

bioactive Sclerostin

(EN) ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF
BIOACTIVE SCLEROSTIN IN SERUM, EDTA PLASMA OR CITRATE PLASMA
CAT. NO. BI-20472 . 12 X 8 TESTS

(DE) ENZYM IMMUNOASSAY ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON
BIOAKTIVEM SCLEROSTIN IN HUMAN SERUM, EDTA PLASMA ODER CITRATE
PLASMA
KAT. NR. BI-20472 . 12 X 8 TESTS

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES

*For the measurement of bioactive Sclerostin in cell culture supernatants or urine please visit our
homepage www.bmgrp.com.*

rev.no. 180124

This kit was developed and manufactured by:
Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, A-1210 Wien, Divischgasse 4
Tel. +43/1/291 07 45, Fax +43/1/291 07 85, E-mail export@bmgrp.com



CONTENT / INHALT

ENGLISH **Page 3**
DEUTSCH **Seite 7**

Detailed information on the assay characteristics including the validation data can be found on our website.

Detaillierte Informationen zu den Testmerkmalen einschließlich der Validierungsdaten finden Sie auf unserer Website.

www.bmgrp.com

1) INTRODUCTION

The human *bioactive Sclerostin* immunoassay is a 3.5 hour, 96-well, sandwich ELISA for the quantitative determination of bioactive Sclerostin in human serum, EDTA plasma, and citrate plasma. The assay employs human based serum standards to ensure biological reliable data. The antibody characterization of both antibodies utilized in this assay comprises epitope mapping, binding kinetics, and determination of antibody purity (for further information on antibody characterization please visit our website www.bmgrp.com, see Validation Data).

Sclerostin is a 22.5 kDa secreted glycoprotein that functions as a potent inhibitor of Wnt signaling. It acts by binding to the Wnt-coreceptor LRP5/6 thus inhibiting bone formation by regulating osteoblast function and promoting osteoblast apoptosis (1,2). The Sclerostin protein consists of two flexible N- and C-terminal arms and a cystine-knot with three loops, whereas the second loop binds to the LRP5/6 complex (3,4). Sclerostin is classically considered to be a monomeric protein, but data from *Hernandez and colleagues* (5) postulate that circulating sclerostin has a dimeric configuration. In addition, it is not yet well documented if also Sclerostin fragments circulate, but the comparison of different Sclerostin ELISAs suggest that fragments exist as well (6,7).

As the epitope of the monoclonal capture antibody utilized in the *bioactive Sclerostin ELISA* is located in loop 2, the binding region to the LRP 5/6 complex, all Sclerostin molecules (including potential fragments) containing this receptor binding region can be detected.

Sclerostin is nearly exclusively produced in osteocytes (8). Mutations in the Sclerostin (SOST) gene can cause sclerosteosis and van Buchem disease which are bone dysplasia disorders characterized by progressive skeletal overgrowth (9,10). Sclerostin levels are altered in response to hormonal stimuli or due to pathophysiological conditions. Sclerostin concentrations are increased in disorders such as hypoparathyroidism (11), Paget's disease (12), multiple myeloma (13) and in cancer induced bone diseases (12). Sclerostin levels are decreased in primary hyperparathyroidism (14), as well as by the mechanical stimulation of bone (15). Several studies have found a positive association between sclerostin and bone mineral density (16,17). Sclerostin levels in chronic kidney disease (CKD) patients are up to 4-fold increased compared to patients without CKD and increase with CKD stage and declining kidney function (18,19). In CKD patients, renal elimination of sclerostin increases with decreasing renal function (20). In dialysis patients, sclerostin is an independent predictor of bone loss (21). Numerous studies have shown that serum sclerostin levels are also associated with cardiovascular events (22,23). A monoclonal sclerostin antibody for the treatment of osteoporosis is currently undergoing clinical trials (24). For reviews please see references (25,26).

Areas of Interest

- Osteoporosis
- Cancer induced bone diseases
- Rheumatoid arthritis
- Chronic inflammation
- Kidney diseases
- Therapy monitoring of anabolic treatment

2) CONTENT OF THE KIT

CONT	KIT COMPONENTS	QUANTITY
PLATE	Recombinant human monoclonal Sclerostin antibody, pre-coated microtiter strips in a strip holder, in aluminium bag with desiccant	12 x 8 tests
WASHBUF	Wash buffer, natural cap, concentrate 20x	1 x 50 ml
ASYBUF	Assay buffer, red cap, ready to use	1 x 13 ml
STD	Standard 1-7 (0; 10; 20; 40; 80; 160; 320 pmol/l), white caps, lyophilised	7 vials
CTRL	Controls A+B, yellow caps, lyophilised (exact concentration on the label)	2 vials
CONJ	Conjugate (polyclonal goat anti human Sclerostin antibody)-HRPO, amber bottle, amber cap, ready to use	1 x 13 ml
SUB	Substrate (TMB solution), amber bottle, blue cap, ready to use	1 x 13 ml
STOP	Stop solution, white cap, ready to use	1 x 7 ml

3) ADDITIONAL MATERIAL IN THE KIT

- 2 self-adhesive plastic films
- Quality control protocol
- Protocol sheet
- Instruction for use

4) MATERIAL AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Precision pipettes calibrated to deliver 20 µl, 50 µl, 100 µl, 250 µl and disposable tips
- Distilled or deionised water
- Plate washer is recommended for washing, alternative multichannel pipette or manifold dispenser
- ELISA reader capable of measuring absorbance at 450 nm (reference wavelength 630 nm)
- Graph paper or software for calculation of results

5) REAGENTS AND SAMPLE PREPARATION

All reagents of the kit are stable at 4°C (2-8°C) until expiry date stated on the label of each reagent.

Sample preparation:

Serum, EDTA plasma, and citrate plasma are suitable for use in this assay. Don't change sample type during studies.

Collect venous blood samples by using standardized blood collection tubes. Perform serum or plasma (EDTA, citrate) separation by centrifugation according to supplier's instructions of the blood collection devices. The acquired serum or plasma samples should be measured as soon as possible. For longer storage aliquot samples and store at -25°C or lower. Do not freeze-thaw samples more than 4 times. Lipemic or haemolysed samples may give erroneous results. Samples should be mixed well before assaying. We recommend duplicates for all values. Samples with values above STD7 (320 pmol/l) can be diluted with ASYBUF (Assay buffer).

For further information on sample stability please visit our website www.bmgrp.com (see Validation Data) or contact our customer service by e-mail export@bmgrp.com or by phone +43/ 1/ 29107-45.

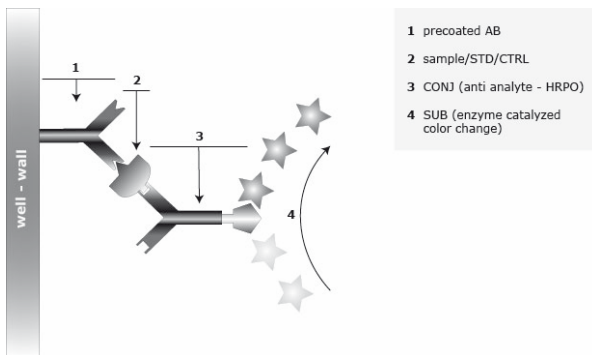
Reagent preparation:

WASHBUF (Wash buffer): Dilute the concentrate 1:20, e.g. 50 ml WASHBUF + 950 ml distilled water. Crystals in the buffer concentrate will dissolve at room temperature. The undiluted WASHBUF is stable at 4°C (2-8°C) until expiry date stated on label. The diluted WASHBUF is stable up to one month at 4°C (2-8°C). Use only diluted WASHBUF when performing the assay.

STD (Standards) + CTRL (Controls): Pipette 250 µl of distilled or deionised water into each vial. Leave at room temperature (18-26°C) for 15 min. Mix well. Reconstituted STDs and CTRLs are stable at -25°C or lower until expiry date stated on label. STDs and CTRLs are stable for at least 4 freeze-thaw cycles.

6) PRINCIPLE OF THE ASSAY

This kit is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative determination of bioactive sclerostin in human serum and plasma samples (EDTA, citrate). In a first step, assay buffer is pipetted into the wells of the microtiter strips. Thereafter, STD/sample/CTRL are pipetted into the wells, which are pre-coated with the recombinant human monoclonal Sclerostin antibody. Any bioactive Sclerostin present in the STD/sample/CTRL binds to the pre-coated antibody in the well. After incubation, a washing step is applied where all non-specific unbound material is removed. In a next step, the conjugate (anti sclerostin-HRPO) is pipetted into the wells and reacts with bioactive Sclerostin present in the sample, forming a sandwich. After another washing step, the substrate (TMB Tetramethylbenzidine) is pipetted into the wells. The enzyme catalysed colour change of the substrate is directly proportional to the amount of bioactive sclerostin. This colour change is detectable with a standard microtiter plate ELISA reader. A dose response curve of the absorbance (optical density, OD at 450 nm) versus standard concentration is generated, using the values obtained from the standards. The concentration of bioactive sclerostin in the sample is determined directly from the dose response curve.



- 1 precoated AB
- 2 sample/STD/CTRL
- 3 CONJ (anti analyte - HRPO)
- 4 SUB (enzyme catalyzed color change)

Detailed information on the antibodies utilized in this ELISA can be found www.bmgrp.com, s. Validation Data.

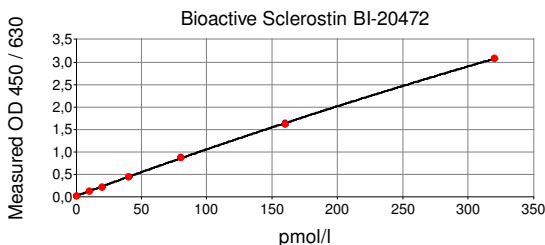
7) ASSAY PROTOCOL

All reagents and samples must be at room temperature (18-26°C) before use in the assay.
Mark position for STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) on the protocol sheet.
Take microtiter strips out of the aluminium bag. Store unused strips with desiccant at 4°C (2-8°C) in the aluminium bag. Strips are stable until expiry date stated on the label.
1) Pipette 100 µl ASYBUF (Assay buffer, red cap) into each well.
2) Add 20 µl STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) in duplicate into respective well. Swirl gently.
3) Cover tightly and incubate for 2 hours at room temperature (18-26°C).
4) Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer). After final wash, remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel.
5) Add 100 µl CONJ (Conjugate, amber cap) into each well. Swirl gently.
6) Cover tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) in the dark.
7) Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer). After final wash, remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel.
8) Add 100 µl SUB (Substrate, blue cap) into each well. Swirl gently.
9) Incubate for 30 min at room temperature (18-26°C) in the dark.
10) Add 50 µl STOP (Stop solution, white cap) into each well. Swirl gently.
11) Measure absorbance immediately at 450 nm with reference 630 nm, if available.

8) CALCULATION OF RESULTS

Read the optical density (OD) of all wells on a plate reader using 450 nm wavelength (reference wavelength 630 nm). Construct the standard curve from the OD values of the STD. Use commercially available software or graph paper. Obtain sample concentration from the standard curve. The assay was evaluated with logit-log and 4PL algorithm curve fitting. Different curve fitting methods need to be evaluated by the user.

Typical STD-curve:



The quality control protocol supplied with the kit shows the results of the final release QC for each kit at production date. Data for OD obtained by customers may differ due to various influences and/or due to the normal decrease of signal intensity during shelf life. However, this does not affect validity of results as long as an OD of 1.00 or higher is obtained for the standard with the highest concentration and the control value is in range (target range see label).

9) ASSAY CHARACTERISTICS

Method	Sandwich ELISA, HRP/TMB, 12x8-well strips			
Sample type	Serum, EDTA plasma, and citrate plasma (cell culture and urine protocol available)			
Standard range	0 to 320 pmol/l (7 standards and 2 controls in a human serum matrix.) (Standards: 0/10/20/40/80/160/320 pmol/l)			
Conversion factor	Sclerostin: 1 pg/ml = 0.046 pmol/l, 1 pmol/l = 21.793 pg/ml (MW: 21.8 kDa)			
Sample volume	20 µl / well			
Incubation time, temp.	2 h / 1 h / 30 min, room temperature			
Sensitivity	LOD: (0 pmol/l + 3 SD): 1.9 pmol/l; LLOQ: 1.3 pmol/l			
Specificity	This assay recognizes endogenous and recombinant human bioactive Sclerostin.			
Precision	Intra-assay (n=3) ≤ 1%, Inter-assay (n=7) ≤ 5%			
Spike/Recovery	Average % recovery spiked with 26 and 110 pmol/l, respectively	Serum (n=5): 93%, 86% EDTA plasma (n=5): 94%, 93% Citrate plasma (n=1): 104%, 99%		
Dilution linearity of recombinant Sclerostin	<u>Average % of expected of dilution:</u>	<u>1+1</u>	<u>1+3</u>	<u>1+7</u>
	Serum (n=6):	98	86	89
	EDTA plasma (n=6):	102	99	91
	Citrate plasma (n=1):	119	132	103
Dilution linearity of endogenous Sclerostin	<u>Average % of expected of dilution:</u>	<u>1+1</u>	<u>1+3</u>	<u>1+7</u>
	Serum (n=7):	100	103	106
	EDTA plasma (n=6):	105	108	123
	Citrate plasma (n=2):	91	91	103
Values of apparently healthy individuals	Median serum (n=32): 61.5 pmol/l Median EDTA plasma (n=24): 87 pmol/l Median citrate plasma (n=24): 61.5 pmol/l Each laboratory should establish its own reference range for the samples under investigation. Do not change sample type during the study.			

For details on validation data and assay characteristics please visit our website www.bmgrp.com (see Validation Data) or contact our customer service by e-mail export@bmgrp.com or by phone +43/ 1/ 29107-45.

10) PRECISION

Intra-assay: 2 samples of known concentrations were tested 3 times with 1 assay lot by one operator.

Inter-assay: 2 samples of known concentrations were tested 7 times with 2 assay lots by 2 different operators.

Intra-assay (n=3)	Sample 1	Sample 2	Inter-assay (n=7)	Sample 1	Sample 2
Mean (pmol/l)	19	153	Mean (pmol/l)	19	157
SD (pmol/l)	0.3	1.0	SD (pmol/l)	1.0	8.3
CV (%)	1	1	CV (%)	5	5

11) TECHNICAL HINTS

- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- Do not mix stoppers and caps from different reagents or use reagents between lots.
- Do not use reagents beyond expiration date.
- Protect reagents from direct sunlight.
- Substrate solution should remain colourless until added to the plate.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.

12) PRECAUTIONS

All test components of human source were tested against HIV-Ab, HCV-Ab and HBsAg and were found negative. Nevertheless, they should be handled and disposed of as if they were infectious.

Liquid reagents contain $\leq 0.1\%$ Proclin 300 as preservative. Avoid contact with skin and mucous membrane. Proclin 300 is not toxic in concentrations used in this kit. It may cause allergic skin reactions – avoid contact with skin or eyes.

- Do not pipette by mouth.
- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics where reagents are used.
- Avoid all contact with reagents by using gloves.
- Sulfuric acid is irritating to eyes and skin. Avoid contact with skin and mucous membrane. Irritations are possible – Flush with water if contact occurs!!

13) LITERATURE

1. Sclerostin and Wnt signaling-the pathway to bone strength. Ott SM, J Clin Endocrinol Metab, 2005; 90(12):6392-6395.
2. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. Semenov M et al., J Biol Chem, 2005; 280(29):26770-26775.
3. Characterization of the structural features and interactions of sclerostin: molecular insight into a key regulator of Wnt-mediated bone formation. Veverka V et al., J Biol Chem, 2009; 284:10890-10900.
4. Characterization of the Interaction of Sclerostin with the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP) Family of Wnt Co-receptors. Holdsworth G et al., J Biol Chem, 2012; 284(16), 287(32): 26464-26477.
5. New insights into the location and form of sclerostin. Hernandez P et al., Biochem Biophys Res Commun, 2014; 446 (4):1108-1113.
6. Association of circulating sclerostin with bone mineral mass, microstructure, and turnover biochemical markers in healthy elderly men and women. Durosier C et al., J Clin Endocrinol Metab, 2013; 98 (9):3873-3883.
7. Circulating sclerostin levels are decreased in patients with endogenous hypercortisolism and increase after treatment. van Lierop AH et al., J Clin Endocrinol Metab, 2012; 97:E1953-E1957.
8. The Osteocyte: An Endocrine Cell ... and More. Dallas SL et al., Endocrine Rev, 2013; 34:658-690.
9. Sclerostin in mineralized matrices and van Buchem disease. van Bezooijen RL et al., J Dent Res, 2009; 88(6):569-574.
10. Patients with Van Buchem disease, an osteosclerotic genetic disease, have elevated bone formation markers, higher bone density, and greater derived polar moment of inertia than normal. Wergedal, JE et al., J Clin Endocrinol Metab, 2003; 88:5778.
11. Circulating sclerostin in disorders of parathyroid gland function. Costa AG et al., J Clin Endocrinol Metab, 2011; 96: 3804-3810.

12. Serum sclerostin levels in Paget's disease and prostate cancer with bone metastases with a wide range of bone turnover. Yavropoulou MP et al., *Bone*, 2012; 51:153-157.
13. Elevated circulating sclerostin correlates with advanced disease features and abnormal bone remodeling in symptomatic myeloma: reduction post-bortezomib. Monotherapy. Terpos E et al., *Int J Cancer*, 2012; 131:1466-1471.
14. Patients with primary hyperparathyroidism have lower circulating sclerostin levels than euparathyroid controls. Van Lierop AH et al., *Eur J Endocrinol*, 2010; 163:833-837.
15. Mechanical stimulation in vivo reduces osteocyte expression of sclerostin. Robling AG et al., *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2006; 6(4):354.
16. Association of serum sclerostin with bone mineral density, bone turnover, steroid and parathyroid hormones, and fracture risk in postmenopausal women: the OFELY study. Gamero P et al., *Osteoporos Int*, 2013; 13; 24(2):489-494.
17. Sclerostin and its association with physical activity, age, gender, body composition, and bone mineral content in healthy adults. Amrein K et al., *J Clin Endocrinol Metab*, 2012; 97:148-154.
18. Sclerostin and Dickkopf-1 in renal osteodystrophy. Cejka D et al., *Clin J Am Soc Nephrol*, 2012; 6: 877-882.
19. The Relation between Renal Function and Serum Sclerostin in Adult Patients with CKD. Pelletier S et al., *Clin J Am Soc Nephrol*, 2013; 8 (5): 819-823.
20. Renal elimination of Sclerostin increases with declining kidney function. Cejka D et al., *J Clin Endocrinol Metab*, 2014; 99(1):248-255.
21. Bone mineral density and serum biochemical predictors of bone loss in patients with CKD on dialysis. Malluche HH et al., *Clin J Am Soc Nephrol*, 2014; 9:1254-1262.
22. Serum sclerostin and adverse outcomes in nondialyzed chronic kidney disease patients. Kanbay M et al., *J. Clin. Endocrinol Metab*, 2014; 99:E1854-E1861.
23. Sclerostin: Another bone-related protein related to all-cause mortality in haemodialysis? Viaene L et al., *Nephrol Dial Transplant*, 2013; 28:3024-3030.
24. Clinical utility of anti-sclerostin antibodies. McClung MR, *Bone*, 2017; 96:3-7.
25. Sclerostin measurement in human disease: Validity and current limitations. Costa AG et al., *Bone*, 2017; 96:24-28.
26. Hormonal and systemic regulation of sclerostin. MT Drake and S Khosla, *Bone*, 2017; 96:8-17.

1) EINLEITUNG

Der humane *bioaktive Sklerostin* Immunoassay ist ein 3,5-stündiger Sandwich-ELISA für die quantitative Bestimmung von bioaktivem Sklerostin in humanem Serum, EDTA Plasma und Citrat Plasma. Der Test verwendet humane Serumstandards, um biologisch zuverlässige Daten zu gewährleisten. Die Charakterisierung der in diesem Assay verwendeten Antikörper umfasst Epitopkartierung, Analyse der Bindungskinetik und die Bestimmung der Antikörperreinheit (für weitere Informationen zur Antikörpercharakterisierung besuchen Sie bitte unsere Website www.bmgrp.com, siehe Validierungsdaten).

Sklerostin ist ein sekretiertes 22,5 kDa großes Glykoprotein, das als potenter Inhibitor des Wnt-Signalwegs fungiert. Es wirkt durch Bindung an den Wnt-Korezeptor LRP5/6 und hemmt somit die Knochenbildung durch Regulierung der Osteoblastenfunktion und Förderung der Osteoblastenapoptose (1,2). Das Sklerostin-Protein besteht aus zwei flexiblen N- und C-terminalen Armen und einem Cystin-Knoten mit drei Schleifen, wobei die zweite Schleife an den LRP5/6-Komplex bindet (3,4). Sklerostin wird klassisch als monomeres Protein angesehen, aber Daten von *Hernandez und Kollegen* (5) postulieren, dass zirkulierendes Sklerostin ebenso als Dimer vorliegen könnte. Darüber hinaus ist noch nicht gut untersucht, ob zirkulierende Sklerostin-Fragmente existieren, aber der Vergleich verschiedener Sklerostin-ELISA Assays legt diese Vermutung nahe (6,7).

Da das Epitop des in dem *bioaktiven Sklerostin-ELISA* verwendeten monoklonalen Beschichtungs-Antikörpers in der Bindungsregion zu dem LRP 5/6-Komplex lokalisiert ist, werden alle Sklerostin Moleküle (einschließlich potentieller Fragmente), die diese Rezeptorbindungsregion enthalten, erkannt.

Sklerostin wird fast ausschließlich in Osteozyten produziert (8). Mutationen im Sklerostin (SOST) Gen können Sklerosteosis und Van-Buchem Krankheit verursachen. Bei diesen Erkrankungen handelt es sich um Knochen-Dysplasie-Erkrankungen, die durch fortschreitende Skelettüberwucherung gekennzeichnet sind (9,10). Sklerostin-Spiegel werden als Reaktion auf hormonelle Stimuli oder aufgrund pathophysiologischer Bedingungen verändert. Sklerostin-Konzentrationen sind bei Erkrankungen wie Hypoparathyreoidismus (11), Paget-Syndrom (12), multiplem Myelom (13) und bei durch Krebs induzierten Knochenerkrankungen erhöht (12). Verringerte Sklerostin-Level sind sowohl beim primären Hyperparathyreoidismus (14) als auch bei der mechanischen Stimulation des Knochens (15) zu sehen. Mehrere Studien haben eine positive Assoziation zwischen Sklerostin und Knochenmineraldichte festgestellt (16,17). Sklerostin-Spiegel sind bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung (CKD) im Vergleich zu Patienten ohne CKD bis zu 4-fach erhöht und steigen mit CKD-Stadium und sinkender Nierenfunktion (18,19). Bei CKD-Patienten steigt die renale Elimination von Sklerostin mit abnehmender Nierenfunktion an (20). Bei Dialysepatienten ist Sklerostin ein unabhängiger Prädiktor für den Knochenverlust (21). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Serum-Sklerostin-Konzentrationen auch mit kardiovaskulären Ereignissen assoziiert sind (22,23). Ein monoklonaler Sklerostin-Antikörper zur Behandlung von Osteoporose befindet sich derzeit in klinischen Studien (24). Rezensionen finden sich in der Literaturliste (25,26).

Interessensgebiete:

- Osteoporosis
- Krebs induzierte Knochenerkrankungen
- Rheumatoide Arthritis
- Chronische Entzündungen
- Nierenerkrankungen
- Monitoring anaboler Therapien

2) INHALT DES KITS

CONT	KIT KOMPONENTEN	MENGE
PLATE	Rekombinanter monoklonaler anti human Sklerostin Antikörper, beschichtet auf Mikrotiterplattenstreifen im Streifenhalter. Verpackt im Aluminiumbeutel mit Trockenmittel.	12 x 8 Tests
WASHBUF	Waschpuffer, durchsichtiger Schraubverschluss, 20fach Konzentrat	1 x 50 ml
ASYBUF	Assay Puffer, roter Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 13 ml
STD	Standards 1-7 (0; 10; 20; 40; 80; 160; 320 pmol/l), weißer Schraubverschluss, lyophilisiert	7 Fläschchen
CTRL	Kontrollen A+B, gelber Schraubverschluss, lyophilisiert (genaue Konzentration siehe Etikett)	2 Fläschchen
CONJ	Konjugat (polyklonaler Ziegen anti human Sklerostin Antikörper)-HRPO, braune Flasche, brauner Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 13 ml

SUB	Substrat (TMB Lösung), braune Flasche, blauer Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 13 ml
STOP	Stopplösung, weißer Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 7 ml

3) ZUSÄTZLICHES MATERIAL IM KIT

- 2 selbstklebende Abdeckfolien
- Protokollblatt
- QC Protokoll
- Arbeitsanleitung (Beipacktext)

4) ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL UND GERÄTE

- Kalibrierte Präzisionspipetten für 20 µl, 50 µl, 100 µl, 250 µl inkl. Pipettenspitzen
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Mikrotiterplattenwascher wird empfohlen; Alternativen: Mehrkanalpipetten oder Dispenser
- Mikrotiterplattenphotometer mit 450 nm Filter (630 nm Referenz)
- Millimeterpapier oder Software

5) REAGENZIEN UND PROBENVORBEREITUNG

Alle Reagenzien des Kits sind bei 4°C (2-8°C) bis zum Ablaufdatum (siehe Etikett des Reagenz) haltbar.

Probenvorbereitung:

Serum, EDTA Plasma und Citrat Plasma sind zur Verwendung in diesem Test geeignet. Die Probenmatrix sollte innerhalb einer Studie nicht gewechselt werden.

Abnahme von venösem Blut mittels standardisierter Blutabnahmeröhrchen zur Gewinnung von Serum bzw. Plasma (EDTA, Citrat). Durchführung der Zentrifugation des Blutes laut Herstellerangaben der Probenentnahmebehälter, so schnell wie möglich. Das gewonnene Serum bzw. Plasma soll so schnell wie möglich gemessen werden. Für Langzeitlagerung sollen die Proben aliquotiert und bei -25°C oder tiefer gelagert werden. Bis zu 4 Frier/Tau-Zyklen verändern die Messwerte nicht. Lipämische und hämolytische Proben können falsche Ergebnisse liefern. Proben vor Verwendung gut mischen. Wir empfehlen Doppelbestimmung für alle Werte. Proben mit Ergebnissen über STD7 (320 pmol/l) können mit ASYBUF aus dem Kit verdünnt und erneut getestet werden.

Nähere Informationen zur Probenstabilität finden Sie auf unserer Website unter www.bmgrp.com (siehe Validation Data) oder kontaktieren Sie unseren Kundenservice: e-Mail unter export@bmgrp.com, Tel. unter +43/1/ 29107-45.

Vorbereitung der Reagenzien:

WASHBUF (Waschpuffer): Das mitgelieferte Konzentrat wird 1:20 verdünnt (zB. 50 ml WASHBUF + 950 ml destilliertes Wasser). Kristalle im Pufferkonzentrat lösen sich bei Raumtemperatur auf. Das Konzentrat ist bei 4°C (2-8°C) bis zum Ablaufdatum haltbar. Der verdünnte Puffer ist bei 4°C (2-8°C) bis zu einem Monat haltbar. Im Testsystem darf nur verdünnter WASHBUF (Waschpuffer) verwendet werden.

STD (Standards) und CTRL (Kontrollen): Lösen Sie das Lyophilisat in jeweils 250 µl destilliertem oder deionisiertem Wasser bei Raumtemperatur (18-26°C) für 15 min. Achten Sie auf vollständige Lösung des Lyophilisates. Gut mischen. Die genaue Konzentration ist am Etikett vermerkt. Rekonstituierte STD und CTRL sind bei -25°C oder tiefer bis zum Ablaufdatum haltbar. STD und CTRL sind für 4 Frier/Tau-Zyklen stabil.

6) TESTPRINZIP

Schema siehe Kapitel 6) *PRINCIPLE OF THE ASSAY* im englischen Teil des Beipacktextes.

7) TESTPROTOKOLL

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen.
Markieren Sie die Positionen für STD/PROBE/CTRL (Standard/Probe/Kontrolle) am Protokoll Blatt.

Nehmen Sie die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Aluminium Beutel. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können mit Trockenmittel im Aluminium Beutel auf 4°C (2-8°C) bis zum angegebenen Ablaufdatum gelagert werden.

- 1) Pipettieren Sie 100 µl ASYBUF (roter Schraubverschluss) in die Mikrotiterstreifen.
- 2) Pipettieren Sie 20 µl STD /PROBE/CTRL(Standard/Probe/Kontrolle) in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen. Gut mischen.
- 3) **Streifen abdecken und 2 h bei Raumtemperatur (18-26°C) inkubieren.**
- 4) Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
- 5) Pipettieren Sie 100 µl CONJ (Konjugat, brauner Schraubverschluss) in alle Wells. Gut mischen.
- 6) **Streifen abdecken und 1 h bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren.**
- 7) Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
- 8) Pipettieren Sie 100 µl SUB (Substrat, blauer Schraubverschluss) in alle Wells. Gut mischen.
- 9) **30 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren.**
- 10) Pipettieren Sie 50 µl STOP (StoppLösung, weißer Schraubverschluss) in alle Wells. Gut mischen.
- 11) Extinktion unmittelbar bei 450 nm messen, mit 630 nm als Referenz, falls möglich.

8) BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Messen Sie die optische Dichte (OD) von allen Wells mit einem Mikrotiterplattenphotometer mit einem 450 nm Filter (Referenz 630 nm). Konstruieren Sie eine Standardkurve aus den OD Werten der STD unter Verwendung von kommerziell erhältlichem Millimeterpapier oder einer geeigneten Software. Das Testsystem wurde mittels Logit-Log sowie einem 4 Parameter Algorithmus evaluiert. Andere Auswerte Algorithmen müssen vom Verwender evaluiert werden. Die Konzentration der Proben wird aus der Standardkurve abgelesen. Eventuelle Verdünnungen müssen berücksichtigt werden.

Typische STD-Kurve:

Siehe Kapitel 8) *CALCULATION OF RESULTS* im englischen Teil des Beipacktextes.

In dem beige-packten QC Protokoll sind die Resultate der QC Freigabe der entsprechenden Kit Lot vermerkt. Vom Verwender erhaltene Daten der OD können abweichend sein, bedingt durch verschiedene Einflüsse und/oder dem normalen Signalverlust des Kits während der Laufzeit. Dieser mögliche Signalverlust hat keinen Einfluss auf die Gültigkeit der Resultate, so lange die OD von STD7 den Wert 1,00 oder höher erreicht und die Werte der CTRL im gültigen Bereich sind (Bereiche siehe Etiketten).

9) TESTMERKMALE

Methode	Sandwich ELISA, HRP/TMB, 12x8-well Streifen
Probentyp	Serum, EDTA Plasma und Citrat Plasma Protokolle für Urin- und Zellkulturproben sind verfügbar auf www.bmgrp.com .
Standardbereich	0 bis 320 pmol/l (7 Standards und 2 Kontrollen in humaner Serum Matrix.) (Standards: 0/10/20/40/80/160/320 pmol/l)
Umrechnungsfaktor	Sklerostin: 1 pg/ml = 0,046 pmol/l, 1 pmol/l = 21,793 pg/ml (MW: 21,8 kDa)
Probenvolumen	20 µl / Well
Inkubationszeiten	2 h / 1 h / 30 min, Raumtemperatur
Sensitivität	LOD: (0 pmol/l + 3 SD): 1,9 pmol/l; LLOQ: 1,3 pmol/l
Spezifität	Dieser Assay erkennt endogenes und rekombinantes, humanes bioaktives Sklerostin.
Präzision	Intra-assay (n=3) ≤ 1%, Inter-assay (n=7) ≤ 5%

Wiederfindung	Wiederfindung (26 + 110 pmol/l rekombinantes Sklerostin)	Serum (n=5): 93%, 86% EDTA plasma (n=5): 94%, 93% Citrat plasma (n=1): 104%, 99%		
Verdünnungslinearität von rekombinantem Sklerostin	<u>Durchschnittliche Wiederfindung % nach Verdünnung:</u>	<u>1+1</u>	<u>1+3</u>	<u>1+7</u>
	Serum (n=6):	98	86	89
	EDTA plasma (n=6):	102	99	91
	Citrat plasma (n=1):	119	132	103
Verdünnungslinearität von endogenem Sklerostin	<u>Durchschnittliche Wiederfindung % nach Verdünnung:</u>	<u>1+1</u>	<u>1+3</u>	<u>1+7</u>
	Serum (n=7):	100	103	106
	EDTA plasma (n=6):	105	108	123
	Citrat plasma (n=2):	91	91	103
Werte von anscheinend gesunden Spendern	Median Serum (n=32): 61,5 pmol/l Median EDTA Plasma (n=24): 87 pmol/l Median Citrat Plasma (n=24): 61,5 pmol/l Jedes Labor sollte den Normalbereich für seine Proben evaluieren. Wechseln Sie nicht die Probenmatrix innerhalb einer Studie.			

Nähere Informationen zu den Validierungsdaten und Testmerkmalen finden Sie auf unserer Website unter www.bmgrp.com (siehe Validation Data) oder kontaktieren Sie unseren Kundenservice: e-Mail unter export@bmgrp.com, Tel. unter +43/1/ 29107-45.

10) PRÄZISION

Intra-assay: 2 Proben mit bekannten Konzentrationen wurden 3fach in einem Test von 1 Operator getestet.

Inter-assay: 2 Proben mit bekannten Konzentrationen wurden 7fach in 2 verschiedenen Test Chargen von 2 Operatoren getestet.

Intra-assay (n=3)	Probe 1	Probe 2	Inter-assay (n=7)	Probe 1	Probe 2
Durchschnitt (pmol/l)	19	153	Durchschnitt (pmol/l)	19	157
SD (pmol/l)	0,3	1,0	SD (pmol/l)	1,0	8,3
VK (%)	1	1	VK (%)	5	5

11) TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien von verschiedenen Lots oder Tests dürfen nicht gemischt werden.
- Stöpsel und Verschlüsse von verschiedenen Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Abgelaufene Reagenzien dürfen nicht verwendet werden.
- Reagenzien sind vor direktem Sonnenlicht zu schützen.
- Substratlösung muss vor Verwendung farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen bei den Inkubationen mit Abdeckfolie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.

12) VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Bestandteile humanen Ursprunges wurden auf HIV-Ak, HCV-Ak und HBsAg getestet und negativ gefunden. Trotzdem sollten die Reagenzien als potentiell infektiös behandelt werden. Die flüssigen Reagenzien enthalten $\leq 0,1\%$ Proclin 300 als Konservierungsmittel. Vermeiden Sie Kontakt mit Augen, Haut und Schleimhaut. Proclin 300 ist in der verwendeten Konzentration nicht toxisch. Allergische Reaktionen sind möglich.

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Nicht Rauchen, Essen, Trinken oder Kosmetika benutzen während der Verwendung der Testreagenzien.
- Verwenden Sie Handschuhe zur Vermeidung jedes Kontaktes mit Reagenzien.
- Schwefelsäure reizt Augen und Haut. Bei Berührung gründlich mit Wasser spülen.

13) LITERATUR

Siehe Kapitel 13) *LITERATURE* im englischen Teil des Beipacktextes.

Notes:

SYMBOLS



Expiry date / Verfallsdatum / Date de péremption / Data di scadenza / Fecha de caducidad / Data de validade / Uiterste gebruiksdatum / Udløbsdato / Utgångsdatum / Termin Ważności / Lejárati idő / Doba expirácie / Doba expirace



Consider instructions for use / Bitte Gebrauchsanweisung beachten / Consultez la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las instrucciones de utilización / Consulte as instruções de utilização / Raadpleeg de gebruiksaanwijzing / Se brugsanvisningen / Läs anvisningarna före användning / Proszę przeczytać instrukcję wykonania / Vegyük figyelembe a használati utasításban foglaltakat / Postupujte podľa pokynov na použitie / Postupujte dle návodu k použití



In vitro Diagnostic Medical Device (for in Vitro Diagnostic Use) / In vitro Diagnostikum (zur In-vitro-Diagnostik) / Dispositif médical de diagnostic in vitro (Pour usage diagnostique in vitro) / Dispositivo medico per diagnostica in vitro (per uso diagnostico in vitro) / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro (para uso diagnóstico in vitro) / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro (Para utilização de diagnóstico "in vitro") / Medisch hulpmiddel voor diagnostiek in vitro (Voor diagnostisch gebruik in vitro) / Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik (Udelukkende til in vitro diagnostisk anvendelse) / Medicinteknisk produkt avsedd för in vitro-diagnostik (För in vitro-diagnostiskt bruk) / Wyrób medyczny do Diagnostyki In Vitro / In vitro orvosdiagnosztikai termék / In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určené pre diagnostiku „in vitro“) / In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určeno pro diagnostiku „in vitro“)



Lot-Batch Number / Charge-Chargennummer / Lot-Code du lot / Lotto-Numero di lotto / Lote-Código de lote / Lote-Código do lote / Lot-Partijnummer / Lot-Batchkode / Lot-Satskod / Numer serii / Lot-Batch szám / Číslo šarže / Číslo šarže



Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por / Vervaardigd door / Fabrikation af / Tillverkad av / Wyprodukowane pr / Gyártotta / Vyrobené / Vyrobeno



Catalogue Number / Bestellnummer / Numéro de référence / Numero di riferimento / Número de referencia / Número de referência / Referentienummer / Referencenummer / Katalognummer / Numer katalogowy / Katalógusszám / Katalógové číslo / Katalogové číslo



Store at between / Lagerung bei zwischen / Conserver à entre / Conservare a tra / Conservar a temp. entre / Armazene a entre / Bewaar bij tussen / Opbevares mellem / Förvaras vid / Przechowywać w / Tároljuk között / Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezi



Contains sufficient for x tests / Inhalt ausreichend für x Tests / Contient suffisant pour x tests / Contenuto sufficiente per x test / Contiene suficiente para x pruebas / Contém suficiente para x testes / Bevat voldoende voor x bepalingen / Indeholder tilstrækkeligt til x prøver / Innehållet räcker till x analyser / Zawartość na x testów / Tartalma X teszt elévzésére elegendő / Obsahuje materiál pre x testov / Obsahuje materiál pro x testů

BI-20472 BIOACTIVE SCLEROSTIN

ASSAY PROTOCOL AND CHECKLIST

PREPARATION OF REAGENTS:

- Bring all reagents to room temperature (18-26°C).
- Prepare reagents and samples as instructed.
- Bring unused and prepared components to the storage temperature mentioned in the package insert.
- Take microtiter strips out of the aluminium bag and mark positions on the protocol sheet.

TEST PROCEDURE:

- Step 1) Pipette 100 µl ASYBUF (Assay buffer, red cap) into each well.
- Step 2) Add 20 µl STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) into respective wells. Swirl gently.
- Step 3) Cover tightly and incubate for 2 hours at room temperature (18-26°C).**
- Step 4) Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer). After final wash, remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel.
- Step 5) Add 100 µl CONJ (Conjugate, amber cap) into each well. Swirl gently.
- Step 6) Cover tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) in the dark.**
- Step 7) Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer). After final wash, remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel.
- Step 8) Add 100 µl SUB (Substrate, blue cap) into each well. Swirl gently.
- Step 9) Incubate for 30 min at room temperature (18-26°C) in the dark.**
- Step 10) Add 50 µl STOP (Stop solution, white cap) into each well. Swirl gently.
- Step 12) Read Optical Density immediately at 450 nm with reference 630 nm, if available.