

WISP2 / CCN5 ELISA Kit

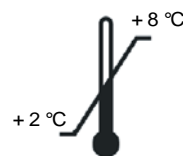
Zur Bestimmung des WISP2/CCN5 Proteins in Serum, Plasma und Synovialflüssigkeit

For the determination of WISP2/CCN5 in serum, plasma and synovial liquid

Gültig ab / Valid from 15.10.2012



K1015



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.Immundiagnostik.com

Inhalt / Content

1. Deutsch
2. English

Weitere Informationen zu unseren Produkten finden Sie auf unserer Homepage

Additional information about our products is available on our homepage

www.immundiagnostik.com

Inhaltsverzeichnis	Seite/Page
Table of content	2
1. VERWENDUNGSZWECK	5
2. INDIKATIONEN	5
3. EINLEITUNG	5
4. TESTPRINZIP	5
5. INHALT DER TESTPACKUNG	6
6. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	6
7. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	7
8. VORBEREITUNG DER STANDARDS	8
9. PROBENVORBEREITUNG	8
10. TESTDURCHFÜHRUNG	8
<i>PIPETTIERSCHEMA</i>	9
11. AUSWERTUNG	10
12. EINSCHRÄNKUNGEN	10
13. QUALITÄTSKONTROLLE	10
<i>ERWARTETE ERGEBNISSE</i>	11
14. TESTCHARAKTERISTIKA	11
<i>PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT</i>	11
<i>SENSITIVITÄT</i>	12
<i>KREUZREAKTIVITÄT</i>	12
15. LITERATUR	12
16. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST/VORSICHTSMASSNAHMEN	13

Table of content	Page
1. INTENDED USE	17
2. INDICATIONS	17
3. INTRODUCTION	17
4. PRINCIPLE OF THE TEST	17
5. MATERIAL SUPPLIED	18
6. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
7. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	19
8. PREPARATION OF STANDARDS	20
9. SAMPLE PREPARATION	20
10. PRECAUTIONS	20
<i>PROCEDURAL NOTES</i>	20
<i>TEST PROCEDURE</i>	21
11. RESULTS	22
12. LIMITATIONS	22
13. QUALITY CONTROL	22
14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	23
<i>PRECISION AND REPRODUCIBILITY</i>	23
<i>SENSITIVITY</i>	24
<i>CROSS REACTIVITY</i>	24
15. REFERENCES	24
16. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	25

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist zur quantitativen Bestimmung von **WISP2/CCN5** aus Serum, Plasma und Synovialflüssigkeit geeignet.

2. INDIKATIONEN

Krankheiten des Knochenstoffwechsels

3. EINLEITUNG

CCN (CYR61/CTGF/NOV)-Proteine sind extrazelluläre Modulatoren der Signalübertragung zwischen Matrix-assoziierten Proteinen und Molekülen auf der Zelloberfläche. Entsprechend ist WISP2 (Wnt1-inducible signaling pathway protein-2)/CCN5 an vielen physiologischen wie auch pathophysiologischen Prozessen beteiligt: WISP2/CCN5 kann in Knochen, Muskeln und Haut nachgewiesen werden, aber auch in der Gelenkinnenhaut von Patienten mit rheumatoider Arthritis. Bei Krebserkrankungen, wie z.B. Brust-, Bauchspeicheldrüsen- und Darmkrebs nimmt die Expression von WISP2/CCN5 ab je invasiver der Tumor wird. Zusätzlich konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Expression von WISP2/CCN5 die epithelial-mesenchymale Transition (EMT), die Migration und Invasion von Krebszellen verhindert.

4. TESTPRINZIP

Dieser Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) dient zur quantitativen Bestimmung von WISP2/CCN5 in Serum, Plasma und Synovialflüssigkeit. WISP2/CCN5 wird aus den Proben an auf Mikrotiterplatten fixierte polyklonale Antikörper (Kaninchen anti-human WISP2/CCN5) gebunden. Während eines Waschschrilles werden ungebundene Komponenten entfernt. Gebundenes WISP2/CCN5 wird mit Hilfe eines biotinylierten Antikörpers (Maus anti-WISP2/CCN5) detektiert. Dieser erkennt spezifisch das gebundene WISP2/CCN5. Über die Bindung von peroxidasemarkiertem Streptavidin an den biotinylierten Antikörper wird das WISP2/CCN5 durch die Peroxidase – TMB Reaktion detektiert (Blaufärbung). Nach Zugabe einer Stopplösung wechselt die Farbe von blau nach gelb. Die Farbentwicklung ist dabei zur nachgewiesenen Analytmenge (Probe bzw. Standard) proportional. Anhand mitgeführter Standards und deren spezifischen Konzentrationen lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

5. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K1015MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, beschichtet	96 Kavitäten
K1015WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	1 x 100 ml
K1015K	CONJ	Konjugat	1 x 200 µl
K1015A2	2 AB	2 Antikörper	1 x 200 µl
K1015ST	STD	Standard, lyophilisiert	3 x 1 vial
K1015KO1	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	2 x 1 vial
K1015KO2	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	2 x 1 vial
K1015TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K1015SV	STDBUF	Standardverdünnungspuffer	1x 100 ml
K1015PV	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer	1x 100 ml
K1015AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

6. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

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

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

7. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfacher Verwendung des Testkits darauf, dass alle 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 3 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml Reinstwasser). Aufgrund der hohen Salzkonzentration im Waschpufferkonzentrate kann es zu Kristallbildung kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8°C einen Monat** (in einem geschlossenen Gefäß) haltbar.
- Der lyophilisierte **Standard** (STD) und die **Kontrollen** (CTRL) werden mit **500 µl** Reinstwasser rekonstituiert. Um eine vollständige Lösung des rekonstituierten Standards zu gewährleisten den Standard mindestens **2 min**, jedoch nicht länger als 15min, bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Mischen stehen lassen. **Der rekonstituierte Standard und die Kontrollen sind nicht wieder verwendbar**.
- Der **2.AB** (2. Antikörper) wird **1:100** in verdünnten Waschpuffer verdünnt (z. B. 100 µl 2.AB + 990 µl Waschpuffer). Unverdünnter Antikörper ist bei 2-8 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünnter Antikörper ist nicht stabil und darf nicht wiederverwendet werden**.
- Das **CONJ** (Konjugat) wird **1:100** in verdünnten Waschpuffer verdünnt (z. B. 100 µl CONJ + 990 µl Waschpuffer). Unverdünntes Konjugat ist bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konjugat ist nicht stabil und darf nicht wiederverwendet werden**.
- Alle Testreagenzien sind bei 2-8°C zu lagern und bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

8. VORBEREITUNG DER STANDARDS

Die Verdünnungen für die Standardkurve werden aus dem WISP2-STD (Standard, S7; Konzentration: 2400 ng/ml) mit STDBUF (Standardverdünnungspuffer) in **1:2 Verdünnungsschritten** wie folgt hergestellt:

S7	S7: 2400 ng/ml
S6 = 250 µl S7 + 250 µl STDBUF	S6: 1200 ng/ml
S5 = 250 µl S6 + 250 µl STDBUF	S5: 600 ng/ml
S4 = 250 µl S5 + 250 µl STDBUF	S4: 300 ng/ml
S3 = 250 µl S4 + 250 µl STDBUF	S3: 150 ng/ml
S2 = 250 µl S3 + 250 µl STDBUF	S2: 75 ng/ml
S1	S1: 0 ng/ml

Als Standard **S1** (0 ng/ml) wird **SAMPLEBUF** (Probenverdünnungspuffer) verwendet.

- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8°C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

9. PROBENVORBEREITUNG

Serum-/Plasmaproben, Synovialflüssigkeit

Für den Test werden die Proben **1:10** in SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer) verdünnt,

z.B. 30 µl Probe + 270 µl SAMPLEBUF.

Aus dieser Endverdünnung werden dann **100 µl** / Kavität im Test eingesetzt.

Die unverdünnten Proben sind bei einer Lagerung von -20°C bis zu 6 Monaten stabil und können erneut analysiert werden.

10. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Die Immundiagnostik AG übernimmt hierfür keine Haftung.

- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Die Bestimmungen sind in der PLATE (Mikrotiterplatte) in Doppelwerten durchzuführen.

Pipettierschema

1. Die beschichtete PLATE (Mikrotiterplatte) vor Gebrauch **5x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen und nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
2. **100 µl STD/CTRL/SAMPLE** (Leerwert/Standards/Kontrollen/Probe/n) in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3. **2 Stunden** bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren.
4. Inhalt der Platte verwerfen, die Vertiefungen **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen und nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
5. **100 µl** verdünnten 2.AB (2. Antikörper) in jede Vertiefung pipettieren.
6. **1 Stunde** bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren.
7. Inhalt der Platte verwerfen, die Vertiefungen **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen und nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
8. **100 µl** verdünntes CONJ (Konjugat) in jede Vertiefung pipettieren.
9. **1 Stunde** bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren.
10. Inhalt der Platte verwerfen, die Vertiefungen **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen und nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
11. **100µl SUB** (Substrat) in jede Vertiefung pipettieren.
12. **10 - 20 Minuten** bei Raumtemperatur (18-26°C) inkubieren bis eine ausreichend große Farbdifferenzierung auftritt.
13. **100 µl STOP** (Stopplösung) pro Kavität pipettieren und kurz mischen.
14. **Extinktion** sofort im Mikrotiterplattenphotometer mit einer Messwellenlänge von **450 nm** messen. Sofern die höchste Extinktion der Standards (**STD**) den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte die Messung sofort bei einer Messwellenlänge von **405 nm** wiederholt und diese Ergebnisse für eine Auswertung herangezogen werden. Wenn möglich, sollten bei jeder Messung die Extinktionen der Messwellenlänge mit den Extinktionen einer Referenzwellenlänge verglichen werden. Zulässige Referenzwellenlängen sind z.B.: 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm und 690 nm.

11. AUSWERTUNG

Zur Auswertung empfehlen wir die 4-Parameter Funktion. Alternativ können die unten beschriebenen mathematischen Modelle verwendet werden .

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. 0.01).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

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

3. Gewichtete Spline-Funktion

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

Nach jeder automatischen Auswertung stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchführen; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte dies der Operator durchführen.

Die ermittelte Konzentration muss mit dem Verdünnungsfaktor der Probe multipliziert werden.

12. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer WISP2 /CCN5 Konzentration größer dem größten Standard sollten mit Probenpuffer in einer höheren Verdünnung nochmals im Assay eingesetzt werden.

13. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen Kontrollen bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegt der Messwert einer Kontrolle außerhalb des angegebenen Gültigkeitsbereiches kann die Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Proben nicht gewährleisten.

Erwartete Ergebnisse

Normbereich

Der Normbereich wurde anhand 200 augenscheinlich gesunden Patientenproben erstellt.

WISP2 /CCN5 im Serum/Plasma

Alter 0-15 Lebensjahre	0 – 25 [ng/ml]
Alter 15-20 Lebensjahre	0 – 50 [ng/ml]
Alter 20-30 Lebensjahre	200 – 700 [ng/ml]
Alter 30-40 Lebensjahre	400 – 900 [ng/ml]
Alter > 50 Lebensjahre	800– 1800 [ng/ml]

Synovialflüssigkeit weist einen erhöhten WISP2 /CCN5 Spiegel auf.

14. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben innerhalb einer Messserie wurde geprüft. Zwei Normalproben wurden 74 mal in einem WISP2/CCN5 ELISA von einer Person gemessen.

Intra-Assay VK n= 74

Probe	WISP2 [ng/ml]	Intra-Assay Vk [%]
1	1049	7
2	3517	4

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben an unterschiedlichen Tagen wurde geprüft. Zwei Normalproben wurden an verschiedenen Tagen und von verschiedenen Personen im WISP2/CCN5 ELISA gemessen.

Inter-Assay VK n= 28

Probe	WISP2 [ng/ml]	Inter-Assay Vk [%]
1	989	9
2	3554	7

Sensitivität

LoB Limit of Blank: 8,12 ng/ml

Der Limit of Blank wurde ermittelt als $B_0 + 1,645 SD_{\text{Blank}}$. Gemessen wurde 22 mal der Standard 0 (Probenpuffer; Probe ohne Analyt) im WISP2/CCN5 ELISA.

LoD Limit of Detection: 25,13ng/ml

Die untere Nachweisgrenze wurde ermittelt als $LoB + 1,645 SD_{\text{low sample}}$. Gemessen wurde 22 mal eine Probe (mit geringer Menge Analyt) im WISP2/CCN5 ELISA.

Kreuzreaktivität

Es wurde geringfügige Kreuzreaktivität zu anderen Proteinen der CCN-Familie (Cyr61; CTGF; NOV; WISP1; WISP3) und Albumin festgestellt.

Kreuzreaktivität WISP2/CCN5 ELISA					
Albumin	CYR 61	CTGF	NOV	WISP1	WISP3
0.78%	0.01%	1.97%	0.16%	0.27%	3.19%

15. LITERATUR

Banerjee, S. u. a., 2008. CCN5/WISP-2 expression in breast adenocarcinoma is associated with less frequent progression of the disease and suppresses the invasive phenotypes of tumor cells. *Cancer Research*, 68(18), S.7606–7612.

Banerjee, S. u. a., 2003. WISP-2 Gene in Human Breast Cancer: Estrogen and Progesterone Inducible Expression and Regulation of Tumor Cell Proliferation. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 5(1), S.63–73.

Davies, S.R. u. a., 2010. Differential expression of the CCN family member WISP-1, WISP-2 and WISP-3 in human colorectal cancer and the prognostic implications. *International Journal of Oncology*, 36(5), S.1129–1136.

Dhar, G. u. a., 2007. Loss of WISP-2/CCN5 signaling in human pancreatic cancer: a potential mechanism for epithelial-mesenchymal-transition. *Cancer Letters*, 254(1), S.63–70.

- Fritah, A. u. a., 2008. Role of WISP-2/CCN5 in the Maintenance of a Differentiated and Noninvasive Phenotype in Human Breast Cancer Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 28(3), S.1114–1123.
- Inadera, H. u. a., 2000. WISP-2 as a novel estrogen-responsive gene in human breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275(1), S.108–114.
- Jones, J.A. u. a., 2007. CCN5 expression in mammals. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 1(2), S.127–143.
- Jun, J.-I. & Lau, L.F., 2011. Taking aim at the extracellular matrix: CCN proteins as emerging therapeutic targets. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 10(12), S.945–963.
- Lake, A.C. u. a., 2003. CCN5 Is a Growth Arrest-Specific Gene That Regulates Smooth Muscle Cell Proliferation and Motility. *The American Journal of Pathology*, 162(1), S.219–231.
- Leask, A. & Abraham, D.J., 2006. All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *Journal of cell science*, 119(Pt 23), S.4803–4810.
- Rittié, L. u. a., 2011. Spatial-temporal modulation of CCN proteins during wound healing in human skin in vivo. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 5(1), S.69–80.
- Russo, J.W. & Castellot, John J., 2010. CCN5: biology and pathophysiology. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 4(3), S.119–130.
- Sabbah, M. u. a., 2011. CCN5, a Novel Transcriptional Repressor of the Transforming Growth Factor β Signaling Pathway ∇ . *Molecular and Cellular Biology*, 31(7), S.1459–1469.
- Tanaka, I. u. a., 2005. Expression and regulation of WISP2 in rheumatoid arthritic synovium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334(4), S.973–978.
- Wiesman, K.C. u. a., 2010. CCN5, a secreted protein, localizes to the nucleus. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 4(2), S.91–98.
- Yeger, H. & Perbal, B., 2007. The CCN family of genes: a perspective on CCN biology and therapeutic potential. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 1(3), S.159–164.

16. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST/VORSICHTSMASSNAHMEN

- Falls für die Herstellung der Testkomponenten Humanserum verwendet wurde, ist dieses auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befunden worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Testkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid. Natriumazid ist giftig. Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit der Haut oder der Schleimhaut ist zu vermeiden.

- Alle im Test enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken oder, wenn vermerkt, zur *in vitro* Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Datums nicht mehr verwendet werden.
- Einzelkomponenten verschiedener Chargen dürfen nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgestimmte Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller- der Immundiagnostik AG zurück zu senden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter H_2SO_4 . H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht behandelt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit Haut/Schleimhäuten muss die betroffene Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	Nur für Forschungszwecke		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Hersteller		Verwendbar bis
	Chargenbezeichnung		

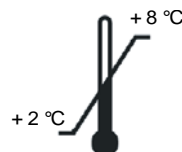
WISP2/CCN5 ELISA Kit

For the determination of WISP2/CCN5 in serum, plasma and synovial liquid

Valid from 15.10.2012



K1015



1. INTENDED USE

The assay described here is intended for the quantitative determination of **WISP2/CCN5** in serum, plasma and synovial liquid.

2. INDICATIONS

Diseases of bone metabolism

3. INTRODUCTION

CCN (Cyr 61; CTGF; NOV) proteins are extracellular modulators of signal transduction between matrix associated proteins and molecules belong to the cell surface. WISP2/ CCN5 is participated in many physiological and pathophysiological processes. It can be measured in bone, muscle and dermis, also in the synovium of patients with rheumatoid arthritis (RA). At cancer e.g. breast, pancreas and colon cancer the expression level of WISP2/CCN5 is decreased when the tumor becomes more invasive. Additionally it could be shown (in vivo) that WISP2/CCN5 expression stopped the epithelial mesenchymal transition (EMT) and the migration of cancer cells.

4. PRINCIPLE OF THE TEST

This Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) is intended for the quantitative determination of **WISP2/CCN5** in serum, plasma and synovial liquid. The WISP2/CCN5 in the sample is bound to polyclonal antibodies (rabbit-anti-human WISP2/CCN5) coated on a microtiter plate. A wash step removes all unbound components of the sample. The detection of bound WISP2/CCN5 takes place with a biotinylated secondary antibody (monoclonal mouse-anti WISP2/CCN5). In a next step peroxidase-labeled Streptavidin is pipetted into the wells. The Peroxidase-Tetramethylbenzidine (TMB) reaction produces a blue color. After adding a stop solution, the color changes from blue to yellow. The intensity of the color reaction product is proportional to the concentration of the analyte in the samples, standards and controls. With the help of the standard curve the concentration of the sample can exactly be determined.

5. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K1015MTP	PLATE	One holder with coated strips	96 wells
K1015WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	1 x 100 ml
K1015K	CONJ	Conjugate	1 x 200 µl
K1015A2	2AB	2. Antibody	1 x 200 µl
K1015ST	STD	Standard, lyophilized	3 x 1 vial
K1015KO1	CTRL	Control, lyophilized	3 x 1 vial
K1015KO2	CTRL	Control, lyophilized	3 x 1 vial
K1015TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K1015SV	STDBUF	Standard Dilution buffer	1 x 100 ml
K1015PV	SAMPLEBUF	Sample Dilution buffer	1 x 100 ml
K1015AC	STOP	ELISA stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

6. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

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

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

7. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 3 times within the expiry date stated on the label.
- The **ELISA WASHBUF** (wash buffer concentrate) has to be diluted with ultra-pure-water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra-pure-water). Crystals could occur due to high salt concentration. The crystals must be re-suspended **before dilution of the buffer solutions** using a water bath (37°C). The buffer concentrate is stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label. Diluted solutions can be stored at 2-8°C for 1 month.
- The **STD** (standard) and **CTRL** (controls) must be reconstituted with **500 µl ultra-pure-water**. Allow the vial content to dissolve for **2 minutes** and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. **Reconstituted standard and controls are not stable and cannot be used repeatedly.**
- The **2. AB** (secondary Antibody) must be diluted **1:100** in diluted wash buffer (e.g. 100 µl 2.AB + 990 µl wash buffer). Undiluted 2.AB is stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label. **Diluted antibody solution is not stable and cannot be used repeatedly.**
- The **CONJ** (conjugate) must be diluted **1:100** in diluted wash buffer (e.g. 100 µl CONJ + 990 µl wash buffer). Undiluted CONJ is stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label. **Diluted conjugate solution is not stable and cannot be used repeatedly.**
- All other test reagents are ready for use. The test reagents are stable up to the date of expiry (see label of test package) when stored at **2-8°C**.

8. PREPARATION OF STANDARDS

For the standard curve dilute the concentrate WISP2-STD (Standard, S7; concentration: 2400 ng/ml) with STDBUF (standard dilution buffer) **in 1:2 dilution steps** as described in the following example:

S7 **S7:** 2400 ng/ml

S6 = 250 µl S7 + 250 µl STDBUF **S6:** 1200 ng/ml

S5 = 250 µl S6 + 250 µl STDBUF **S5:** 600 ng/ml

S4 = 250 µl S5 + 250 µl STDBUF **S4:** 300 ng/ml

S3 = 250 µl S4 + 250 µl STDBUF **S3:** 150 ng/ml

S2 = 250 µl S3 + 250 µl STDBUF **S2:** 75 ng/ml

S1 **S1:** 0 ng/ml

SAMPLEBUF is used as zero standard **S1** (0 ng/ml).

9. SAMPLE PREPARATION

Serum and Plasma samples, synovial liquid

Samples are diluted **1:10** in **SAMPLEBUF** (sample dilution buffer), e.g. 30 µl Sample + 270 µl **SAMPLEBUF**.

Use **100 µl** of the final diluted sample per well.

The undiluted samples are stable up to 6 months when stored at -20°C and can be reanalyzed.

10. PRECAUTIONS

Procedural notes

- Do not mix different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the test results. Immundiagnostik can therefore not be held responsible for any damage.
- Carry out the assay with the actual manual delivered with the kit.

- The quality control guidelines should be observed.
- Carry out the determinations in the PLATE (micro titer plate) in duplicate.

TEST PROCEDURE

1. Wash the coated PLATE (microtiter plate) **5 x with 250 µl** ELISA wash buffer. After the last wash, tap the PLATE firmly on absorbent paper to remove excess liquid.
2. Add **100 µl of STD/CTRL/SAMPLE** (Standards/Controls/Sample) in duplicate into respective well.
3. Incubate for **2 hours**, shaking on a horizontal mixer, at room temperature (18-26°C).
4. Aspirate and wash the wells **5 x with 250 µl** diluted wash buffer. After the final washing step, tap firmly the microtiter plate on absorbent paper to remove excess liquid.
5. Add **100 µl** of diluted 2.AB in each well.
6. Incubate for **1 hour**, shaking on a horizontal mixer, at room temperature (18-26°C).
7. Aspirate and wash the wells **5 x with 250 µl** diluted wash buffer. After the final washing step, tap firmly the microtiter plate on absorbent paper to remove excess liquid.
8. Add **100 µl** of diluted CONJ (conjugate) in each well.
9. Incubate for **1 hour**, shaking on a horizontal mixer, at room temperature (18-26°C).
10. Aspirate and wash the wells **5 x with 250 µl** diluted wash buffer. After the final washing step, tap firmly the microtiter plate on absorbent paper to remove excess liquid.
11. Add **100 µl** of SUB (TMB substrate) in each well.
12. Incubate for **10-20 minutes** at room temperature (18-26°C).
13. Add **100 µl** of STOP (stop solution) in each well and mix shortly.
14. Determine **absorption** immediately with an ELISA reader at **450 nm**. If the highest extinction of the standards (**STD**) is above the range of the photometer, absorption must be measured immediately at **405 nm** and the obtained results used for evaluation. If possible, the extinctions from each measurement should be compared with extinctions obtained at a reference wavelength, e. g. 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm and 690 nm can be used.

11. RESULTS

We recommend to use the 4-parameter-algorithm for evaluation of the results. Alternatively, the other two algorithms can be used.

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 calibrator has to be specified with a value smaller than 1 (e. g. 0.01).

2. **Point-to-point-calculation**

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

3. **Spline-algorithm**

We recommend for the optical density a linear ordinate and for the concentration a logarithmic abscissa. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator has to be specified with a value smaller than 1 (e. g. 0.01).

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

The estimated concentration must be multiplied by the dilution factor of the sample.

12. LIMITATIONS

Samples with a WISP2/CCN5 level greater than the highest calibrator, should be prepared in a higher dilution and re-assayed.

13. QUALITY CONTROL

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

Expected results

Normal range

The normal range was estimated based on sample values obtained from 200 apparently healthy persons.

WISP2/CCN5 in serum or plasma

Age 0-15	0 – 25 [ng/ml]
Age 15-20	0 – 50 [ng/ml]
Age 20-30	200 – 700 [ng/ml]
Age 30-40	400 – 900 [ng/ml]
Age > 50	800– 1800 [ng/ml]

Synovial liquid has a considerable higher WISP2 /CCN5 level.

14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

The precision (intra-assay variation) was calculated from 74 replicate measurements of two normal samples in the WISP2/CCN5 ELISA by one person.

Intra-Assay CV n= 74

Sample	WISP2 [ng/ml]	Intra-Assay CV [%]
1	1049	7
2	3517	4

The precision (inter-assay variation) was calculated from WISP2/CCN5 ELISA measurements of two normal samples on different days by two persons.

Inter-Assay CV n= 28

Sample	WISP2 [ng/ml]	Inter-Assay CV [%]
1	989	9
2	3554	7

Sensitivity

LoB Limit of Blank: 8,12 ng/ml

The limit of blank was determined as $B_0 + 1,645 SD_{\text{Blank}}$. Standard 0 (Sample buffer; sample without analyte) was measured 22 times in the WISP2 /CCN5 ELISA.

LoD Limit of Detection: 25,13 ng/ml

The lower limit of detection was determined as $LoB + 1,645 SD_{\text{low sample}}$. A sample with a low amount of analyte was measured 22 times in the WISP2/CCN5 ELISA.

Cross reactivity

There was insignificant cross-reactivity with the other proteins of the CCN-family (Cyr61; CTGF; NOV; WISP1; WISP3) and albumin.

Cross-Reactivity WISP2/CCN5 ELISA					
Albumin	CYR 61	CTGF	NOV	WISP1	WISP3
0.78%	0.01%	1.97%	0.16%	0.27%	3.19%

15. REFERENCES

- Banerjee, S. u. a., 2008. CCN5/WISP-2 expression in breast adenocarcinoma is associated with less frequent progression of the disease and suppresses the invasive phenotypes of tumor cells. *Cancer Research*, 68(18), S.7606–7612.
- Banerjee, S. u. a., 2003. WISP-2 Gene in Human Breast Cancer: Estrogen and Progesterone Inducible Expression and Regulation of Tumor Cell Proliferation. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 5(1), S.63–73.
- Davies, S.R. u. a., 2010. Differential expression of the CCN family member WISP-1, WISP-2 and WISP-3 in human colorectal cancer and the prognostic implications. *International Journal of Oncology*, 36(5), S.1129–1136.
- Dhar, G. u. a., 2007. Loss of WISP-2/CCN5 signaling in human pancreatic cancer: a potential mechanism for epithelial-mesenchymal-transition. *Cancer Letters*, 254(1), S.63–70.
- Fritah, A. u. a., 2008. Role of WISP-2/CCN5 in the Maintenance of a Differentiated and Noninvasive Phenotype in Human Breast Cancer Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 28(3), S.1114–1123.

- Inadera, H. u. a., 2000. WISP-2 as a novel estrogen-responsive gene in human breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275(1), S.108–114.
- Jones, J.A. u. a., 2007. CCN5 expression in mammals. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 1(2), S.127–143.
- Jun, J.-I. & Lau, L.F., 2011. Taking aim at the extracellular matrix: CCN proteins as emerging therapeutic targets. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 10(12), S.945–963.
- Lake, A.C. u. a., 2003. CCN5 Is a Growth Arrest-Specific Gene That Regulates Smooth Muscle Cell Proliferation and Motility. *The American Journal of Pathology*, 162(1), S.219–231.
- Lake, A.C. & Castellot, John J., 2003. CCN5 modulates the antiproliferative effect of heparin and regulates cell motility in vascular smooth muscle cells. *Cell communication and signaling* [\[7\]](#): CCS, 1, S.5.
- Leask, A. & Abraham, D.J., 2006. All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *Journal of cell science*, 119(Pt 23), S.4803–4810.
- Rittié, L. u. a., 2011. Spatial-temporal modulation of CCN proteins during wound healing in human skin in vivo. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 5(1), S.69–80.
- Russo, J.W. & Castellot, John J., 2010. CCN5: biology and pathophysiology. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 4(3), S.119–130.
- Sabbah, M. u. a., 2011. CCN5, a Novel Transcriptional Repressor of the Transforming Growth Factor β Signaling Pathway ∇ . *Molecular and Cellular Biology*, 31(7), S.1459–1469.
- Tanaka, I. u. a., 2005. Expression and regulation of WISP2 in rheumatoid arthritic synovium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334(4), S.973–978.
- Wiesman, K.C. u. a., 2010. CCN5, a secreted protein, localizes to the nucleus. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 4(2), S.91–98.
- Yeger, H. & Perbal, B., 2007. The CCN family of genes: a perspective on CCN biology and therapeutic potential. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 1(3), S.159–164.

16. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- 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 as bactericides. Sodium azide is toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

Used symbols:

Temperature limitation



Catalogue Number



For research use only



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number