The results (in ng/ml) are tabulated below:

Sample	Observed	Expected	% Recovery
1 Unspiked	3.89	-	-
+ 3.06	6.28	6.95	90.4
+ 8.06	10.98	11.95	91.9
+ 23.06	25.43	26.95	94.4
2 Unspiked	7.89	-	-
+ 1.06	8.82	8.95	98.5
+ 6.06	15.03	13.95	107.7
+ 21.06	30.32	28.95	104.7
3 Unspiked	11.61	-	-
+ 4.2	15.71	15.81	99.4
+ 12.8	25.42	24.41	104.1
+ 29.46	41.18	41.07	100.3

LINEARITY
Three patient serum samples were serially diluted with leptin assay buffer. The results (in ng/ml) are tabulated below:

Sample	Observed	Expected	% Recovery
1	3.03	-	-
1:2	1.42	1.52	93.4
1:4	0.71	0.76	93.4
1:8	0.35	0.38	92.1
2	11.27	-	-
1:2	5.93	5.64	105.1
1:4	3.05	2.82	108.2
1:8	1.35	1.41	95.7
3	27.91	-	-
1:2	14.91	13.96	106.8
1:4	6.74	6.98	96.6
1:8	3.29	3.49	94.3

COMPARATIVE STUDY
The Leptin ELISA was compared against a leading competitor's Leptin EIA kit (Kit X).
Thirty-eight serum samples ranging from 1.05 - 75.62 ng/ml were assayed with both kits, yielding the following results:

Regression: Kit X = 0.9644 (Leptin ELISA) + 1.5489
r = 0.98
Kit X Mean: 21.13
Leptin ELISA Mean: 20.30

EXPECTED NORMAL VALUES
As for all clinical assays each laboratory should collect data and establish their own range of expected normal values.

Group	Mean (ng/ml)	Range (ng/ml)
Lean Women	7.4	3.7 - 11.1
Lean Men	3.8	2.0 - 5.6

Leptin values are approximately 2.5 times higher in women than men per unit BMI.

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

REFERENCES

1. Dagogo-Jack S, et al. Plasma Leptin and Inulin Relationships in Obese and Nonobese Humans. Diabetes. 1996; 45(5):695–8.
2. Chessler SD, et al. Increased Plasma Leptin Levels Are Assosciated with Fat Accumulation in Japanese Americans. Diabetes. 1998; 47(2):239–43.
3. Heymsfield SB, et al. Recombinant Leptin for Weight Loss in Obese and Lean Adults: A Randomized, Controlled, Dose-Escalation Trial. JAMA. 1999; 282(16):1568–75.
4. Wiesner G, et al. Leptin is Released from the Human Brain: Influence of Adiposity and Gender. J Clin Endocrinol Metab. 1999; 84(7):2270–4.
5. Quinton ND, et al. Leptin Binding Activity Changes With Age: The Link Between Leptin and Puberty. J Clin Endocrinol Metab. 1999; 84(7):2336–41.
6. Considine R, et al. Serum Immunoreactive Leptin Concentration in Normal-Weight and Obese Humans. N Engl J Med. 1996; 334:292–95.
7. Maffei M, et al. Leptin Levels in Human and Rodent: Measurement of Plasma Level Leptin and obRNA in Obese and Weight Reduced Subjects. Nat Med. 1995; 1(11):1155–61.
8. Tamura T, et al. Serum Leptin Concentrations During Pregnancy and Their Relationship to Fetal Growth. Obstet Gynecol. 1998; 91(3):389–95.
9. Matsuda J, et al. Serum Leptin Concentration in Cord Blood: Relationship to Birth Weight and Gender. J Clin Endocrinol Metab. 1997; 82(5):1642–4.
10. Check JH, et al. Falsely Elevated Steroidal Assay Levels Related to Heterophile Antibodies Against Various Animal Species. Gynecol Obstet Invest. 1995; 40(2): 139–40.

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Expiry date	LOT	Batch code	I V D	For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use	CONT	Content	CE	CE labelled
	Caution	REF	Catalogue number		

VERWENDUNGSZWECK

Für die quantitative Bestimmung von Leptin im menschlichen Serum durch ein Enzymimmunoassayverfahren.

TESTPRINZIP

Das Prinzip des folgenden Enzymimmunoassays folgt einem typischen Zweistufenerfassungs- oder "Sandwich"-Typ-Assay. Das Assay verwendet zwei hochspezifische monoklonale Antikörper: Ein monoklonaler Antikörper gegen Leptin ist auf der Mikrotiterplatte immobilisiert, ein anderer, gegen ein anderes Epitop von Leptin, an Biotin konjugiert. Im ersten Schritt wird in den Proben und Standards vorliegendes Leptin an den immobilisierten Antikörper und von dem biotinylierten Antikörper gebunden, wodurch ein Sandwich-Komplex gebildet wird. Überschüssiger und ungebundener biotinylierter Antikörper wird durch einen Waschschritt entfernt. Im zweiten Schritt wird Streptavidin-HRP zugegeben, das spezifisch an jeden biotinylierten Antikörper bindet. Wiederum wird ungebundenes Streptavidin-HRP durch einen Waschschritt entfernt. Danach wird das Enzymsubstrat (TMB) zugegeben, was ein blau gefärbtes Produkt ergibt, dessen Menge direkt proportional zu der des vorliegenden Leptins ist. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe der Stopplösung beendet, was die blaue in eine gelbe Farbe umwandelt. Die Extinktion wird auf einem Mikrotiterplattenlesegerät bei 450 nm gemessen. Eine Reihe von Standards wird verwendet, um eine Standardkurve zu erzeugen, von der die Mengen von Leptin in den Patientenproben und Kontrollen direkt abgelesen werden können.

KLINISCHE ANWENDUNGEN

Menschliches Leptin ist ein 16 kDa schweres, 146 Aminosäuren umfassendes, unglykosyliertes Polypeptid. Leptin wird durch das OB-Gen kodiert. Seine Hauptquelle ist das Fettgewebe, und seine zirkulierenden Konzentrationen spiegeln die Größe der Körperfettspeicher indirekt wider.

Die Plasma- oder Serum-Konzentrationen von Leptin sind bei übergewichtigen Menschen erhöht und stark mit dem Grad der Adipositas korreliert, wie er durch den Körperfettanteil oder den Body Mass Index ausgedrückt wird.

Das neuentdeckte Hormon Leptin trägt zur Regulation der Energiebilanz bei, indem es dem Gehirn die Menge an Fettgewebe im Körper mitteilt. Das Gehirn kann dann Energieaufnahme oder -verbrauch entsprechend einstellen.

Viele Bereiche der Leptin-Physiologie sind noch zu erforschen. Die Funktionen von Leptin im Stoffwechsel, für Insulinempfindlichkeit, als potenzieller therapeutischer Ansatz für die Gewichtsabnahme sowie Beteiligung an der endokrinen Funktion sind aktuelle Forschungsthemen. Während die Zukunft von Leptin als therapeutischem Mittel noch unklar ist, macht seine Rolle in vielen Bereichen der Physiologie es ohne Zweifel zu einem neuen Hormon, das umfangreiche zukünftige Studien zum Verständnis seiner Physiologie erfordert.

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

1. Dieses Kit ist nur für den in-vitro-Gebrauch bestimmt.
2. Halten Sie die folgende gute Laborpraxis beim Umgang mit Testreagenzien ein:
   - Nicht mit dem Mund pipettieren.
   - In Bereichen, in denen Proben oder Bestandteile gehandhabt werden, nicht rauchen, trinken oder essen.
   - Schutzkleidung und Einmalhandschuhe beim Umgang mit den Proben und Kitreagenzien tragen.
   - Nach der Durchführung des Tests die Hände gründlich waschen.
   - Augenkontakt vermeiden; Schutzbrille tragen; bei Kontakt mit Wasser spülen und sofort einen Arzt aufsuchen.
3. Anwender sollten für den erfolgreichen Einsatz dieses Kits das Protokoll gründlich verstanden haben. Zuverlässige Leistung wird nur durch strenge und sorgfältige Einhaltung der Anleitung erreicht.
4. Vermeiden Sie mikrobielle Kontamination der Reagenzien.
5. Für jeden Lauf muss eine Standardkurve erstellt werden.
6. Es wird allen Kunden empfohlen, ihre eigenen Kontrollmaterialien oder Serumpools herzustellen, die in jeden Durchlauf mit hohem und niedrigem Spiegel für die Beurteilung der Zuverlässigkeit der Ergebnisse aufgenommen werden sollten.
7. Die Kontrollen (im Kit enthalten) sollten in jeden Lauf eingeschlossen werden und innerhalb etablierter Vertrauensgrenzen liegen.
8. Wenn Wasser zur Verdünnung oder Rekonstitution zu verwenden ist, ist demineralisiertes oder destilliertes Wasser einzusetzen.
9. Alle Reagenzien und Proben sollten vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig, aber gründlich durchmischt werden. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben.
10. Unsachgemäße Verfahrenstechniken, unpräzises Pipettieren, unvollständiges Waschen und Unsachgemäße Lagerung der Reagenzien können in Frage kommen, wenn die Messwerte für die Kontrollen nicht in den etablierten Bereichen liegen.
11. Beim Lesen der Mikrotiterplatte beeinflussen Blasen in den Wells die Extinktionswerte (ODs). Entfernen Sie vor dem Messschritt jegliche Blasen sorgfältig.

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

12. Die Substratlösung (TMB) ist lichtempfindlich und sollte bei richtiger Lagerung farblos bleiben. Instabilität und Verunreinigung können an der Entstehung einer blauen Farbe erkannt werden, in welchem Fall die Lösung nicht verwendet werden sollte.
13. Beim Dosieren von Substrat und Stopplösung verwenden Sie keine Pipetten, in denen diese Flüssigkeiten in Kontakt mit Metallteilen kommen.
14. Um Kontamination der Reagenzien zu vermeiden, verwenden Sie zur Entnahme aller Reagenzien, Proben, Standards und Kontrollen jeweils eine neue Einweg-Pipettenspitze.
15. Verschiedene Chargen von Kit-Komponenten sind innerhalb eines Tests nicht zu mischen, und keine Komponente darf nach dem Verfallsdatum auf dem Etikett verwendet werden.
16. Kit-Reagenzien müssen gemäß nationalen und/oder örtlichen Vorschriften als gefährlicher Abfall entsorgt werden.

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Alle Reagenzien in dem Kit sind für die direkte Bestimmung von Leptin in menschlichem Serum geeicht. Das Kit ist nicht für die Bestimmung von Leptin in Speichel, Plasma oder anderen Proben menschlichen oder tierischen Ursprungs geeicht.
2. Verwenden Sie keine stark hämolysierten, lipämischen, ikterischen oder unsachgemäß gelagerten Sera.
3. Thimerosal enthaltende Proben oder Kontrollseren sind mit diesem Kit nicht kompatibel, da sie zu falschen Ergebnissen führen können.
4. Nur Assay-Puffer darf verwendet werden, um Proben mit hoher Serumkonzentration zu verdünnen. Verwendung anderer Reagenzien kann zu falschen Ergebnissen führen.
5. Die mit diesem Kit erhaltenen Ergebnisse sollten niemals als alleinige Grundlage für die klinische Diagnostik verwendet werden. Zum Beispiel hat das Auftreten heterophiler Antikörper bei Patienten, die regelmäßig Kontakt mit Tieren oder Tierprodukten haben, ein Störpotential für immunologische Tests. Daher sollte die klinische Diagnose alle Aspekte des Hintergrunds eines Patienten einschließlich der Häufigkeit seiner Exposition gegenüber Tieren/Tierprodukten berücksichtigen, wenn falsche Ergebnisse vermutet werden.

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE
POTENZIELL INFEKTIÖSES MATERIAL

Alle Serumproben sollten als potenzielle Biogefährdungen betrachtet und mit den entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen gehandhabt werden.

CHEMISCHE GEFAHREN

Kontakt mit Reagenzien, die TMB, Wasserstoffperoxid oder Schwefelsäure enthalten, vermeiden. Bei Kontakt mit einem dieser Reagenzien: mit viel Wasser abwaschen. TMB steht im Verdacht, krebserregend zu sein.

PROBENABNAHME UND -LAGERUNG

Etwa 0,1 ml Serum ist pro Doppelbestimmung erforderlich. Nehmen Sie 4–5 ml Blut in ein entsprechend gekennzeichnetes Röhrchen auf und lassen es gerinnen. Zentrifugieren Sie und entfernen vorsichtig die Serumschicht. Lagerung bei 4 °C bis zu 24 Stunden oder bei -10 °C oder kälter, wenn die Analysen zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden sollen. Betrachten Sie alle Humanproben als potentielle Biogefährdungen und ergreifen geeignete Schutzmaßnahmen beim Umgang.

BENÖTIGTE, ABER NICHT MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND INSTRUMENTE

1. Präzisionspipette für 20-100 µl
2. Einweg-Pipettenspitzen
3. Destilliertes oder demineralisiertes Wasser
4. Plattenschüttler
5. Mikroplatten-Waschautomat (empfohlen)
6. Mikrotiterplattenlesegerät mit einem 450-nm-Filtersatz und einer oberen OD-Messgrenze von 3.0 oder höher

MITGELIEFERTE REAGENZIEN

1. AA E-0030 WASH-CONC 10x **Waschpufferkonzentrat –** benötigt eine Vorbereitung **X10**

Inhalt:	Eine Flasche Puffer mit nichtionischem Detergens und quecksilberfreiem Konservierungsmittel.
Volumen:	50 ml/Flasche
Lagerung:	Gekühlt bei 2 - 8 °C
Stabilität:	12 Monate oder bis zum Verfallsdatum auf dem Etikett.
Vorbereitung:	Vor der Verwendung 1:10 in destilliertem oder demineralisiertem Wasser verdünnen. Wenn die gesamte Platte verwendet werden soll, 50 ml Waschpufferkonzentrat mit 450 ml Wasser verdünnen.

Please use only the valid version of the Instructions for use provided with the kit

2. AA E-0055 SUBSTRATE **TMB Substrat**

Inhalt: Eine Flasche Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid in einem DMF- und DMSO-freien Puffer.

Volumen: 16 ml/Flasche

Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 °C

Stabilität: Ungeöffnet bei 2–8 °C bis zum Verfallsdatum auf dem Etikett.

3. AA E-0080 STOP-SOLN **Stopplösung**

Inhalt: Ein Fläschchen 1M Schwefelsäure.

Volumen: 6 ml/Flasche

Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 °C

Stabilität: Ungeöffnet bei 2–8 °C bis zum Verfallsdatum auf dem Etikett.

Mögliche Gefahren:

H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

4. Standards und **Kontrollen**

Nachfolgend sind ungefähre Konzentrationen angegeben; die genauen Konzentrationen finden sich auf den Etiketten der Fläschchen:

Kat.-Nr.	Zeichen	Standard	Konzentration	Volumen/Fläschchen
ME E-0301	STANDARD A	**Standard A**	0 ng/ml	0,5 ml
ME E-0302	STANDARD B	**Standard B**	1 ng/ml	0,5 ml
ME E-0303	STANDARD C	**Standard C**	5 ng/ml	0,5 ml
ME E-0304	STANDARD D	**Standard D**	10 ng/ml	0,5 ml
ME E-0305	STANDARD E	**Standard E**	20 ng/ml	0,5 ml
ME E-0306	STANDARD F	**Standard F**	50 ng/ml	0,5 ml
ME E-0307	STANDARD G	**Standard G**	100 ng/ml	0,5 ml
ME E-0351	CONTROL 1	**Kontrolle 1**	Siehe Fläschchenetiketten für Erwartungswert und akzeptablen Bereich!	0,5 ml
ME E-0352	CONTROL 2	**Kontrolle 2**		0,5 ml

Inhalt: Leptin in proteinhaltigem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel. Hergestellt durch Dotieren von Puffer mit einer definierten Menge Leptin.

Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 °C

Stabilität: Ungeöffnet bei 2 - 8 °C bis zum Verfallsdatum auf dem Etikett.

5. ME E-0313 ASSAY-BUFF **Assay-Puffer**

Inhalt: Ein Fläschchen mit proteinhaltigem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel.

Volumen: 20 ml/Flasche

Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 °C

Stabilität: Ungeöffnet bei 2–8 °C bis zum Verfallsdatum auf dem Etikett.

6. ME E-0331 96 **Mikrotiterplatte mit monoklonalem Anti-Leptin-Antikörper beschichtet - herausbrechbare Wells**

Inhalt: Eine 96-Loch-Mikrotiterplatte (12×8), mit monoklonalem Antikörper beschichtet, in einem wiederverschließbaren Beutel mit Trockenmittel.

Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 °C

Stabilität: 12 Monate oder bis zum Verfallsdatum auf dem Etikett.

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

7. ME E-0341 BIOTIN-AB **Monoklonales Anti-Leptin-Biotinkonjugat**

Inhalt: Eine Flasche mit monoklonalem anti-Leptin-Antikörper, biotinkonjugiert, in proteinhaltigem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel.

Volumen: 10 ml/Flasche

Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 °C

Stabilität: 12 Monate oder bis zum Verfallsdatum auf dem Etikett.

8. ME E-0340 CONJUGATE-CONC 50x **Streptavidin-HRP-Konjugat-Konzentrat** – benötigt eine Vorbereitung **X50**

Inhalt: Ein Fläschchen Streptavidin konjugiert mit Meerrettichperoxidase in proteinhaltigem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel.

Volumen: 0,4 ml/Fläschchen

Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 °C

Stabilität: Ungeöffnet bei 2 - 8 °C bis zum Verfallsdatum auf dem Etikett.

Vorbereitung: Vor der Verwendung 1:50 mit Assay-Puffer verdünnen (z. B. 40 µl Konzentrat in 2 ml Assay-Puffer). Wenn die ganze Platte verwendet werden soll, 240 µl HRP mit 12 ml Assay-Puffer verdünnen. Was übrigbleibt, ist zu entsorgen.

TESTVERFAHREN

Alle Reagenzien müssen vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden. Standards, Kontrollen und Proben sollten jeweils doppelt getestet werden. Sobald das Verfahren begonnen wurde, sollten alle Arbeitsschritte ohne Unterbrechung durchgeführt werden.

1.	Stellen Sie **Arbeitslösungen** von **Streptavidin-HRP-Konjugat** und **Waschpuffer** her.
2.	Je **20 µl** jeder **Standard, Kontrolle** und **Serumprobe** jeweils zweifach in die entsprechenden Wells.
3.	Pipettieren Sie jeweils **80 µl** des **monoklonalen Anti-Leptin-Biotin-Konjugats** in jeden Well.
4.	**1 Stunde** bei **Raumtemperatur** auf einem Plattenschüttler (≈ 200 UPM) inkubieren.
5.	Waschen Sie die Wells **3×** mit vorbereitetem Waschpuffer (**300 µl**/Well für jeden Waschgang) und schlagen die Platte fest auf saugfähigem Papier aus, um sicherzustellen, dass sie trocken ist. (Die Verwendung eines Mikroplatten-Waschautomaten wird empfohlen).
6.	Pipettieren Sie jeweils **100 µl** des vorbereiteten **Streptavidin-HRP-Konjugats** in jeden Well.
7.	**30 Minuten** bei **Raumtemperatur** auf einem Plattenschüttler (≈ 200 UPM) inkubieren.
8.	Waschen Sie die Wells **3×** mit vorbereitetem Waschpuffer (**300 µl**/Well für jeden Waschgang) und schlagen die Platte fest auf saugfähigem Papier aus, um sicherzustellen, dass sie trocken ist. (Die Verwendung eines Mikroplatten-Waschautomat wird empfohlen).
9.	Pipettieren Sie jeweils **100 µl TMB-Substrat** in definierten Zeitintervallen in die Wells.
10.	Die Platte **10-15** Minuten lang auf einem Plattenschüttler bei **Raumtemperatur** inkubieren.
11.	Zu den gleichen Zeitintervallen wie in Schritt 9 je **50 µl Stopplösung** in jeden Well pipettieren.
12.	Messen der Platte auf einem Mikrotiterplattenlesegerät bei **450 nm** innerhalb von 20 Minuten nach der Zugabe der Stopplösung.

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

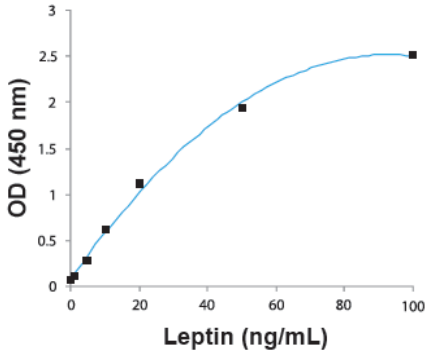
BERECHNUNGEN

1. Berechnen Sie die mittlere optische Dichte jedes Standard-Duplikats.
2. Zeichnen Sie auf halblogarithmischem Papier eine Standardkurve mit mittlerer optischer Dichten als Y-Achse und Standardkonzentration als X-Achse. Wenn Immunoassay-Software verwendet wird, wird eine 4- oder 5-Parameter-Kurve empfohlen.
3. Berechnen Sie die mittlere optische Dichte jedes unbekannten Duplikats.
4. Lesen Sie die unbekannten Werte direkt von der Standardkurve ab.
5. Wenn eine Probe mit mehr als 100 ng/ml gemessen wird, verdünnen Sie sie mit Assay-Puffer auf eine Verdünnung von nicht mehr als 1:8. Das erhaltene Ergebnis ist mit dem Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

TYPISCHE TABELLARISCHE DATEN
Beispiel! Nicht für die Ergebnisrechnung verwenden!

Standard	OD 1	OD 2	MW OD	Wert (ng/ml)
A	0,073	0,070	0,072	0
B	0,102	0,100	0,101	1
C	0,290	0,293	0,292	5
D	0,620	0,630	0,625	10
E	1,140	1,086	1,113	20
F	1,947	1,919	1,933	50
G	2,518	2,514	2,516	100
Unbekannt	0,275	0,273	0,274	4,22

TYPISCHE STANDARDKURVE
Beispielkurve. **Nicht** zur Ergebnisberechnung verwenden.



LEISTUNGSMERKMALE

EMPFINDLICHKEIT
Die Nachweisgrenze (LOD) für Leptin ist 0,50 ng/ml, bestimmt durch Verwendung eines NCCLS-Protokolls und mit einer falsch-positiven Fehlerrate (α) von weniger als 5% und einer falsch-negativen Fehlerrate (β) von weniger als 5% bestimmt; basierend auf 82 Blindbestimmungen; LOD = 0,42 ng/ml.

SPEZIFITÄT (KREUZREAKTION)
Die folgenden Substanzen wurden bei 1000 ng/ml getestet und zeigten keine Kreuzreaktivität:
Murines Leptin, TNF-α, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-16, GM-CSF, CSF und EGF.

REPRODUZIERBARKEIT INNERHALB EINES ASSAYS
Vier Proben wurden jeweils zwanzigmal mit der gleichen Standardkurve getestet. Die Ergebnisse (in ng/ml) sind im Folgenden dargestellt:

Probe	Mittelwert	StAbw	VK %
1	2,45	0,09	3,7
2	7,94	0,34	4,3
3	11,67	0,64	5,5
4	27,51	1,37	5,0

REPRODUZIERBARKEIT ZWISCHEN ASSAYS
Vier Proben wurden zehn Mal über einen Zeitraum von zehn Tagen untersucht. Die Ergebnisse (in ng/ml) sind im Folgenden dargestellt:

Probe	Mittelwert	StAbw	VK%
1	2,71	0,16	5,9
2	8,24	0,48	5,8
3	12,01	0,82	6,8
4	24,98	1,45	5,8

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

WIEDERFINDUNG
Dotierte Proben wurden durch Zugabe von definierten Mengen von Leptin zu drei Patientenserumproben hergestellt. Die Ergebnisse (in ng/ml) sind im Folgenden dargestellt:

Probe	Beobachtet	Erwartet	% Wiederfindung
1. Undotiert	3,89	-	-
+ 3,06	6,28	6,95	90,4
+ 8,06	10,98	11,95	91,9
+ 23,06	25,43	26,95	94,4
2. Undotiert	7,89	-	-
+ 1,06	8,82	8,95	98,5
+ 6,06	15,03	13,95	107,7
+ 21,06	30,32	28,95	104,7
3. Undotiert	11,61	-	-
+ 4,2	15,71	15,81	99,4
+ 12,8	25,42	24,41	104,1
+ 29,46	41,18	41,07	100,3

LINEARITÄT
Drei Patientenserumproben wurden seriell mit Leptin-Assay-Puffer verdünnt. Die Ergebnisse (in ng/ml) sind im Folgenden dargestellt:

Probe	Beobachtet	Erwartet	% Wiederfindung
1	3,03	-	-
1:2	1,42	1,52	93,4
1:4	0,71	0,76	93,4
1:8	0,35	0,38	92,1
2	11,27	-	-
1:2	5,93	5,64	105,1
1:4	3,05	2,82	108,2
1:8	1,35	1,41	95,7
3	27,91	-	-
1:2	14,91	13,96	106,8
1:4	6,74	6,98	96,6
1:8	3,29	3,49	94,3

VERGLEICHSSTUDIE
Der Leptin-ELISA wurde mit einem Leptin-EIA-Kit eines führenden Wettbewerbers (Kit X) verglichen.
Achtunddreißig Serumproben von 1,05 bis 75,62 ng/ml wurden mit beiden Kits untersucht und führten zu den folgenden Ergebnissen:

Regression: Kit X = 0,9644 (Leptin ELISA) + 1,5489
r = 0,98
Kit X Mittelwert: 21,13
Leptin ELISA Mittelwert: 20,30

ERWARTETE STANDARDWERTE
Wie bei allen klinischen Tests sollte jedes Labor Daten sammeln und seinen eigenen Bereich erwarteter Standardwerte erstellen.

Gruppe	MW (ng/ml)	Bereich (ng/ml)
Schlanke Frauen	7,4	3,7-11,1
Schlanke Männer	3,8	2,0-5,6

Die Leptin-Werte sind bei Frauen pro Einheit BMI etwa 2,5-mal so hoch wie bei Männern.

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

LITERATUR

1. Dagogo-Jack S, et al. Plasma Leptin and Inulin Relationships in Obese and Nonobese Humans. Diabetes. 1996; 45(5):695–8.
2. Chessler SD, et al. Increased Plasma Leptin Levels Are Assosciated with Fat Accumulation in Japanese Americans. Diabetes. 1998; 47(2):239–43.
3. Heymsfi eld SB, et al. Recombinant Leptin for Weight Loss in Obese and Lean Adults: A Randomized, Controlled, Dose- Escalation Trial. JAMA. 1999; 282(16):1568–75.
4. Wiesner G, et al. Leptin is Released from the Human Brain: Influence of Adiposity and Gender. J Clin Endocrinol Metab. 1999; 84(7):2270–4.
5. Quinton ND, et al. Leptin Binding Activity Changes With Age: The Link Between Leptin and Puberty. J Clin Endocrinol Metab. 1999; 84(7):2336–41.
6. Considine R, et al. Serum Immunoreactive Leptin Concentration in Normal-Weight and Obese Humans. N Engl J Med. 1996; 334:292–95.
7. Maffei M, et al. Leptin Levels in Human and Rodent: Measurement of Plasma Level Leptin and obRNA in Obese and Weight Reduced Subjects. Nat Med. 1995; 1(11):1155–61.
8. Tamura T, et al. Serum Leptin Concentrations During Pregnancy and Their Relationship to Fetal Growth. Obstet Gynecol. 1998; 91(3):389–95.
9. Matsuda J, et al. Serum Leptin Concentration in Cord Blood: Relationship to Birth Weight and Gender. J Clin Endocrinol Metab. 1997; 82(5):1642–4.
10. Check JH, et al. Falsely Elevated Steroidal Assay Levels Related to Heterophile Antibodies Against Various Animal Species. Gynecol Obstet Invest. 1995; 40(2): 139–40.

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis	LOT	Chargennummer	IVD	In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen	CONT	Inhalt	CE	CE gekennzeichnet
	Achtung	REF	Katalog-Nummer		