

Myostatin ELISA Kit

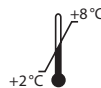
*Zur in-vitro-Bestimmung von Myostatin in humanem Serum
und Plasma*

Myostatin ELISA Kit

*For the determination of Myostatin in human serum
and plasma*

Gültig ab / Valid from 08.09.2014

REF K 1012



RUO



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	5
<i>Probenlagerung</i>	5
<i>Vorbereitung von Proben, Standards und Kontrollen</i>	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	7
10. QUALITÄTSKONTROLLE	8
11. TESTCHARAKTERISTIKA	8
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	8
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	8
<i>Analytische Sensitivität</i>	9
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	9
13. TECHNISCHE MERKMALE	9
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	10
15. LITERATUR	10
<i>Allgemeine Literatur</i>	10
<i>Literatur mit dem Immundiagnostik Myostatin-ELISA</i>	11

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene ELISA ist für die quantitative Bestimmung von Myostatin aus humanem Serum und Plasma geeignet. Nur für wissenschaftliche Zwecke.

2. EINLEITUNG

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

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

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

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

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

Indikationen

- Regulation des Muskelwachstums
- Muskelatrophie
- Muskelschwund
- Erworbene Insulinresistenz

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 1012MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 1012WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 1012PV	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer	1 x 100 ml
K 1012ST	STD	Standards (lyophilisiert)	2 x 5 vials
K 1012T	TRACER	Tracer, biotinyliertes Myostatin	1 x 150 µl
K 1012KO1	CTRL	Kontrolle (lyophilisiert)	2 x 1 vial
K 1012KO2	CTRL	Kontrolle (lyophilisiert)	2 x 1 vial
K 1012K	CONJ	Konjugat (Streptavidin-markierte Peroxidase)	1 x 200 µl
K 1012TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 1012AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

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

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz an-zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** (Waschpuffer) ist bei **2–8°C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die **lyophilisierten STD (Standards)** und **CTRL (Kontrollen)** sind bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar (Volumen und Konzentration siehe entsprechende Produktspezifikation). **Rekonstituierte Standards und Kontrollen sind nicht stabil und können nicht aufbewahrt werden.**
- Der **TRACER (biotinylierter Myostatin-Tracer, Konzentrat)** wird **1:101** in **SAMPLEBUF** (Probenverdünnungspuffer) verdünnt (z. B. 100 µl TRACER + 10 ml SAMPLEBUF). Unverdünnter TRACER ist bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünnter TRACER ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Das **Konjugatkonzentrat** (CONJ) wird unmittelbar vor Gebrauch **1:101 in Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das Konzentrat ist bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konjugat ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8°C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Probenlagerung

Als Probenmaterial sollte **EDTA Plasma oder Serum** verwendet werden. Es ist bis zur Verwendung bei **-20°C** lagern.

Vorbereitung von Proben, Standards und Kontrollen

- Je **20 µl Serum-** oder Plasmaprobe in entsprechend beschriftete 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettieren. **180 µl SAMPLEBUF** (Probenverdünnungspuffer) zu jeder Probe zugeben, gut vortexen. (**Verdünnungsfaktor 1:10**)
- Dann zu je **200 µl verdünnter Probe 200 µl verdünnten TRACER** pipettieren, gut vortexen. Dieser Probenansatz wird als **Vorinkubat** bezeichnet.
- **200 µl STD bzw. CTRL** in entsprechend beschriftete 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettieren, mit **200 µl verdünntem TRACER** versetzen, gut mischen. Dieser Ansatz wird ebenfalls als **Vorinkubat** bezeichnet.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser Myostatin Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) dient zur quantitativen Erfassung von Myostatin aus humanem Serum und EDTA-Plasma.

Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven ELISA. Die zu untersuchenden Proben, Standards und Kontrollen werden mit einem biotinylierten Myostatin-Tracer versetzt und anschließend in einer mit einem polyklonalen anti-Myostatin-Antikörper beschichteten ELISA-Platte inkubiert. Während der Inkubation kompetitiert das freie Zielantigen in den Proben mit dem biotinylierten Myostatin-Tracer um die Bindung der polyklonalen anti-Myostatin-Antikörper. Beim zweiten Inkubationsschritt wird Streptavidin-markierte Peroxidase zugegeben, die an den biotinylierten Myostatin-Tracer bindet. Nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Komponenten wird das Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidin zugegeben. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration des gemessenen Analyten, d.h. mit steigender Myostatin-Konzentration in der Probe reduziert sich die Konzentration des an den anti-Myostatin-Antikörper gebundenen biotinylierten Myostatin-Tracers und das Signal nimmt ab. Parallel dazu wird eine Standardkurve, optische Dichte (Absorption bei 450 nm) gegen Standard-

konzentration, erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

Pipettierschema

Vor Gebrauch alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (15–30 °C) bringen, gut mischen.

Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können in der Aluminiumverpackung mit Trockenmittel bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	100 µl der vorbehandelten STD (Standards), CTRL (Kontrollen) oder Proben (entsprechendes Vorinkubat) in die Vertiefungen pipettieren.
2.	Streifen abdecken und 2 Stunden bei Raumtemperatur (15-30°C) unter Schütteln inkubieren.
3.	Inhalt der Platte verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf saugfähigem Papier ausschlagen.
4.	100 µl verdünntes CONJ (Konjugat) pro Vertiefung pipettieren.
5.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30°C) unter Schütteln inkubieren.
6.	Inhalt der Platte verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf saugfähigem Papier ausschlagen.
7.	100 µl SUB (Substrat) pro Vertiefung pipettieren.
8.	10 - 20 Minuten* bei Raumtemperatur (15-30°C) inkubieren.
9.	100 µl STOP (Stopplösung) pro Vertiefung pipettieren, kurz mischen.
10.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des niedrigsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

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

8. ERGEBNISSE

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

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0,001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

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

3. Gewichtete Spline-Funktion

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

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

Serum- und Plasmaproben

Die ermittelten Werte werden mit dem Verdünnungsfaktor **10** multipliziert.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

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

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs müssen stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Standardkurve × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

LoB × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

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

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 23)

Probe	Myostatin [ng/ml]	VK [%]
1	24,1	10,4
2	37,9	7,8

Inter-Assay (n = 6)

Probe	Myostatin [ng/ml]	VK [%]
1	18,1	12,2
2	14,8	14,0

Wiederfindung in der Verdünnung

Zwei Proben wurden seriell verdünnt und vermessen. Gegenübergestellt sind die erwarteten (berechneten) und die gemessenen Myostatin Konzentrationen. (n = 2)

Probe	Verdünnung	Myostatin erwartet [ng/ml]	Myostatin gemessen [ng/ml]
1	1:10		30,4
	1:20	15,2	12,5
	1:40	7,6	8,7
2	1:10		29,0
	1:20	14,5	13,9
	1:40	7,3	8,2

Analytische Sensitivität

Die Leerwert-Obergrenze (*limit of blank, LoB*) wurde gemäß der Richtlinie CLSI EP17-A2 bestimmt und ist 0,37 ng/ml.

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

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

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.

- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

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

15. LITERATUR

Allgemeine Literatur

1. Dschietzig, T.B., 2014. Myostatin - From the Mighty Mouse to cardiovascular disease and cachexia. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, **433C**, pp.216–224.
2. Gonzalez-Cadavid, N.F. et al., 1998. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**(25), pp.14938–43.
3. Hamrick, M.W. et al., 2006. Increased muscle mass with myostatin deficiency improves gains in bone strength with exercise. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, **21**(3), pp.477–83.
4. McPherron, a C. & Lee, S.J., 1997. Double muscling in cattle due to mutations in

the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**(23), pp.12457–61.

5. Turner, C.H., 2000. Muscle-bone interactions, revisited. *Bone*, **27**(3), pp.339–40.
6. Yarasheski, K.E. et al., 2002. Serum myostatin-immunoreactive protein is increased in 60-92 year old women and men with muscle wasting. *The journal of nutrition, health & aging*, **6**(5), pp.343–8.
7. Zachwieja, J.J. et al., 1999. Plasma myostatin-immunoreactive protein is increased after prolonged bed rest with low-dose T3 administration. *Journal of gravitational physiology : a journal of the International Society for Gravitational Physiology*, **6**(2), pp.11–5.

Literatur mit dem Immundiagnostik Myostatin-ELISA

8. Bowser, M. et al., 2013. Effects of the activin A-myostatin-follistatin system on aging bone and muscle progenitor cells. *Experimental gerontology*, **48**(2), pp.290–7.
9. Cheung, W.W. et al., 2008. Modulation of melanocortin signaling ameliorates uremic cachexia. *Kidney international*, **74**(2), pp.180–6.
10. Diel, P. et al., 2010. Analysis of the effects of androgens and training on myostatin propeptide and follistatin concentrations in blood and skeletal muscle using highly sensitive immuno PCR. *Molecular and cellular endocrinology*, **330**(1-2), pp.1–9.
11. Eehalt, S. et al., 2011. Investigation of myostatin serum levels before and after a 6-month lifestyle intervention program in obese children. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, **119**(4), pp.238–42.
12. Gruson, D. et al., 2011. Increased plasma myostatin in heart failure. *European journal of heart failure*, **13**(7), pp.734–6.
13. Hittel, D.S. et al., 2010. Myostatin decreases with aerobic exercise and associates with insulin resistance. *Medicine and science in sports and exercise*, **42**(11), pp.2023–9.
14. Kukreti, H. et al., 2013. Muscle-specific microRNA1 (miR1) targets heat shock protein 70 (HSP70) during dexamethasone-mediated atrophy. *The Journal of biological chemistry*, **288**(9), pp.6663–78.
15. Lokireddy, S. et al., 2012. Myostatin is a novel tumoral factor that induces cancer cachexia. *The Biochemical journal*, **446**(1), pp.23–36.
16. Szulc, P. et al., 2012. Endocrine and clinical correlates of myostatin serum con-

- centration in men--the STRAMBO study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **97**(10), pp.3700–8.
17. Vamvini, M.T. et al., 2013. Irisin mRNA and circulating levels in relation to other myokines in healthy and morbidly obese humans. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, **169**(6), pp.829–34.
18. Wintgens, K.F. et al., 2012. Plasma myostatin measured by a competitive ELISA using a highly specific antiserum. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, **413**(15-16), pp.1288–94.
19. Zamora, E. et al., 2010. Serum myostatin levels in chronic heart failure. *Revista española de cardiología*, **63**(8), pp.992–6.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



Nur für Forschungszwecke



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

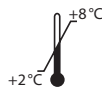
Manual

Myostatin ELISA Kit

*For the determination of Myostatin in human serum
and plasma*

Valid from 08.09.2014

REF K 1012



RUO



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	15
2. INTRODUCTION	15
3. MATERIAL SUPPLIED	16
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	17
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	17
<i>Sample storage</i>	17
<i>Preparation of samples, standards and controls</i>	18
7. ASSAY PROCEDURE	18
<i>Principle of the test</i>	18
<i>Test procedure</i>	19
8. RESULTS	20
9. LIMITATIONS	20
10. QUALITY CONTROL	21
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	21
<i>Precision and reproducibility</i>	21
<i>Analytical Sensitivity</i>	21
<i>Dilution recovery</i>	22
12. PRECAUTIONS	22
13. TECHNICAL HINTS	22
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	23
15. REFERENCES	23
<i>General literature</i>	23
<i>Literature using Immundiagnostik Myostatin-ELISA</i>	24

1. INTENDED USE

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

2. INTRODUCTION

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

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

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

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

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

Indications

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

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 1012MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 1012WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 1012PV	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready to use	1 x 100 ml
K 1012ST	STD	Standards (lyophilized)	2 x 5 vials
K 1012T	TRACER	Tracer, biotinylated myostatin	1 x 150 µl
K 1012KO1	CTRL	Control (lyophilized)	2 x 1 vial
K 1012KO2	CTRL	Control (lyophilized)	2 x 1 vial
K 1012K	CONJ	Conjugate (Streptavidin-labeled peroxidase)	1 x 200 µl
K 1012TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K 1012AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Laboratory balance
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 g
- Vortex
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩcm).

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted **1:10 in ultra pure water** before use (100 ml concentrate + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or 37°C before dilution of the buffer solutions. The **buffer concentrate** is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Diluted buffer solution** (wash buffer) can be stored in a closed flask at **2–8°C for one month**.
- The **TRACER** (biotinylated myostatin-tracer, concentrate) must be diluted **1:101 in SAMPLEBUF** (Sample dilution buffer) (e.g. 100 µl TRACER + 10 ml SAMPLEBUF). The TRACER (biotinylated myostatin-tracer) is stable at **2–8°C** until expiry date given on the label. **Diluted TRACER is not stable and cannot be stored.**
- The **lyophilized STD (standards) and CTRL (controls)** are stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. (Volume and concentration, see product specification). **Reconstituted standards and controls are not stable.**
- The **conjugate concentrate** (CONJ) must be diluted **1:101 in wash buffer** (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The concentrate is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Diluted conjugate is not stable and cannot be stored.**
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8°C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Sample storage

Either EDTA plasma or serum can be used for analysis.

Store samples until use at -20°C.

Preparation of samples, standards and controls

- Pipette **20 µl** of each **serum or plasma** sample in the respective labeled 1.5 ml reaction cups. Add **180 µl of SAMPLEBUF** (sample dilution buffer) to each sample, vortex well.
- **Dilution factor 1:10**
- Then add **200 µl diluted TRACER to 200 µl of each diluted sample**, vortex well. The prepared sample is named **pre-incubate**.
- Transfer **200 µl of STD or CTRL** in the corresponding reaction cups, add **200 µl of diluted TRACER** and mix well. Each treated standard or control is named **pre-incubate**.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) can be used for the quantitative determination of myostatin in serum and EDTA-plasma.

The assay is based on the method of a competitive ELISA. As a first preparation step, a biotinylated myostatin tracer is added to the samples, standards and controls. Afterwards, aliquots of the treated preparations are transferred and incubated in microtiter plate wells coated with polyclonal anti-myostatin antibodies. During the incubation, the free target antigen in the samples competes with the biotinylated myostatin tracer for the binding of the polyclonal anti-myostatin antibodies immobilized on the microtiter plate wells. The unbound components are removed by a washing step. During a second incubation step, a streptavidin-labeled-peroxidase antibody, which binds to the biotinylated myostatin tracer, is added into each microtiter well. After a washing step to remove the unbound components, the peroxidase substrate tetramethylbenzidine is added. Finally, the enzymatic reaction is terminated by an acidic stop solution. The color changes from blue to yellow and the absorbance is measured in the photometer at 450 nm. The intensity of the yellow color is inverse proportional to the myostatin concentration in the sample; this means, high myostatin concentration in the sample reduces the concentration of the biotinylated myostatin tracer bound to the immobilized anti-myostatin antibodies and lowers the photometric signal. A dose response curve of absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from the standard.

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15–30 °C) and mix well.

Take as many **microtiter strips** as needed from kit. Store unused microtiter strips sealed in the aluminium foil bag with desiccant at 2-8°C.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Add 100 µl of the pre-treated STD (standards), CTRL (controls) or samples (corresponding pre-incubate) into each well.
2.	Cover the strips and incubate for 2 hours shaking on a horizontal shaker at room temperature (15-30 °C).
3.	Decant the contents of each well. Wash the microtiter plate 5 x with 250 µl of wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution.
4.	Add 100 µl of diluted CONJ (conjugate) into each well.
5.	Cover the strips and incubate for 1 hour shaking on a horizontal shaker at room temperature (15-30 °C).
6.	Decant the contents of each well. Wash the microtiter plate 5 x with 250 µl of wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution.
7.	Add 100 µl of SUB (substrate solution) into each well.
8.	Incubate for 10 - 20 minutes* at room temperature (15-30°C).
9.	Add 100 µl of STOP (stop solution) into each well and mix shortly.
10.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the lowest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.

* The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend observing the color change and stopping the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the "4 parameter algorithm".

1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero standard must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

2. Point-to-point calculation

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

3. Spline algorithm

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

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

Serum and plasma samples

The estimated values are multiplied by a **dilution factor of 10**.

9. LIMITATIONS

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

Samples with concentrations above the measurement range must be further diluted and re-assayed. Please consider this greater dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range cannot be clearly quantified.

The upper limit of the measurement range can be calculated as:

highest concentration of the standard curve × sample dilution factor to be used

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

LoB × sample dilution factor to be used

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

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

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 23)

Sample	Myostatin [ng/ml]	CV [%]
1	24.1	10.4
2	37.9	7.8

Inter-Assay (n = 6)

Sample	Myostatin [ng/ml]	CV [%]
1	18.1	12.2
2	14.8	14.0

Analytical Sensitivity

The LoB (limit of blank) was evaluated according to the guideline CLSI EP17-A2 and resulted in 0.37 ng/ml.

Dilution recovery

Two patient serum samples were diluted and analyzed. The results are shown below (n = 2):

Sample	Dilution	Myostatin expected [ng/ml]	Myostatin measured [ng/ml]
1	1:10		30.4
	1:20	15.2	12.5
	1:40	7.6	8.7
2	1:10		29.0
	1:20	14.5	13.9
	1:40	7.3	8.2

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for research only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analyzed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.

- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

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

15. REFERENCES

General literature

1. Dschietzig, T.B., 2014. Myostatin - From the Mighty Mouse to cardiovascular disease and cachexia. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, **433C**, pp.216–224.
2. Gonzalez-Cadavid, N.F. et al., 1998. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**(25), pp.14938–43.
3. Hamrick, M.W. et al., 2006. Increased muscle mass with myostatin deficiency improves gains in bone strength with exercise. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, **21**(3), pp.477–83.
4. McPherron, a C. & Lee, S.J., 1997. Double muscling in cattle due to mutations in

the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**(23), pp.12457–61.

5. Turner, C.H., 2000. Muscle-bone interactions, revisited. *Bone*, **27**(3), pp.339–40.
6. Yarasheski, K.E. et al., 2002. Serum myostatin-immunoreactive protein is increased in 60-92 year old women and men with muscle wasting. *The journal of nutrition, health & aging*, **6**(5), pp.343–8.
7. Zachwieja, J.J. et al., 1999. Plasma myostatin-immunoreactive protein is increased after prolonged bed rest with low-dose T3 administration. *Journal of gravitational physiology : a journal of the International Society for Gravitational Physiology*, **6**(2), pp.11–5.

Literature using Immundiagnostik Myostatin-ELISA

8. Bowser, M. et al., 2013. Effects of the activin A-myostatin-follistatin system on aging bone and muscle progenitor cells. *Experimental gerontology*, **48**(2), pp.290–7.
9. Cheung, W.W. et al., 2008. Modulation of melanocortin signaling ameliorates uremic cachexia. *Kidney international*, **74**(2), pp.180–6.
10. Diel, P. et al., 2010. Analysis of the effects of androgens and training on myostatin propeptide and follistatin concentrations in blood and skeletal muscle using highly sensitive immuno PCR. *Molecular and cellular endocrinology*, **330**(1-2), pp.1–9.
11. Eehalt, S. et al., 2011. Investigation of myostatin serum levels before and after a 6-month lifestyle intervention program in obese children. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, **119**(4), pp.238–42.
12. Gruson, D. et al., 2011. Increased plasma myostatin in heart failure. *European journal of heart failure*, **13**(7), pp.734–6.
13. Hittel, D.S. et al., 2010. Myostatin decreases with aerobic exercise and associates with insulin resistance. *Medicine and science in sports and exercise*, **42**(11), pp.2023–9.
14. Kukreti, H. et al., 2013. Muscle-specific microRNA1 (miR1) targets heat shock protein 70 (HSP70) during dexamethasone-mediated atrophy. *The Journal of biological chemistry*, **288**(9), pp.6663–78.
15. Lokireddy, S. et al., 2012. Myostatin is a novel tumoral factor that induces cancer cachexia. *The Biochemical journal*, **446**(1), pp.23–36.
16. Szulc, P. et al., 2012. Endocrine and clinical correlates of myostatin serum con-

- centration in men--the STRAMBO study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **97**(10), pp.3700–8.
17. Vamvini, M.T. et al., 2013. Irisin mRNA and circulating levels in relation to other myokines in healthy and morbidly obese humans. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, **169**(6), pp.829–34.
18. Wintgens, K.F. et al., 2012. Plasma myostatin measured by a competitive ELISA using a highly specific antiserum. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, **413**(15-16), pp.1288–94.
19. Zamora, E. et al., 2010. Serum myostatin levels in chronic heart failure. *Revista española de cardiología*, **63**(8), pp.992–6.

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



For research use only



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number