

Myostatin ELISA

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

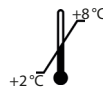
*For the determination of myostatin
in human serum and plasma*

Gültig ab / Valid from 2019-01-21

REF KR1012

Σ
96

+8°C
+2°C



RUO



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

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 der Proben</i>	5
<i>Vorbereitung der Standards und Kontrollen</i>	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	8
10. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Referenzwerte</i>	8
11. TESTCHARAKTERISTIKA	9
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	9
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	9
<i>Analytische Sensitivität</i>	9
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	9
13. TECHNISCHE MERKMALE	10
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
15. LITERATUR	11
<i>Allgemeine Literatur</i>	11
<i>Literatur mit dem Immundiagnostik Myostatin-ELISA</i>	12

1. VERWENDUNGSZWECK

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

Nur für wissenschaftliche Forschung. Nicht für diagnostische 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-Immunreaktivität 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 Myostatinmangel die Adipogenese *in vivo* inhibiert, sogar wenn die Mäuse mit stark fetthaltiger Nahrung gefüttert werden. Transgene Überexpression des Myostatinpropeptids, 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 Fitnesstraining reguliert wird. Ferner spielt Myostatin eine kausale Rolle bei der Entstehung der durch körperliche Inaktivität erworbenen Insulinresistenz.

Forschungsbereiche

- Regulation des Muskelwachstums
- Muskelatrophie
- Muskelschwund
- Erworbenene Insulinresistenz

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kitkomponenten	Menge
KR1012	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
KR0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
KR1012	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
KR1012	STD	Standards, lyophilisiert (Konzentrationen der Spezifikation entnehmen)	2 x 5 vials
KR1012	TRACER	Tracerkonzentrat, biotinyliertes Myostatin	1 x 150 µl
KR1012	CTRL1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entneh- men)	2 x 1 vial
KR1012	CTRL2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entneh- men)	2 x 1 vial
KR1012	CONJ	Konjugatkonzentrat, streptavidinmarkierte Peroxidase	1 x 200 µl
KR0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
KR0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- 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 $> 0,2\mu\text{m}$) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von $0,055\mu\text{S}/\text{cm}$ bei 25°C ($\geq 18,2\text{M}\Omega\text{cm}$).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben 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 anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8 $^\circ\text{C}$** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8 $^\circ\text{C}$** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Die lyophilisierten Standards (STD) und Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8 $^\circ\text{C}$** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Rekonstitutionsvorgaben für STD und CTRL sind dem Spezifikationsdatenblatt zu entnehmen. **Standards und Kontrollen** (rekonstituierte STD und CTRL) **sind nicht stabil und können nicht gelagert werden**.
- **Vorbereitung des Tracers:** Das **Tracerkonzentrat (TRACER)** wird vor Gebrauch **1:101** in **Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF)** verdünnt (100 μl TRACER + 10 ml Probenverdünnungspuffer). Das TRACER ist bei **2–8 $^\circ\text{C}$** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Tracer** (1:101 verdünntes TRACER) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden**.
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:101** in **Waschpuffer** verdünnt (100 μl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das **CONJ** ist bei **2–8 $^\circ\text{C}$** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:101 verdünntes CONJ) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden**.

- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Probenlagerung

EDTA-Plasma und **Serum** sind bis zur Verwendung bei **–20 °C** zu lagern.

Vorbereitung der Proben

1.	Je 20 µl Serum- oder Plasmaprobe in entsprechend beschriftete 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettieren.
2.	180 µl Probenverdünnungspuffer zu jeder Probe zugeben, gut vortexen. Dies resultiert in einem Verdünnungsfaktor von 1:10 .
3.	Je 200 µl Tracer (verdünntes TRACER) zu jeder verdünnten Probe pipettieren, gut vortexen. Dieser Probenansatz wird als Vorinkubat bezeichnet.

Vorbereitung der Standards und Kontrollen

Je **200 µl Standard** bzw. **Kontrolle** in entsprechend beschriftete 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettieren, mit **200 µl Tracer** (verdünntes TRACER) versetzen, gut mischen. Dieser Ansatz wird ebenfalls als **Vorinkubat** bezeichnet.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung 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 streptavidinmarkierte Peroxidase zugegeben, die an den biotinylierten Myostatin-Tracer bindet. Nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Komponenten wird das Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidin zugegeben. Die Enzymre-

aktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. 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. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

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

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der verschlossenen Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Je 100 µl der vorbereiteten Standards/Kontrollen/Proben (entsprechendes Vorinkubat) in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
2.	Streifen abdecken und 2 Stunden bei Raumtemperatur (15-30°C) unter Schütteln* inkubieren.
3.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
4.	100 µl Konjugat (verdünntes CONJ) in alle Vertiefungen pipettieren.
5.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30°C) unter Schütteln* inkubieren.
6.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
7.	100 µl Substrat (SUB) in alle Vertiefungen pipettieren.

8.	10–20 min** bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
9.	100 µl Stopplösung (STOP) in alle Vertiefungen pipettieren, gut 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.

* Wir empfehlen die Streifen bei 550 rpm (Umdrehungen pro Minute) mit einem Orbit von 2 mm zu schütteln.

** 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 Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 10** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

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

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) 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

LoB siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

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.

Referenzwerte

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

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 liegt bei 0,37 ng/ml.

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur wissenschaftlichen Forschung verwendet werden.

- 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. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

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 auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der 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 dem Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Für die Qualitätskontrolle sind die für Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina 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. Szulc, P. et al., 2012. Endocrine and clinical correlates of myostatin serum concentration in men--the STRAMBO study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **97**(10), pp.3700–8.
16. 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.
17. 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.
18. Zamora, E. et al., 2010. Serum myostatin levels in chronic heart failure. *Revista española de cardiología*, **63**(8), pp.992–6.

Verwendete Symbole:

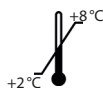
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	Nur für Forschungszwecke		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		

Myostatin ELISA

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

Valid from 2019-01-21

REF **KR1012**



RUO



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	17
2. INTRODUCTION	17
3. MATERIAL SUPPLIED	18
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	19
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	20
<i>Sample storage</i>	20
<i>Preparation of samples</i>	20
<i>Preparation of standards and controls</i>	20
7. ASSAY PROCEDURE	20
<i>Principle of the test</i>	20
<i>Test procedure</i>	21
8. RESULTS	22
9. LIMITATIONS	23
10. QUALITY CONTROL	23
<i>Reference range</i>	23
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	23
<i>Precision and reproducibility</i>	23
<i>Analytical Sensitivity</i>	24
<i>Dilution recovery</i>	24
12. PRECAUTIONS	24
13. TECHNICAL HINTS	25
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	25
15. REFERENCES	26
<i>General literature</i>	26
<i>Literature using Immundiagnostik Myostatin-ELISA</i>	26

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of myostatin in human serum and plasma.

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

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
KR1012	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
KR0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
KR1012	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	1 x 100 ml
KR1012	STD	Standards, lyophilised (see specification for concentrations)	2 x 5 vials
KR1012	TRACER	Tracer concentrate, biotinylated myostatin	1 x 150 µl
KR1012	CTRL1	Control, lyophilised (see specification for range)	2 x 1 vial
KR1012	CTRL2	Control, lyophilised (see specification for range)	2 x 1 vial
KR1012	CONJ	Conjugate concentrate, streptavidin-labelled peroxidase	1 x 200 µl
KR0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
KR0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

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

* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure 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 MΩ cm).

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.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37°C. The **WASHBUF** is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8°C for 1 month**.
- **Preparation of the tracer:** Before use, the **tracer concentrate (TRACER)** has to be diluted **1:101** in sample dilution buffer (100 µl TRACER + 10 ml SAMPLE-BUF). The TRACER is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Tracer** (1:101 diluted TRACER) **is not stable and cannot be stored**.
- The **lyophilised standards (STD)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Reconstitution** details are given in the **specification data sheet**. **Standards and controls** (reconstituted STD and CTRL) **are not stable and cannot be stored**.
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:101** in wash buffer (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The CONJ is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Conjugate** (1:101 diluted CONJ) **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) when stored at **2–8°C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Sample storage

Store EDTA plasma and serum until use at -20°C.

Preparation of samples

1.	Pipet 20 µl of each serum or plasma sample in the respective labelled 1.5 ml reaction tubes.
2.	Add 180 µl of sample dilution buffer to each sample, mix well. This results in a dilution factor of 1:10
3.	Add 200 µl tracer (diluted TRACER) to each diluted sample , mix well. The prepared sample is named pre-incubate .

Preparation of standards and controls

Transfer **200 µl standard or control** in the corresponding reaction tubes, add **200 µl tracer** (diluted TRACER), mix well. Each treated standard or control is also named **pre-incubate**.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed 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 immobilised 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 colour changes from blue to yellow. The intensity of the yel-

low colour 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 immobilised anti-myostatin antibodies and lowers the photometric signal. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. Myostatin, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

Test procedure

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

Mark the positions of standards/controls/samples on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips as needed from the kit. Store unused strips together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging at 2–8°C. Strips are stable until the expiry date stated on the label.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Add each 100 µl of the pre-treated standards/controls/samples (corresponding pre-incubate) into the respective wells.
2.	Cover the strips and incubate for 2 hours on a horizontal shaker at room temperature (15-30°C).
3.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
4.	Add 100 µl conjugate (diluted CONJ) into each well.
5.	Cover the strips and incubate for 1 hour on a horizontal shaker at room temperature (15-30°C).
6.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
7.	Add 100 µl TMB substrate (SUB) into each well.
8.	Incubate for 10–20 minutes* at room temperature (15–30°C) in the dark .

9.	Add 100 µl ELISA stop solution (STOP) and mix well.
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 colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour 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 obtained results have to be multiplied with the **dilution factor of 10** to get the actual concentrations.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result with the dilution factor used.

9. LIMITATIONS

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

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) can be further diluted and re-assayed. Please consider this higher dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range (see definition below) cannot be clearly quantified.

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

highest concentration of the calibration 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

LoB see chapter "Performance Characteristics".

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.

Reference range

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

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 analysed. 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 use 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 colour 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 should 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 analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the 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 to the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- 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. Szulc, P. et al., 2012. Endocrine and clinical correlates of myostatin serum concentration in men--the STRAMBO study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **97**(10), pp.3700–8.
16. 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.
17. 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.
18. 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		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		