

# PRODUCT INFORMATION & MANUAL

## Human sCD40L Platinum ELISA

Enzyme-linked Immunosorbent Assay for  
quantitative detection of human sCD40L.



*For in-vitro diagnostic  
use. Not for therapeutic  
procedures.*

**REF** *BMS239CE*

*BMS239TENCE*

*96 TESTS*



*Human sCD40L  
Platinum ELISA*

### North America

Technical Support:

Research Products:  
888.810.6168  
858.642.2058  
tech@eBioscience.com

Clinical Products:  
877.726.8559  
858.642.2058  
tech@eBioscience.com

Customer Service:

888.999.1371  
858.642.2058  
info@eBioscience.com

Fax:

858.642.2046

### Europe/International\*

Technical Support:

+43 1 796 40 40-120  
tech@eBioscience.com

Customer Service:

+43 1 796 40 40-304  
info@eBioscience.com

Fax:

+43 1 796 40 40-400



Bender MedSystems GmbH  
Campus Vienna Biocenter 2  
1030 Vienna, Austria  
www.eBioscience.com

\* Customers outside North America and Europe  
may contact their eBioscience distributor listed on  
our website at [www.eBioscience.com/distributors](http://www.eBioscience.com/distributors).

## TABLE OF CONTENTS

|     |                                              |    |
|-----|----------------------------------------------|----|
| 1.  | Intended Use                                 | 4  |
| 2.  | Summary                                      | 4  |
| 3.  | Principles of the Test                       | 6  |
| 4.  | Reagents Provided                            | 7  |
| 5.  | Storage Instructions – ELISA Kit             | 9  |
| 6.  | Specimen Collection and Storage Instructions | 9  |
| 7.  | Materials Required But Not Provided          | 10 |
| 8.  | Precautions for Use                          | 11 |
| 9.  | Preparation of Reagents                      | 13 |
| 10. | Test Protocol                                | 17 |
| 11. | Calculation of Results                       | 17 |
| 12. | Limitations                                  | 24 |
| 13. | Performance Characteristics                  | 25 |
| 14. | Ordering Information                         | 30 |
| 15. | Reagent Preparation Summary                  | 30 |
| 16. | Test Protocol Summary                        | 32 |

## **PRODUKTINFORMATION UND HANDBUCH (Deutsch) 33**

|    |                                          |    |
|----|------------------------------------------|----|
| 1. | Mitgelieferte Reagenzien                 | 33 |
| 2. | Lagerhinweise                            | 35 |
| 3. | Sicherheitsvorkehrungen für den Gebrauch | 36 |
| 4. | Vorbereitung der Reagenzien              | 38 |
| 5. | Testprotokoll                            | 43 |

## **INFORMACIÓN Y MANUAL DEL PRODUCTO (Español) 48**

|    |                               |    |
|----|-------------------------------|----|
| 1. | Reactivos Suministrados       | 48 |
| 2. | Instrucciones de Conservación | 50 |
| 3. | Precauciones de uso           | 51 |
| 4. | Preparación de los Reactivos  | 53 |
| 5. | Protocolo de Ensayo           | 58 |

|                                                         |           |
|---------------------------------------------------------|-----------|
| <b>INFORMATIONS SUR LE PRODUIT ET MANUEL (Français)</b> | <b>63</b> |
| 1. Réactifs Fournis                                     | 63        |
| 2. Instruction de Stockage                              | 65        |
| 3. Préventions de Sécurité pour l'Usage                 | 66        |
| 4. Préparation des Réactifs                             | 68        |
| 5. Protocole de Test                                    | 73        |
| <b>INFORMAZIONI SUL PRODOTTO E MANUALE (Italiano)</b>   | <b>78</b> |
| 1. Reagenti Forniti                                     | 78        |
| 2. Istruzioni di Conservazione                          | 80        |
| 3. Precauzioni per l'Uso                                | 81        |
| 4. Preparazione dei Reagenti                            | 83        |
| 5. Procedura del Test                                   | 88        |

## 1. Intended Use

The human sCD40L ELISA is an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative detection of human sCD40L. **The human sCD40L ELISA is for in vitro diagnostic use. Not for use in therapeutic procedures.**

## 2. Summary

CD40 belongs to the TNF receptor superfamily. While the biological role of some of the ligand-receptor pairs in this family still remains obscure, CD40 has proven its importance.

A key role of CD40/CD40ligand interactions in immune activation, particularly in T-cell dependent B cell responses is anticipated. This molecule as well as the other ligands of the family share the property of co-stimulation of T-cell proliferation and are all expressed by activated T-cells.

The programmed cell death has been suggested to be involved in clonal elimination of self-reactive lymphocytes for the normal function of the immune system. Interaction with membrane bound self antigens may eliminate self-reactive nature B cells by apoptosis. Antigen-receptor mediated B cell apoptosis is blocked when a signal is transduced via the CD40 molecule on the B cell surface.

Because the ligand of CD40 (CD40L) is expressed on activated T helper cells, B cells may escape from apoptosis and are activated when the immune system interacts with foreign antigens, which are normally able to activate T-helper cells. Thus the CD40/CD40L interaction plays a central role in the various phases of the B cell response to T-dependent antigens.

Taken together, B cells can participate in regulating their own destruction. Protection against Fas-dependent apoptosis afforded by immunoglobulin-receptor engagement may constitute a fail-safe mechanism that eliminates bystander B cells activated by CD40L-expressing T cells, but ensures survival of antigen-specific B cells.

CD40 Ligand is expressed on the surface of activated CD4<sup>+</sup> T cells, basophils, and mast cells. Binding of CD40L to its receptor, CD40, on the surface of B cells stimulates B-cell proliferation, adhesion and differentiation. A soluble isoform of CD40L has been shown to exist in the circulation. This soluble molecule is a homotrimer of a 18kDa protein exhibiting full activity in B cell proliferation and differentiation assays, is able to rescue B cells from apoptosis and binds soluble CD40.

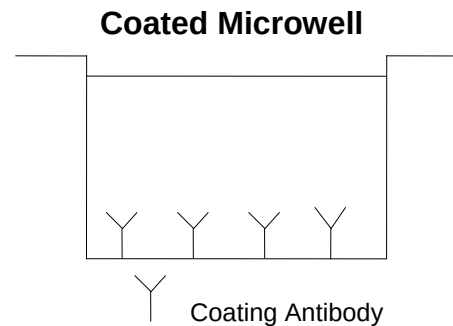
CD40L is discussed in relation to a potential role in supporting B cell tumors and it has been discovered that the molecular defect in the X-linked Hyper-IgM-Syndrome is targeted to the CD40L gene, it is functional involved in B cell hybridomas and chronic lymphocytic leukemia as well as several autoimmune diseases.

For literature update refer to **[www.eBioscience.com](http://www.eBioscience.com)**

### 3. Principles of the Test

An anti-human sCD40L coating antibody is adsorbed onto microwells.

Figure 1



Human sCD40L present in the sample or standard binds to antibodies adsorbed to the microwells and the HRP-conjugated anti-human sCD40L antibody is added and binds to human sCD40L captured by the first antibody.

Figure 2

#### First Incubation

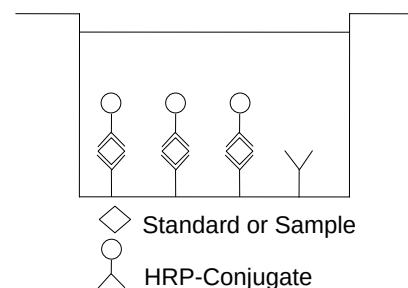


Figure 3

#### Second Incubation

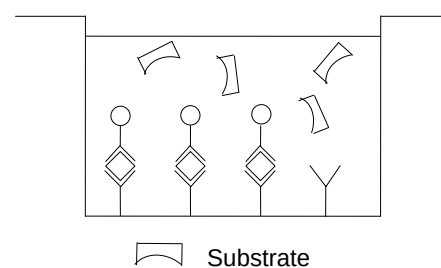
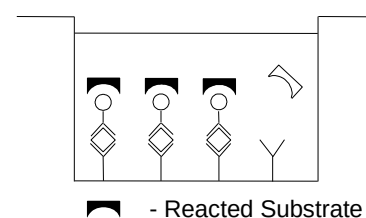


Figure 4



Following incubation unbound HRP-conjugated anti-human sCD40L is removed during a wash step, and substrate solution reactive with HRP is added to the wells.

A coloured product is formed in proportion to the amount of human sCD40L present in the sample or standard. The reaction is terminated by addition of acid and absorbance is measured at 450 nm. A standard curve is prepared from 7 human sCD40L standard dilutions and human sCD40L concentration determined.

## 4. Reagents Provided

### 4.1 Reagents for human sCD40L ELISA BMS239CE (96 tests)

- 1 aluminium pouch with a **Microwell Plate coated** with monoclonal antibody to human sCD40L
- 1 vial (200 µl) **HRP-Conjugate** anti-human sCD40L monoclonal antibody
- 2 vials human sCD40L **Standard** lyophilized, 20 ng/ml upon reconstitution
- 1 vial **Control high**, lyophilized
- 1 vial **Control low**, lyophilized
- 1 vial (12 ml) **Sample Diluent**
- 1 vial (5 ml) **Assay Buffer Concentrate** 20x (PBS with 1% Tween 20 and 10% BSA)
- 1 bottle (50 ml) **Wash Buffer Concentrate** 20x (PBS with 1% Tween 20)
- 1 vial (15 ml) **Substrate Solution** (tetramethyl-benzidine)
- 1 vial (15 ml) **Stop Solution** (1M Phosphoric acid)
- 1 vial (0.4 ml) **Blue-Dye**
- 1 vial (0.4 ml) **Green-Dye**
- 2 **Adhesive Films**
- 2 **Dilution Plates**

## 4.2 Reagents for human sCD40L ELISA BMS239TENCE (10x96 tests)

- 10 aluminium pouches with a **Microwell Plate coated** with monoclonal antibody to human sCD40L
- 10 vials (200 µl) **HRP-Conjugate** anti-human sCD40L monoclonal antibody
- 10 vials human sCD40L **Standard** lyophilized, 20 ng/ml upon reconstitution
- 10 vials **Control high**, lyophilized
- 10 vials **Control low**, lyophilized
- 10 vials (12 ml) **Sample Diluent**
- 2 vials (5 ml) **Assay Buffer Concentrate** 20x  
(PBS with 1% Tween 20 and 10% BSA)
- 3 bottles (50 ml) **Wash Buffer Concentrate** 20x  
(PBS with 1% Tween 20)
- 10 vials (15 ml) **Substrate Solution** (tetramethyl-benzidine)
- 10 vials (15 ml) **Stop Solution** (1M Phosphoric acid)
- 6 vials (0.4 ml) **Blue-Dye**
- 6 vials (0.4 ml) **Green-Dye**
- 10 **Adhesive Films**
- 10 **Dilution Plates**

**Please note:** *In some, very rare cases, an insoluble precipitate of stabilizing protein has been seen in vials. This precipitate does not interfere in any way with the performance of the test and can thus be ignored.*



## 5. Storage Instructions – ELISA Kit

Store kit reagents between 2° and 8°C except controls. Store lyophilized controls at -20°C. Immediately after use remaining reagents should be returned to cold storage (2° to 8°C), or to -20°C, respectively. Expiry of the kit and reagents is stated on labels.

Expiry of the kit components can only be guaranteed if the components are stored properly, and if, in case of repeated use of one component, this reagent is not contaminated by the first handling.

## 6. Specimen Collection and Storage Instructions

Cell culture supernatant, serum and plasma (EDTA, citrate, heparin) were tested with this assay. Other biological samples might be suitable for use in the assay. **BMS239 is not suitable for the detection of very low levels of sCD40L in plasma; for this please refer to BMS293, human sCD40L high sensitive ELISA.**

Remove serum or plasma from the clot or cells as soon as possible after clotting and separation.

Pay attention to a possible “**Hook Effect**” due to high sample concentrations (see chapter 11).

Samples containing a visible precipitate must be clarified prior to use in the assay. Do not use grossly hemolyzed or lipemic specimens.

Samples should be aliquoted and must be stored frozen at -20°C to avoid loss of bioactive human sCD40L. If samples are to be run within 24 hours, they may be stored at 2° to 8°C (for sample stability refer to 13.5).

Avoid repeated freeze-thaw cycles. Prior to assay, the frozen sample should be brought to room temperature slowly and mixed gently.

## **7. Materials Required But Not Provided**

- 5 ml and 10 ml graduated pipettes
- 5  $\mu$ l to 1000  $\mu$ l adjustable single channel micropipettes with disposable tips
- 50  $\mu$ l to 300  $\mu$ l adjustable multichannel micropipette with disposable tips
- Multichannel micropipette reservoir
- Beakers, flasks, cylinders necessary for preparation of reagents
- Device for delivery of wash solution (multichannel wash bottle or automatic wash system)
- Microplate shaker
- Microwell strip reader capable of reading at 450 nm (620 nm as optional reference wave length)
- Glass-distilled or deionized water
- Statistical calculator with program to perform regression analysis

## 8. Precautions for Use

- All reagents should be considered as potentially hazardous. We therefore recommend that this product is handled only by those persons who have been trained in laboratory techniques and that it is used in accordance with the principles of good laboratory practice. Wear suitable protective clothing such as laboratory overalls, safety glasses and gloves. Care should be taken to avoid contact with skin or eyes. In the case of contact with skin or eyes wash immediately with water. See material safety data sheet(s) and/or safety statement(s) for specific advice.
- Reagents are intended for in vitro diagnostic use and are not for use in therapeutic procedures.
- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or other sources.
- Do not use kit reagents beyond expiration date on label.
- Do not expose kit reagents to strong light during storage or incubation.
- Do not pipette by mouth.
- Do not eat or smoke in areas where kit reagents or samples are handled.
- Avoid contact of skin or mucous membranes with kit reagents or specimens.
- Rubber or disposable latex gloves should be worn while handling kit reagents or specimens.
- Avoid contact of substrate solution with oxidizing agents and metal.
- Avoid splashing or generation of aerosols.
- In order to avoid microbial contamination or cross-contamination of reagents or specimens which may invalidate the test use disposable pipette tips and/or pipettes.
- Use clean, dedicated reagent trays for dispensing the conjugate and substrate reagent.

- Exposure to acid inactivates the conjugate.
- Glass-distilled water or deionized water must be used for reagent preparation.
- Substrate solution must be at room temperature prior to use.
- Decontaminate and dispose specimens and all potentially contaminated materials as they could contain infectious agents. The preferred method of decontamination is autoclaving for a minimum of 1 hour at 121.5°C.
- Liquid wastes not containing acid and neutralized waste may be mixed with sodium hypochlorite in volumes such that the final mixture contains 1.0% sodium hypochlorite. Allow 30 minutes for effective decontamination. Liquid waste containing acid must be neutralized prior to the addition of sodium hypochlorite.

## 9. Preparation of Reagents

**Buffer Concentrates** should be brought to room temperature and should be diluted before starting the test procedure.

If crystals have formed in the **Buffer Concentrates**, warm them gently until they have completely dissolved.

### 9.1. Wash Buffer (1x)

Pour entire contents (50 ml) of the **Wash Buffer Concentrate** (20x) into a clean 1000 ml graduated cylinder. Bring to final volume of 1000 ml with glass-distilled or deionized water. Mix gently to avoid foaming.

Transfer to a clean wash bottle and store at 2° to 25°C. Please note that Wash Buffer (1x) is stable for 30 days.

Wash Buffer (1x) may also be prepared as needed according to the following table:

| Number of Strips | Wash Buffer Concentrate (20x)<br>(ml) | Distilled Water<br>(ml) |
|------------------|---------------------------------------|-------------------------|
| 1 - 6            | 25                                    | 475                     |
| 1 - 12           | 50                                    | 950                     |

### 9.2. Assay Buffer (1x)

Pour the entire contents (5 ml) of the **Assay Buffer Concentrate** (20x) into a clean 100 ml graduated cylinder. Bring to final volume of 100 ml with distilled water. Mix gently to avoid foaming.

Store at 2° to 8°C. Please note that the Assay Buffer (1x) is stable for 30 days.

Assay Buffer (1x) may also be prepared as needed according to the following table:

| Number of Strips | Assay Buffer Concentrate (20x)<br>(ml) | Distilled Water<br>(ml) |
|------------------|----------------------------------------|-------------------------|
| 1 - 6            | 2.5                                    | 47.5                    |
| 1 - 12           | 5.0                                    | 95.0                    |

### 9.3. HRP-Conjugate

**Please note that the HRP-Conjugate should be used within 30 minutes after dilution.**

Make a 1:100 dilution of the concentrated **HRP-Conjugate** solution with Assay Buffer (1x) in a clean plastic tube as needed according to the following table:

| Number of Strips | HRP-Conjugate<br>(ml) | Assay Buffer (1x)<br>(ml) |
|------------------|-----------------------|---------------------------|
| 1 - 6            | 0.06                  | 5.94                      |
| 1 - 12           | 0.12                  | 11.88                     |

### 9.4. Human sCD40L Standard

Reconstitute **human sCD40L standard** by addition of distilled water. Reconstitution volume is stated on the label of the standard vial. Swirl or mix gently to insure complete and homogeneous solubilization (concentration of reconstituted standard = 20 ng/ml). Allow the standard to reconstitute for 10-30 minutes. Mix well prior to making dilutions.

After usage remaining standard cannot be stored and has to be discarded.

**Standard dilutions** can be prepared directly on the dilution plate (see 10.b) or alternatively in tubes (see 9.4.1).

### 9.4.1. External Standard Dilution

Label 7 tubes, one for each standard point.

S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7

Then prepare 1:2 serial dilutions for the standard curve as follows:

Pipette 225  $\mu$ l of Sample Diluent into each tube.

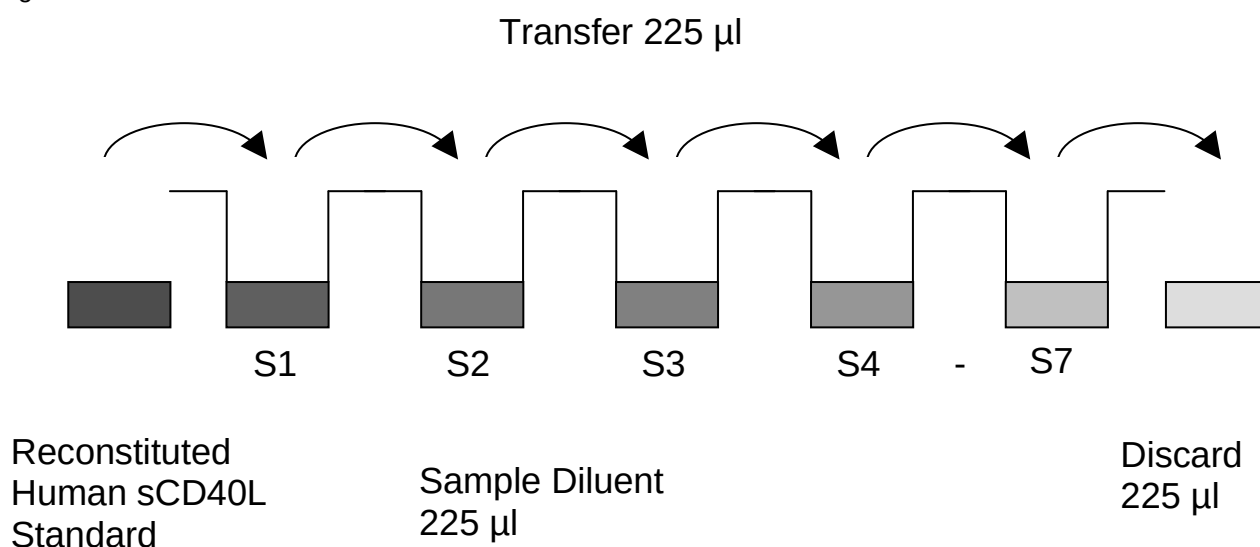
Pipette 225  $\mu$ l of reconstituted standard (concentration of standard = 20 ng/ml) into the first tube, labelled S1, and mix (concentration of standard 1 = 10 ng/ml).

Pipette 225  $\mu$ l of this dilution into the second tube, labelled S2, and mix thoroughly before the next transfer.

Repeat serial dilutions 5 more times thus creating the points of the standard curve (see Figure 5).

Sample Diluent serves as blank.

Figure 5



### 9.5. Controls

Reconstitute by adding 150  $\mu$ l distilled water to lyophilized **controls** (10-30 minutes). Further treat the controls like your samples in the assay. For control range please refer to certificate of analysis or vial label. Store reconstituted controls aliquoted at -20°C. Avoid repeated freeze and thaw cycles.

## 9.6. Addition of Colour-giving Reagents: **Blue-Dye**, **Green-Dye**

In order to help our customers to avoid any mistakes in pipetting the Platinum ELISAs, eBioscience offers a tool that helps to monitor the addition of even very small volumes of a solution to the reaction well by giving distinctive colours to each step of the ELISA procedure.

**This procedure is optional**, does not in any way interfere with the test results, and is designed to help the customer with the performance of the test, but can also be omitted, just following the instruction booklet.

Alternatively, the dye solutions from the stocks provided (**Blue-Dye**, **Green-Dye**) can be added to the reagents according to the following guidelines:

### 1. Diluent:

Before standard dilution add the **Blue-Dye** at a dilution of 1:250 (see table below) to the appropriate diluent (1x) according to the test protocol. After addition of **Blue-Dye**, proceed according to the instruction booklet.

|                      |                        |
|----------------------|------------------------|
| 5 ml Sample Diluent  | 20 µl <b>Blue-Dye</b>  |
| 12 ml Sample Diluent | 48 µl <b>Blue-Dye</b>  |
| 50 ml Sample Diluent | 200 µl <b>Blue-Dye</b> |

### 2. HRP-Conjugate:

Before dilution of the concentrated HRP-Conjugate add the **Green-Dye** at a dilution of 1:100 (see table below) to the Assay Buffer (1x) used for the final conjugate dilution. Proceed after addition of **Green-Dye** according to the instruction booklet: Preparation of HRP-Conjugate.

|                         |                         |
|-------------------------|-------------------------|
| 3 ml Assay Buffer (1x)  | 30 µl <b>Green-Dye</b>  |
| 6 ml Assay Buffer (1x)  | 60 µl <b>Green-Dye</b>  |
| 12 ml Assay Buffer (1x) | 120 µl <b>Green-Dye</b> |



## 10. Test Protocol

- Remove **dilution plate** from the pouch. Determine the number of microwell strips required to test the desired number of samples plus appropriate number of wells needed for running blanks and standards. Each sample, standard, blank and optional control sample should be assayed in duplicate.

- Prepare **standard dilutions on the dilution plate** as follows:  
(Alternatively the standard dilution can be prepared in tubes – see 9.4.1):

Add 100 µl of Sample Diluent in duplicate to all **standard wells**.

Pipette 100 µl of prepared **standard** (see Preparation of Standard 9.4, concentration = 20 ng/ml) in duplicate into well A1 and A2 (see Figure 6). Mix the contents of wells A1 and A2 by repeated aspiration and ejection (concentration of standard 1, S1 = 10 ng/ml), and transfer 100 µl to wells B1 and B2, respectively (see Figure 6). Continue this procedure 5 times, creating two rows of human sCD40L standard dilutions ranging from 10.00 to 0.16 ng/ml. Discard 100 µl of the contents from the last microwells (G1, G2) used.

In case of an **external standard dilution** (see 9.4.1), pipette 100 µl of these standard dilutions (S1 - S7) in the standard wells according to Table 1.

Table 1Figure 6

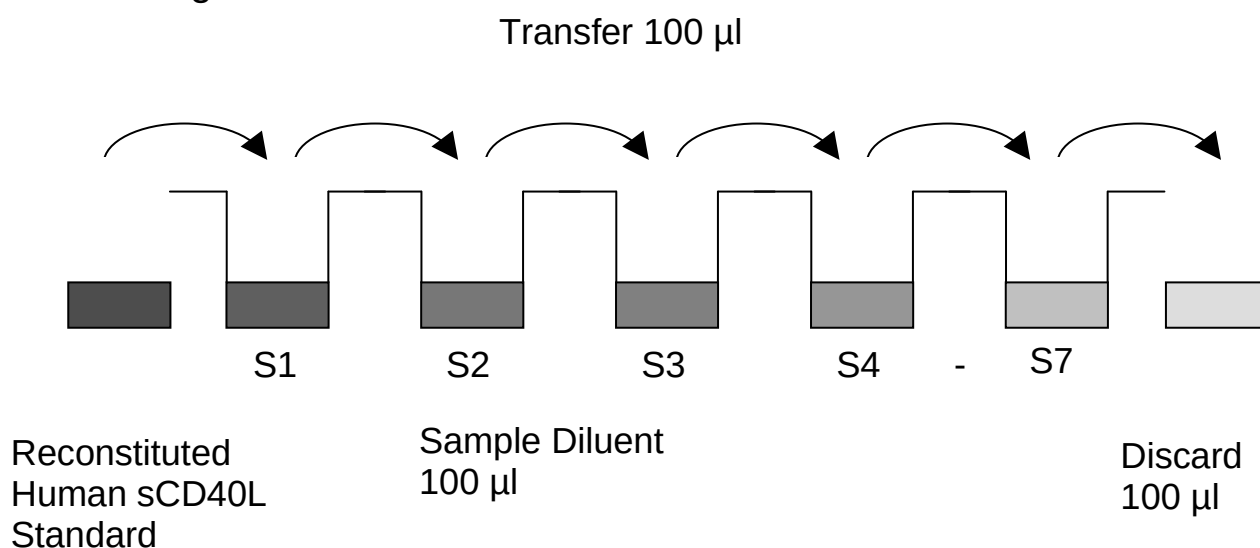


Table 1

Table depicting an example of the arrangement of blanks, standards and samples in the microwell strips of the dilution plate:

|          | <b>1</b>                    | <b>2</b>                    | <b>3</b> | <b>4</b> |
|----------|-----------------------------|-----------------------------|----------|----------|
| <b>A</b> | Standard 1<br>(10.00 ng/ml) | Standard 1<br>(10.00 ng/ml) | Sample 1 | Sample 1 |
| <b>B</b> | Standard 2<br>(5.00 ng/ml)  | Standard 2<br>(5.00 ng/ml)  | Sample 2 | Sample 2 |
| <b>C</b> | Standard 3<br>(2.50 ng/ml)  | Standard 3<br>(2.50 ng/ml)  | Sample 3 | Sample 3 |
| <b>D</b> | Standard 4<br>(1.25 ng/ml)  | Standard 4<br>(1.25 ng/ml)  | Sample 4 | Sample 4 |
| <b>E</b> | Standard 5<br>(0.63 ng/ml)  | Standard 5<br>(0.63 ng/ml)  | Sample 5 | Sample 5 |
| <b>F</b> | Standard 6<br>(0.31 ng/ml)  | Standard 6<br>(0.31 ng/ml)  | Sample 6 | Sample 6 |
| <b>G</b> | Standard 7<br>(0.16 ng/ml)  | Standard 7<br>(0.16 ng/ml)  | Sample 7 | Sample 7 |
| <b>H</b> | Blank                       | Blank                       | Sample 8 | Sample 8 |

- c. Add 100 µl of **Sample Diluent** in duplicate to the **blank wells** of the dilution plate.
- d. Add 80 µl of **Sample Diluent** to the **sample wells** of the dilution plate.
- e. Add 20 µl of each **sample** in duplicate to the **sample wells** of the dilution plate.
- f. Prepare **HRP-Conjugate** (see Preparation of HRP-Conjugate 9.3).
- g. Add 100 µl of **HRP-Conjugate** to all wells of the dilution plate.
- h. Remove **microwell plate coated with monoclonal antibody to human sCD40L** from the aluminium pouch. Remove extra microwell strips from holder and store in foil bag with the desiccant provided at 2°-8°C sealed tightly.
- i. Wash the microwell strips twice with approximately 400 µl **Wash Buffer** per well with thorough aspiration of microwell contents between washes. Allow the Wash Buffer to sit in the wells for about **10 – 15 seconds** before aspiration. Take care not to scratch the surface of the microwells.  
After the last wash step, empty wells and tap microwell strips on absorbent pad or paper towel to remove excess Wash Buffer. Use the microwell strips immediately after washing. Alternatively microwell strips can be placed upside down on a wet absorbent paper for not longer than 15 minutes. **Do not allow wells to dry.**
- j. **Mix** the contents of each well of the dilution plate by aspiration and ejection and **transfer** 150 µl of each reaction mixture from the dilution plate to the microwell strips coated with monoclonal antibody to human sCD40L in the same scheme as prepared on the dilution plate (see Table 1).
- k. Cover with an adhesive film and incubate at room temperature (18 to 25°C) for 2 hours on a microplate shaker set at 400 rpm. If no rotator is available, the microwell plate can alternatively be incubated at 4°C over night.
- l. Remove adhesive film and empty wells. **Wash** microwell strips 3 times according to point i. of the test protocol. Proceed immediately to the next step.

- m. Pipette 100 µl of **TMB Substrate Solution** to all wells.
- n. Incubate the microwell strips at room temperature (18° to 25°C) for about 10 min. Avoid direct exposure to intense light.

**The colour development on the plate should be monitored and the substrate reaction stopped (see next point of this protocol) before positive wells are no longer properly recordable. Determination of the ideal time period for colour development has to be done individually for each assay.**

It is recommended to add the stop solution when the highest standard has developed a dark blue colour. Alternatively the colour development can be monitored by the ELISA reader at 620 nm. The substrate reaction should be stopped as soon as Standard 1 has reached an OD of 0.9 – 0.95.

- o. Stop the enzyme reaction by quickly pipetting 100 µl of **Stop Solution** into each well. It is important that the Stop Solution is spread quickly and uniformly throughout the microwells to completely inactivate the enzyme. Results must be read immediately after the Stop Solution is added or within one hour if the microwell strips are stored at 2 - 8°C in the dark.
- p. Read absorbance of each microwell on a spectro-photometer using 450 nm as the primary wave length (optionally 620 nm as the reference wave length; 610 nm to 650 nm is acceptable). Blank the plate reader according to the manufacturer's instructions by using the blank wells. Determine the absorbance of both the samples and the standards.

**Note: In case of incubation without shaking the obtained O.D. values may be lower than indicated below. Nevertheless the results are still valid.**

## 11. Calculation of Results

- Calculate the average absorbance values for each set of duplicate standards and samples. Duplicates should be within 20 per cent of the mean value.
- Create a standard curve by plotting the mean absorbance for each standard concentration on the ordinate against the human sCD40L concentration on the abscissa. Draw a best fit curve through the points of the graph (a 5-parameter curve fit is recommended).
- To determine the concentration of circulating human sCD40L for each sample, first find the mean absorbance value on the ordinate and extend a horizontal line to the standard curve. At the point of intersection, extend a vertical line to the abscissa and read the corresponding human sCD40L concentration.
- **If instructions in this protocol have been followed samples have been diluted 1:5 (20 µl sample + 80 µl Sample Diluent), the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor (x 5).**
- **Calculation of samples with a concentration exceeding standard 1 will result in incorrect, low human sCD40L levels (Hook Effect). Such samples require further external predilution according to expected human sCD40L values with Sample Diluent in order to precisely quantitate the actual human sCD40L level.**
- It is suggested that each testing facility establishes a control sample of known human sCD40L concentration and runs this additional control with each assay. If the values obtained are not within the expected range of the control, the assay results may be invalid.
- A representative standard curve is shown in Figure 7. This curve cannot be used to derive test results. Each laboratory must prepare a standard curve for each group of microwell strips assayed.

Figure 7

Representative standard curve for human sCD40L ELISA. Human sCD40L was diluted in serial 2-fold steps in Sample Diluent. Do not use this standard curve to derive test results. A standard curve must be run for each group of microwell strips assayed.

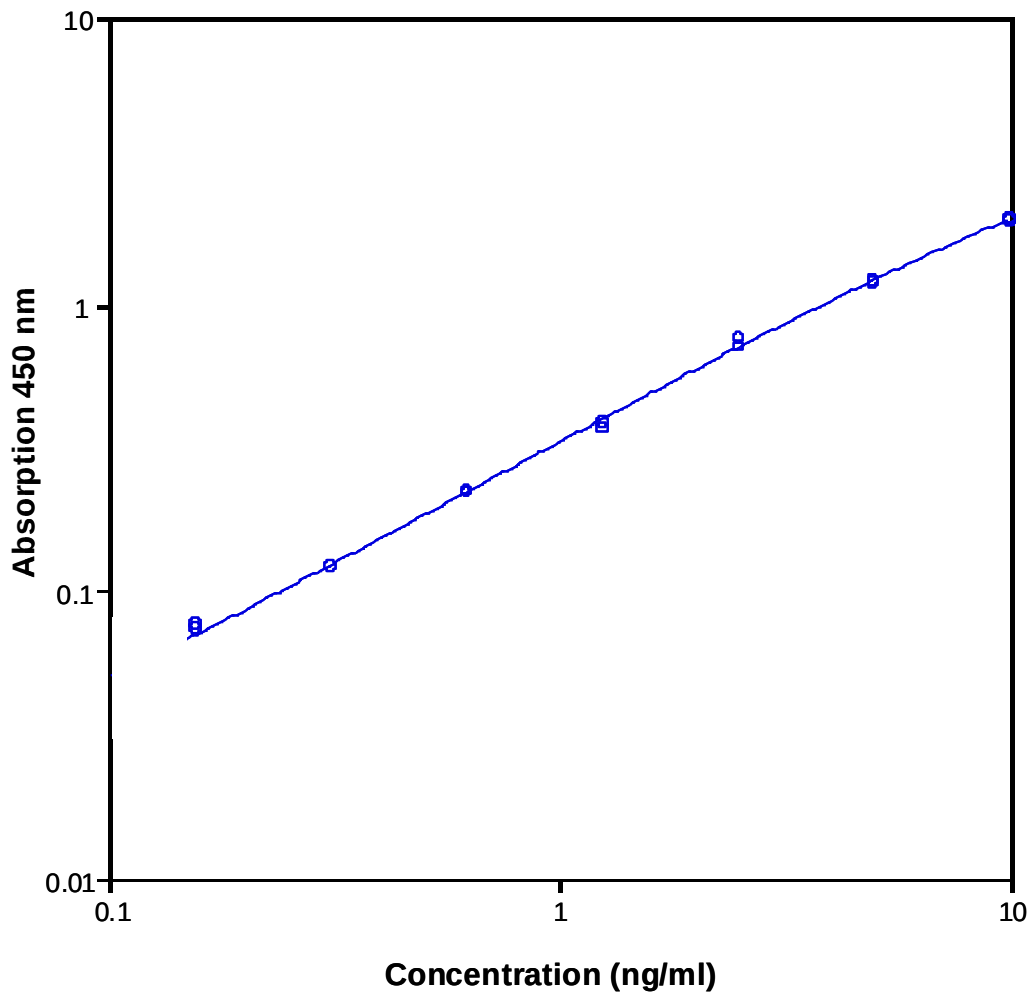


Table 2

Typical data using the human sCD40L ELISA

Measuring wavelength: 450 nm

Reference wavelength: 620 nm

| Standard | Human<br>sCD40L<br>Concentration<br>(ng/ml) | O.D. at<br>450 nm | Mean<br>O.D. at<br>450 nm | C.V.<br>(%) |
|----------|---------------------------------------------|-------------------|---------------------------|-------------|
| 1        | 10.00                                       | 1.997<br>1.960    | 1.979                     | 1.3         |
| 2        | 5.00                                        | 1.194<br>1.210    | 1.202                     | 0.9         |
| 3        | 2.50                                        | 0.713<br>0.755    | 0.734                     | 4.0         |
| 4        | 1.25                                        | 0.385<br>0.369    | 0.377                     | 3.0         |
| 5        | 0.63                                        | 0.225<br>0.222    | 0.224                     | 0.9         |
| 6        | 0.31                                        | 0.122<br>0.122    | 0.122                     | 0.0         |
| 7        | 0.16                                        | 0.076<br>0.074    | 0.075                     | 0.5         |
| Blank    | 0                                           | 0.029<br>0.026    | 0.028                     | 5.4         |

The OD values of the standard curve may vary according to the conditions of assay performance (e.g. operator, pipetting technique, washing technique or temperature effects). Furthermore shelf life of the kit may affect enzymatic activity and thus colour intensity. Values measured are still valid.

## 12. Limitations

- Since exact conditions may vary from assay to assay, a standard curve must be established for every run.
- Bacterial or fungal contamination of either screen samples or reagents or cross-contamination between reagents may cause erroneous results.
- Disposable pipette tips, flasks or glassware are preferred, reusable glassware must be washed and thoroughly rinsed of all detergents before use.
- Improper or insufficient washing at any stage of the procedure will result in either false positive or false negative results. Empty wells completely before dispensing fresh wash solution, fill with Wash Buffer as indicated for each wash cycle and do not allow wells to sit uncovered or dry for extended periods.
- The use of radioimmunotherapy has significantly increased the number of patients with human anti-mouse IgG antibodies (HAMA). HAMA may interfere with assays utilizing murine monoclonal antibodies leading to both false positive and false negative results. Serum samples containing antibodies to murine immunoglobulins can still be analysed in such assays when murine immunoglobulins (serum, ascitic fluid, or monoclonal antibodies of irrelevant specificity) are added to the sample.



## **13. Performance Characteristics**

### **13.1. Sensitivity**

The limit of detection of human sCD40L defined as the analyte concentration resulting in an absorbance significantly higher than that of the dilution medium (mean plus 2 standard deviations) was determined to be 0.06 ng/ml (mean of 6 independent assays).

### **13.2. Reproducibility**

#### **13.2.1. Intra-assay**

Reproducibility within the assay was evaluated in 3 independent experiments. Each assay was carried out with 6 replicates of 8 serum samples containing different concentrations of human sCD40L. 2 standard curves were run on each plate. Data below show the mean human sCD40L concentration and the coefficient of variation for each sample (see Table 3). The calculated overall intra-assay coefficient of variation was 4.0%.

Table 3

The mean human sCD40L concentration and the coefficient of variation for each sample

| Sample | Experiment | Mean Human<br>sCD40L<br>Concentration<br>(ng/ml) | Coefficient of<br>Variation<br>(%) |
|--------|------------|--------------------------------------------------|------------------------------------|
| 1      | 1          | 14.8                                             | 1.6                                |
|        | 2          | 15.8                                             | 3.1                                |
|        | 3          | 15.0                                             | 1.4                                |
| 2      | 1          | 12.6                                             | 0.5                                |
|        | 2          | 13.9                                             | 1.7                                |
|        | 3          | 13.3                                             | 5.8                                |
| 3      | 1          | 10.9                                             | 1.3                                |
|        | 2          | 12.8                                             | 5.9                                |
|        | 3          | 11.8                                             | 3.9                                |
| 4      | 1          | 10.2                                             | 2.2                                |
|        | 2          | 11.9                                             | 0.7                                |
|        | 3          | 11.1                                             | 3.4                                |
| 5      | 1          | 7.3                                              | 0.8                                |
|        | 2          | 8.0                                              | 4.6                                |
|        | 3          | 7.4                                              | 5.1                                |
| 6      | 1          | 6.6                                              | 5.9                                |
|        | 2          | 7.4                                              | 4.6                                |
|        | 3          | 7.0                                              | 8.3                                |
| 7      | 1          | 4.9                                              | 5.9                                |
|        | 2          | 5.5                                              | 3.0                                |
|        | 3          | 4.7                                              | 2.6                                |
| 8      | 1          | 2.9                                              | 13.6                               |
|        | 2          | 3.5                                              | 4.5                                |
|        | 3          | 2.9                                              | 4.8                                |

### 13.2.2. Inter-assay

Assay to assay reproducibility within one laboratory was evaluated in 3 independent experiments. Each assay was carried out with 6 replicates of 8 serum samples containing different concentrations of human sCD40L. 2 standard curves were run on each plate. Data below show the mean human sCD40L concentration and the coefficient of variation calculated on 18 determinations of each sample (see Table 4). The calculated overall inter-assay coefficient of variation was 6.8%.

Table 4

The mean human sCD40L concentration and the coefficient of variation of each sample

| Sample | Mean Human sCD40L<br>Concentration<br>(ng/ml) | Coefficient of<br>Variation<br>(%) |
|--------|-----------------------------------------------|------------------------------------|
| 1      | 15.2                                          | 3.4                                |
| 2      | 13.3                                          | 5.0                                |
| 3      | 11.8                                          | 8.2                                |
| 4      | 11.1                                          | 7.7                                |
| 5      | 7.6                                           | 5.3                                |
| 6      | 7.0                                           | 6.0                                |
| 7      | 5.1                                           | 8.5                                |
| 8      | 3.1                                           | 10.1                               |

### 13.3. Spike Recovery

The spike recovery was evaluated by spiking 4 levels of human sCD40L into serum plasma. Recoveries were determined in 4 independent experiments with 6 replicates each.

The amount of endogenous human sCD40L in unspiked serum was subtracted from the spike values.

The recovery ranged from 78% to 112% with an overall mean recovery of 91%.

### 13.4. Dilution Parallelism

4 serum samples with different levels of human sCD40L were analysed at serial 2 fold dilutions with 4 replicates each.

The recovery ranged from 100% to 113% with an overall recovery of 105% (see Table 5).

Table 5

| Sample | Dilution | Expected Human sCD40L Concentration (ng/ml) | Observed Human sCD40L Concentration (ng/ml) | Recovery of Expected human sCD40L Concentration (%) |
|--------|----------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 1      | 1:5      | --                                          | 14.5                                        | --                                                  |
|        | 1:10     | 7.3                                         | 7.3                                         | 101                                                 |
|        | 1:20     | 3.6                                         | 3.7                                         | 103                                                 |
|        | 1:40     | 1.8                                         | 1.8                                         | 100                                                 |
| 2      | 1:5      | --                                          | 12.5                                        | --                                                  |
|        | 1:10     | 6.3                                         | 6.7                                         | 106                                                 |
|        | 1:20     | 3.1                                         | 3.2                                         | 102                                                 |
|        | 1:40     | 1.6                                         | 1.8                                         | 112                                                 |
| 3      | 1:5      | --                                          | 11.1                                        | --                                                  |
|        | 1:10     | 5.5                                         | 6.0                                         | 108                                                 |
|        | 1:20     | 2.8                                         | 2.9                                         | 106                                                 |
|        | 1:40     | 1.4                                         | 1.4                                         | 103                                                 |
| 4      | 1:5      | --                                          | 10.5                                        | --                                                  |
|        | 1:10     | 5.3                                         | 5.5                                         | 104                                                 |
|        | 1:20     | 2.6                                         | 2.7                                         | 104                                                 |
|        | 1:40     | 1.3                                         | 1.5                                         | 113                                                 |

### **13.5. Sample Stability**

#### **13.5.1. Freeze-Thaw Stability**

Aliquots of serum samples (spiked or unspiked) were stored at -20°C and thawed 5 times, and the human sCD40L levels determined. There was no significant loss of human sCD40L immunoreactivity detected by freezing and thawing.

#### **13.5.2. Storage Stability**

Aliquots of serum samples (spiked or unspiked) were stored at -20°C, 2-8°C, room temperature (RT) and at 37°C, and the human sCD40L level determined after 24 h. There was no significant loss of human sCD40L immunoreactivity detected during storage at -20 °C and 2-8°C. A significant loss of human sCD40L immunoreactivity was detected during storage at RT (57% immunoreactivity) and at 37°C (4% immunoreactivity) after 24 h.

### **13.6. Comparison of Serum and Plasma**

Serum as well as EDTA, citrate, and heparin plasma obtained from 8 individuals at the same time point were evaluated. It clearly turned out that plasma preparations give results that do not correlate with the respective serum data.

### **13.7. Specificity**

The assay detects both natural and recombinant human sCD40L. The cross reactivity and interference of circulating factors of the immune system was evaluated by spiking these proteins at physiologically relevant concentrations into a human sCD40L positive sample. There was no cross reactivity or interference.

### **13.8. Expected Values**

A panel of 40 sera samples from randomly selected apparently healthy donors (males and females) was tested for human sCD40L. The detected human sCD40L levels ranged between 0.03 and 3.98 ng/ml with a mean level of 2.13 ng/ml and a standard deviation of 1.00 ng/ml.

## 14. Ordering Information

### North America

#### Technical Support:

Research Products:  
888.810.6168  
858.642.2058  
tech@eBioscience.com

Clinical Products:  
877.726.8559  
858.642.2058  
tech@eBioscience.com

#### Customer Service:

888.999.1371  
858.642.2058  
info@eBioscience.com

#### Fax:

858.642.2046

### Europe/International\*

#### Technical Support:

+43 1 796 40 40-120  
tech@eBioscience.com

#### Customer Service:

+43 1 796 40 40-304  
info@eBioscience.com

#### Fax:

+43 1 796 40 40-400



Bender MedSystems GmbH  
Campus Vienna Biocenter 2  
1030 Vienna, Austria  
www.eBioscience.com

\* Customers outside North America and Europe may contact their eBioscience distributor listed on our website at [www.eBioscience.com/distributors](http://www.eBioscience.com/distributors).

## 15. Reagent Preparation Summary

### 15.1. Wash Buffer (1x)

Add **Wash Buffer Concentrate** 20x (50 ml) to 950 ml distilled water.

| Number of Strips | Wash Buffer Concentrate (ml) | Distilled Water (ml) |
|------------------|------------------------------|----------------------|
| 1 - 6            | 25                           | 475                  |
| 1 - 12           | 50                           | 950                  |

### 15.2. Assay Buffer (1x)

Add **Assay Buffer Concentrate** 20x (5 ml) to 95 ml distilled water.

| Number of Strips | Assay Buffer Concentrate (ml) | Distilled Water (ml) |
|------------------|-------------------------------|----------------------|
| 1 - 6            | 2.5                           | 47.5                 |
| 1 - 12           | 5.0                           | 95.0                 |

### 15.3. HRP-Conjugate

Make a 1:100 dilution of **HRP-Conjugate** in Assay Buffer (1x):

| Number of Strips | HRP-Conjugate (ml) | Assay Buffer (1x) (ml) |
|------------------|--------------------|------------------------|
| 1 - 6            | 0.06               | 5.94                   |
| 1 - 12           | 0.12               | 11.88                  |

### 15.4. Human sCD40L Standard

Reconstitute lyophilized **human sCD40L standard** with distilled water.  
(Reconstitution volume is stated on the label of the standard vial.)

### 15.5. Controls

Add 150 µl distilled water to lyophilized **controls**.

## 16. Test Protocol Summary

1. Remove dilution plate from pouch.
2. Determine the number of microwell strips required.
3. Prepare a standard dilution on the dilution plate: Add 100 µl Sample Diluent, in duplicate, to all standard wells of the dilution plate. Pipette 100 µl prepared standard into the first wells and create standard dilutions by transferring 100 µl from well to well. Discard 100 µl from the last wells.  
Alternatively external standard dilution in tubes (see 9.4.1): Pipette 100 µl of these standard dilutions in the standard wells of the dilution plate.
4. Add 100 µl Sample Diluent, in duplicate, to the blank wells of the dilution plate.
5. Add 80 µl Sample Diluent to sample wells of the dilution plate.
6. Add 20 µl sample in duplicate, to designated sample wells of the dilution plate.
7. Prepare HRP-Conjugate.
8. Add 100 µl HRP-Conjugate to all wells of the dilution plate.
9. Remove coated microwell strips from aluminium pouch.
10. Wash coated microwell strips twice with Wash Buffer.
11. Transfer 150 µl of reaction mix from dilution plate to coated microwell strips.
12. Cover microwell strips and incubate 2 hours at room temperature (18° to 25°C) on a rotator set at 400 rpm.
13. Empty and wash microwell strips 3 times with Wash Buffer.
14. Add 100 µl of TMB Substrate Solution to all wells.
15. Incubate the microwell strips for about 10 minutes at room temperature (18°to 25°C).
16. Add 100 µl Stop Solution to all wells.
17. Blank microwell reader and measure colour intensity at 450 nm.

**Note: If instructions in this protocol have been followed samples have been diluted 1:5 (20 µl sample + 80 µl Sample Diluent), the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor (x 5).**



# PRODUKTINFORMATION UND HANDBUCH (Deutsch)

## 1. Mitgelieferte Reagenzien

### 1.1. Mitgelieferte Reagenzien für human sCD40L ELISA BMS239CE (96 Tests)

- 1 Aluminiumbeutel mit **Mikrotiterplatte, beschichtet** mit Antikörper (monoklonal) gegen human sCD40L
- 1 Fläschchen (200 µl) **HRP-Konjugat**, monoklonaler anti-human sCD40L Antikörper
- 2 Fläschchen human sCD40L-**Standard**, lyophilisiert, 20 ng/ml nach Rekonstitution
- 1 Fläschchen lyophilisierte **Kontrolle, hoch konzentriert**
- 1 Fläschchen lyophilisierte **Kontrolle, niedrig konzentriert**
- 1 Fläschchen (12 ml) **Verdünnungslösung**
- 1 Fläschchen (5 ml) **Probenpufferkonzentrat 20x** (PBS mit 1% Tween 20 und 10% BSA)
- 1 Flasche (50 ml) **Waschpufferkonzentrat 20x** (PBS mit 1% Tween 20)
- 1 Fläschchen (15 ml) **Substratlösung** (Tetramethylbenzidin)
- 1 Fläschchen (15 ml) **Stopplösung** (1 M Phosphorsäure)
- 1 Fläschchen (0.4 ml) **Farbstoff, blau**
- 1 Fläschchen (0.4 ml) **Farbstoff, grün**
- 2 **Klebefolien**
- 2 **Verdünnungsplatten**

## **1.2. Mitgelieferte Reagenzien für human sCD40L ELISA BMS239TENCE (10x96 Tests)**

- 10 Aluminiumbeutel mit **Mikrotiterplatte, beschichtet** mit Antikörper (monoklonal) gegen human sCD40L
- 10 Fläschchen (200 µl) **HRP-Konjugat**, monoklonaler anti-human sCD40L Antikörper
- 10 Fläschchen human sCD40L-**Standard**, lyophilisiert, 20 ng/ml nach Rekonstitution
- 10 Fläschchen lyophilisierte **Kontrolle, hoch konzentriert**
- 10 Fläschchen lyophilisierte **Kontrolle, niedrig konzentriert**
- 10 Fläschchen (12 ml) **Verdünnungslösung**
- 2 Fläschchen (5 ml) **Probenpufferkonzentrat 20x** (PBS mit 1% Tween 20 und 10% BSA)
- 3 Flaschen (50 ml) **Waschpufferkonzentrat 20x** (PBS mit 1% Tween 20)
- 10 Fläschchen (15 ml) **Substratlösung** (Tetramethylbenzidin)
- 10 Fläschchen (15 ml) **Stopplösung** (1 M Phosphorsäure)
- 6 Fläschchen (0.4 ml) **Farbstoff, blau**
- 6 Fläschchen (0.4 ml) **Farbstoff, grün**
- 10 **Klebefolien**
- 10 **Verdünnungsplatten**

**Beachten Sie:** *In einigen seltenen Fällen kann sich ein unlöslicher Niederschlag in den Fläschchen bilden. Dieser Niederschlag hat keinen Einfluß auf die Durchführung oder Ergebnisse des Tests.*

## **2. Lagerhinweise**

Lagern Sie den Inhalt des Kits mit Ausnahme der Kontrollen bei 2°-8°C. Lagerung der lyophilisierten Kontrollen bei –20°C. Verbliebene Reagenzien nach Verwendung sofort wieder auf 2°-8°C, bzw. auf -20°C kühlen. Das Ablaufdatum des Kits und der Reagenzien ist auf den Etiketten angegeben.

Die Haltbarkeit des Kits und der Komponenten kann nur bei fachgerechter Lagerung garantiert werden, sowie bei mehrfacher Verwendung nur dann, wenn die Reagenzien bei der ersten Verwendung nicht kontaminiert wurden.

### **3. Sicherheitsvorkehrungen für den Gebrauch**

- Alle enthaltenen Reagenzien sollten als potenziell gefährlich betrachtet werden. Daher wird empfohlen, dass dieses Produkt nur von Personen mit labortechnischer Erfahrung und in Übereinstimmung mit GLP Richtlinien verwendet wird. Passende Schutzbekleidung, wie Labormäntel, Sicherheitsbrillen und Laborhandschuhe müssen getragen werden. Vermeiden Sie jeden Kontakt der Reagenzien mit Haut oder Augen. Im Falle des Kontaktes von Reagenzien mit Haut oder Augen, sofort mit Wasser spülen. Bitte entnehmen Sie weitere spezifische Hinweise den Sicherheitsdatenblättern und/oder den Sicherheitsbestimmungen.
- Die Reagenzien sind ausschließlich für Diagnosezwecke bestimmt und nicht für den Einsatz bei Therapien.
- Reagenzien aus verschiedenen Chargen oder anderer Herkunft nicht mischen oder untereinander austauschen.
- Verwenden Sie die Kitreagenzien nicht nach dem Ablaufdatum (siehe Etikett).
- Setzen Sie die Kitreagenzien während der Lagerung oder Inkubation keiner starken Lichteinstrahlung aus.
- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- In Bereichen, in denen mit Kitreagenzien oder Proben hantiert wird, nicht essen, trinken oder rauchen.
- Vermeiden Sie den Kontakt der Haut/Schleimhäute mit Kitreagenzien/Proben.
- Tragen Sie während des Hantierens mit Kitreagenzien oder Proben geeignete Gummi- oder Einweghandschuhe.
- Vermeiden Sie den Kontakt zwischen Substratlösung und Oxidationsmitteln/Metallen.
- Vermeiden Sie Verspritzen von Flüssigkeit oder Bildung von Aerosolen.
- Zur Vermeidung von Kontamination mit Mikroben oder Kreuzkontamination der Reagenzien oder Proben, die den Test

ungültig machen könnten, verwenden Sie Einwegpipettenspitzen und/oder Einwegpipetten.

- Verwenden Sie saubere, geeignete Reagenzgefäße für das Dispensieren von Konjugat und Substratreagenzien.
- Vermeiden Sie Kontakt mit Säuren, da dadurch Konjugate inaktiviert werden.
- Für die Reagensherstellung muss destilliertes oder entionisiertes Wasser verwendet werden.
- Die Substratlösung muss vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden.
- Dekontaminieren und entsorgen Sie Proben sowie alle möglicherweise kontaminierten Materialien so, als ob sie Infektionserreger enthalten könnten. Die bevorzugte Dekontaminationsmethode ist Autoklavieren für mind. eine Stunde bei 121.5°C.
- Flüssige Abfälle, die kein Säure enthalten, sowie neutralisierte Abfälle werden zur Dekontamination mit Natrium Hypochlorit versetzt (Endkonzentration von Natrium Hypochlorit 1.0%). Nach 30 min ist eine effektive Dekontamination erreicht. Flüssige Abfälle, die Säure enthalten, müssen vor der Dekontamination neutralisiert werden.

## 4. Vorbereitung der Reagenzien

Bringen Sie die **Pufferkonzentrate** auf Raumtemperatur und stellen Sie die Verdünnungen vor Beginn des Tests her. Sollten sich in den **Pufferkonzentraten** Kristalle gebildet haben, erwärmen Sie diese dieses vorsichtig bis zur vollständigen Auflösung der Kristalle.

### 4.1. Waschpuffer (1x)

Leeren Sie den gesamten Inhalt (50 ml) des **Waschpufferkonzentrats** (20x) in einen sauberen 1000-ml-Messzylinder. Füllen Sie mit destilliertem oder entionisiertem Wasser auf, bis ein Endvolumen von 1000 ml erreicht ist. Mischen Sie vorsichtig um Schäumen zu vermeiden.

Füllen Sie in eine saubere Waschflasche um und lagern Sie den Waschpuffer (1x) bei 2° bis 25°C lagern. Bitte beachten Sie, dass dieser 30 Tage haltbar ist.

Der benötigte Waschpuffer (1x) kann auch entsprechend der untenstehenden Tabelle hergestellt werden:

| Anzahl der Streifen | Waschpufferkonzentrat (20x)<br>(ml) | Destilliertes Wasser<br>(ml) |
|---------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| 1 - 6               | 25                                  | 475                          |
| 1 - 12              | 50                                  | 950                          |

### 4.2. Probenpuffer (1x)

Leeren Sie den gesamten Inhalt (5 ml) des **Probenpufferkonzentrates** (20x) in einen sauberen 100-ml-Messzylinder. Füllen Sie mit destilliertem oder entionisiertem Wasser auf, bis ein Endvolumen von 100 ml erreicht ist. Mischen Sie vorsichtig um Schäumen zu vermeiden.

Probenpuffer (1x) bei 2° bis 8°C lagern. Bitte beachten Sie, dass der Probenpuffer (1x) 30 Tage haltbar ist.

Der benötigte Probenpuffer (1x) kann auch entsprechend der untenstehenden Tabelle hergestellt werden:

| Anzahl der Streifen | Probenpufferkonzentrat (20x) (ml) | Destilliertes Wasser (ml) |
|---------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| 1 - 6               | 2.5                               | 47.5                      |
| 1 - 12              | 5.0                               | 95.0                      |

### 4.3. HRP-Konjugat

**Bitte beachten Sie, dass die HRP-Konjugatlösung nach der Verdünnung nur 30 Minuten haltbar ist.**

Stellen Sie eine 1:100 Verdünnung der konzentrierten **HRP-Konjugatlösung** in Probenpuffer (1x) in einem sauberen Gefäß entsprechend der untenstehenden Tabelle her.

| Anzahl der Streifen | HRP-Konjugat (ml) | Probenpuffer (1x) (ml) |
|---------------------|-------------------|------------------------|
| 1 - 6               | 0.06              | 5.94                   |
| 1 - 12              | 0.12              | 11.88                  |

### 4.4. Human sCD40L-Standard

Rekonstituieren Sie den **human sCD40L standard** durch Zugabe von destilliertem Wasser. Das Rekonstitutionsvolumen ist auf dem Standardfläschchen angegeben. Rühren oder mischen Sie vorsichtig um eine vollständige und homogene Auflösung zu erzielen (Konzentration des rekonstituierten Standards = 20 ng/ml). Den rekonstituierten Standard nach 10-30 min verdünnen und davor gut mischen.

Der Standard muß sofort nach Rekonstitution verwendet und kann nicht gelagert werden.

Die **Standardverdünnungen** können direkt auf der Verdünnungsplatte (siehe 5.b) oder in Reaktionsgefäßen (siehe 4.4.1) hergestellt werden.

#### 4.4.1. Externe Standardverdünnung

Beschriften Sie 7 Gefäße, jedes für einen Standardpunkt.:  
S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7

Danach stellen Sie eine 1:2 Verdünnungsreihe für die Standardkurve her:

Pipettieren Sie in jedes Gefäß 225 µl der Verdünnungslösung.

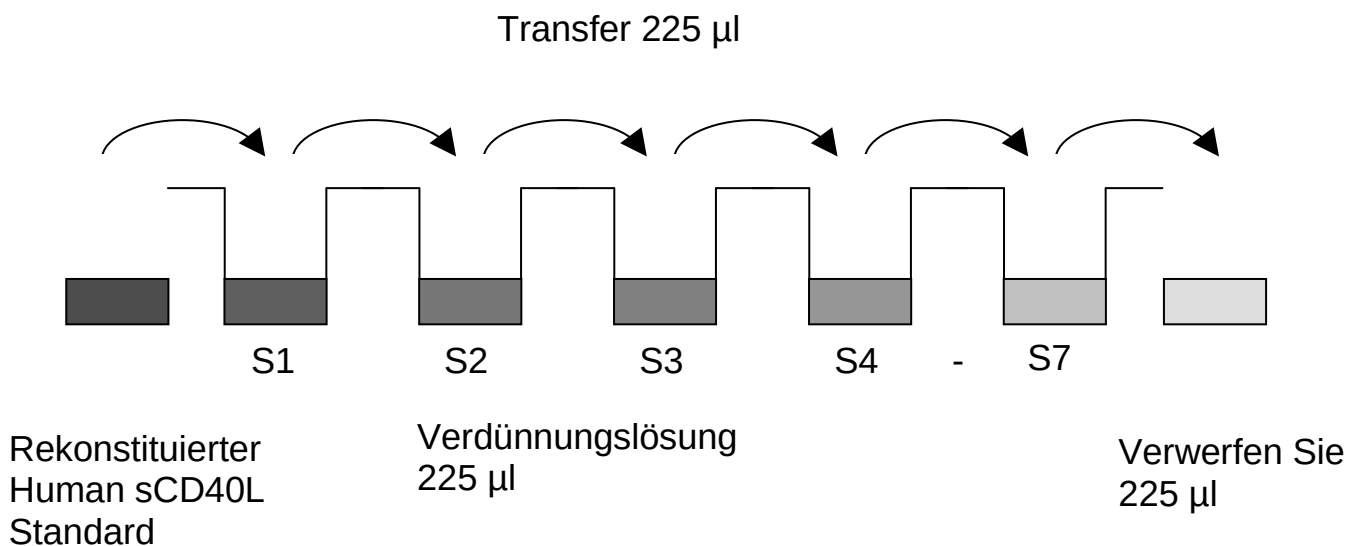
Pipettieren Sie 225 µl des rekonstituierten Standards (Konzentration des Standards = 20 ng/ml) in das erste Gefäß mit der Beschriftung S1 und mischen Sie (Konzentration des Standard 1 = 10 ng/ml).

Pipettieren Sie 225 µl dieser Verdünnung in das zweite Gefäß (mit der Beschriftung S2) und mischen Sie sorgfältig vor dem nächsten Verdünnungsschritt.

Wiederholen Sie diese Verdünnungsschritte 5x. Die so hergestellte Verdünnungsreihe dient zur Erstellung der Standardkurve (siehe Abbildung 1).

Verdünnungslösung dient als Blindwert.

Abbildung 1





#### 4.5. Kontrollen

Lösen Sie die **Kontrollen** durch Zugabe von 150 µl destilliertem Wasser auf. Für die Kontrollen 10-30 min Rekonstitutionszeit einhalten. Mixen oder schütteln Sie die Fläschchen vorsichtig um eine vollständige Lösung zu erreichen. Verfahren Sie in der Folge mit den Kontrollen analog zu den Proben. Der Konzentrationsbereich der Kontrollen ist am Analysenzertifikat oder am Flaschenetikett angegeben. Lagern sie die rekonstituierten Kontrollen aliquotiert bei -20°C. Vermeiden Sie wiederholtes Frieren und Tauen.

#### 4.6. Zugabe von Farbstoffen (blau, grün)

Um dem Kunden zu helfen, Pipettierfehler bei der Arbeit mit Platinum ELISAs zu vermeiden, bieten wir die Möglichkeit, jede Volumenzugabe in eine Probenvertiefung durch eine Farbänderung zu verfolgen. Dazu wird jedem Pipettierschritt im Ablauf eines ELISAs ein Farbstoff zugegeben.

**Die Zugabe von Farbstoffen ist eine Option**, beeinflusst die Ergebnisse auf keine Weise, wurde entworfen, um Kunden bei der Durchführung des Tests zu unterstützen und kann auch weggelassen werden, indem man dem nächsten Schritt des Protokolls folgt.

Im Zuge der Farbstoffzugabe als Pipettierhilfe werden die konzentrierten Farbstoffe (**blau, grün**) den Reagenzien entsprechend den folgenden Angaben beigemischt:

##### 1. Verdünnung

Vor der Verdünnung des Standards geben Sie den **blauen Farbstoff** in einer 1:250 Verdünnung zum entsprechenden Reagenz zu (siehe Tabelle unten). Nach der Zugabe des **blauen Farbstoffes** fahren Sie entsprechend der Anleitung fort.

|                            |                                |
|----------------------------|--------------------------------|
| 5 ml<br>Verdünnungslösung  | 20 µl <b>blauer Farbstoff</b>  |
| 12 ml<br>Verdünnungslösung | 48 µl <b>blauer Farbstoff</b>  |
| 50 ml<br>Verdünnungslösung | 200 µl <b>blauer Farbstoff</b> |

## 2. HRP-Konjugat

Mischen sie den **grünen Farbstoff** vor der Verdünnung des konzentrierten HRP-Konjugats in einer Verdünnung von 1:100 (siehe Tabelle unten) zu Probenpuffer (1x).

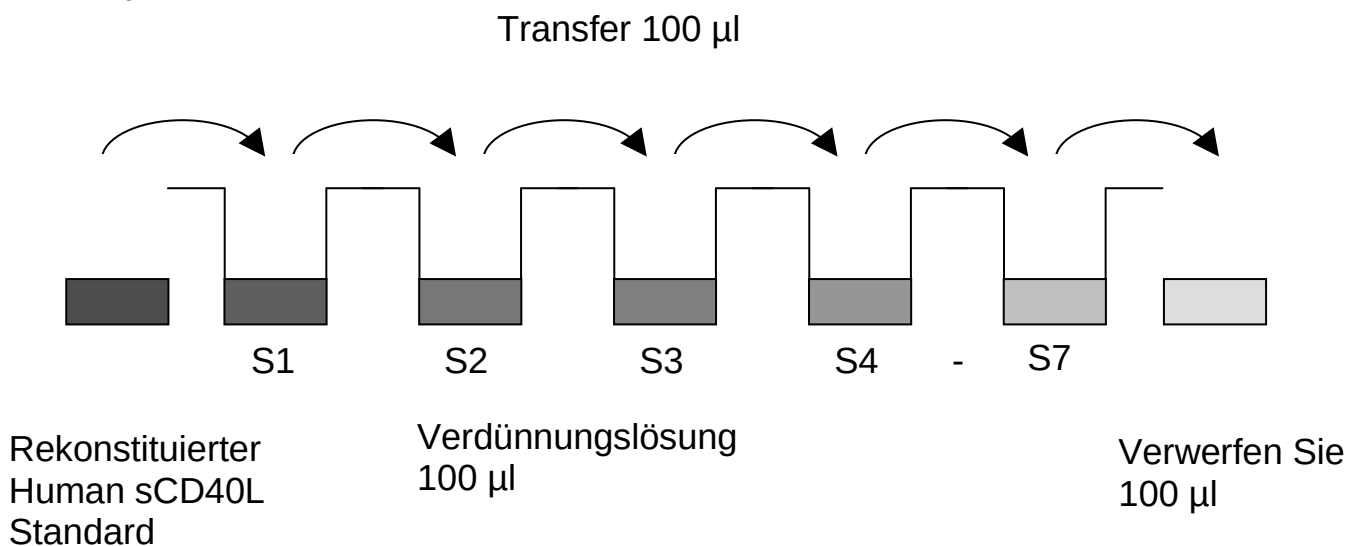
Nach der Zugabe des **grünen Farbstoffes** fahren Sie entsprechend der Anleitung fort: Präparation des HRP-Konjugats.

|                            |                                |
|----------------------------|--------------------------------|
| 3 ml Probenpuffer<br>(1x)  | 30 µl <b>grüner Farbstoff</b>  |
| 6 ml Probenpuffer<br>(1x)  | 60 µl <b>grüner Farbstoff</b>  |
| 12 ml Probenpuffer<br>(1x) | 120 µl <b>grüner Farbstoff</b> |

## 5. Testprotokoll

- a. Entnehmen Sie die **Verdünnungsplatte** dem Kunststoffbeutel. Bestimmen Sie die Anzahl der Mikrowellstreifen die für das Testen der gewünschten Anzahl von Proben benötigt werden, sowie die Mikrowellstreifen für Blindwert und Standards. Probe, Standard, Blindwert und optionale Kontrollproben immer jeweils doppelt testen.
- b. **Standardverdünnung auf der Verdünnungsplatte** (Wahlweise können die Standardverdünnungen auch in Reaktionsgefäßen hergestellt werden – siehe 4.4.1)  
 Pipettieren Sie 100 µl Verdünnungslösung in alle **Standardvertiefungen**. Pipettieren Sie 100 µl des rekonstituierten **Standards** (siehe Herstellung des Standards 4.4.1, Konzentration des Standards = 20.00 ng/ml) in die Vertiefungen A1 und A2 (Doppelbestimmung, siehe Tabelle 1). Mischen Sie den Inhalt der Vertiefungen A1 und A2 durch wiederholtes Aufsaugen und Zugeben gut durch (Konzentration des Standards S1 = 10.00 ng/ml) und transferieren Sie 100 µl in die Probenvertiefungen B1 und B2 (siehe Abbildung 2). Achten Sie darauf, die Oberfläche der Vertiefungen nicht zu zerkratzen. Wiederholen Sie diese Verdünnungsschritte 5x, wodurch zwei human sCD40L Verdünnungsreihen mit den Konzentrationen von 10.00 bis 0.16 ng/ml hergestellt werden. Verwerfen Sie 100 µl aus den letzten Standardvertiefungen (G1/2). Die so hergestellten Verdünnungsreihen dienen zur Erstellung der Standardkurve.

Abbildung 2



Falls sie eine **externe Standardverdünnungsreihe** erstellen (siehe 4.4.1), pipettieren Sie 100 µl der Standardverdünnungen (S1 – S7) in die Standardvertiefungen (entsprechend Tabelle 1).

Tabelle 1

Diagramm mit Beispiel für die Anordnung von Blindwert, Standards und Proben in den Mikrowellstreifen:

|          | <b>1</b>                    | <b>2</b>                    | <b>3</b> | <b>4</b> |
|----------|-----------------------------|-----------------------------|----------|----------|
| <b>A</b> | Standard 1<br>(10.00 ng/ml) | Standard 1<br>(10.00 ng/ml) | Probe 1  | Probe 1  |
| <b>B</b> | Standard 2<br>(5.00 ng/ml)  | Standard 2<br>(5.00 ng/ml)  | Probe 2  | Probe 2  |
| <b>C</b> | Standard 3<br>(2.50 ng/ml)  | Standard 3<br>(2.50 ng/ml)  | Probe 3  | Probe 3  |
| <b>D</b> | Standard 4<br>(1.25 ng/ml)  | Standard 4<br>(1.25 ng/ml)  | Probe 4  | Probe 4  |
| <b>E</b> | Standard 5<br>(0.63 ng/ml)  | Standard 5<br>(0.63 ng/ml)  | Probe 5  | Probe 5  |
| <b>F</b> | Standard 6<br>(0.31 ng/ml)  | Standard 6<br>(0.31 ng/ml)  | Probe 6  | Probe 6  |
| <b>G</b> | Standard 7<br>(0.16 ng/ml)  | Standard 7<br>(0.16 ng/ml)  | Probe 7  | Probe 7  |
| <b>H</b> | Blindwert                   | Blindwert                   | Probe 8  | Probe 8  |

- c. Pipettieren Sie in alle **Blindwertvertiefungen** der Verdünnungsplatte (Doppelbestimmung), 100 µl **Verdünnungslösung**.
- d. Pipettieren Sie in alle **Probenvertiefungen** der Verdünnungsplatte 80 µl **Verdünnungslösung**.
- e. Pipettieren Sie je 20 µl von jeder **Probe** (Doppelbestimmung) in die **Probenvertiefungen** und mischen Sie den Inhalt durch.
- f. Stellen Sie das **HRP-Konjugat** (siehe: Vorbereitung der Reagenzien HRP-Konjugat 4.3) her.
- g. Pipettieren Sie in alle Vertiefungen, einschließlich der Blindwertvertiefungen 100 µl **HRP-Konjugat**.
- h. Entnehmen Sie die **Mikrotiterplatte** dem Aluminiumbeutel. Entfernen Sie die zusätzlichen Mikrowellstreifen von der Halterung und bewahren Sie diese mit dem mitgelieferten Trockenmittel in dem Folienbeutel fest verschlossen bei 2°-8°C auf.
- i. Waschen Sie die Mikrowellstreifen 2 mal mit ca. 400 µl **Waschpuffer** pro Vertiefung; zwischen den Waschgängen den Inhalt der Vertiefungen gründlich absaugen. Vor dem Absaugen Waschpuffer **10-15 Sekunden** einwirken lassen. Achten Sie darauf, die Oberfläche der Vertiefungen nicht zu zerkratzen.  
Leeren Sie die Vertiefungen nach dem letzten Waschschrift und klopfen Sie die Mikrowellstreifen auf einem Saug- oder Papiertuch aus um überschüssigen Waschpuffer zu entfernen. Verwenden Sie die Mikrowellstreifen sofort nach dem Waschen, oder legen Sie diese für maximal 15 min umgedreht auf ein nasses Saugtuch. **Lassen Sie die Vertiefungen nicht austrocknen.**
- j. **Mischen** Sie die Reaktionsgemische in den Vertiefungen der Verdünnungsplatte durch wiederholtes Aufsaugen und Zugeben und **transferieren** Sie 150 µl der Reaktionsgemische aus den Vertiefungen der Verdünnungsplatte in die Vertiefungen der beschichteten Mikrotiterplatte. Behalten sie das Schema bei (entsprechend Tabelle 1).
- k. Mit einer Klebefolie abdecken und bei Raumtemperatur (18° bis 25°C) auf einem Schüttler bei 100 U/min für 2 Stunden inkubieren. Inkubationszeit ohne Schüttler: 4°C, über Nacht;

- l. Entfernen Sie die Klebefolie und entleeren Sie die Vertiefungen. **Waschen** Sie die Mikrowellstreifen 3 mal wie in Punkt i des Testprotokolls beschrieben. Verwenden Sie die Mikrowellstreifen sofort nach dem Waschen.
- m. Pipettieren Sie in alle Vertiefungen, einschließlich der Blindwertvertiefungen, 100 µl **TMB-Substratlösung**.
- n. Inkubieren Sie die Mikrowellstreifen bei Raumtemperatur (18° bis 25°C) für ca. 10 Minuten. Vermeiden Sie direkte, starke Lichteinstrahlung.

**Die Farbentwicklung innerhalb der einzelnen Vertiefungen muss beobachtet und die Substratreaktion gestoppt werden (siehe nächster Protokollpunkt), bevor die gefärbten Vertiefungen nicht mehr richtig gemessen werden können.**  
**Die optimale Inkubationszeit für die Farbentwicklung muß bei jedem Versuch neu bestimmt werden.**

Es wird empfohlen, die Stopplösung zuzugeben, wenn der höchste Standardpunkt eine dunkelblaue Farbe angenommen hat. Alternativ kann die Farbentwicklung auch mit einem Photometer bei 620 nm verfolgt werden. Die Substratreaktion sollte gestoppt werden, wenn der höchste Standardpunkt eine OD von 0.9 -0.95 erreicht.

- o. Stoppen Sie die Enzymreaktion durch rasche Zugabe von 100 µl **Stopplösung** in jede Vertiefung, einschließlich der Blindwertvertiefungen. Für eine vollständige Inaktivierung der Enzyme ist es wichtig, die Stopplösung rasch und gleichmäßig in den Vertiefungen zu verteilen. Die OD Werte müssen sofort nach Zugabe der Stopplösung oder innerhalb einer Stunde nach Lagerung der Mikrowellstreifen in Dunkelheit bei 2-8°C gemessen werden.
- p. Messen Sie die Absorption jeder Vertiefung mit einem Spektrophotometer. Verwenden Sie dabei 450 nm als primäre Wellenlänge (optional 620 nm als Referenzwellenlänge; 610 nm bis 650 nm sind möglich). Stellen Sie das Plattenmessgerät nach Anleitung des Herstellers und unter Verwendung der Blindwertvertiefungen auf den Leerwert ein. Bestimmen Sie die Absorption der Proben wie auch des human sCD40L-Standards.

**Die Proben wurden im Zuge der Testdurchführung 1:5 verdünnt. Daher muß der aus der Standardkurve berechnete Wert mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden (x 5).**

**Anmerkung: Falls die Platte während der Inkubation nicht geschüttelt wurde, können die erreichten OD Werte niedriger als die unten angeführten sein. Die Ergebnisse sind trotzdem gültig.**

# INFORMACIÓN Y MANUAL DEL PRODUCTO (Español)

## 1. Reactivos Suministrados

### 1.1. Reactivos Suministrados para human sCD40L ELISA BMS239CE (96 tests)

- 1 bolsa de aluminio con **una placa de micropocillos recubiertos** con anticuerpos monoclonales anti-human sCD40L
- 1 vial (200 µl) con **conjugado de HRP** (anticuerpos monoclonales anti-human sCD40L)
- 2 viales con **Estándar** human sCD40L liofilizado, 20 ng/ml tras la reconstitución
  - 1 vial del **control alto**, liofilizado
  - 1 vial del **control bajo**, liofilizado
- 1 vial (12 ml) de **diluyente de muestra**
- 1 vial (5 ml) de **concentrado de tampón de ensayo** 20x (PBS con Tween 20 al 1% y BSA al 10%)
- 1 frasco (50 ml) de **concentrado de tampón de lavado** 20x (PBS con Tween 20 al 1%)
- 1 vial (15 ml) de **solución de sustrato** (tetrametil-bencidina)
- 1 vial (15 ml) de **solución de parada** (ácido fosfórico 1M)
- 1 vial (0.4 ml) **colorante azul**
- 1 vial (0.4 ml) **colorante verde**
- 2 **tapas para placas**, adhesives
- 2 **placas de dilución**



## **1.2. Reactivos Suministrados para human sCD40L ELISA BMS239TENCE (10x96 tests)**

- 10 bolsas de aluminio con **una placa de micropocillos recubiertos** con anticuerpos monoclonales anti-human sCD40L
- 10 viales (200 µl) con **conjugado de HRP** (anticuerpos monoclonales anti-human sCD40L)
- 10 viales con **Estándar** human sCD40L liofilizado, 20 ng/ml tras la reconstitución
- 10 viales del **control alto**, liofilizado
- 10 viales del **control bajo**, liofilizado
- 10 viales (12 ml) de **diluyente de muestra**
- 2 viales (5 ml) de **concentrado de tampón de ensayo 20x** (PBS con Tween 20 al 1% y BSA al 10%)
- 3 frascos (50 ml) de **concentrado de tampón de lavado 20x** (PBS con Tween 20 al 1%)
- 10 viales (15 ml) de **solución de sustrato** (tetrametil-bencidina)
- 10 viales (15 ml) de **solución de parada** (ácido fosfórico 1M)
- 6 viales (0.4 ml) **colorante azul**
- 6 viales (0.4 ml) **colorante verde**
- 10 **tapas para placas**, adhesives
- 10 **placas de dilución**

**Nota:** *En algunos (muy raros) casos un precipitado insoluble de proteína estabilizante ha sido observado en los viales. Este precipitado no interfiere de ninguna manera con el desarrollo del test y puede ser, por tanto, ignorado.*

## **2. Instrucciones de Conservación**

Conservar los reactivos del kit a una temperatura comprendida entre 2 y 8°C excepto los controles. Conservar los controles liofilizados a –20° C. Inmediatamente después de utilizarlos deberá volver a conservar los reactivos a dicha temperature (2° to 8°C), controles a -20°C. En las etiquetas figuran las fechas de caducidad del kit y de los reactivos. Sólo se podrá garantizar la fecha de caducidad de los componentes del kit si se conservan adecuadamente y, en caso de uso reiterado de un mismo componente, si el reactivo no queda contaminado en la primera manipulación.

### 3. Precauciones de uso

- Todos los productos químicos deben considerarse potencialmente peligrosos. Por tanto, recomendamos que este producto sea manipulado únicamente por aquellas personas que hayan sido entrenadas en técnicas de laboratorio y que sea usado de acuerdo con los principios de buenas prácticas de laboratorio. Se debe llevar ropa de protección apropiada como puedan ser las batas de laboratorio, gafas de seguridad y guantes. Se debe trabajar con cuidado para evitar cualquier contacto con piel y ojos. En el caso de que tenga lugar un contacto con piel u ojos, proceder de forma inmediata a lavar la parte afectada con abundante agua. Véase la(s) hoja(s) de seguridad y/o declaraciones de seguridad para recomendaciones específicas.
- Los reactivos están destinados para un uso en diagnóstico in vitro y no se deben usar en procedimientos terapéuticos.
- No mezclar o sustituir los reactivos por los equivalentes de otros lotes u otras fuentes.
- No usar reactivos caducados.
- No exponer los reactivos del kit a una luz intensa durante su almacenamiento o incubación.
- No pipetear con la boca.
- No se recomienda comer o fumar en las zonas donde se manipulen muestras o reactivos.
- Evitar el contacto de los reactivos del kit o de las muestras con piel o mucosas.
- Se recomienda el uso de guantes desechables de goma o látex durante la manipulación de las muestras y reactivos.
- Evitar el contacto de la solución de sustrato con agentes oxidantes y metales.
- Evitar salpicaduras y la generación de aerosoles.
-

- Con el propósito de evitar una contaminación microbiológica o contaminaciones cruzadas de reactivos y muestras que puedan invalidar el test se recomienda el uso de pipetas y/o puntas de pipetas de un solo uso.
- Usar recipientes limpios y específicos de reactivos para la dispensación de reactivos de sustrato.
- La exposición a los ácidos inactiva el conjugado.
- Se debe usar agua destilada o desionizada en la preparación de los reactivos.
- La solución de sustrato debe de estar a temperatura ambiente antes de su uso.
- Descontaminar y disponer las muestras y todos los materiales potencialmente contaminados como si pudieran contener agentes infecciosos. El método preferente de descontaminación es un autoclavado durante un mínimo de 1 hora a 121.5°C.
- Los residuos líquidos que no contengan ácido y los residuos neutralizados pueden ser mezclados con hipoclorito sódico en volúmenes tales que la mezcla final contenga 1.0% de hipoclorito sódico. Dejar actuar durante 30 minutos para una efectiva descontaminación. Los residuos líquidos que contengan ácido deben ser neutralizados previamente a la adición de hipoclorito sódico.

## 4. Preparación de los Reactivos

Los **tampónes concentrados** debe de alcanzar la temperatura ambiente y ser diluidos antes de iniciar el procedimiento del test. Si en el concentrado de **tampónes concentrados** se han formado cristales, caliente suavemente hasta su completa disolución.

### 4.1. Tampón de Lavado (1x)

Vierta todo el contenido (50 ml) del **concentrado de tampón de lavado** (20x) en un matraz aforado de 1000 ml limpio. Enrase en matraz con agua destilada o desionizada. Mezcle suavemente para evitar la formación de espuma.

Transfiera la solución a un frasco de lavado limpio y consérvela a una temperatura entre 2°C y 25°C. El tampón de lavado permanece estable durante 30 días.

En función de la cantidad que vaya a necesitar, prepare el tampón de lavado de acuerdo a la siguiente tabla:

| Número de tiras | Tampón de lavado (20x) (ml) | Agua destilada (ml) |
|-----------------|-----------------------------|---------------------|
| 1 – 6           | 25                          | 475                 |
| 1 - 12          | 50                          | 950                 |

### 4.2. Tampón de Ensayo (1x)

Vierta todo el contenido (5 ml) del **concentrado de tampón de ensayo** (20x) en un matraz aforado de 100 ml limpio. Enrase en matraz con agua destilada o desionizada. Mezcle suavemente para evitar la formación de espuma.

Conserve la solución a una temperatura de entre 2°C y 8°C. El tampón de trabajo permanece estable durante 30 días.

En función de la cantidad que vaya a necesitar, prepare el tampón de ensayo de acuerdo a la siguiente tabla:

| Número de tiras | Tampón de ensayo (20x) (ml) | Agua destilada (ml) |
|-----------------|-----------------------------|---------------------|
| 1 - 6           | 2.5                         | 47.5                |
| 1 - 12          | 5.0                         | 95.0                |

### 4.3. Conjugado de HRP

**Se utilizará el conjugado de HRP antes de transcurridos 30 minutos desde su dilución.**

Justo antes de utilizar el **conjugado de HRP**, se debe diluirlo con Tampón de ensayo (1x) en un tubo de ensayo de plástico limpio, en una proporción de 1:100.

En función de la cantidad que vaya a necesitar, prepare el conjugado de HRP de acuerdo a la siguiente tabla:

| Número de tiras | Conjugado de biotina (ml) | Tampón de ensayo (1x) (ml) |
|-----------------|---------------------------|----------------------------|
| 1 - 6           | 0.06                      | 5.94                       |
| 1 - 12          | 0.12                      | 11.88                      |

### 4.4. Dilución estándar human sCD40L

Reconstituir el **estándar human sCD40L** la adición de agua destilada. El volumen de reconstitución está indicado en la etiqueta del vial del estándar. Girar o mezclar cuidadosamente para garantizar una completa y homogénea solubilización (concentración del estándar reconstituido = 20 ng/ml).

Permitir que el estándar reconstituido se asiente durante 10-30 minutos. Mezclar bien previamente a realizar las diluciones.

Tras su uso los restos del estándar no pueden ser almacenados y deben ser descartados.

Las **diluciones estándar** pueden ser preparadas directamente en la placa de dilución (véase 5.a) o alternativamente en tubos (véase 4.4.1).

#### 4.4.1. Dilución Estándar Externa

Rotular 7 tubos, uno para cada punto de la curva estándar.

S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7.

Acto seguido, preparar diluciones seriadas 1:2 para la curva estándar como se indica a continuación:

Pipetear 225 µl de Diluyente de muestra a todos los tubos.

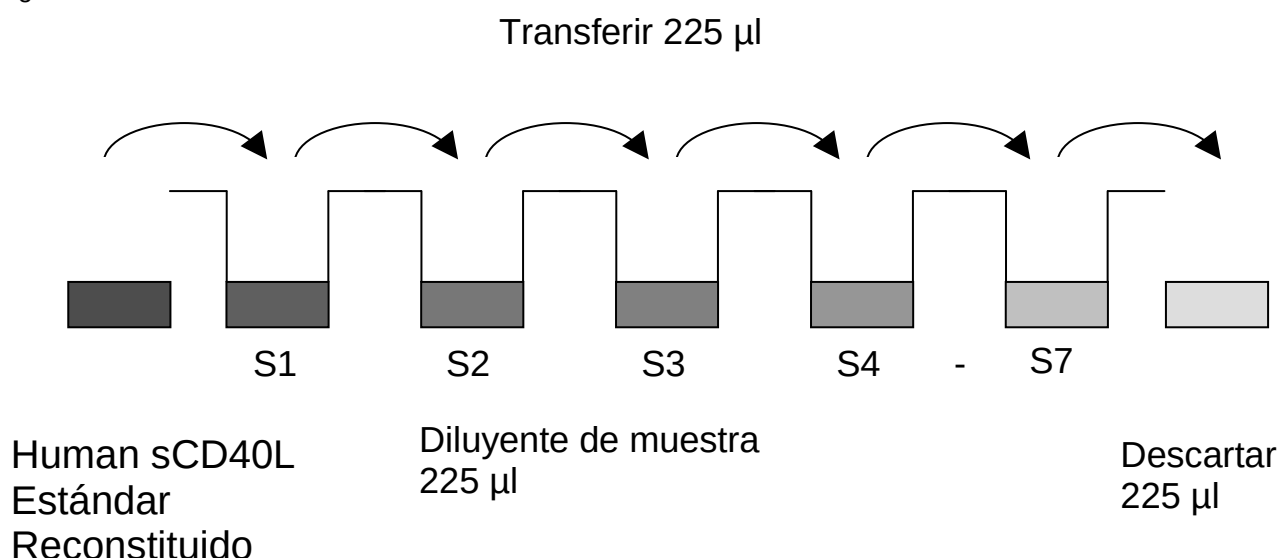
Pipetear 225 µl de estándar reconstituido (concentración del estándar = 20 ng/ml) en el primer tubo, etiquetado como S1, y mezclar (concentración del estándar 1 = 10 ng/ml).

Pipetear 225 µl de esta dilución en el segundo tubo, etiquetado como S2, y mezclar completamente antes de la siguiente transferencia.

Repetir la serie de diluciones 5 veces más de manera que se obtengan los diferentes puntos de la curva estándar (véase Figura 1).

Diluyente de muestra sirve como blanco.

Figura 1



## 4.5. Controles

Solubilizar añadiendo 150 µl de agua destilada al **controles** liofilizados. Permitir que el controles liofilizados se asiente durante 10-30 minutos. Vortear concienzudamente para asegurar una solubilización homogénea y completa. A partir de aquí, tratar el control de la misma forma que las muestras. El rango del control viene indicado en el certificado de calidad y en la etiqueta del vial. Almacenar el controles reconstituido y alicuotado a -20°C. Evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación.

## 4.6. Adición de reactivos colorantes: Colorante azul, Colorante verde

Para ayudar a nuestros clientes a evitar errores durante el pipeteado de los ELISA de eBioscience, ofrecemos ahora una nueva herramienta para supervisar la adición de volúmenes incluso muy pequeños al pocillo de reacción al dotar de un color diferente a cada etapa del procedimiento ELISA.

**Esta herramienta es opcional** y no interfiere de ningún modo con los resultados del ensayo. Está diseñada para ayudar al cliente a realizar dicho ensayo aunque es un método omisible y cabe la posibilidad de seguir simplemente las instrucciones expuestas en el manual.

Como alternativa, se puede añadir a los reactivos las soluciones colorantes obtenidas de los materiales iniciales suministrados (**colorante azul, colorante verde**), conforme a las siguientes pautas:

- 1. Diluyente:** Antes de diluir el estándar, añada el **colorante azul** diluido en proporción 1:250 (véase la tabla siguiente) al tampón consiguiente (1x) de acuerdo con el protocolo. Después de añadir el **colorante azul**, siga las instrucciones del manual.



|                               |                                 |
|-------------------------------|---------------------------------|
| 5 ml de Diluyente de muestra  | 20 µl de <b>Colorante azul</b>  |
| 12 ml de Diluyente de muestra | 48 µl de <b>Colorante azul</b>  |
| 50 ml de Diluyente de muestra | 200 µl de <b>Colorante azul</b> |

**2. Conjugado de HRP:** Antes de diluir el conjugado concentrado, añada el **Colorante verde** diluido en una proporción de 1:100 (véase la tabla siguiente) al Tampón de ensayo (1x) utilizado para la dilución final del conjugado. Después de añadir el **Colorante verde**, siga las instrucciones del manual: Conjugado de HRP.

|                                |                                  |
|--------------------------------|----------------------------------|
| 3 ml de Tampón de ensayo (1x)  | 30 µl de <b>Colorante verde</b>  |
| 6 ml de Tampón de ensayo (1x)  | 60 µl de <b>Colorante verde</b>  |
| 12 ml de Tampón de ensayo (1x) | 120 µl de <b>Colorante verde</b> |

## 5. Protocolo de Ensayo

- a. Retire la **placa de dilución** de bolsa. Determine el número de tiras necesarias para analizar el número deseado de muestras y además añada las tiras para blancos y patrones. Todas las muestras, estándares, blancos y las posibles muestras de control deben ser analizadas por duplicado.
- b. **Dilución de los Estándars en la placa de dilución:**  
(Alternativamente, la dilución de los estándares puede ser preparada en tubos – véase 4.4.1)  
Añadir 100 µl de Diluyente de muestra a todos los pocillos estándar. Pipetear 100 µl de estándar preparado (véase Preparación del Estándar 4.4, concentración = 20.00 ng/ml) por duplicado en los pocillos A1 y A2 (véase Tabla 1). Mezclar el contenido de los pocillos A1 y A2 por repetidas aspiraciones y expulsiones del contenido con la pipeta (concentración del estándar 1, S1 = 10.00 ng/ml), y transferir 100 µl a los pocillos B1 y B2, respectivamente (véase Figura 2). Llevar cuidado de no rasar la superficie interior de los micropocillos con la punta de la pipeta. Continuar este procedimiento 5 veces, formando dos filas de diluciones estándar del human sCD40L ordenadas desde 10.00 a 0.16 ng/ml. Descartar 100 µl de los contenidos de los últimos micropocillos (G1, G2) usados.  
  
En caso de una dilución estándar externa (véase 4.4.1), pipetear 100 µl de estas diluciones estándar (S1 - S7) en los pocillos correspondientes al estándar de acuerdo con la Tabla 1.

Figura 2

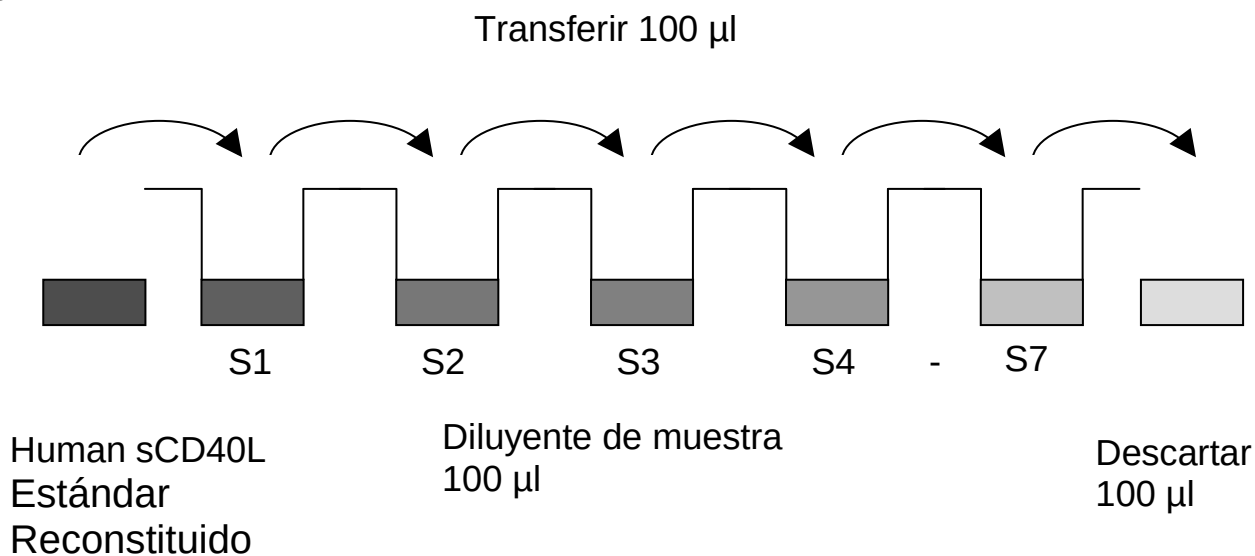


Tabla 1

Tabla que describe un ejemplo de la disposición de los blancos, estándares y muestras en los micropocillos de la placa de dilución:

|          | 1                           | 2                           | 3         | 4         |
|----------|-----------------------------|-----------------------------|-----------|-----------|
| <b>A</b> | Estándar 1<br>(10.00 ng/ml) | Estándar 1<br>(10.00 ng/ml) | Muestra 1 | Muestra 1 |
| <b>B</b> | Estándar 2<br>(5.00 ng/ml)  | Estándar 2<br>(5.00 ng/ml)  | Muestra 2 | Muestra 2 |
| <b>C</b> | Estándar 3<br>(2.50 ng/ml)  | Estándar 3<br>(2.50 ng/ml)  | Muestra 3 | Muestra 3 |
| <b>D</b> | Estándar 4<br>(1.25 ng/ml)  | Estándar 4<br>(1.25 ng/ml)  | Muestra 4 | Muestra 4 |
| <b>E</b> | Estándar 5<br>(0.63 ng/ml)  | Estándar 5<br>(0.63 ng/ml)  | Muestra 5 | Muestra 5 |
| <b>F</b> | Estándar 6<br>(0.31 ng/ml)  | Estándar 6<br>(0.31 ng/ml)  | Muestra 6 | Muestra 6 |
| <b>G</b> | Estándar 7<br>(0.16 ng/ml)  | Estándar 7<br>(0.16 ng/ml)  | Muestra 7 | Muestra 7 |
| <b>H</b> | Blanco                      | Blanco                      | Muestra 8 | Muestra 8 |

- c. Añada 100 µl **Diluyente de muestra** a los **pocillos del blanco** de la placa de dilución, por duplicado.
- d. Añada 80 µl de **Diluyente de muestra** a los **pocillos con maestra** de la placa de dilución.
- e. Por duplicado, añada 20 µl de cada **muestra** a los **pocillos designados** de la placa de dilución.
- f. Prepare **conjugado de HRP** (véase la preparación de conjugado de HRP 4.3)
- g. Añada 100 µl **conjugado de HRP** a todos los pocillos de la placa de dilución.
- h. Retire la **placa de micropocillos recubiertos con anticuerpos** anti-human sCD40L de bolsa de aluminio. Retire del soporte las tiras sobrantes y consérvelas, junto con el desecante suministrado en una bolsa metalizada y cerrada herméticamente, a una temperatura de 2°-8° C.
- i. Lave 2 veces las tiras con aproximadamente 400 µl de **tampón de lavado** por cada pocillo, aspirando completamente el contenido de los pocillos entre cada lavado. Permitir que el tampón de lavado permanezca en los pocillos durante **10-15 segundos** antes de su aspiración. Evite rayar la superficie de los pocillos.  
Tras el último lavado, golpee suavemente las tiras contra un papel absorbente o una toallita de papel para eliminar el exceso de tampón de lavado. Utilice las tiras inmediatamente después de lavadas o bien colóquelas boca abajo sobre un papel absorbente húmedo durante como máximo 15 minutos. **No deje secar los pocillos.**
- j. **Mezclar** el contenido de cada pocillo de la placa de dilución por repetidas aspiraciones y expulsiones del contenido con la pipeta, y **transferir** 150 µl de cada reacción de la placa de dilución a los pocillos de la placa de micropocillos recubiertos con anticuerpos anti-human sCD40L, siguiendo el mismo esquema que la placa (ver Tabla 1).

- k. Cubra la placa con una tapa e incúbela a temperatura ambiente (18°C - 25°C) durante 2 horas en un agitador mecánico a 400 rpm. En caso de no disponer ningún agitador, alternativamente se puede incubar a 4°C durante toda la noche o en la noche a 4°C sin agitador mecánico.
- l. Retire la tapa y vacíe los pocillos. **Lavar** los micropocillos de las tiras 3 veces de acuerdo al punto i del protocolo del test. Proseguir inmediatamente después al próximo paso.
- m. Pipetee 100 µl de **solución de sustrato TMB** y viértalos en todos los pocillos, incluidos los del blanco.
- n. Incube las tiras a temperatura ambiente (18°C - 25°C) durante aproximadamente 10 minutos. Evite la exposición directa a la luz intensa.

**Deben monitorizarse los valores DO de la placa para detener la reacción del sustrato (véase el siguiente punto de este protocolo) antes de que deje de ser posible registrar correctamente los pocillos positivos.**

**La determinación del tiempo adecuado para el desarrollo del color, debe realizarse de forma individual para cada ensayo.**

Se recomienda añadir la solución de parada cuando el estándar más alto presente un color azul oscuro. Alternativamente el desarrollo de color puede ser monitorizado con un lector de placas de ELISA a 620 nm. La reacción del sustrato debería ser parada cuando este estándar alcance una DO entre 0.9 y 0.95.

- o. Detenga la reacción enzimática pipeteando rápidamente 100 µl de **solución de parada** en cada pocillo, incluidos los del blanco. Es importante dispensar la solución de parada de forma rápida y uniforme en todos los pocillos para inactivar totalmente la enzima. Los resultados deben leerse inmediatamente después de añadir la solución de parada o, como máximo, en el plazo de 1 hora si las tiras se conservan a una temperatura entre 2 - 8°C en un lugar oscuro.

- p. Lea la absorbancia de cada pocillo en un espectrofotómetro utilizando 450 nm como longitud de onda principal (opcionalmente 620 nm como longitud de onda de referencia; los valores comprendidos entre 610 nm y 650 nm son aceptables). Utilizando los pocillos de blanco, haga el blanco del lector de placas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Determine la absorbancia de las muestras y de los human sCD40L.

**Las muestras han sido diluidas 1: 5, por tanto la concentración leída a partir de la curva estándar debe ser multiplicada por el factor de dilución (x 5).**

**Nota: En caso de incubar sin agitar, los valores de D.O. pueden ser inferiores a los indicados más abajo. De todas formas los resultados siguen siendo válidos.**

# INFORMATIONS SUR LE PRODUIT ET MANUEL (Français)

## 1. Réactifs Fournis

### 1.1. Reactifs pour ELISA de human sCD40L BMS239CE (96 essais)

- 1 pochette en aluminium contenant **une plaque de microtitration** recouverte d'anticorps monoclonaux anti-human sCD40L
- 1 flacon (200 µl) de **conjugué HRP** anti-human sCD40L (anticorps monoclonaux anti-human sCD40L)
- 2 flacons d'**étalon** human sCD40L, lyophilisé, 20 ng/ml après reconstitution
- 1 flacon de **contrôle élevé**, lyophilisé
- 1 flacon de **contrôle bas**, lyophilisé
- 1 flacon (12 ml) **diluant d'échantillon**
- 1 flacon (5 ml) **tampon d'essai concentré 20 x**  
(PBS avec Tween 20 1% et de la sérumalbumine bovine 10%)
- 1 flacon (50 ml) de **tampon de lavage concentré 20 x**  
(PBS avec du Tween 20 1 %)
- 1 flacon (15 ml) de **solution de substrat** (tétraméthyle-benzidine)
- 1 flacon (15 ml) de **solution d'arrêt** (acide phosphorique 1 M)
- 1 flacon (0.4 ml) de **colorant bleu**
- 1 flacon (0.4 ml) de **colorant vert**
- 2 **couvre-plaques** adhésifs
- 2 **plaques de dilution**

## **1.2. Reactifs pour ELISA de human sCD40L BMS239TENCE** (10x96 essais)

- 10 pochettes en aluminium contenant **une plaque de microtitration** recouverte d'anticorps monoclonaux anti-human sCD40L
- 10 flacons (200 µl) de **conjugué HRP** anti-human sCD40L (anticorps monoclonaux anti-human sCD40L)
- 10 flacons d'**étalon** human sCD40L, lyophilisé, 20 ng/ml après reconstitution
- 10 flacons de **contrôle élevé**, lyophilisé
- 10 flacons de **contrôle bas**, lyophilisé
- 10 flacons (12 ml) **diluant d'échantillon**
- 2 flacons (5 ml) **tampon d'essai concentré 20 x**  
(PBS avec Tween 20 1% et de la sérumalbumine bovine 10%)
- 3 flacons (50 ml) de **tampon de lavage concentré 20 x**  
(PBS avec du Tween 20 1 %)
- 10 flacons (15 ml) de **solution de substrat** (tétraméthyle-benzidine)
- 10 flacons (15 ml) de **solution d'arrêt** (acide phosphorique 1 M)
- 6 flacons (0.4 ml) de **colorant bleu**
- 6 flacons (0.4 ml) de **colorant vert**
- 10 **couvre-plaques** adhésifs
- 10 **plaques de dilution**

**Veillez noter:** *Par rares occasions un précipité insoluble de protéines stabilisatrices a pu être observé dans les tubes. Ce précipité n'interfère d'aucune manière avec le test et peut donc être ignoré.*



## **2. Instruction de Stockage**

Conserver les réactifs du kit entre 2° et 8°C et les contrôles à -20°C. Immédiatement après l'utilisation, les réactifs doivent être rangés au frais (2° à 8°C), les contrôles à -20°C. La date de péremption du kit est spécifiée sur les étiquettes.

Le délai de péremption du kit ne peut être garanti que si les composants sont conservés correctement et si, en cas d'utilisation répétée d'un composant, le réactif n'a pas été contaminé lors d'une première utilisation.

### **3. Préventions de Sécurité pour l'Usage**

- Tout réactifs doivent être considérés comme potentiellement dangereux. Pour cela il est recommandé que ce produit est utilisé que par des personnes ayant une qualification de laboratoire et qu'il soit utilisé à l'avenant au code GLP. Une tenue correspondante comme des une blouse de travail, des lunettes protectrices et des gants de travail doivent-être portés. Evitez tous contacts de réactifs avec la peau ou les yeux. En cas de contact avec les yeux ou la peau rincez immédiatement avec de l'eau. Veuillez consulter tous conseils spécifiques dans les fiches de données de sécurité et/ou les les règles de sécurité.
- Les réactifs sont réservés exclusivement au diagnostique et non pas au thérapeutique.
- Evitez de mélanger et d'échanger les réactifs de lots différents et de provenance différents.
- Evitez l'utilisation des réactifs périmés (voyez étiquette).
- N'exposez pas les réactifs à la lumière pendant le stockage ou l'incubation.
- Ne pas pipeter avec la bouche
- Ne pas manger, boire ou fumer dans les zones de manipulation de réactifs et d'échantillons.
- Evitez le contact de la peau et des muqueuses avec les réactifs.
- Pendant le travail avec les réactifs, utilisez des gants appropriés.
- Evitez le contact de substrats avec des métaux/oxydant.
- Evitez de gicler des liquides et la formation d'Aérosols.
- A fin d'éviter des contaminations avec microbes ou contaminations de réactifs et d'échantillons qui pourraient rendre le test sans valeur, veuillez utiliser des pointes de pipettes jetables.
- Utilisez des tubes appropriés pour dispenser le conjugué et le substrat.

- Toute exposition aux acides inactive le conjugué.
- Pour la préparation des réactifs de l'eau distillée ou déionisée doit être utilisée.
- La solution de substrat doit être rendue à température ambiante avant usage.
- Décontaminez et éliminez les échantillons et tous matériaux contaminés de manière comme si ils contenaient des germes de maladies infectieuses. La méthode préférée de décontamination est par l'autoclave pour au moins une heure à 121.5 °C.
- Traitez les déchets liquides non-acidiques tel que des déchets neutralisés par l'hypochlorite de sodium (concentration finale d'hypochlorite: 1.0%). Après 30 minutes la décontamination effective est atteinte. Les déchets liquides contenant de l'acide doivent être neutralisés avant la décontamination.

## 4. Préparation des Réactifs

Placer **les concentrés** de tampon à une température ambiante et diluer avant de commencer le test. Si des cristaux se sont formés dans les **concentrés de tampon**, chauffer doucement ces derniers jusqu'à fin de les dissoudre la dissolution des cristaux totale.

### 4.1. Tampon de Lavage (1x)

Verser tout le contenu (50 ml) du concentré de **tampon de lavage** (20x) dans un cylindre gradué propre de 1000 ml. Porter le volume final à 1000 ml avec de l'eau distillée ou déionisée dans un alambic en verre. Mélanger doucement pour éviter la formation de mousse.

Transférer tout dans une bouteille de lavage et conserver à une température comprise entre 2° et 25°C. Noter que le tampon de lavage reste stable pendant 30 jours.

Le tampon de lavage peut être préparé selon le tableau suivant:

| Nombre de bandes | Tampon de lavage (20x) (ml) | Eau distillée (ml) |
|------------------|-----------------------------|--------------------|
| 1 - 6            | 25                          | 475                |
| 1 - 12           | 50                          | 950                |

### 4.2. Tampon d'Essai (1x)

Bien mélanger le contenu de la bouteille. Ajouter le contenu du **tampon d'essai** concentré (20x) (5.0 ml) aux 95 ml d'eau distillée ou déionisée et mélanger doucement pour éviter la formation de mousse. Stocker le tout entre 2° et 8°C. Noter que le tampon d'essai reste stable pendant 30 jours.

Le tampon d'essai peut être préparé selon le tableau suivant :

| Nombre de bandes | Tampon d'essai (20x) (ml) | Eau distillée (ml) |
|------------------|---------------------------|--------------------|
| 1 - 6            | 2.5                       | 47.5               |
| 1 - 12           | 5.0                       | 95.0               |

### 4.3. Préparation du conjugué HRP

**Noter que le conjugué HRP doit être utilisé dans les 30 minutes qui suivent la dilution.**

Le **conjugué HRP** doit être dilué au 1:100 avec le Tampon d'essai (1x) juste avant l'utilisation dans un tube à essais en plastique propre.

Le conjugué HRP peut être préparé selon le tableau suivant :

| Nombre de bandes | Conjugué HRP (ml) | Tampon d'essai (1x) (ml) |
|------------------|-------------------|--------------------------|
| 1 - 6            | 0.06              | 5.94                     |
| 1 - 12           | 0.12              | 11.88                    |

### 4.4. Étalon human sCD40L

Reconstituer **étalon human sCD40L** en ajoutant de l'eau distillée tampon de dilution.

Le volume de reconstitution est indiqué sur l'étiquette de flacon d'étalon. Agiter et mélanger avec précaution pour assurer une solubilisation homogène complète (concentration d'étalon reconstitué = 20 ng/ml). Laisser reconstituer l'étalon pendant 10-30 min.

Après utilisation le surplus d'étalon ne doit pas être gardé et doit être éliminé.

Des **dilutions d'étalon** peuvent être préparées directement sur la plaque de dilution (voir 5.b) ou comme alternative dans des tubes (voir 4.4.1).

#### 4.4.1. Dilution d' étalon externe

Etiquetter les tubes 7, une pour chaque point d' étalon.

S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7

Puis préparer séries de dilutions 1:2 pour la courbe d' étalonnage de manière suivante: Pipeter 225 µl de Diluant d'échantillon dans chaque tube.

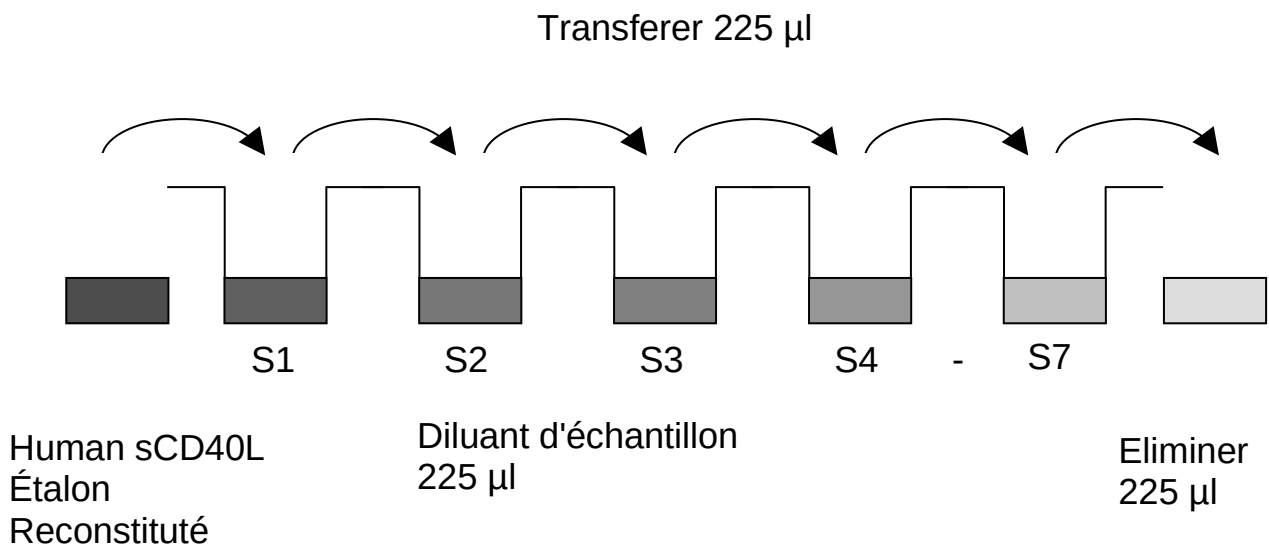
Pipeter 225 µl d' étalon reconstitué (concentration d' étalon = 20 ng/ml) dans un premier tube marqué S1 et agiter (concentration d' étalon  $1/2 = 10$  ng/ml).

Pipeter 225 µl de cette dilution dans un deuxième tube marqué S2, et mélanger soigneusement avant le transfert suivant.

Répéter des séries de dilutions 5 fois pour créer les dilutions d' étalon pour la courbe d' étalonnage (voir Figure 1).

Diluant d'échantillon sert comme contrôle vide.

Figure 1



#### 4.5. Contrôle(s)

Solubiliser en ajoutant 150 µl d'eau distillée aux **contrôles** lyophilisés. Laisser reconstituer les contrôles pendant 10-30 min. Agiter doucement jusqu'à la dissolution complète et homogène. Traiter ensuite le contrôle comme les échantillons dans le test. Pour la gamme étalon référez au certificat d'analyse ou l'étiquette de l'ampoule. Conserver les contrôles reconstitués aliquotés à -20°C. Eviter la congélation et le dégel répété.

#### 4.6. Ajout de réactifs colorants : colorant bleu, colorant vert

Pour permettre à nos clients d'éviter des erreurs de pipetage des Platinum ELISA de eBioscience, eBioscience propose désormais un nouvel outil qui permet de contrôler l'ajout de très petits volumes d'une solution dans la réaction en donnant des couleurs différentes à chaque étape du dosage par la méthode ELISA.

Cette méthode est facultative et n'altère en aucun cas les résultats de tests. Elle a été conçue pour aider le client à réaliser le test. Cependant, elle peut également être omise, conformément au guide d'utilisation.

Les solutions de teintes des stocks fournis (**colorant bleu, colorant vert**) peuvent être ajoutées aux réactifs conformément aux règles suivantes :

**1. Diluant :** Avant la dilution de l'étalon ajouter le **Colorant bleu** à une dilution de 1:250 (voir le tableau ci-dessous) au tampon ou diluent (1x) conformément au protocole de test. Après l'ajout du **Colorant bleu**, suivre le guide d'utilisation.

|                             |                             |
|-----------------------------|-----------------------------|
| 5 ml Diluant d'échantillon  | 20 µl <b>Colorant bleu</b>  |
| 12 ml Diluant d'échantillon | 48 µl <b>Colorant bleu</b>  |
| 50 ml Diluant d'échantillon | 200 µl <b>Colorant bleu</b> |

**2. Conjugué HRP:** Avant la dilution du Conjugué HRP concentré, ajouter le **Colorant vert** à une dilution de 1:100 (voir le tableau ci-dessous) au Tampon d'essai (1x) utilisé pour la dilution finale du conjugué. Après l'ajout du **Colorant vert**, suivre le guide d'utilisation : préparation Conjugué HRP.

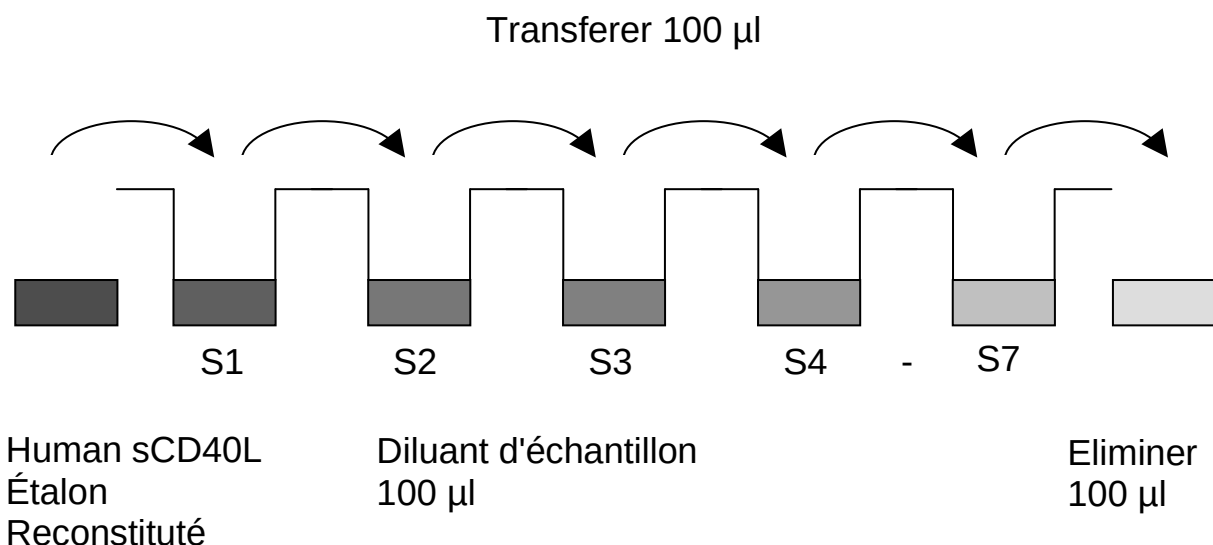
|                           |                             |
|---------------------------|-----------------------------|
| 3 ml Tampon d'essai (1x)  | 30 µl <b>Colorant vert</b>  |
| 6 ml Tampon d'essai (1x)  | 60 µl <b>Colorant vert</b>  |
| 12 ml Tampon d'essai (1x) | 120 µl <b>Colorant vert</b> |



## 5. Protocole de Test

- a. Retirer la plaque de dilution de la pochette. Déterminer le nombre de barrettes de puits nécessaires pour tester le nombre souhaité d'échantillons plus les puits nécessaires aux contrôles vides et aux étalons. Chaque échantillon, étalon, contrôle vide et contrôles doit être testé en double.
- b. **Dilution d'étalon sur la plaque de dilution:**  
 (Comme alternative des dilutions d'étalon peuvent être préparées dans des tubes –voir 4.4.1)  
 Ajouter en double 100 µl de Diluant d'échantillon dans tous les **puits d'étalon**. Pipeter en double 100 µl d'**étalon** préparé (voir Préparation d'étalon 4.4, concentration = 20.00 ng/ml) dans les puits A1 et A2 (voir). Mélanger bien le contenu des puits A1 et A2 par aspiration et ejection répétée (concentration d'étalon 1, S1 = 10.00 ng/ml), et transférer 10 µl dans les puits B1 et B2, respectivement (voir Figure 2). Veiller à ne pas rayer la surface des puits de microtitration. Continuer la procédure 5 fois en préparant deux séries de dilutions d'étalon human sCD40L, de 10.00 à 0.16 ng/ml. Eliminer 100 µl du contenu des derniers puits (G1, G2).

Figure 2



Dans le cas d'une **dilution d'étalon externe** (voir 4.4.1), pipeter 100 µl de ces dilutions d'étalon (S1 – S7) dans les puits de façon montrée dans Tableau 1.

Tableau 1

Exemple d'arrangement d'échantillons, d'étalons et de contrôles vides dans les barrettes de puits de dilution.

|          | <b>1</b>                  | <b>2</b>                  | <b>3</b>      | <b>4</b>      |
|----------|---------------------------|---------------------------|---------------|---------------|
| <b>A</b> | Étalon 1<br>(10.00 ng/ml) | Étalon 1<br>(10.00 ng/ml) | Échantillon 1 | Échantillon 1 |
| <b>B</b> | Étalon 2<br>(5.00 ng/ml)  | Étalon 2<br>(5.00 ng/ml)  | Échantillon 2 | Échantillon 2 |
| <b>C</b> | Étalon 3<br>(2.50 ng/ml)  | Étalon 3<br>(2.50 ng/ml)  | Échantillon 3 | Échantillon 3 |
| <b>D</b> | Étalon 4<br>(1.25 ng/ml)  | Étalon 4<br>(1.25 ng/ml)  | Échantillon 4 | Échantillon 4 |
| <b>E</b> | Étalon 5<br>(0.63 ng/ml)  | Étalon 5<br>(0.63 ng/ml)  | Échantillon 5 | Échantillon 5 |
| <b>F</b> | Étalon 6<br>(0.31 ng/ml)  | Étalon 6<br>(0.31 ng/ml)  | Échantillon 6 | Échantillon 6 |
| <b>G</b> | Étalon 7<br>(0.16 ng/ml)  | Étalon 7<br>(0.16 ng/ml)  | Échantillon 7 | Échantillon 7 |
| <b>H</b> | Contrôle vide             | Contrôle vide             | Échantillon 8 | Échantillon 8 |

- c. Ajouter 100 µl de **Diluant d'échantillon** dans tous les **puits de contrôle vide** de la plaque de dilution.
- d. Ajouter 80 µl de **Diluant d'échantillon** dans tous les **puits d'échantillon** de la plaque de dilution.
- e. Ajouter 20 µl de chaque **échantillon**, en double, dans les **puits d'échantillon** de la plaque de dilution.
- f. Préparer du **Conjugué HRP** (se reporter à la préparation des réactifs Conjugué HRP 4.3.).
- g. Ajouter 100 µl de **Conjugué HRP** dans tous les **puits** de la plaque de dilution.
- h. Retirer **la plaque de microtitration recouverte d'anticorps** anti-human sCD40L de la pochette en aluminium. Retirer les barrettes de microtitration inutiles du support et les stocker à 2°-8°C dans une pochette hermétiquement refermée, avec le dessiccant fourni.
- i. Laver deux fois les barrettes de puits avec environ 400 µl de **tampon de lavage** pour chaque puits et en aspirant à fond le contenu des puits entre les lavages. Laisser le Tampon de lavage dans les puits pendant **10 - 15 secondes** avant l'aspiration. Veiller à ne pas rayer la surface des puits de microtitration.  
Après le dernier lavage, vider les barrettes de puits et les tapoter sur un tampon absorbant ou une serviette en papier pour éliminer l'excès de tampon de lavage. Utiliser les barrettes de micropuits immédiatement après le lavage ou les placer renversées sur un papier absorbant pendant 15 minutes au maximum. **Ne pas laisser sécher les puits.**
- j. **Mélanger** bien le contenu des puits de la plaque de dilution par aspiration et ejection répétée et **transférer** 150 µl de mélanges de réaction de la plaque de dilution dans les puits de la plaque de microtitration recouverte d'anticorps monoclonaux anti-human sCD40L de façon montrée dans Tableau 1
- k. **Recouvrir** avec un couvre-plaque et incuber à température ambiante (entre 18° et 25°C) pendant 2 heures, sur un agitateur rotateur réglé à 400 tr/min. Sans agitateur rotateur, incuber à 4°C pendant la nuit.

- l. Retirer le couvre-plaque et vider les puits. **Laver** 3 fois les barrettes de puits de microtitration comme indiqué à point c de ce protocole. Utiliser les barrettes de micropuits immédiatement après le lavage.
- m. Pipeter 100 µl de **solution de substrat TMB** dans chaque puits, y compris les puits de contrôle vide.
- n. Incuber les puits de microtitration à température ambiante (entre 18 et 25 C) pendant environ 10 minutes. Éviter toute exposition directe à une source de lumière intense.

**Les valeurs de densité optique au niveau de la plaque doivent être surveillées et la réaction du substrat stoppée (voir le point prochain) avant que les puits positifs ne soient plus correctement mesurables.**

**La durée de l'incubation pour le développement de couleur doit être déterminé pour chaque essai individuellement.**

Il est recommandé d'ajouter la solution stop quand une couleur bleu sombre se développe à la concentration la plus haute de la gamme étalon. Une autre alternative consiste à suivre le développement de la couleur par lecteur ELISA à 620 nm. La réaction du substrat doit être arrêtée dès que la DO atteint 0.9 à 0.95.

- o. Arrêter la réaction enzymatique en pipetant rapidement 100 µl de **solution d'arrêt** dans chaque puits, y compris les puits de contrôle vide. Il est important que la solution d'arrêt soit répandue rapidement et uniformément dans les puits pour inactiver complètement l'enzyme. Les résultats doivent être lus immédiatement après l'ajout de la solution d'arrêt ou dans l'heure qui suit si les barrettes de microtitration sont conservées à l'obscurité entre 2 et 8 °C.
- p. Lire l'absorbance de chaque puits sur un spectrophotomètre avec 450 nm comme longueur d'onde primaire (éventuellement 620 nm comme longueur d'onde de référence; 610 à 650 nm sont acceptables). Mesurer le contrôle vide du lecteur de plaque conformément aux instructions du fabricant, en utilisant les puits de contrôle vide. Déterminer l'absorbance des échantillons et des human sCD40L.

**Les échantillons ont été dilués 1:5 en cours de test. Pour cette raison, la valeur de concentration déterminée par la gamme étalon doit être multipliée par le facteur de dilution (x 5).**

**Remarque: Si la plaque n'est pas agitée pendant l'incubation, les valeurs de densité optique peuvent être inférieures aux valeurs indiquées plus haut. Néanmoins ces valeurs sont valables.**

# INFORMAZIONI SUL PRODOTTO E MANUALE (Italiano)

## 1. Reagenti Forniti

### 1.1. Reagenti Forniti per human sCD40L ELISA BMS245CE (96 test)

- 1 busta d'alluminio con **Piastra Micropozzetti rivestita** con anticorpo monoclonale anti human sCD40L
- 1 flaconcino (200 µl) di anticorpo **HRP-Coniugato** (anticorpo monoclonale human sCD40L)
- 2 flaconcini human sCD40L **Standard** liofilizzato, 20 ng/ml previa ricostituzione
- 1 flaconcino di **Controllo basso**, liofilizzato
- 1 flaconcino di **Controllo alto**, liofilizzato
- 1 flaconcino (12 ml) con **Diluyente del Campione**
- 1 flaconcino (5 ml) con **Tampone del Saggio concentrata 20x** (PBS con 1% Tween 20 e 10% BSA)
- 1 bottiglia (50 ml) con **Tampone di Lavaggio concentrato 20x** (PBS con 1% Tween 20)
- 1 flaconcino (15 ml) di **Soluzione Substrato** (tetrametilbenzidina)
- 1 flaconcino (15 ml) di **Soluzione bloccante** (acido fosforico 1M)
- 1 flaconcino (0.4 ml) **Colorante blu**
- 1 flaconcino (0.4 ml) **Colorante verde**
- 2 **Copripiastra** adesivi
- 2 **Piastri per diluizione**

## **1.2. Reagenti Forniti per human sCD40L ELISA BMS239TENCE (10x96 test)**

- 10 buste d'alluminio con **Piastra Micropozzetti rivestita** con anticorpo monoclonale anti human sCD40L
- 10 flaconcini (200 µl) di anticorpo **HRP-Coniugato** (anticorpo monoclonale verso human sCD40L)
- 10 flaconcini human sCD40L **Standard** liofilizzato, 20 ng/ml previa ricostituzione
- 10 flaconcini di **Controllo basso**, liofilizzato
- 10 flaconcini di **Controllo alto**, liofilizzato
- 10 flaconcini (12 ml) con **Diluente del Campione**
- 2 flaconcini (5 ml) con **Tampone del Saggio concentrata 20x** (PBS con 1% Tween 20 e 10% BSA)
- 3 bottiglie (50 ml) con **Tampone di Lavaggio concentrato 20x** (PBS con 1% Tween 20)
- 10 flaconcini (15 ml) di **Soluzione Substrato** (tetrametilbenzidina)
- 10 flaconcini (15 ml) di **Soluzione bloccante** (acido fosforico 1M)
- 10 flaconcini (0.4 ml) **Colorante blu**
- 10 flaconcini (0.4 ml) **Colorante verde**
- 10 **Copripiastra** adesivi
- 10 **Piastri per diluizione**

**Attenzione:** *In alcuni rari casi un precipitato insolubile di stabilizzatore della proteina potrebbe essere visibile nella fiala. Questo precipitato non interferisce in alcun modo con il buon risultato dei test e può quindi essere ignorato.*

## **2. Istruzioni di Conservazione**

Conservare i reagenti del kit a 2°-8° C e i controlli a -20° C.

Subito dopo l'uso riporre i reagenti nel luogo di conservazione a 2°-8° C e i controlli a -20° C. La scadenza del kit e dei reagenti è indicata sulle etichette.

La data di scadenza dei componenti del kit può essere garantita solo se questi sono conservati correttamente e, in caso di uso ripetuto di un componente, il reagente non è stato contaminato durante la prima manipolazione.



### 3. Precauzioni per l'Uso

- Tutti i prodotti chimici vanno considerati come potenzialmente pericolosi. Raccomandiamo, perciò, l'utilizzo di questo prodotto solo da personale addestrato alle tecniche di laboratorio e che siano avvezze alle comuni pratiche di laboratorio. Indossare abbigliamento idoneo come camici, guanti ed occhiali. Attenzione ad evitare contatto con la pelle e gli occhi. Nel caso di contatto con pelle o occhi, immediatamente lavare con acqua. Consultare la scheda di sicurezza del prodotto per specifici consigli.
- I reagenti sono per uso in vitro diagnostico e non sono per uso terapeutico.
- Non mischiare tra loro reagenti di diversi lotti o provenienza.
- Non usare i kit dopo la data di scadenza.
- Non esporre i reagenti del kit, durante la conservazione e incubazione a forti fonti di luce.
- Non pipettare utilizzando la bocca.
- Non mangiare o fumare nell'area dove sono utilizzati i reagenti dei kit o i campioni.
- Evitare il contatto dei reagenti o campioni con la pelle o le mucose.
- Guanti di gomma o lattice dovrebbero essere sempre indossati quando si usano reagenti e campioni.
- Evitare il contatto tra il substrato del kit e agenti ossidanti e metallo.
- Evitare schizzi o produzione di aerosol.
- Per evitare contaminazione microbica o cross-contaminazione dei reagenti o dei campioni che invaliderebbero il test, usare sempre pipette e puntali mono-uso.
- Usare vaschette pulite e dedicate per la dispensare il reagente substrato.
- L'esposizione agli acidi inattiva il coniugato.

- Acqua distillata o de-ionizzata deve essere utilizzata per la preparazione dei reagenti.
- La soluzione di substrato deve essere portata a temperatura ambiente prima dell'utilizzo.
- Decontaminare ed eliminare i campioni e tutto il materiale potenzialmente contaminante perchè potrebbero contenere agenti infettanti. Il metodo preferito per la decontaminazione è l'autoclavaggio per minimo 1 ora a 121.5°C.
- Gli scarti liquidi, non contenenti acido e gli scarti neutralizzati possono essere mischiati con sodio ipoclorido in un volume finale di 1.0%. Lasciare minimo 30 minuti per l'effettiva decontaminazione. Scarti liquidi contenenti acido devono essere neutralizzati prima dell'aggiunta di sodio ipoclorido.

## 4. Preparazione dei Reagenti

Prima di cominciare con le procedure del test i **concentrati** dei tamponi devono essere portati a temperatura ambientale e diluiti alle concentrazioni adeguate. Se i **concentrati dei tampone** presenta cristalli in sospensione, riscaldare lievemente i tamponei fino a ottenere la completa dissoluzione dei cristalli.

### 4.1. Tampone di Lavaggio (1x)

Versare l'intero contenuto (50 ml) del **tampone di lavaggio concentrato** (20x) in un cilindro graduato pulito da 1000 ml. Portare il volume finale a 1000 ml utilizzando acqua distillata o acqua deionizzata. Mescolare delicatamente per evitare la formazione di schiuma.

Trasferire il prodotto in una bottiglia pulita e conservare a temperature comprese fra 2°C e 25°C. Il tampone di lavaggio è stabile per 30 giorni.

Se necessario, è possibile preparare il tampone di lavaggio secondo la tabella seguente:

| Numero di strip | Tampone di lavaggio (20x) (ml) | Acqua distillata (ml) |
|-----------------|--------------------------------|-----------------------|
| 1 - 6           | 25                             | 475                   |
| 1 - 12          | 50                             | 950                   |

### 4.2. Tampone del Saggio (1x)

Versare l'intero contenuto (5 ml) del **tampone del saggio concentrato** (20x) in un cilindro graduato pulito da 100 ml. Portare il volume finale a 100 ml utilizzando acqua distillata o acqua deionizzata. Mescolare delicatamente per evitare la formazione di schiuma.

Conservare a temperatura compresa fra 2°C e 8°C. La soluzione tampone diluita è stabile per 30 giorni.

Se necessario, è possibile preparare la soluzione tampone secondo la tabella seguente:

| Numero di strip | Tampone del saggio (20x) (ml) | Acqua distillata (ml) |
|-----------------|-------------------------------|-----------------------|
| 1 - 6           | 2.5                           | 47.5                  |
| 1 - 12          | 5.0                           | 95.0                  |

### 4.3. HRP-Coniugato

**Il HRP-Coniugato deve essere utilizzato entro 30 minuti dalla diluizione.**

Il HRP-Coniugato deve essere diluito 1:100 con Tampone del saggio (1x) in una provetta di plastica pulita secondo la tabella seguente:

| Numero di strip | HRP-Coniugato (ml) | Tampone del saggio (1x) (ml) |
|-----------------|--------------------|------------------------------|
| 1 - 6           | 0.06               | 5.94                         |
| 1 - 12          | 0.12               | 11.88                        |

### 4.4. Human sCD40L Standard

Ricostituire lo **human sCD40L standard** aggiungendo con acqua distillata. Il volume di ricostituzione è indicato sull'etichetta della flaconcino. Girare o mescolare gentilmente per garantire la completa ed omogenea solubilizzazione (concentrazione dello standard ricostituito = 20.00 ng/ml).

Permettere allo standard ricostituito di riposare per 10-30 minuti. Prima di fare le diluizione mescolare bene.

Dopo l'uso, lo standard rimanente non può essere riutilizzato e deve essere buttato.

**La diluizione dello standard** può essere fatto direttamente nella piastra per diluizione (vedi 5.a) oppure nei tubi (vedi 4.4.1).

#### 4.4.1. Diluizione degli Standard esterni

Etichettare 7 tubi, uno per ogni punto dello standard.

S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7

Preparare diluizione seriali 1:2 per lo standard nel seguente modo:

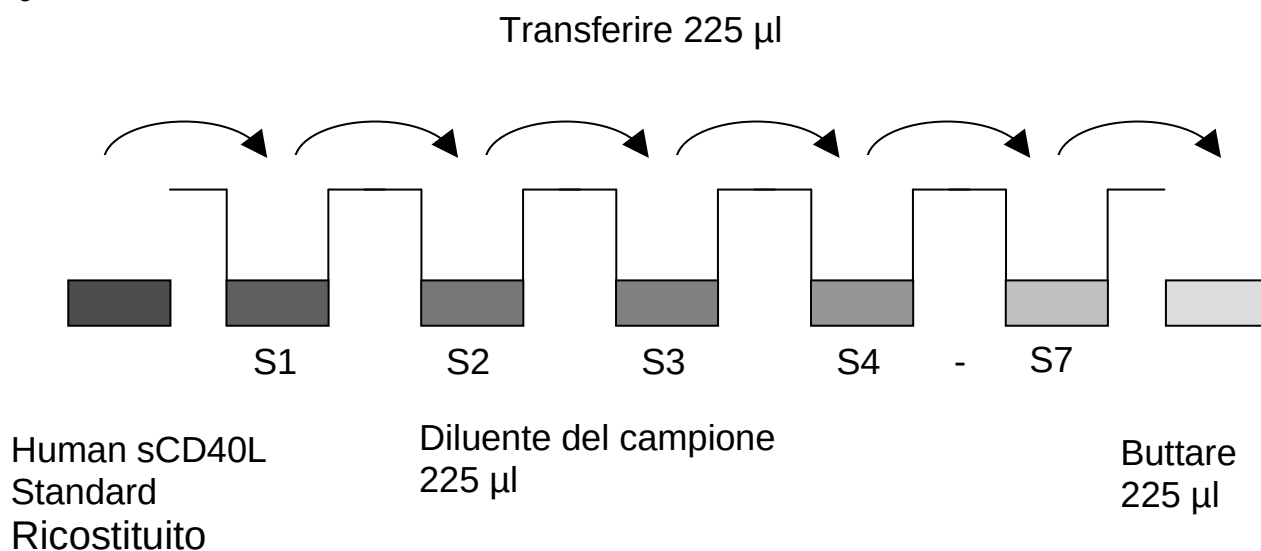
Pipettare 225  $\mu$ l di Diluente del campione nei tutti tubi.

Pipettare 225  $\mu$ l di ricostituito (concentrazione dello standard 1= 20 ng/ml) nel primo tubo, etichettato S1, e mescolare (concentrazione dello standard 1 = 10 ng/ml).

Pipettare 225  $\mu$ l di questa diluizione nel secondo tubo, etichettato S2, mischiare accuratamente prima del successivo trasferimento. Ripetere le 5 diluizioni seriali in modo da creare i punti della curva di calibrazione (vedere Figura 1)

Diluente del campione serve come bianco.

Figura 1



#### 4.5. Controlli

Solubilizzare aggiungendo 150 µl di acqua distillata al **controlli** liofilizzati. Permettere ai controlli di riposare per 10-30 minuti. Agitare o mescolare delicatamente per assicurare una solubilizzazione completa ed omogenea. In seguito considerare i controlli allo stesso modo dei campioni del dosaggio. Per il range dei valori del controllo si rimanda al certificato di analysis o all'etichetta presente sulla fiala. Conservare i controlli ricostituiti in aliquote a -20°C. Evitare ripetuti cicli di scongelamento.

#### 4.6. Aggiunta di reagenti coloranti: colorante blu, colorante verde

Per aiutare i clienti ad evitare errori di pipettamento con i kit Platinum ELISA, eBioscience offre ora una nuovo strumento che aiuta a controllare, mediante l'aggiunta di soluzione colorata, ciascuna fase della procedura ELISA.

**Questa procedura è facoltativa**, non interferisce in alcun modo con i risultati del test ed ha l'obiettivo di facilitare l'esecuzione del test da parte del cliente, ma può anche essere tralasciata seguendo semplicemente il libretto di istruzioni.

In alternativa, è possibile aggiungere ai reagenti le soluzioni coloranti incluse nel kit (colorante blu, colorante verde) attenendosi alle linee guida seguenti:

- 1. Diluente:** Prima di diluire il standard aggiungere il **Colorante blu** alla concentrazione di 1:250 (vedere la tabella seguente) alla soluzione tampone (1x) secondo il protocollo del test. Dopo l'aggiunta del **Colorante blu**, procedere secondo il libretto di istruzioni.

|                             |                             |
|-----------------------------|-----------------------------|
| 5 ml Diluente del campione  | 20 µl <b>Colorante blu</b>  |
| 12 ml Diluente del campione | 48 µl <b>Colorante blu</b>  |
| 50 ml Diluente del campione | 200 µl <b>Colorante blu</b> |

**2. HRP-Coniugato:** prima di diluire il HRP-Coniugato, aggiungere il **Colorante verde** alla concentrazione di 1:100 (vedere la tabella seguente) alla soluzione tampone utilizzata per la diluizione finale del coniugato. Procedere dopo l'aggiunta del **Colorante verde** secondo il libretto di istruzioni e la preparazione del HRP-Coniugato.

|                               |                               |
|-------------------------------|-------------------------------|
| 3 ml Tampone del saggio (1x)  | 30 µl <b>Colorante verde</b>  |
| 6 ml Tampone del saggio (1x)  | 60 µl <b>Colorante verde</b>  |
| 12 ml Tampone del saggio (1x) | 120 µl <b>Colorante verde</b> |

## 5. Procedura del Test

- a. Rimuovere **la piastra per diluizione** di buste. Stabilire il numero di strip dei micropozzetti necessarie per analizzare la quantità desiderata di campioni più le strip per i bianchi e gli standard. Tutti i campioni, gli standard, il bianco e i campioni di controllo opzionali devono essere processati in duplicato.
- b. **Diluizione dello standard in micropozzetti de la piastra per diluizione** (alternativamente la diluizione dello standard può avvenire in tubi – vedi 4.4.1)

Aggiungere 100 µl di Diluente del campione in duplicato a tutti i **pozzetti dello standard**. Pipettare 100 µl **standard** preparato (vedi preparazione dello standard 4.4.1, concentrazione = 20.00 ng/ml) in duplicato nei pozzetti A1 e A2 (vedi tabella 1). Mescolare il contenuto dei pozzetti A1 e A2 attraverso ripetute aspirazione ed iniezioni (concentrazione dello standard 1, S1 = 10.00 ng/ml) e trasferire 100 µl, rispettivamente, ai pozzetti B1 e B2 (vedere Figura 2). Fare attenzione a non graffiare la parte interna dei pozzetti. Continuare questa procedura per 5 volte, creando due colonne di standard in diluizione con concentrazione da 10.00 a 0.16 ng/ml. Buttare 100 µl del contenuto degli ultimi pozzetti (G1 e G2).

In caso di **diluizione esterna dello standard** (vedi 4.4.1) pipettare 100 µl di queste diluizioni standard (S1 – S7) nei pozzetti degli standard come da tabella 1.



Figura 2

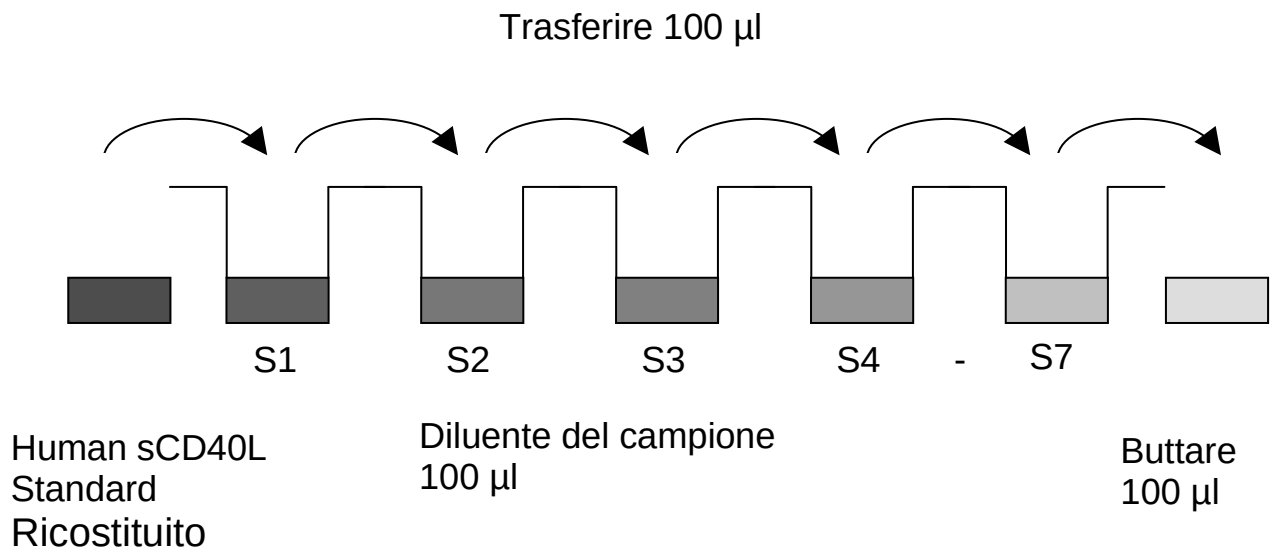


Tabella 1

Tabella rappresenta un esempio dell'organizzazione dei bianchi, standardi e campioni nei pozzetti:

|          | <b>1</b>                    | <b>2</b>                    | <b>3</b>   | <b>4</b>   |
|----------|-----------------------------|-----------------------------|------------|------------|
| <b>A</b> | Standard 1<br>(10.00 ng/ml) | Standard 1<br>(10.00 ng/ml) | Campione 1 | Campione 1 |
| <b>B</b> | Standard 2<br>(5.00 ng/ml)  | Standard 2<br>(5.00 ng/ml)  | Campione 2 | Campione 2 |
| <b>C</b> | Standard 3<br>(2.50 ng/ml)  | Standard 3<br>(2.50 ng/ml)  | Campione 3 | Campione 3 |
| <b>D</b> | Standard 4<br>(1.25 ng/ml)  | Standard 4<br>(1.25 ng/ml)  | Campione 4 | Campione 4 |
| <b>E</b> | Standard 5<br>(0.63 ng/ml)  | Standard 5<br>(0.63 ng/ml)  | Campione 5 | Campione 5 |
| <b>F</b> | Standard 6<br>(0.31 ng/ml)  | Standard 6<br>(0.31 ng/ml)  | Campione 6 | Campione 6 |
| <b>G</b> | Standard 7<br>(0.16 ng/ml)  | Standard 7<br>(0.16 ng/ml)  | Campione 7 | Campione 7 |
| <b>H</b> | Bianco                      | Bianco                      | Campione 8 | Campione 8 |

- c. Dispensare 100 µl di **Diluente del campione** in duplicato ai **pozzetti de bianco** de la piastra per diluizione.
- d. Dispensare 80 µl di **Diluente del campione** in duplicato ai **pozzetti dei campioni** de la piastra per diluizione.
- e. Dispensare 20 µl di **campione** in duplicato ai **pozzetti dei campioni** de la piastra per diluizione.
- f. Preparare la **HRP-coniugato** (consultare la sezione HRP-coniugato 4.3 sulla preparazione dei reagenti).

- g. Dispensare 100 µl di **HRP-coniugato** a ciascun pozzetto de la piastra per diluizione.
- h. Rimuovere la **piastra micropozzetti rivestita** con anticorpo monoclonale anti human sCD40L di buste. Rimuovere dal supporto le strip micropozzetti non utilizzate e conservarle nella bustina metallica contenente la polvere essiccante, mantenendole a 2°-8°C e perfettamente sigillate.
- i. Lavare due volte le strip micropozzetti utilizzando circa 400 µl di **tampone di lavaggio** per pozzetto, aspirando accuratamente il contenuto dei micropozzetti tra un lavaggio e l'altro. Permettere al tampone di lavaggio di rimanere, nei pozzetti, circa **10-15 secondi** prima dell'aspirazione. Evitare di scalfire la superficie dei micropozzetti.  
Dopo l'ultimo lavaggio, asciugare le strip micropozzetti con un tampone o carta assorbente per rimuovere il tampone di lavaggio in eccesso. Utilizzare le strip subito dopo il lavaggio o sistemarle capovolte su carta assorbente umida per non più di 15 min. **Non lasciar asciugare i pozzetti.**
- j. **Mescolare** il contenuto di ogni pozzetto della piastra di diluizione mediante aspirazione ed espulsione e **trasferire** 150 ul di ciascuna miscela di reazione dalla piastra di diluizione ai pozzetti de la piastra micropozzetti rivestita con anticorpo monoclonale anti human sCD40L nello stesso modo in cui è stata preparata la piastra di diluizione (vedi Tabella 1).
- k. **Coprire** con un copripiastra ed incubare a temperatura ambiente (18°-25°C) per 2 ore su un agitatore per micropiastre a 400 rpm Se non è disponibile un agitatore, in alternativa la micropiastra può essere incubata a 4 °C over night.
- l. Rimuovere il copripiastra e svuotare i pozzetti. **Lavare** le strip della pozzeti 3 volte come descritto in punto 5.i. del protocollo. Procedere immediatamente al punto successivo.
- m. Pipettare 100 µl di **soluzione substrato TMB** in tutti i pozzetti, inclusi quelli del blank.
- n. Incubare le strip a temperatura ambiente (18°-25° C) per circa 10 minuti. Evitare l'esposizione diretta a luci intense.

**È necessario monitorare i valori O.D. a livello della piastra e interrompere la reazione del substrato (vedi il punto prossimo del protocollo) prima che i pozzetti positivi cessino di essere appropriatamente registrabili.**

**La determinazione del tempo necessario per lo sviluppo del colore dev'essere fatto per ogni singolo parametro.**

Si raccomanda di aggiungere la soluzione di stop quando lo standard più elevato ha sviluppato un colore blu scuro.

Alternativamente lo sviluppo del colore può essere monitorato con un lettore ELISA a 620 nm. La reazione del substrato deve essere bloccata non appena viene misurato un valore delle OD di 0.9 - 0.95.

- o. Interrompere la reazione enzimatica pipettando rapidamente 100 µl di **soluzione bloccante** in ciascun pozzetto, inclusi i pozzetti del bianco. È importante che la soluzione bloccante si diffonda rapidamente e uniformemente attraverso i micropozzetti per inattivare completamente l'enzima. I risultati devono essere letti immediatamente dopo l'aggiunta della soluzione bloccante o entro 1 ora se le strip sono conservate in un luogo buio a 2°-8° C.
- p. Leggere l'assorbanza di ciascun micropozzetto su uno spettrofotometro che utilizza 450 nm come lunghezza d'onda primaria (620 nm come lunghezza d'onda di riferimento alternativa; valori da 610 nm a 650 nm sono accettabili). Azzerare il lettore della piastra secondo le istruzioni del produttore e utilizzando i pozzetti del bianco. Determinare l'assorbanza sia dei campioni, sia degli standard di human SCD40L.

**I campioni sono stati diluiti 1:5, quindi la concentrazione dalla curva standard risultante deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione (x5).**

**Annotazione: In caso di incubazione senza agitazione i valori di densità ottica (O.D.) potranno essere più bassi di quanto indicato sotto. Tuttavia i risultati saranno da ritenersi validi.**