

FGF23 (INTACT)

(EN) ELISA FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF HUMAN
INTACT FGF23 IN EDTA PLASMA, HEPARIN PLASMA, AND CITRATE PLASMA
Cat. No. BI-20700 . 12 x 8 TESTS

(DE) ELISA ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON HUMANEM,
INTAKTEM FGF23 IN EDTA PLASMA, HEPARIN PLASMA UND CITRAT PLASMA
Kat. Nr. BI-20700 . 12 x 8 TESTE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES

This ELISA is optimized and validated for human plasma samples. Serum and other sample types are compatible with this ELISA (for more information please visit our website).

Dieser ELISA ist für humane Plasmaproben optimiert und validiert. Serum und andere Probenarten sind mit diesem ELISA kompatibel (weitere Informationen finden Sie auf unserer Website).

www.bmgrp.com

Rev.no. 241024 (replacing 240913)

This kit was developed and manufactured by:
Biomedica Medizinprodukte GmbH, A-1210 Wien, Divischgasse 4
Tel. +43/1/29107 45, Fax +43/1/29107 6389, e-mail info@bmgrp.com



CONTENT / INHALT

ENGLISH	Page 3
DEUTSCH	Seite 9

Detailed information on the FGF23 (intact) human ELISA, e.g. assay validation data, sample matrix comparisons, and stability data is available on our website.

Detaillierte Informationen und Validierungsdaten zum FGF23 (intakt) human ELISA, wie z.B. Probenmatrix Vergleiche und Probenstabilität finden Sie auf unserer Webseite.

www.bmgrp.com

1) INTRODUCTION

FGF23 (fibroblast growth factor 23) is a member of the fibroblast growth factor family and controls phosphate and vitamin D homeostasis. The full-length protein comprises 251 amino acids including a 24 amino acid signal peptide. The N-terminal FGF region of FGF23 is separated from the C-terminal region by a proteolytic cleavage site. A fraction of FGF23 is proteolytically processed between arginine179 and serine180 to generate N-terminal and C-terminal fragments. Therefore, the main forms of FGF23 present in human circulation are hormonally intact FGF23 and inactive N-terminal and C-terminal fragments. FGF23 binds to FGF receptor 1c (FGFR1c) with its N-terminal region, while the C-terminal region interacts with the co-receptor α -Klotho to confer high-affinity binding to the receptor. FGFR1c and α -Klotho are expressed in the distal nephron and the parathyroid gland. Co-receptor independent signaling of FGF23 has been described for other FGFRs, which are expressed in a variety of tissues. The main source of FGF23 are osteocytes in the bone.

Areas of interest:

Bone Diseases

Autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR), autosomal recessive hypophosphatemic rickets (ARHR), X-linked hypophosphatemic rickets (XLH), McCune-Albright syndrome/fibrous dysplasia, hypophosphatemic rickets and hyperparathyroidism (HRHPT), drug-induced rickets/osteomalacia, hyperphosphatemia, hyperostosis-hyperphosphatemia syndrome, fibrous dysplasia, neurofibromatosis, osteoglophonic dysplasia (OGD), linear nevus sebaceous syndrome (LNSS)/epidermal nevus syndrome (ENS), Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia

Cancer

Tumor-induced osteomalacia, familial tumor calcinosis

Cardiovascular Disease

Heart failure, left-ventricular hypertrophy, vascular calcification

Endocrine disorders

Primary hyperparathyroidism, secondary hyperparathyroidism

Kidney Disease

Chronic kidney disease (CKD), chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD), chronic kidney disease and cardiovascular disease, acute kidney injury

Metabolic disorders

Dyslipidemia, type 2 diabetes, anemia

2) CONTENTS OF THE KIT

CONTENTS	KIT COMPONENTS	QUANTITY
PLATE	Recombinant monoclonal anti-human FGF23 antibody precoated microtiter strips in strip holder, packed in aluminium bag with desiccant	12 x 8 tests
WASHBUF	Wash buffer concentrate, 20x, natural cap	1 x 50 ml
ASYBUF	Assay buffer, red cap, ready to use	1 x 10 ml
STD	Standards (0; 50; 100; 200; 400; 800; 1600 pg/ml), recombinant human FGF23 in human plasma, white caps, lyophilized	7 vials
CTRL	Controls A and B, yellow caps, lyophilized, exact concentration see labels	2 vials
CONJ	Conjugate (monoclonal mouse anti-human FGF23-HRP), amber cap, ready to use	1 x 7 ml
SUB	Substrate (TMB solution), 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

- 1 self-adhesive plastic film
- Quality control protocol
- Protocol sheet
- Instruction for use

4) MATERIAL AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Precision pipettes calibrated to deliver 10 µl, 50 µl, 100 µl, 400 µl, and disposable tips
- Distilled or deionised water
- Plate washer is recommended for washing, alternative multichannel pipette or manifold dispenser
- Refrigerator with 4°C (2-8°C)
- Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 nm (with correction wavelength at 630 nm)
- EP-tubes for sample dilution if pre-dilution is necessary
- Graph paper or software for calculation of results

5) REAGENTS AND SAMPLE PREPARATION

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

Sample preparation/dilution:

Collect venous blood samples by using standardized blood collection tubes. Perform plasma or serum separation by centrifugation according to supplier's instructions of the blood collection devices. **Assay the acquired samples immediately or aliquot and store at -25°C or lower.** Lipemic or haemolyzed samples may give erroneous results. Samples are stable for at least four freeze-thaw cycles. Samples should be mixed well before assaying. We recommend duplicates for all values.

Samples with values above Standard 7 (STD7) can be diluted 1:11 (1+10), e.g. 10 µl sample + 100 µl ASYBUF, and tested again.

The kit includes sufficient assay buffer (ASYBUF) for a 1:11 dilution of 40 samples (in duplicates). Additional ASYBUF can be ordered using cat.no. BI-20700-ASYBUF.

Due to the instability of the intact FGF23 molecule samples should be collected, processed, aliquoted and stored at -25°C or below as quickly as possible.

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

Reconstitution/handling:

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

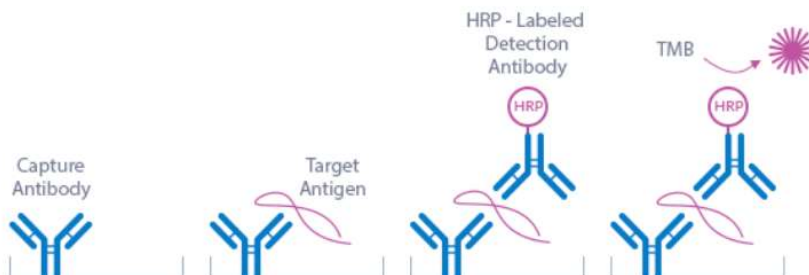
STD (standards) + CTRL (controls): Pipette 400 µl of distilled or deionized water into each vial. Leave at room temperature (18-24°C) for 15 min. Vortex gently. The exact concentration is printed on the label. Reconstituted STD and CTRL can be stored at -25°C or lower until expiry date stated on the label. STDs and CTRLs are stable for four freeze-thaw cycles.

6) PRINCIPLE OF THE ASSAY

The FGF23 (intact) human ELISA kit is a sandwich enzyme immunoassay that has been optimized and validated for the quantitative determination of intact FGF23 in human plasma samples. Serum and other sample types are compatible with this ELISA. For further information on serum measurements please see page 6/7 or visit our website (see Validation Data).

In a first step, standard/control/sample and conjugate (monoclonal mouse anti-human FGF23-HRP) are pipetted into the wells of the microtiter strips, which are pre-coated with a recombinant monoclonal anti-human FGF23 antibody. FGF23 present in the standard/control/sample binds to the pre-coated antibody in the well and forms a sandwich with the conjugated anti-human FGF23-HRP antibody. In a washing step all non-specific unbound material is removed. In a second step, the substrate (TMB, tetramethylbenzidine) is pipetted into the wells. The enzyme-catalyzed color change of the substrate is directly proportional to the amount of intact FGF23 present in the sample. This color change is detectable with a standard microplate reader. A dose response curve of the absorbance (optical density, OD at 450 nm) using the values obtained from the standards versus the standard

concentration is generated. The concentration of intact FGF23 in the sample is determined directly from the dose response curve.



7) ASSAY PROTOCOL

All reagents and samples must be at room temperature (18-24°C) before use in the assay.

Mark position for STD/CTRL/SAMPLE (standard/control/sample) 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.

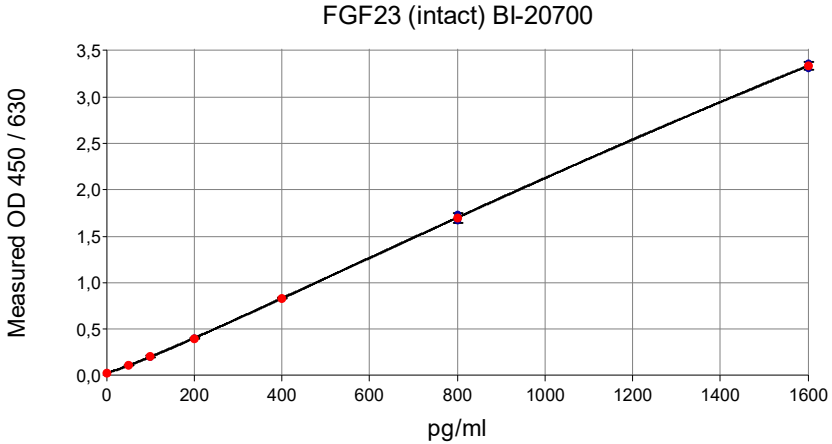
1. Pipette 50 µl STD/CTRL/SAMPLE (standard/control/sample) in duplicate into respective well.
2. Add 50 µl CONJ (conjugate, amber cap) into each well, mix gently.
3. **Cover the plate tightly and incubate for 3 hours at room temperature (18-24°C), in the dark.**
4. Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (wash buffer, natural cap). After final wash, remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel.
5. Add 100 µl SUB (substrate, blue cap) into each well. Swirl gently.
6. **Incubate for 30 min at room temperature (18-24°C), in the dark.**
7. Add 50 µl STOP (stop solution, white cap) into each well. Swirl gently.
8. Measure absorbance immediately at 450 nm with reference 630 nm, if available.

8) CALCULATION OF RESULTS

Construct a standard curve from the absorbance read-outs of the standards using commercially available software capable of generating a four-parameter logistic (4-PL) fit. Alternatively, plot the standards' concentration on the x-axis against the mean absorbance for each standard on the y-axis and draw a best fit curve through the points on the graph. Curve fitting algorithms other than 4-PL have not been validated and will need to be evaluated by the user.

Obtain sample concentrations from the standard curve. If required, the pg/ml concentration can be converted into pmol/l by applying a conversion factor (1 pg/ml = 0.038 pmol/l; MW: 26 kDa). Respective dilution factors have to be considered when calculating the final concentration of the sample.

Example of a typical standard curve:



The quality control protocol supplied with the kit shows the results of the final release QC for each kit lot. Data for optical density 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 1.50 or more is obtained for the standard with the highest concentration and the values of the CTRLs are in range (target ranges see labels).

9) ASSAY CHARACTERISTICS

Method	Sandwich ELISA, HRP/TMB, 12x8-well detachable strips		
Sample type(s)*	EDTA plasma, heparin plasma, citrate plasma		
Sample volume	50 µl / well		
Assay time	3 h / 30 min		
Detection limit	5.4 pg/ml		
Standard range	0 - 1600 pg/ml		
Conversion factor	1 pg/ml = 0.038 pmol/l; MW: 26 kDa		
Precision		n	CV (%)
	Within-run	3	≤8
	In-between-run	9	≤6
Accuracy		n	Recovery (%)
	EDTA plasma	6	100
	Heparin plasma	1	79
	Citrate plasma	1	103
	Serum	6	91

Dilution linearity of endogenous intact FGF23		n	Recovery of expected dilution (%)		
			1+1	1+3	1+7
	EDTA plasma	6	107	108	111
	Heparin plasma	1	99	97	107
	Citrate plasma	2	129	112	126
	Serum	6	87	74	67
Specificity	Endogenous and recombinant human intact FGF23				
Use	Research use only (RUO)				
Values for apparently healthy donors		n	Median intact FGF23 [pg/ml]		
	EDTA plasma	22	24.4 pg/ml		
	Heparin plasma	22	26.4 pg/ml		
	Citrate plasma	22	17.4 pg/ml		
	Serum	22	14.8 pg/ml		

* This ELISA is optimized and validated for human plasma samples. Serum and other sample types are compatible with this ELISA. For further information on serum measurement and assay performance characteristics, matrix comparisons and stability data please visit our website www.bmgrp.com (see Validation Data) or contact our customer service by e-mail info@bmgrp.com or by phone +43/ 1/ 29107-45.

10) PRECISION

Within-run (intra-assay): 2 samples of known concentrations were tested 3 times within 1 kit lot by 1 operator.
 In-between-run (inter-assay): in progress

Within-run (n=3)	Sample 1	Sample 2	In-between-run (n=9)	Sample 1	Sample 2
Mean (pg/ml)	99	800	Mean (pg/ml)	103	803
SD (pg/ml)	8.4	10.2	SD (pg/ml)	6	15
CV (%)	8	1	CV (%)	6	2

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 colorless 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 as if they were infectious. All liquid reagents contain $\leq 0.1\%$ Proclin 950 as preservative. Avoid contact with skin and mucous membrane. Proclin 950 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.
- Wear gloves, glasses, and lab coat while performing this assay.

- Sulfuric acid is irritating to the eyes and skin. Avoid contact with skin and mucous. Irritations are possible. Flush with water if contact occurs!

13) LITERATURE

1. Physiology of FGF23 and overview of genetic diseases associated with renal phosphate wasting. Bachetta J et al., *Metabolism* 2019; Epub ahead of print.
2. Renal and extrarenal effects of fibroblast growth factor 23. Vervloet M, *Nature Rev* 2019; 15:109-119.
3. Role of phosphate sensing in bone and mineral metabolism. Chande S and Bergwitz C, *Nat Rev Endocrinol* 2018; 14(11):637-655.
4. FGF23 Actions on Target Tissues-With and Without Klotho. Richter B and Faul CF, *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018; 9:189.
5. FGF23 in Cardiovascular Disease: Innocent Bystander or Active Mediator? Stöhr R et al., *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018; 9:351.
6. FGF23 beyond Phosphotropic Hormone. Takashi Y and Fukumoto S, *Trends Endocrinol Metab*, 2018; 29(11):755-767.
7. Role of phosphate sensing in bone and mineral metabolism. Chande S and Bergwitz C, *Nat Rev Endocrinol* 2018; 14(11):637-655.
8. FGF23-Klotho signaling axis in the kidney. Erben RG and Andrukhova O, *Bone* 2017; 100:62-68.
9. Fibroblast Growth Factor 23-Mediated Bone Disease. Goncivlea AR and Jan De Beur SM, *Endocrinol Metab Clin North Am* 2017; 46(1):19-39.
10. Posttranslational processing of FGF23 in osteocytes during the osteoblast to osteocyte transition. Yamamoto H et al., *Bone* 2016; 84:120-130.
11. Coupling fibroblast growth factor 23 production and cleavage: iron deficiency, rickets, and kidney disease. Wolf M and White KE., *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2014; 23(4):411-419.
12. FGF23 from bench to bedside. Kovesdy CP and Quarles LD, *Am J Physiol Renal Physiol* 2016; 310(11):F1168-1174.

EINLEITUNG

FGF23 (Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23) gehört zur Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren und kontrolliert die Phosphat- und Vitamin-D-Homöostase. Das gesamte FGF23-Protein umfasst 251 Aminosäuren einschließlich dem 24-Aminosäuren-Signalpeptid. FGF23 wird zwischen Arginin179 und Serin180 proteolytisch gespalten und bildet N-terminale und C-terminale Fragmente. Die im menschlichen Blutkreislauf vorhandenen Hauptformen von FGF23 sind daher biologisch aktives intaktes FGF23 und inaktive N-terminale und C-terminale Fragmente. FGF23 bindet mit seiner N-terminalen Region an den FGF-Rezeptor 1c (FGFR1c), während die C-terminale Region mit dem α Klotho-Co-Rezeptor interagieren kann, um dem Rezeptor eine hochaffine Bindung zu verleihen. FGFR1c und α Klotho werden im distalen Nephron und in der Nebenschilddrüse exprimiert. Für andere FGFRs, die in einer Vielzahl von Geweben exprimiert werden, wurde eine vom Korezeptor unabhängige Aktivierung durch FGF23 beschrieben. Die Hauptquelle von FGF23 sind die Osteozyten im Knochen.

Interessensgebiete:

Siehe Kapitel 1) *INTRODUCTION* im englischen Teil des Beipacktextes.

2) INHALT DES KITS

CONTENTS	KIT KOMPONENTEN	MENGE
PLATE	Rekombinanter monoklonaler anti-humaner FGF23 Antikörper beschichtet auf Mikrotiterplattenstreifen im Streifenhalter. Verpackt im Aluminiumbeutel mit Trockenmittel.	12 x 8 Tests
WASHBUF	Waschpuffer, 20-fach Konzentrat, durchsichtiger Schraubverschluss	1 x 50 ml
ASYBUF	Assaypuffer, roter Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 10 ml
STD	Standards (0; 50; 100; 200; 400; 800; 1600 pg/ml), rekombinantes humanes FGF23 in humanem Plasma, weißer Schraubverschluss, lyophilisiert	7 Fläschchen
CTRL	Kontrollen A und B, gelber Schraubverschluss, lyophilisiert (genaue Konzentrationen siehe Etiketten)	2 Fläschchen
CONJ	Konjugat (monoklonaler Maus anti-human FGF23-HRP), braune Flasche, brauner Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 7 ml
SUB	Substrat (TMB Lösung), braune Flasche, blauer Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 13 ml
STOP	Stopp Lösung, weißer Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 7 ml

3) ZUSÄTZLICHES MATERIAL IM KIT

- 1 selbstklebende Abdeckfolien
- QC Protokoll
- Protokoll Blatt
- Arbeitsanleitung (Beipacktext)

4) ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL UND GERÄTE

- Kalibrierte Präzisionspipetten für 10 μ l, 50 μ l, 100 μ l, 400 μ l, inkl. Pipettenspitzen
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Mikrotiterplatten Wascher wird empfohlen, Alternativen: Mehrkanalpipetten oder Dispenser
- Kühlschrank mit 4°C (2-8°C)
- 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:

Abnahme von venösem Blut mittels standardisierter Blutabnahmeröhrchen zur Gewinnung von Plasma oder Serum. Durchführung der Zentrifugation des Blutes laut Herstellerangaben der Probenentnahmebehälter, so schnell wie möglich. Das gewonnene Plasma oder Serum **sollte sofort gemessen** oder für Langzeitlagerung aliquotiert und bei

-25°C oder tiefer gelagert werden. Bis zu vier 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 Werten höher als Standard 7 (STD7) können mit ASYBUF (Assaypuffer) 1:11 (1+10, z.B. 10 µl Probe + 100 µl ASYBUF) 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 per Email an info@bmgrp.com oder telefonisch unter +43/ 1/ 29107-45.

Rekonstitution/Handhabung:

WASHBUF (Waschpuffer): Das mitgelieferte Konzentrat wird 1:20 verdünnt (z.B. 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 400 µl destilliertem oder deionisiertem Wasser bei Raumtemperatur (18-24°C) für 15 min. Gut mischen. Die genaue Konzentration ist am Etikett vermerkt. Rekonstituierte STDs und CTRLs können bei -25°C oder tiefer bis zum Ablaufdatum gelagert werden. STD und CTRL sind für vier Frier/Tau-Zyklen stabil.

6) TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der Methode eines Sandwich ELISA und dient zur quantitativen Bestimmung von intaktem FGF23 in humanen Plasmaproben.

Zuerst werden Standard/Kontrolle/Probe und Konjugat (monoklonaler Maus anti-human FGF23-HRP) in die entsprechenden Vertiefungen, welche mit einem rekombinanten monoklonalen anti-human FGF23-Antikörper beschichtet sind, pipettiert. Das in den Standard/Kontrolle/Probe vorhandene FGF23 bildet mit beiden Antikörpern einen stabilen Komplex. Durch Waschen werden die unspezifischen und nicht gebundenen Anteile entfernt. In einem zweiten Schritt wird das Substrat (TMB, Tetramethylbenzidin) in die Vertiefungen pipettiert. Die dadurch enzymatisch bedingte Farbentwicklung ist direkt proportional mit der FGF23 Konzentration in den Proben und kann mittels eines Mikrotiterplattenphotometer gemessen werden. Aus der jeweiligen Absorption und den Konzentrationen der STD wird eine Kalibrationskurve erstellt, von der die FGF23 Konzentration der Proben direkt ablesbar ist.

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 (18-24°C) aufweisen.

Markieren Sie die Positionen für STD/CTRL/PROBE (Standard/Kontrolle/Probe) 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 50 µl STD/CTRL/PROBE (Standard/Kontrolle/Probe) in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen.
- 2) Pipettieren Sie 50 µl CONJ (Konjugat, brauner Schraubverschluss) in alle Wells, gut mischen.
- 3) Streifen abdecken und 3 Stunden bei Raumtemperatur (18-24°C) im Dunkeln 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 SUB (Substrat, blauer Schraubverschluss) in alle Wells, gut mischen.
- 6) Für 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-24°C) im Dunkeln inkubieren.**
- 7) Pipettieren Sie 50 µl STOP (Stopplösung, weißer Schraubverschluss) in alle Wells, gut mischen.
- 8) Absorption unmittelbar bei 450 nm messen, mit 630 nm als Referenz, falls möglich.

8) BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Messen Sie die Absorption (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 STDs unter Verwendung von kommerziell erhältlichem Millimeterpapier oder einer geeigneten Software. Das Testsystem wurde mittels eines 4 Parameter Algorithmus evaluiert. Andere Auswertungsalgorithmen müssen vom Verwender evaluiert werden. Die Konzentration der Proben wird aus der Standardkurve abgelesen. Bei Bedarf kann die pg/ml Konzentration durch Anwendung eines Umrechnungsfaktors in pmol/l umgerechnet werden (1 pg/ml = 0,038 pmol/l; MW: 26 kDa). 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 1,50 oder höher erreicht und die Werte der CTRL im gültigen Bereich sind (Bereiche siehe Etiketten).

9) TESTMERKMALE

Methode:	Sandwich ELISA, HRP/TMB, 12x8-well detachable strips				
Probentyp*:	EDTA Plasma, Heparin Plasma und Citrat Plasma				
Probenvolumen:	50 µl / Well				
Inkubationszeiten:	3 h / 30 min				
Detektionslimit:	5,4 pg/ml				
Standardbereich:	0 - 1600 pg/ml (7 Standards und 2 Kontrollen in einer humanen Plasma Matrix).				
Umrechnungsfaktor pg/ml zu pmol/l:	Intaktes FGF23: 1 pg/ml = 0,038 pmol/l; MW: 26 kDa				
Präzision:		n	CV (%)		
	Within-run	3	≤8		
	In-between-run	9	≤6		
Wiederfindung nach Spike mit rekombinatem intaktem FGF23		n	Wiederfindung (%)		
	EDTA plasma	6	100		
	Heparin plasma	1	79		
	Citrate plasma	1	103		
	Serum	6	91		
Verdünnungslinearität endogenes intaktes FGF23		n	Wiederfindung nach Verdünnung (%)		
			1+1	1+3	1+7
	EDTA plasma	6	107	108	111
	Heparin plasma	1	99	97	107
	Citrate plasma	2	129	112	126
Serum	6	87	74	67	
Spezifität	Dieser Assay erkennt endogenes und rekombinantes humanes intaktes FGF23.				
Verwendungszweck:	Nur für Forschungszwecke. (RUO)				

Werte von anscheinend gesunden Spendern:		n	Median FGF23 (intact) [pg/ml]
	EDTA plasma	22	24,4
	Heparin plasma	22	26,4
	Citrat plasma	22	17,4
	Serum	22	14,8

* Dieser ELISA ist für humane Plasmaproben optimiert und validiert. Serum und andere Probenarten sind jedoch mit diesem ELISA kompatibel. Nähere Informationen zur Messung von Serum, zu den Testmerkmalen und dem Matrixvergleich wie auch Daten zur Probenstabilität finden Sie auf unserer Website unter www.bmgrp.com (siehe Validation Data) oder kontaktieren Sie unseren Kundenservice per Email an info@bmgrp.com oder telefonisch unter +43/ 1/ 29107-45.

10) PRÄZISION

Within-run (Intra-assay): 2 Proben bekannter Konzentration wurden 3fach von 1 Operator getestet.
In-between-run (Inter-assay): in Arbeit

Within-run (n=3)	Probe 1	Probe 2	In-between-run (n=9)	Probe 1	Probe 2
Durchschnitt (pg/ml)	99	800	Durchschnitt (pg/ml)	103	803
SD (pg/ml)	8,4	10,2	SD (pg/ml)	6	15
VK (%)	8	1	VK (%)	6	2

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. Alle flüssigen Reagenzien enthalten $\leq 0,01\%$ Proclin 950 als Konservierungsmittel. Vermeiden Sie Kontakt mit Augen, Haut und Schleimhaut. Proclin 950 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, Schutzbrillen und Laborkleidung während der Testdurchführung.
- Schwefelsäure reizt Augen und Haut. Bei Berührung gründlich mit Wasser spülen.

13) LITERATUR

Siehe Kapitel 13) LITERATURE im englischen Teil des Beipacktextes.

Notes/Notizen:

Notes/Notizen:

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



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 / Opbevaars mellem / Förvaras vid / Przechowywać w / Tároljuk között / Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí



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 elvégzésére elegendő / Obsahuje materiál pre x testov / Obsahuje materiál pro x testů

BI-20700 FGF23 INTACT ASSAY PROTOCOL AND CHECKLIST

PREPARATION OF REAGENTS:

- Bring all reagents to room temperature (18-24°C).
- Prepare reagents and samples as instructed.
- Bring unused 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 50 µl STD/CTRL/SAMPLE (standard/control/sample) into respective wells.
- Step 2) Add 50 µl CONJ (conjugate, amber cap) into each well. Swirl gently.
- Step 3) Cover tightly and incubate for 3 hours at room temperature (18-24°C), in the dark.**
- Step 4) Aspirate and wash wells with 300 µl WASHBUF (wash buffer, natural cap) five times. Remove remaining buffer by strongly tapping the plate against a paper towel.
- Step 5) Add 100 µl SUB (Substrate, blue cap) into each well. Swirl gently.
- Step 6) Incubate for 30 minutes at room temperature (18-24°C), in the dark.**
- Step 7) Add 50 µl STOP (stop solution, white cap) into each well. Swirl gently.
- Step 8) Measure absorbance immediately at 450 nm with reference 630 nm, if available.