

***FluoBolt™-WNT3A***  
***METALL-VERSTÄRKTER***  
***FLUORESZENZ***  
***IMMUNOASSAY***  
***für***  
***humanes WNT3A***

METALL-VERSTÄRKTER FLUORESZENZ IMMUNOASSAY FÜR DIE  
QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON WNT3A IN HUMANEM SERUM UND PLASMA

KAT. NO. FIA-1705-F,-C3,-C5,-A6  
96-Well Format



rev.no. 200312

FIANOSTICS GmbH, A-2700 Wiener Neustadt, Viktor Kaplan Straße 2

Tel. + 43/2622/27514, E-mail [office@fianostics.at](mailto:office@fianostics.at)

## INHALT

1. METALL / PLASMON VERSTÄRKTE FLUORESZENZ	2
2. WNT3A	2
3. INHALT DES KITS	3
4. ZUSÄTZLICHES MATERIAL BEREITGESTELLT DURCH DEN KIT	3
5. ERFORDERLICHE, NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN UND GERÄTE	4
6. REAGENZIEN- UND PROBEN- PRÄPARATION	4
7. ASSAY DURCHFÜHRUNG	6
8. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	9
9. ASSAY CHARAKTERISTIKA	10
10. TECHNISCHE HINWEISE	13
11. VORSICHTSMAßNAHMEN	13
12. LITERATUR	14



[www.fianostics.at](http://www.fianostics.at)

## 1) METALL / PLASMON VERSTÄRKTE FLUORESZENZ

Metall-verstärkte Fluoreszenz (MEF, für engl. „Metal Enhanced Fluorescence“) ermöglicht die analytische Empfindlichkeit eines auf Fluoreszenz-Detektion basierenden Testsystems drastisch zu steigern. MEF basiert auf der Tatsache, dass anregendes Licht mit den Elektronen von Nano-Metallstrukturen wechselwirkt, wodurch lokalisierte, sehr hohe elektromagnetische Felder, sogenannte lokalisierte Oberflächenplasmonen (LSPs, für engl. „Localized Surface Plasmons“) entstehen. Deswegen werden solch Strukturen auch plasmonische Strukturen genannt, weswegen Kombinationen von (z.B. polymerem) Träger und Struktur auch „plasmonische Substrate“ genannt werden. Diese LSPs führen zu einer Steigerung der Emission von fluoreszierenden Molekülen (z.B. Fluoreszenz-markierte Antikörper), wenn diese an die Oberfläche von Nano-Metallstrukturen gebunden werden, die das Signal verstärken. FIANOSTICS hat eine neue Plasmon-verstärkte Immunoassay Plattform in Kooperation mit Sony DADC BioSciences (seit 1. Juni 2016 STRATEC Consumables) entwickelt, die eine bis um das 300-fache Steigerung der Empfindlichkeit ermöglicht. Diese Plattform ist vollständig kompatibel zur Standardlabormethodik unter Verwendung des 96-Well Mikrotiter-Platten Formats. Dadurch können auf dieser Technologie basierende Assays mit jedem standardmäßigen Fluoreszenz-Mikrotiter-Platten Messgerät gemessen werden. Die einzigartigen Eigenschaften ermöglichen Fluoreszenz Immunoassays mit höchster Empfindlichkeit und ohne Waschschriffe.

## 2) WNT3A

WNT3A ist ein sekretorisches Glykoprotein und gehört zur WNT Familie. Mitglieder dieser Familie können mit Zellmembranrezeptoren interagieren und übernehmen dadurch wichtige Funktionen bei der autokrinen Regulation und parakrinen Signalübertragung. WNT3A wird in moderaten Mengen in der Plazenta und in geringen Konzentrationen in der Lunge, der Milz und der Prostata exprimiert.

Die kanonische Sequenz von WNT3A besteht aus 352 Aminosäuren (AS) und einer Masse von 39,365 kDa. Sie ist reich an Cystein und formt dadurch einige Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten. Bei AS 87 und AS 298 finden sich N-Acetylglucosamin-Modifikationen. AS 209 trägt einen Lipidrest, der das Moleküls sehr hydrophob macht. Deswegen bildet WNT3A in seiner physiologischen Form einen Komplex mit Afamin, das als Träger für hydrophobe Moleküle in Körperflüssigkeiten fungiert und essenziell für die Aktivität und Löslichkeit von WNT3A in der Zirkulation ist.

WNT3A spielt eine wichtige Rolle bei Zellwachstum und -differenzierung, Embryonalentwicklung, neuronaler Entwicklung, Immunregulation, Knochenbildung und Karzinogenese.

### 3) INHALT DES KITS

ID	KIT KOMPONENTE	QUANTITÄT
GM	Mit Anti-humanem WNT3A Antikörper vorbeschichtete MEF-Mikrotiter-Platte; Vakuum-verpackt in einem Aluminiumbeutel	1 x 96 Wells
WP	Waschpuffer Konzentrat 20x, durchsichtige Kappe	1 x 25 ml
GAF, GA3, GA5, GAA	Anti-humaner WNT3A Antikörper, markiert mit FITC, Cy3, Cy5 oder AlexaFluor680, schwarzes Fläschchen,	1 x 2,5 ml
GS	Standards 1-6, (2800, 1400, 700, 350, 175, 0 pmol/l), weiße Kappe, lyophilisiert	6 Vials, 0,25 ml
GCA/B	Kontrolle A und B, gelbe Kappe, lyophilisiert (für Konzentrationen siehe Etikett)	2 Vials, 0,25 ml
GD	Probenverdünnungspuffer, durchsichtige Kappe, einsatzbereit	1 x 10 ml

### 4) ZUSÄTZLICH IM KIT VORHANDENES MATERIAL

- 2 selbstklebende Plastikfolien
- 2 Trockenmittelbeutel für die Plattenlagerung

- Protokollblatt
- Gebrauchsanweisung
- QC Datenblatt

### 5) ERFORDERLICHE, NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN UND GERÄTE

- Präzisionspipetten kalibriert auf 10 µl, 20 µl, 50 µl, 200 µl, 500 µl und Einweg-Pipettenspitzen
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Plattenwaschgerät, Multipipette oder Mehrkanalpipette zum Waschen
- Kühlschrank mit 4°C (2-8°C)
- Fluoreszenz Mikrotiterplatten Messgerät
- Millimeterpapier oder Software zum Berechnen der Ergebnisse

### 6) REAGENZIEN- UND PROBEN- PRÄPARATION

Alle Reagenzien des Kits sind bei 4°C (2-8°C) bis zu dem auf dem Etikett jedes Reagenzes angegebenen Verfallsdatum haltbar.

#### Proben-Präparation:

Sammeln Sie venöses Blut in standardisierten Blutsammelröhrchen für Serum oder Plasma. Wir empfehlen die Plasma- oder Serum-Separierung durch schnellstmögliche Zentrifugation, z.B. 10 Min bei 2000 x g, vorzugsweise bei 4°C (2-8°C) durchzuführen. Die erhaltenden Serum- oder Plasma-Proben sollten so bald als möglich gemessen werden. Da WNT3A bei Raumtemperatur nicht stabil ist, sollten die Proben nicht für längere Zeit (> 1 Stunde) bei Raumtemperatur stehen gelassen werden. Für längere Lagerung sollten die Proben aliquotiert und bei -25°C

oder kälter gelagert werden. Proben sollten nicht öfter als fünfmal eingefroren und wieder aufgetaut werden.

Lipämische oder hämolytische Proben können zu falschen Ergebnissen führen. Proben sollten gut gemischt werden, bevor sie im Assay eingesetzt werden.

Für weitere Informationen bezüglich der Proben-Stabilität kontaktieren Sie uns per E-Mail an [support@fianostics.at](mailto:support@fianostics.at) oder per Telefon +43/2622/27514.

#### Reagenzien-Vorbereitung:

Fügen Sie 250 µl destilliertes oder deionisiertes Wasser zu den lyophilisierten GS (Standards) und GC (Kontrollen) hinzu. Lassen Sie sie bei Raumtemperatur (18-26°C) für mindestens 15 Minuten aber längstens 30 Minuten vor dem Einsatz im Assay stehen. Da WNTA bei Raumtemperatur nicht stabil ist, sollten rekonstituierte Standards und Kontrollen nicht über einen längeren Zeitraum (> 1 Stunde) bei Raumtemperatur stehen gelassen werden. Rekonstituierte GS und GC sind bei -25°C oder kälter bis zum am Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar. Rekonstituierte GS und GC können bis zu fünfmal eingefroren und wieder aufgetaut werden.

Bringen Sie das WP (Waschpuffer) Konzentrat (20x) auf Raumtemperatur. Achten Sie darauf, dass die Lösung klar und ohne jegliche Salzpräzipitate vorliegt, bevor das Konzentrat weiter verdünnt wird. Verdünnen Sie das WP Konzentrat vor dem Einsatz im Assay auf die Arbeitskonzentration, indem Sie die entsprechende Menge destilliertes oder deionisiertes Wasser zugeben, z.B. 25 ml WP + 475 ml Wasser. Unverdünnter WP ist bei 4°C (2-8°C) bis zum auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum haltbar. Verdünnter WP ist bei 4°C (2-8°C) bis zu einem Monat haltbar. Verwenden Sie nur verdünnten WP im Assay.

## 7) ASSAY DURCHFÜHRUNG

Alle Reagenzien und Proben müssen vor Verwendung im Assay auf Raumtemperatur (18-26°C) gebracht werden.

Markieren Sie die Positionen der Standards, Kontrollen und Proben auf dem Protokollblatt. Wir empfehlen die Proben und die Standards in Doppelwerten zu messen.

Nehmen Sie die plasmonverstärkte Mikrotiter-Platte aus dem Aluminiumbeutel. Vermeiden Sie die Berührung des Bodens der Platte mit bloßen Händen, da die Messung ohne Waschschrift durch den Well-Boden durchgeführt wird.

Verschließen Sie alle Wells, die Sie **nicht im folgenden Assay benutzen**, mit der mitgelieferten selbstklebenden Plastikfolie (passend zuschneiden!).

Standardmäßig wird der Kit mit einem AlexaFluor680 markierten Detektionsantikörper (GAA) geliefert, aufgrund der Tatsache, dass die Hintergrund-Fluoreszenz von Serum in diesem Wellenlängen-Bereich am geringsten ist. Falls ihr Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Messgerät mit monochromatischer Optik ausgestattet ist, setzen Sie deswegen die Anregung/Emission (Ex/Em) auf 679/702 nm oder falls Sie ein auf einem optischen Filter basierendes Messgerät verwenden, wählen Sie ein passendes Filter-Paar (z.B. 670/720 nm) aus. Auf Anfrage kann der Kit auch mit FITC (Ex/Em = 495/518 nm), Cy3 (Ex/Em = 550/570 nm) oder Cy5 (Ex/Em = 650/670 nm) markiertem Antikörper geliefert werden.

1) Pipettieren Sie 25 µl des markierten Detektionsantikörpers (GA) in jedes benötigte Well.

2) Fügen Sie nun 20 µl Standard, Kontrolle oder Probe in die Wells entsprechend den markierten Positionen auf dem Protokollblatt hinzu und schwenken Sie die Platte vorsichtig in horizontaler Richtung. Verschließen Sie die benutzten Wells gründlich mit der mitgelieferten, selbstklebenden Abdeckfolie und inkubieren Sie die Platte im Dunkeln über Nacht bei Raumtemperatur (18-26°C).

3) Am nächsten Tag messen Sie die Platte mit einem Fluoreszenzlesegerät für Mikrotiterplatten entweder sofort ohne weitere Bearbeitung (3a) oder nach Durchführung eines Waschschrilles (3b)

**Hinweis: Die Qualität der Messung in Bottom-Konfiguration (3a) kann zwischen verschiedenen Mikrotiterplatten-Messgeräten variieren. Deswegen empfehlen wir für Erstanwender den Waschschrill und das Vorgehen nach Protokoll 3b.**

3a) Falls bei Ihrem Messgerät die Messung durch den Wellboden (Bottom-Konfiguration) möglich ist, messen Sie die Platte direkt ohne weitere Bearbeitung bei der zum gewählten Antikörper passenden Ex/Em Wellenlänge (495/518 nm für GAF, 550/570 nm für GA3, 650/670 nm für GA5, 679/702 nm für GAA). Der Gain (Verstärkungsfaktor) sollte so gewählt werden, dass ein Unterschied von mindestens 10000 Fluoreszenz-Einheiten (F.U., für Englisch „fluorescence units“) zwischen dem 0 pmol/l und dem 2800 pmol/l WNT3A Standard erreicht wird. Proben, welche das Signal des höchsten Standards überschreiten, müssen entsprechend mit Probenverdünnungspuffer (GD) erneut angesetzt werden.

3b) Falls bei Ihrem Messgerät die Messung durch den Wellboden nicht möglich ist oder falls Sie die Platte zu Dokumentationszwecken aufbewahren wollen, entfernen Sie den Inhalt der benutzten Wells durch Ausleeren oder Absaugen und waschen Sie sie 3x mit Waschpuffer. Verwenden Sie dafür mindestens 200 µl Waschpuffer pro Well. Nach dem letzten Waschschrill entfernen Sie die restliche Flüssigkeit durch kräftiges Klopfen der Platte gegen einen Stapel Papiertücher oder ähnliches. Messen Sie die Platte von oben (Top-Konfiguration) ohne weitere Bearbeitung bei der zum gewählten Antikörper passenden Ex/Em Wellenlänge (495/518 nm für SAF, 550/570 nm für SA3, 650/670 nm für SA5, 679/702 nm für SAA).

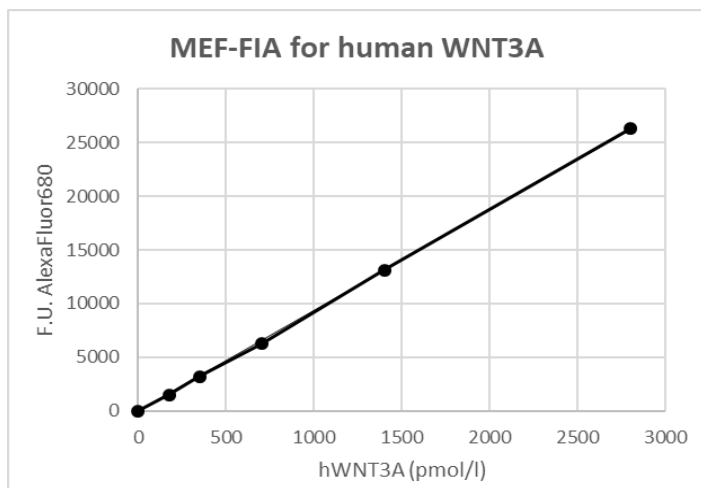
Der Gain sollte so gewählt werden, dass ein Unterschied von mindestens 10000 Fluoreszenz-Einheiten (F.U., für Englisch „fluorescence units“) zwischen dem 0 pmol/l und dem 2800 pmol/l WNT3A Standard erreicht wird. Proben, welche das Signal des höchsten Standards überschreiten, müssen entsprechend mit Probenverdünnungspuffer (GD) erneut angesetzt werden.

5) Lagern Sie die Platte zusammen mit den 2 Trockenmittelbeutel in dem Aluminiumbeutel bei 4°C (2-8°C). Unbenutzte Wells sind bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar. Die Fluoreszenz-Signale der Standards, Kontrollen und Proben bleiben abhängig von deren erreichten Signalintensität für mindestens 2 Monate messbar.

## 8) BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Subtrahieren Sie das Fluoreszenz-Signal des 0 pmol/l Standards von allen Standards, Kontrollen und Proben. Erstellen Sie eine Kalibrierungskurve aus den Fluoreszenz-Einheiten (F.U.) der Standards unter Verwendung von kommerziell erhältlicher Software oder Millimeterpapier. Lesen Sie die Konzentrationen der Proben und Kontrollen von dieser Kalibrierungskurve ab. Der Assay wurde mit einem 4PL Algorithmus evaluiert. Andere Kurvenanpassungsmethoden müssen durch den Benutzer evaluiert werden.

Beispiel einer typischen Kalibrierungskurve:



Das mitgelieferte Qualitätskontroll (QC)-Protokoll zeigt die Ergebnisse der finalen Freigabe-QC für jede Kit-LOT zum Zeitpunkt der Produktion. Die Fluoreszenz-Intensität, die von Kunden erreicht wird, kann sich aufgrund verschiedener Einflüsse und/ oder aufgrund der lagerungs-bedingten Abnahme der Signalintensität unterscheiden.

Dies beeinflusst aber nicht die Gültigkeit der Ergebnisse, solange sich die mitgelieferten Kontrollen laut Spezifikation verhalten (siehe Etikett für Zielbereiche).

## 9) ASSAY CHARAKTERISTIKA

Methode	Metall-verstärkte Fluoreszenz Immunoassay im 96-Well Plattenformat
Proben Typ	Serum, Plasma
Standard Bereich	0 bis 2800 pmol/l (6 Standards und 2 Kontrollen in einer humanen Serummatrix)
Umrechnungsfaktor	1 ng/ml = 25 pmol/l (MW: 39,4 kDa)
Probenvolumen	20 µl (unverdünnte Probe) / Well
Inkubationszeit/ -temperatur	über Nacht / Raumtemperatur (18-26°C)
Empfindlichkeit	LOD (0 pmol/l + 3 SD): 51 pmol/l; LLOQ: 175 pmol/l
Spezifität	Dieser Test detektiert humanes WNT3A
Kreuzreaktivität	Humanes WNT3A teilt etwa 100-97% AS Sequenz-identität mit Primaten, 96-95% mit Bären, 96% mit Walen und 96% mit Mäusen. Die Kreuzreaktivität dieses Assays mit anderen Spezies als dem Menschen wurde nicht getestet.

### Präzision:

Intra-Assay: 4 Proben mit bekannten Konzentrationen wurden 3 Mal innerhalb eines Assay Laufes getestet. CVs reichten von 3-10%.

Inter-Assay: 4 Proben mit bekannten Konzentrationen wurden in Duplikaten innerhalb 3 verschiedenen Assay Läufen getestet. CVs reichten von 7-11%.

### Spike/Wiederfindung:

Die Wiederfindung von WNT3A wurde evaluiert durch Hinzufügen von bekannten Konzentrationen von humanem, rekombinantem WNT3A zu 4 verschiedenen humanen Serum Proben ermittelt. Die mittlere Wiederfindung lag bei 87%.

Die mittlere Wiederfindung in Plasma liegt deutlich niedriger:

Citrat-Plasma: 45% (n=6)

EDTA/Heparin-Plasma: 58% (n=6).

### Linearität:

3 humane Serum Proben wurden mit rekombinantem WNT3A versetzt und 1+1 und 1+2 mit dem im Kit enthaltenen Probenverdünnungspuffer (GD) verdünnt. Die mittlere Linearität lag bei 74%

### Spezifität:

#### *Analyt Spezifität:*

Dieser Test detektiert humanes WNT3A

#### *Spezies Spezifität:*

Die Aminosäuresequenz von humanem WNT3A stimmt zu 100-97% mit Primaten (z.B. Orang-Utan oder Schimpanse), zu 96-95% mit Bären (z.B. Grizzly Bär oder Großer Panda), zu 96% mit Walen (z.B. Belugawal oder Delfine) und zu 96% mit Mäusen überein. Die Reaktivität dieses Assays mit anderen Spezies als dem Menschen wurde nicht überprüft. Der Gebrauch dieses Assays für die quantitative Bestimmung von WNT3A in Serum oder Plasma von anderen Spezies mit hoher Sequenzhomologie kann unter Umständen möglich sein, muss aber durch den Benutzer evaluiert werden.

FIANOSTICS übernimmt keine Verantwortung für die Funktionalität dieses Assays mit nicht humanen Proben.

### **10) TECHNISCHE HINWEISE**

- Mischen oder ersetzen Sie Reagenzien nicht mit denen anderer Chargen oder Quellen.
- Mischen Sie keine Stopfen oder Kappen von verschiedenen Reagenzien und verwenden Sie keine Reagenzien verschiedener Chargen.
- Verwenden Sie keine Reagenzien nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums.
- Schützen Sie Reagenzien vor direkter Sonneneinstrahlung.
- Um genaue Ergebnisse zu gewährleisten, achten Sie auf die richtige Haftung der selbstklebenden Plastikfolien für eine vollständige Versiegelung der Wells während des Inkubationsschrittes.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.

### **11) VORSICHTSMAßNAHMEN**

- Alle Komponenten humanen Ursprungs wurden auf HIV-Ab und HBsAg getestet und als negativ befunden. Dennoch sollten sie sicherheitshalber als potentiell infektiös gehandhabt und entsorgt werden.
- Flüssige Reagenzien enthalten  $\leq 0,1\%$  Proclin 300 als Konservierungsmittel. Proclin 300 ist nicht toxisch in den im Kit verwendeten Konzentrationen. Es kann allergische Hautreaktionen verursachen – vermeiden Sie den Kontakt mit Haut, Augen und Schleimhäuten.
- Pipettieren Sie nicht mit dem Mund.

- Wenn Reagenzien verwendet werden, essen, trinken und rauchen Sie nicht und tragen Sie keine Kosmetika auf.
- Tragen Sie Handschuhe, Schutzbrillen und einen Labormantel, wenn Sie diesen Assay durchführen.

## 12) LITERATUR

- **Single step, direct fluorescence immunoassays based on metal enhanced fluorescence (MEF-FIA) applicable as micro plate-, array-, multiplexing- or point of care-format.** Hawa G et al., Anal Biochem. 2018;549:39-44.
- **Wnt3a: Functions and Implications in Cancer.** Sha H et al., Chin J Cancer. 2015;34(12):554-62.
- **Elevated levels of Wnt3a and low levels of Dickkopf-1 in serum are associated with syndesmophyte formation in ankylosing spondylitis.** Klingberg E et al., Ann Rheum Dis. 2012;71:A64.
- **Expression of Wnt3a in hepatocellular carcinoma and its effects on cell cycle and metastasis.** Caijie L et al., Int J Oncol. 2017;51(4):1135-1145.
- **Wnt3a signaling within bone inhibits multiple myeloma bone disease and tumor growth.** Qiang YW et al., Blood. 2008;112(2):374-382.
- **The Importance of WNT Pathways for Bone Metabolism and Their Regulation by Implant Topography.** Galli C et al., Eur Cell Mater. 2012;24:46-59.

- **Active and water-soluble form of lipidated Wnt protein is maintained by a serum glycoprotein afamin/ $\alpha$ -albumin.** Mihara E et al., eLife. 2016;5:e11621.
- **Wnt3a involved in the mechanical loading on improvement of bone remodeling and angiogenesis in a postmenopausal osteoporosis mouse model.** Li X et al., FASEB J. 2019 Aug;33(8):8913-8924
- **Repair effect of Wnt3a protein on the contused adult rat spinal cord.** Yin ZS et al. Neurol Res. 2008 Jun;30(5):480-6.

## 13) NOTIZEN

---



---



---



---



---



---



---



---