






PRODUCT INFORMATION & MANUAL

Human VEGF-A Platinum ELISA

Enzyme-linked Immunosorbent Assay for
quantitative detection of human VEGF-A.

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

 *BMS277/2CE*
BMS277/2TENICE

 *96 TESTS*



*Human VEGF-A
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.

TABLE OF CONTENTS

1.	Intended Use	4
2.	Summary	4
3.	Principles of the Test	6
4.	Reagents Provided	8
5.	Storage Instructions – ELISA Kit	10
6.	Specimen Collection and Storage Instructions	10
7.	Materials Required But Not Provided	11
8.	Precautions for Use	12
9.	Preparation of Reagents	14
10.	Test Protocol	19
11.	Calculation of Results	24
12.	Limitations	27
13.	Performance Characteristics	28
14.	Ordering Information	34
15.	Reagent Preparation Summary	35
16.	Test Protocol Summary	36
PRODUKTINFORMATION UND HANDBUCH (Deutsch)		37
1.	Mitgelieferte Reagenzien	37
2.	Lagerhinweise	39
3.	Sicherheitsvorkehrungen für den Gebrauch	40
4.	Vorbereitung der Reagenzien	42
5.	Testprotokoll	47
INFORMACIÓN Y MANUAL DEL PRODUCTO (Español)		52
1.	Reactivos Suministrados	52
2.	Instrucciones de Conservación	54
3.	Precauciones de uso	55
4.	Preparación de los Reactivos	57
5.	Protocolo de Ensayo	63

INFORMATIONS SUR LE PRODUIT ET MANUEL (Français)	68
1. Réactifs Fournis	68
2. Instruction de Stockage	70
3. Préventions de Sécurité pour l'Usage	71
4. Préparation des Réactifs	73
5. Protocole de Test	79
INFORMAZIONI SUL PRODOTTO E MANUALE (Italiano)	84
1. Reagenti Forniti	84
2. Istruzioni di Conservazione	86
3. Precauzioni per l'Uso	87
4. Preparazione dei Reagenti	89
5. Procedura del Test	95

1. Intended Use

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

2. Summary

Normal tissue function depends on a regular supply of oxygen through the blood vessels. Understanding the formation of blood vessels has become the focus of a major research effort throughout the last decade.

Vasculogenesis in the embryo is the process by which new blood vessels are generated *de novo* from primitive precursor cells. Angiogenesis is the process of new blood vessel formation from pre-existing vasculatures. It plays an essential role in development, normal tissue growth, wound healing, the female reproductive cycle (placental development, ovulation, corpus luteum) and also plays a major role in various diseases. Special interest is focused on tumor growth, since tumors cannot grow more than a few millimeters in size without developing a new blood supply. This process is described as tumor angiogenesis which is also essential for the spread and growth of tumor cell metastasis. One of the key molecules for angiogenesis and for the survival of the endothelium is vascular endothelial growth factor (VEGF-A). It is a specific endothelial cell mitogen and a strong vascular permeability factor (VPF). VEGF-A is a heparin-binding glycoprotein, secreted as a homodimer of 45 kDa by many different cell types. VEGF-A also causes vasodilation through the nitric oxide synthase pathway in endothelial cells and can activate migration in monocytes. Many different splice variants of VEGF-A have been described, but VEGF₁₆₅ is the most predominant protein and anchors with its heparin binding domain to extracellular matrix and to heparin sulfate. During the past few years, several other members of the VEGF family have been cloned, including VEGF-B, -C- and -D. In terms of vascular angiogenesis, which mainly is regulated by VEGF-A, lymphangiogenesis is mainly regulated by VEGF-C and -D.

VEGF-A transcription is highly activated by hypoxia and by oncogenes like H-ras and several transmembrane tyrosine kinases, such as epidermal growth factor receptor and ErbB2. Together these pathways account for a marked upregulation of VEGF-A in tumors compared to normal tissues and are often of prognostic importance and relevance. VEGF-A can be detected in both plasma and serum samples of patients, with much higher levels in serum. Extremely high levels can be detected in the cystic brain fluid of

brain tumor patients or in ascites fluid of patients. Platelets release VEGF-A upon aggregation and may be another major source of VEGF-A delivery to tumors. Several other studies have shown that association of high serum levels of VEGF-A with poor prognosis in cancer patients may be correlated with an elevated platelet count. Tumors can release cytokines and growth factors that stimulate the production of megakaryocytes in the marrow and elevate the platelet count. This can result in another, indirect increase of VEGF-A delivery to tumors. Furthermore, VEGF-A is implicated in several other pathological conditions associated with enhanced angiogenesis or enhanced vascular permeability. Examples where VEGF-A plays an important role are psoriasis and rheumatoid arthritis, as well as the ovarian hyperstimulation syndrome. Diabetic retinopathy is associated with high intraocular levels of VEGF-A, and inhibition of VEGF-A function may result in infertility by blockage of corpus luteum function. Direct demonstration of the importance of VEGF-A in tumor growth has been achieved using dominant negative VEGF receptors to block in vivo proliferation, as well as blocking antibodies to VEGF or to one of the VEGF receptors. Interference with VEGF-A function has therefore become of major interest for drug development to block angiogenesis and metastasis. More than 110 pharmaceutical companies world-wide are involved in the development of such antagonists. Their approaches include antagonists of VEGF-A or its receptors, selective tyrosine kinase inhibitors, targeting of drugs and toxins to VEGF receptors and gene therapy regulated by the same hypoxia pathway that controls VEGF-A production, Targeting the VEGF signalling may be of major therapeutic importance for many diseases and serves as a basis for the design of future (anti)-angiogenic treatments.

For literature update refer to **www.eBioscience.com**

3. Principles of the Test

An anti-human VEGF-A coating antibody is adsorbed onto microwells.

Human VEGF-A present in the sample or standard binds to antibodies adsorbed to the microwells.

Following incubation unbound biological components are removed during a wash step. A biotin-conjugated anti-human VEGF-A antibody is added and binds to human VEGF-A captured by the first antibody.

Following incubation unbound biotin-conjugated anti-human VEGF-A antibody is removed during a wash step. Streptavidin-HRP is added and binds to the biotin-conjugated anti-human VEGF-A antibody.

Figure 1

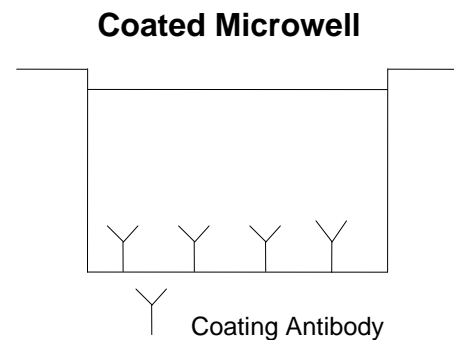


Figure 2

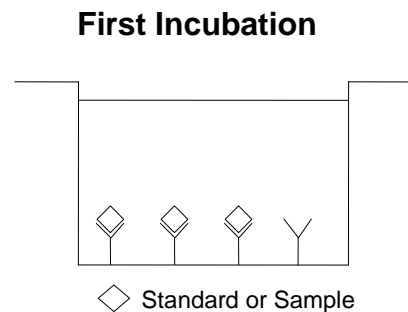


Figure 3

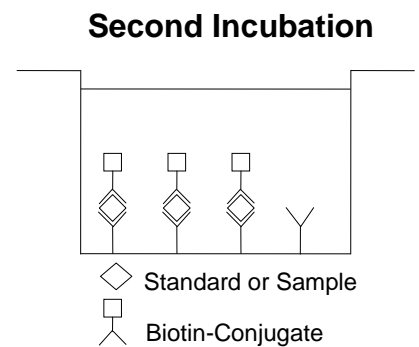
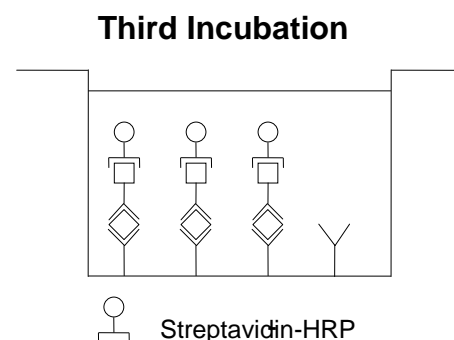


Figure 4



Following incubation unbound Streptavidin-HRP 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 VEGF-A 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 VEGF-A standard dilutions and human VEGF-A sample concentration determined.

Figure 5

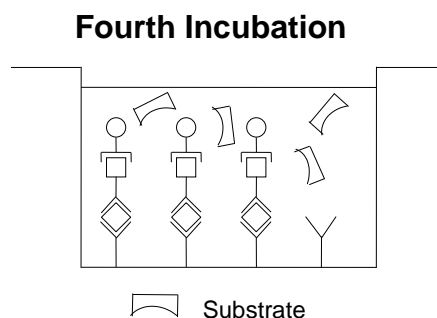
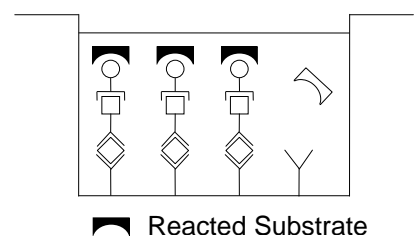


Figure 6



4. Reagents Provided

4.1 Reagents for human VEGF-A ELISA BMS277/2CE (96 tests)

- 1 aluminium pouch with a **Microwell Plate coated** with polyclonal antibody to human VEGF-A
- 1 vial (120 µl) **Biotin-Conjugate** anti-human VEGF-A polyclonal antibody
- 1 vial (150 µl) **Streptavidin-HRP**
- 2 vials human VEGF-A **Standard** lyophilized, 2 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**
- 1 vial (0.4 ml) **Red-Dye**
- 6 **Adhesive Films**

4.2 Reagents for human VEGF-A ELISA BMS277/2TENCE (10x96 tests)

- 10 aluminium pouches with a **Microwell Plate coated** with polyclonal antibody to human VEGF-A
- 10 vials (120 µl) **Biotin-Conjugate** anti-human VEGF-A polyclonal antibody
- 10 vials (150 µl) **Streptavidin-HRP**
- 10 vials human VEGF-A **Standard** lyophilized, 2 ng/ml upon reconstitution
- 10 vials **Control high**, lyophilized
- 10 vials **Control low**, lyophilized
- 10 vials (12 ml) **Sample Diluent**
- 3 vials (5 ml) **Assay Buffer Concentrate 20x**
(PBS with 1% Tween 20 and 10% BSA)
- 8 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**
- 6 vials (0.4 ml) **Red-Dye**
- 30 **Adhesive Films**

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

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 VEGF-A. 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.

* Pay attention to a possibly elevated serum level of human VEGF-A due to VEGF-A release by platelets during platelet activation (sampling process).

7. Materials Required But Not Provided

- 5 ml and 10 ml graduated pipettes
- 5 μ l to 1000 μ l adjustable single channel micropipettes with disposable tips
- 50 μ l to 300 μ 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) (ml)	Distilled Water (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) (ml)	Distilled Water (ml)
1 - 6	2.5	47.5
1 - 12	5.0	95.0

9.3. Biotin-Conjugate

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

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

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

9.4. Streptavidin-HRP

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

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

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

9.5. Human VEGF-A Standard

Reconstitute **human VEGF-A 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 = 2 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 microwell plate (see 10.c) or alternatively in tubes (see 9.5.1).

9.5.1. 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 µl of Sample Diluent into each tube.

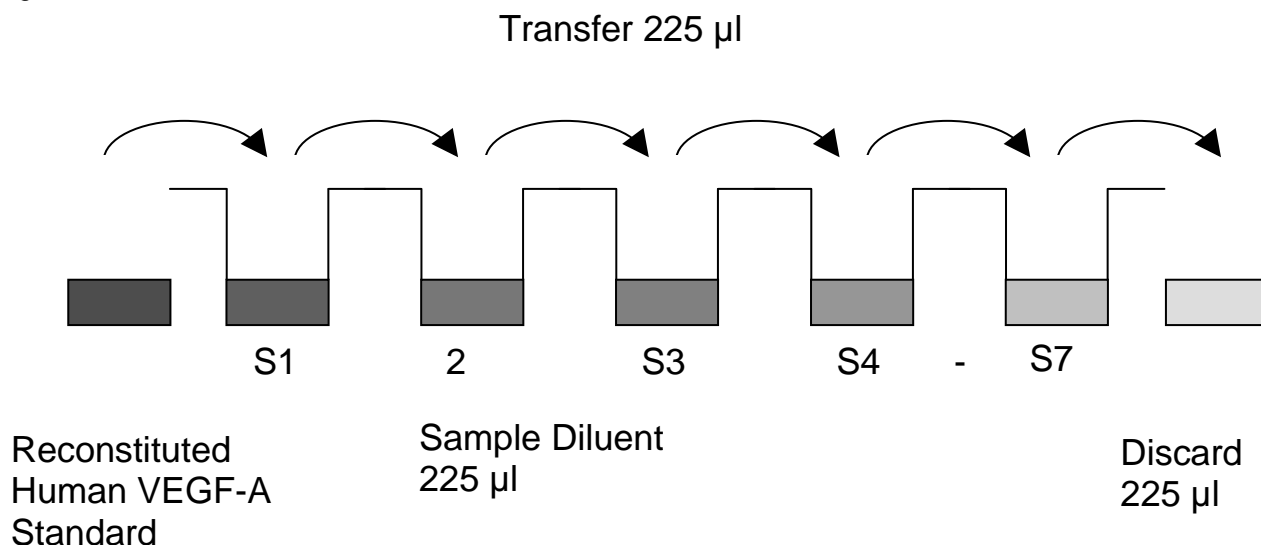
Pipette 225 µl of reconstituted standard (concentration of standard = 2 ng/ml) into the first tube, labelled S1, and mix (concentration of standard 1 = 1 ng/ml).

Pipette 225 µl 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 7).

Sample Diluent serves as blank.

Figure 7



9.6. Controls

Reconstitute by adding 500 μ l distilled water to lyophilized **controls** (10-30 minutes). Swirl or mix gently to ensure complete and homogeneous solubilization. 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.

9.7. Addition of Colour-giving Reagents: Blue-Dye, Green-Dye, Red-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, Red-Dye**) can be added to the reagents according to the following guidelines:

1. Diluent:

Before standard and sample 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 Blue-Dye
12 ml Sample Diluent	48 µl Blue-Dye
50 ml Sample Diluent	200 µl Blue-Dye

2. Biotin-Conjugate:

Before dilution of the concentrated Biotin-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 Biotin-Conjugate.

3 ml Assay Buffer (1x)	30 µl Green-Dye
6 ml Assay Buffer (1x)	60 µl Green-Dye
12 ml Assay Buffer (1x)	120 µl Green-Dye

3. Streptavidin-HRP:

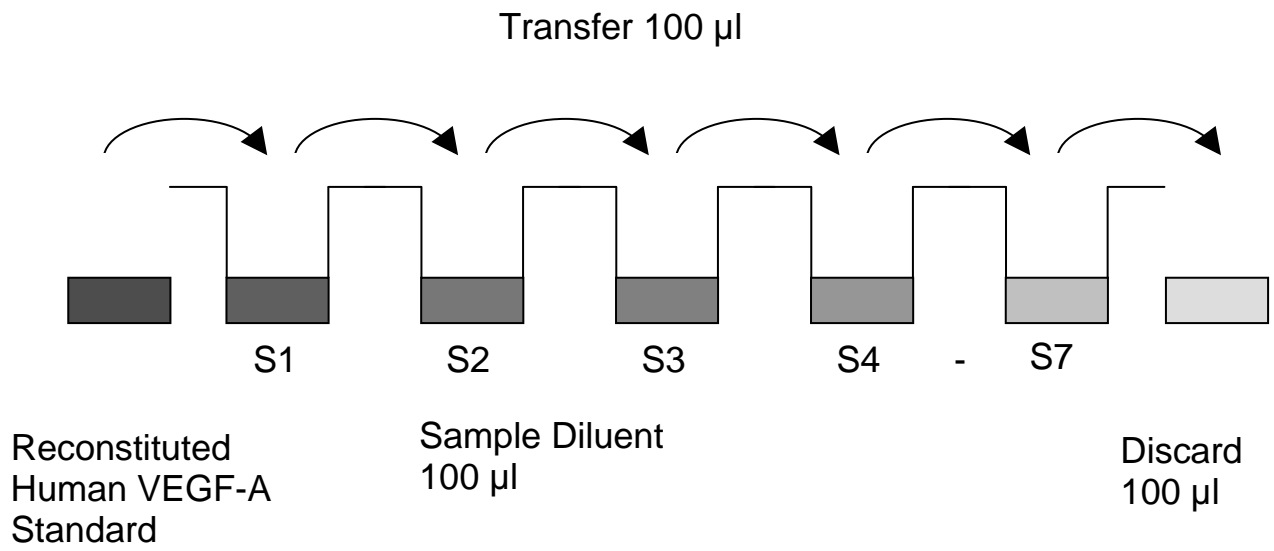
Before dilution of the concentrated Streptavidin-HRP, add the **Red-Dye** at a dilution of 1:250 (see table below) to the Assay Buffer (1x) used for the final Streptavidin-HRP dilution. Proceed after addition of **Red-Dye** according to the instruction booklet: Preparation of Streptavidin-HRP.

6 ml Assay Buffer (1x)	24 µl Red-Dye
12 ml Assay Buffer (1x)	48 µl Red-Dye

10. Test Protocol

- a. 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. Remove extra microwell strips from holder and store in foil bag with the desiccant provided at 2°-8°C sealed tightly.
- b. 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.**
- c. **Standard dilution on the microwell plate** (Alternatively the standard dilution can be prepared in tubes - see 9.5.1):
Add 100 µl of Sample Diluent in duplicate to all **standard wells**.
Pipette 100 µl of undiluted prepared **standard** (see Preparation of Standard 9.5, concentration = 2000.0 pg/ml) in duplicate into well A1 and A2 (see Table 1). Mix the contents of wells A1 and A2 by repeated aspiration and ejection (concentration of standard 1, S1 = 1000 pg/ml), and transfer 100 µl to wells B1 and B2, respectively (see Figure 8). Take care not to scratch the inner surface of the microwells. Continue this procedure 5 times, creating two rows of human VEGF-A standard dilutions ranging from 1000.0 to 15.6 pg/ml. Discard 100 µl of the contents from the last microwells (G1, G2) used.

Figure 8



In case of an **external standard dilution** (see 9.5.1), pipette 100 µl of these standard dilutions (S1 - S7) in the standard wells according to Table 1.

Table 1

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

	1	2	3	4
A	Standard 1 (1000.0 pg/ml)	Standard 1 (1000.0 pg/ml)	Sample 1	Sample 1
B	Standard 2 (500.0 pg/ml)	Standard 2 (500.0 pg/ml)	Sample 2	Sample 2
C	Standard 3 (250.0 pg/ml)	Standard 3 (250.0 pg/ml)	Sample 3	Sample 3
D	Standard 4 (125.0 pg/ml)	Standard 4 (125.0 pg/ml)	Sample 4	Sample 4
E	Standard 5 (62.5 pg/ml)	Standard 5 (62.5 pg/ml)	Sample 5	Sample 5
F	Standard 6 (31.3 pg/ml)	Standard 6 (31.3 pg/ml)	Sample 6	Sample 6
G	Standard 7 (15.6 pg/ml)	Standard 7 (15.6 pg/ml)	Sample 7	Sample 7
H	Blank	Blank	Sample 8	Sample 8

- d. Add 100 µl of **Sample Diluent** in duplicate to the **blank wells**.
- e. Add 50 µl of **Sample Diluent** to the **sample wells**.
- f. Add 50 µl of each **sample** in duplicate to the **sample wells**.
- g. 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. (**Shaking is absolutely necessary for an optimal test performance.**)
- h. Prepare **Biotin-Conjugate** (see Preparation of Biotin-Conjugate 9.3).
- i. Remove adhesive film and empty wells. **Wash** microwell strips 6 times according to point b. of the test protocol. Proceed immediately to the next step.
- j. Add 100 µl of **Biotin-Conjugate Conjugate Mixture** to all wells.
- k. Cover with an adhesive film and incubate at room temperature (18 to 25°C) for 1 hour, on a microplate shaker set at 400 rpm. (**Shaking is absolutely necessary for an optimal test performance.**)
- l. Prepare **Streptavidin-HRP** (refer to Preparation of Streptavidin-HRP 9.4).
- m. Remove adhesive film and empty wells. **Wash** microwell strips 6 times according to point b. of the test protocol. Proceed immediately to the next step.
- n. Add 100 µl of diluted **Streptavidin-HRP** to all wells, including the blank wells.
- o. Cover with an adhesive film and incubate at room temperature (18° to 25°C) for 1 hour, on a microplate shaker set at 400 rpm. (**Shaking is absolutely necessary for an optimal test performance.**)
- p. Remove adhesive film and empty wells. **Wash** microwell strips 6 times according to point b. of the test protocol. Proceed immediately to the next step.
- q. Pipette 100 µl of **TMB Substrate Solution** to all wells.

- r. Incubate the microwell strips at room temperature (18° to 25°C) for **about 30** 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.

- s. 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.
- t. 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.

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 VEGF-A 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 VEGF-A 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 VEGF-A concentration.
- **If instructions in this protocol have been followed samples have been diluted 1:2 (50 µl sample + 50 µl Sample Diluent), the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor (x 2).**
- **Calculation of samples with a concentration exceeding standard 1 may result in incorrect, low human VEGF-A levels. Such samples require further external predilution according to expected human VEGF-A values with Sample Diluent in order to precisely quantitate the actual human VEGF-A level.**
- It is suggested that each testing facility establishes a control sample of known human VEGF-A 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 9. This curve cannot be used to derive test results. Each laboratory must prepare a standard curve for each group of microwell strips assayed.

Figure 9

Representative standard curve for human VEGF-A ELISA. Human VEGF-A 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.

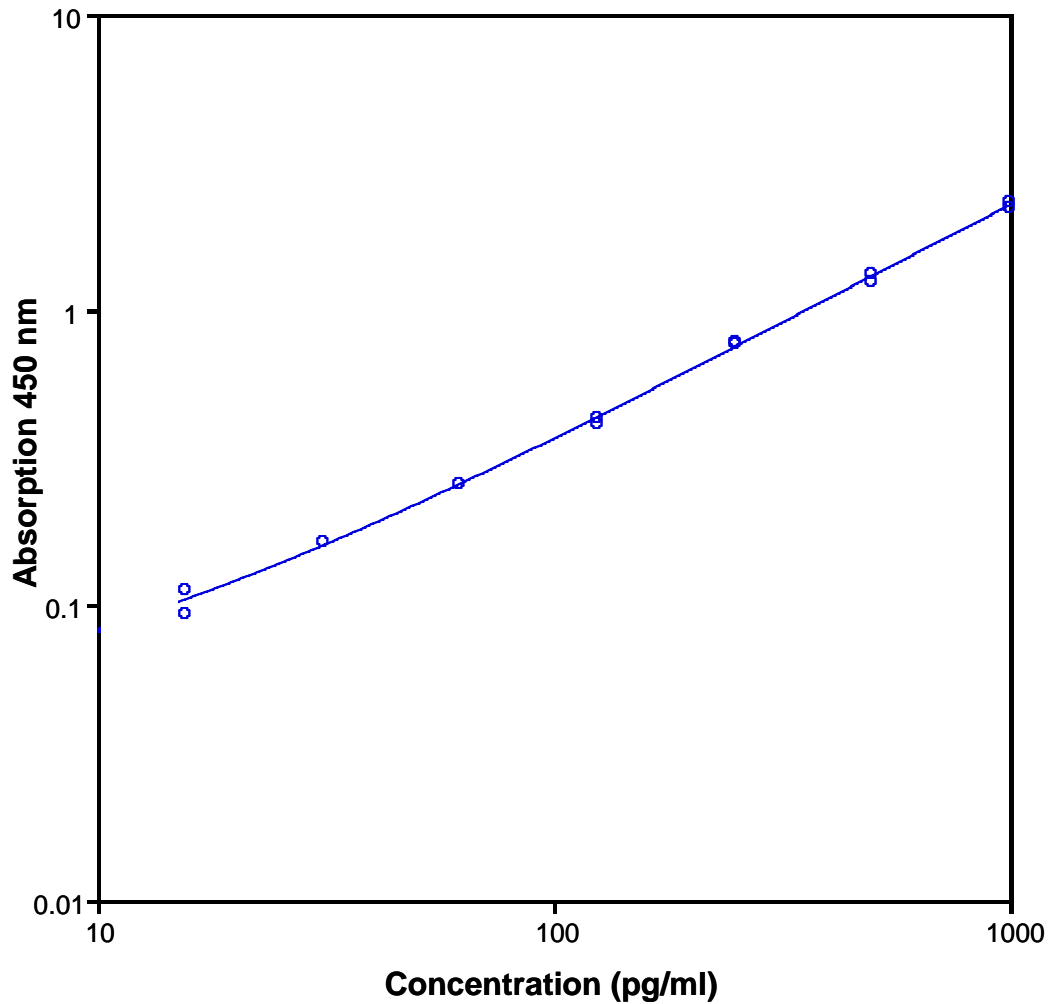


Table 2

Typical data using the human VEGF-A ELISA

Measuring wavelength: 450 nm

Reference wavelength: 620 nm

Standard	Human VEGF-A Concentration (pg/ml)	O.D. at 450 nm	Mean O.D. at 450 nm	C.V. (%)
1	1000.0	2.201 2.308	2.254	2.4
2	500.0	1.244 1.327	1.286	3.2
3	250.0	0.766 0.775	0.771	0.6
4	125.0	0.409 0.429	0.419	2.5
5	62.5	0.258 0.258	0.258	0.1
6	31.3	0.162 0.163	0.163	0.3
7	15.6	0.112 0.093	0.102	9.4
Blank	0	0.066 0.073	0.069	4.9

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.

13. Performance Characteristics

13.1. Sensitivity

The limit of detection of human VEGF-A 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 7.9 pg/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 VEGF-A. 2 standard curves were run on each plate. Data below show the mean human VEGF-A concentration and the coefficient of variation for each sample (see Table 3). The calculated overall intra-assay coefficient of variation was 6.2%.

Table 3

The mean human VEGF-A concentration and the coefficient of variation for each sample

Sample	Experiment	Mean Human VEGF-A Concentration (pg/ml)	Coefficient of Variation (%)
1	1	1596	3.7
	2	1496	2.9
	3	1507	1.8
2	1	881	2.6
	2	853	7.7
	3	888	5.3
3	1	439	3.5
	2	452	6.2
	3	469	10.3
4	1	897	7.1
	2	849	6.5
	3	844	5.7
5	1	119	11.7
	2	118	13.3
	3	130	7.8
6	1	85	8.3
	2	78	8.7
	3	83	2.6
7	1	256	5.2
	2	295	9.9
	3	304	3.1
8	1	371	3.9
	2	350	4.2
	3	352	6.2

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 VEGF-A. 2 standard curves were run on each plate. Data below show the mean human VEGF-A 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 4.3%.

Table 4

The mean human VEGF-A concentration and the coefficient of variation of each sample

Sample	Mean Human VEGF-A Concentration (pg/ml)	Coefficient of Variation (%)
1	1533	3.6
2	874	2.1
3	453	3.4
4	864	3.4
5	122	5.2
6	82	4.6
7	285	8.9
8	358	3.1

13.3. Spike Recovery

The spike recovery was evaluated by spiking 3 levels of human VEGF-A into serum, plasma and cell culture supernatant. Recoveries were determined with 4 replicates each. The amount of endogenous human VEGF-A in unspiked samples was subtracted from the spike values.

For recovery data see Table 5.

Table 5

Sample matrix	Spike high (%)	Spike medium (%)	Spike low (%)
Serum	88	85	81
Plasma (EDTA)	77	77	79
Plasma (citrate)	92	90	94
Plasma (heparin)	106	88	64
Cell culture supernatant	98	92	88

13.4. Dilution Parallelism

Serum, plasma and cell culture supernatant samples with different levels of human VEGF-A were analysed at serial 2 fold dilutions with 4 replicates each.

For recovery data see Table 6.

Table 6

Sample matrix	Recovery of Exp. Val.	
	Range (%)	Mean (%)
Serum	76 - 104	90
Plasma (EDTA)	93 - 147	110
Plasma (citrate)	83 - 99	90
Plasma (heparin)	98 - 119	108
Cell culture supernatant	72 - 103	91

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 VEGF-A levels determined. A significant decrease of human VEGF-A immunoreactivity was detected. Therefore samples should be stored in aliquots at -20°C and thawed only once.

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 VEGF-A level determined after 24 h. There was no significant loss of human VEGF-A immunoreactivity detected during storage at -20°C and 2-8°C. A significant loss of human VEGF-A immunoreactivity was detected during storage at RT and 37°C after 24 h.

13.6. Specificity

The assay detects both natural and recombinant human VEGF-A. 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 VEGF-A positive sample. There was no cross reactivity detected, notably not with human VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D and P1GF. Interference was detected for VEGF-R1 at concentrations > 200 pg/ml, and not for VEGF-R2.

13.7. Expected Values

Panels of 40 serum as well as EDTA, citrate and heparin plasma samples from randomly selected apparently healthy donors were tested for human VEGF-A.

The levels measured may vary with the sample collection used. For detected human VEGF-A levels see Table 7.

Table 7

Sample Matrix	Number of Samples Evaluated	Range (pg/ml)	% Detectable	Mean of Detectable (pg/ml)
Serum	40	nd *- 42.6	2.5	--
Plasma (EDTA)	40	nd *- 128.9	7.5	45.7
Plasma (Citrate)	40	nd *- 66.2	7.5	47.3
Plasma (Heparin)	40	nd *- 311.4	7.5	144.3

* n.d. = non-detectable, samples measured below the lowest standard point are considered to be non-detectable.

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.

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. Biotin-Conjugate

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

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

15.4. Streptavidin-HRP

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

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

15.5. Human VEGF-A Standard

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

15.6. Controls

Add 500 µl distilled water to lyophilized **controls**.

16. Test Protocol Summary

1. Determine the number of microwell strips required.
2. Wash microwell strips twice with Wash Buffer.
3. Standard dilution on the microwell plate: Add 100 µl Sample Diluent, in duplicate, to all standard wells. 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 9.5.1): Pipette 100 µl of these standard dilutions in the microwell strips.
4. Add 100 µl Sample Diluent, in duplicate, to the blank wells.
5. Add 50 µl Sample Diluent to sample wells.
6. Add 50 µl sample in duplicate, to designated sample wells.
7. Cover microwell strips and incubate 2 hours at room temperature (18° to 25°C). (Shaking is absolutely necessary for an optimal test performance.)
8. Prepare Biotin-Conjugate.
9. Empty and wash microwell strips 6 times with Wash Buffer.
10. Add 100 µl Biotin-Conjugate to all wells.
11. Cover microwell strips and incubate 1 hour at room temperature (18° to 25°C). (Shaking is absolutely necessary for an optimal test performance.)
12. Prepare Streptavidin-HRP.
13. Empty and wash microwell strips 6 times with Wash Buffer.
14. Add 100 µl diluted Streptavidin-HRP to all wells.
15. Cover microwell strips and incubate 1 hour at room temperature (18° to 25°C). (Shaking is absolutely necessary for an optimal test performance.)
16. Empty and wash microwell strips 6 times with Wash Buffer.
17. Add 100 µl of TMB Substrate Solution to all wells.
18. Incubate the microwell strips for about 30 minutes at room temperature (18° to 25°C).
19. Add 100 µl Stop Solution to all wells.
20. Blank microwell reader and measure colour intensity at 450 nm.

Note: If instructions in this protocol have been followed samples have been diluted 1:2 (50 µl sample + 50 µl Sample Diluent), the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor (x 2).

PRODUKTINFORMATION UND HANDBUCH (Deutsch)

1. Mitgelieferte Reagenzien

1.1. Mitgelieferte Reagenzien für human VEGF-A ELISA BMS277/2CE (96 Tests)

- 1 Aluminiumbeutel mit **Mikrotiterplatte, beschichtet** mit Antikörper (polyklonal) gegen human VEGF-A
- 1 Fläschchen (120 µl) **Biotin-Konjugat**, polyklonaler anti-human VEGF-A Antikörper
- 1 Fläschchen (150 µl) **Streptavidin-HRP**
- 2 Fläschchen human VEGF-A-**Standard**, lyophilisiert, 2 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**
- 1 Fläschchen (0.4 ml) **Farbstoff, rot**

6 Klebefolien

1.2. Mitgelieferte Reagenzien für human VEGF-A ELISA BMS277/2TENCE (10x96 Tests)

- 10 Aluminiumbeutel mit **Mikrotiterplatte, beschichtet** mit Antikörper (polyklonal) gegen human VEGF-A
- 10 Fläschchen (120 µl) **Biotin-Konjugat**, polyklonaler anti-human VEGF-A Antikörper
- 10 Fläschchen (150 µl) **Streptavidin-HRP**
- 10 Fläschchen human VEGF-A-**Standard**, lyophilisiert, 2 ng/ml nach Rekonstitution
- 10 Fläschchen lyophilisierte **Kontrolle, hoch konzentriert**
- 10 Fläschchen lyophilisierte **Kontrolle, niedrig konzentriert**
- 10 Fläschchen (12 ml) **Verdünnungslösung**
- 3 Fläschchen (5 ml) **Probenpufferkonzentrat 20x** (PBS mit 1% Tween 20 und 10% BSA)
- 8 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**
- 6 Fläschchen (0.4 ml) **Farbstoff, rot**
- 30 **Klebefolien**

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) (ml)	Destilliertes Wasser (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. Biotin-Konjugat

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

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

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

4.4. Streptavidin-HRP

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

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

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

4.5. Human VEGF-A-Standard

Rekonstituieren Sie den **human VEGF-A -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 = 2 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 den Mikrotiterplatten (siehe 5.c) oder in Reaktionsgefäßen (siehe 4.5.1) hergestellt werden.

4.5.1. Externe Standardverdünnung

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

Stellen Sie eine 1:2 Verdünnungsreihe für die Standardkurve her: Pipettieren Sie in jedes Gefäß 225 µl der Verdünnungslösung.

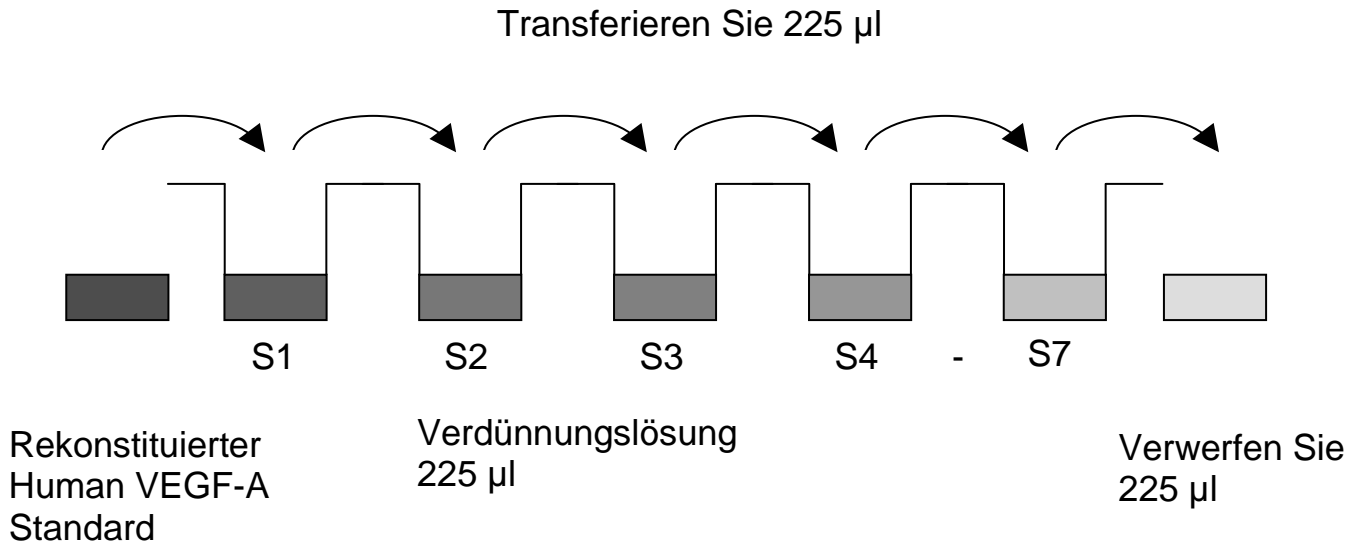
Pipettieren Sie 225 µl des rekonstituierten Standards (Konzentration des Standards = 2 ng/ml) in das erste Gefäß mit der Beschriftung S1 und mischen Sie (Konzentration des Standard 1 = 1 ng/ml).

Pipettieren Sie 225µl 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



4.6. Kontrollen

Lösen Sie die **Kontrollen** durch Zugabe von 500 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 Einfrieren und Auftauen.

4.7. Zugabe von Farbstoffen (blau, grün, rot)

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, rot**) den Reagenzien entsprechend den folgenden Angaben beigemischt:

1. Verdünnung

Vor der Verdünnung des Standards und der Proben 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 Verdünnungslösung	20 µl blauer Farbstoff
12 ml Verdünnungslösung	48 µl blauer Farbstoff
50 ml Verdünnungslösung	200 µl blauer Farbstoff

2. Biotin-Konjugat:

Mischen sie den **grünen Farbstoff** vor der Verdünnung des konzentrierten Biotin-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 Biotin-Konjugats.

3 ml Probenpuffer (1x)	30 µl grüner Farbstoff
6 ml Probenpuffer (1x)	60 µl grüner Farbstoff
12 ml Probenpuffer (1x)	120 µl grüner Farbstoff

3. Streptavidin-HRP:

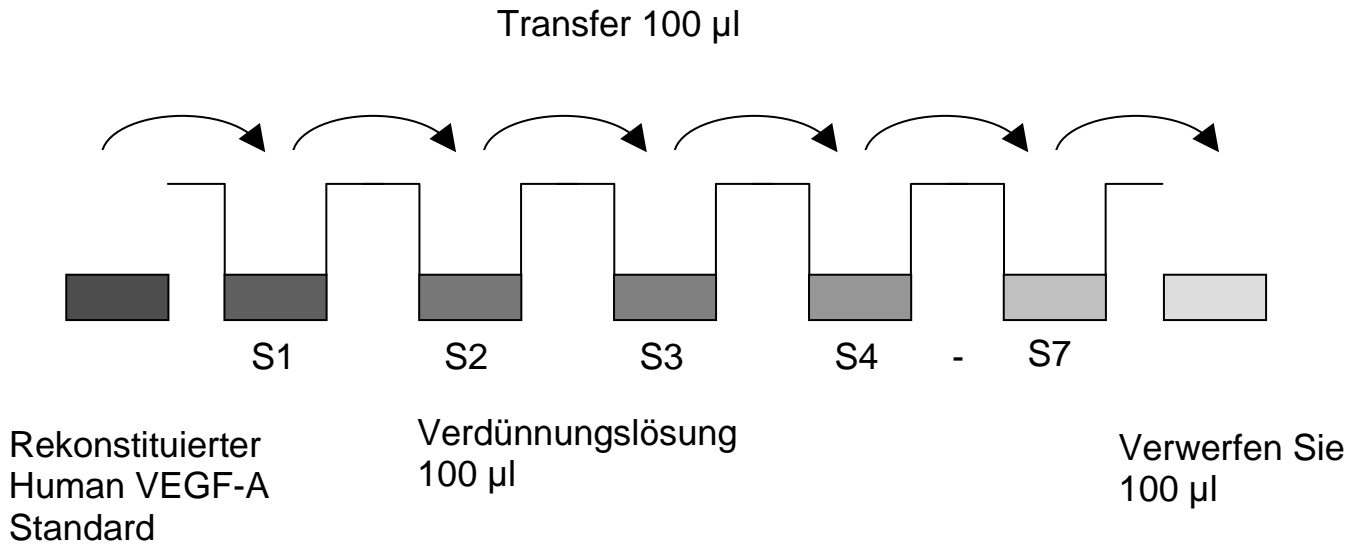
Geben Sie den **roten Farbstoff** vor der Verdünnung des konzentrierten Streptavidin-HRP in einer Verdünnung von 1:250 (siehe Tabelle unten) zu Probenpuffer (1x).
Nach der Zugabe des **roten Farbstoffes** fahren Sie entsprechend der Anleitung fort (Präparation Streptavidin-HRP).

6 ml Probenpuffer (1x)	24 µl roter Farbstoff
12 ml Probenpuffer (1x)	48 µl roter Farbstoff

5. Testprotokoll

- a. 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. 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.
- b. 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.**
- c. **Standardverdünnung auf der Mikrotiterplatte** (Wahlweise können die Standardverdünnungen auch in Reaktionsgefäßen hergestellt werden – siehe 4.5.1)
Pipettieren Sie 100 µl Verdünnungslösung in alle **Standardvertiefungen**. Pipettieren Sie 100 µl des rekonstituierten **Standards** (siehe Herstellung des Standards 4.5.1, Konzentration des Standards = 2000.0 pg/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 = 1000.0 pg/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 VEGF-A Verdünnungsreihen mit den Konzentrationen von 1000.0 bis 15.6 pg/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 4.5.1), pipettieren Sie 100 μ l 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:

	1	2	3	4
A	Standard 1 (1000.0 pg/ml)	Standard 1 (1000.0 pg/ml)	Probe 1	Probe 1
B	Standard 2 (500.0 pg/ml)	Standard 2 (500.0 pg/ml)	Probe 2	Probe 2
C	Standard 3 (250.0 pg/ml)	Standard 3 (250.0 pg/ml)	Probe 3	Probe 3
D	Standard 4 (125.0 pg/ml)	Standard 4 (125.0 pg/ml)	Probe 4	Probe 4
E	Standard 5 (62.5 pg/ml)	Standard 5 (62.5 pg/ml)	Probe 5	Probe 5
F	Standard 6 (31.3 pg/ml)	Standard 6 (31.3 pg/ml)	Probe 6	Probe 6
G	Standard 7 (15.6 pg/ml)	Standard 7 (15.6 pg/ml)	Probe 7	Probe 7
H	Blindwert	Blindwert	Probe 8	Probe 8

- d. Pipettieren Sie in alle **Blindwertvertiefungen** (Doppelbestimmung), 100 µl **Verdünnungslösung**.
- e. Pipettieren Sie in alle **Probenvertiefungen** 50 µl **Verdünnungslösung**.
- f. Pipettieren Sie je 50 µl von jeder **Probe** (Doppelbestimmung) in die **Probenvertiefungen** und mischen Sie den Inhalt durch.
- g. Mit einer Klebefolie abdecken und bei Raumtemperatur (18° bis 25°C) für 2 Stunden inkubieren, auf einem Schüttler bei 400 U/Min (**Schütteln ist absolut nötig, um korrekte Daten zu erzielen.**).

- h. Stellen Sie **Biotin-Konjugat** (siehe: Vorbereitung der Reagenzien Biotin-Konjugat 4.3) her.
- i. Entfernen Sie die Klebefolie und entleeren Sie die Vertiefungen. **Waschen** Sie die Mikrowellstreifen 6 mal wie in Punkt b des Testprotokolls beschrieben. Verwenden Sie die Mikrowellstreifen sofort nach dem Waschen.
- j. Pipettieren Sie in alle Vertiefungen, einschließlich der Blindwertvertiefungen 100 µl **Biotin-Konjugat**.
- k. Mit einer Klebefolie abdecken und bei Raumtemperatur (18° bis 25°C) für 1 Stunde inkubieren, auf einem Schüttler bei 400 U/Min (**Schütteln ist absolut nötig, um korrekte Daten zu erzielen.**).
- l. Stellen Sie **Streptavidin-HRP** (siehe: Vorbereitung der Reagenzien Streptavidin-HRP 4.4) her.
- m. Entfernen Sie die Klebefolie und leeren Sie die Vertiefungen. **Waschen** Sie die Mikrowellstreifen 6 mal wie in Punkt b des Testprotokolls beschrieben. Verwenden Sie die Mikrowellstreifen sofort nach dem Waschen.
- n. Pipettieren Sie in alle Vertiefungen, einschließlich der Blindwertvertiefungen 100 µl **Streptavidin-HRP**.
- o. Mit einer Klebefolie abdecken und bei Raumtemperatur (18° bis 25°C) für 1 Stunde inkubieren, auf einem Schüttler bei 400 U/Min (**Schütteln ist absolut nötig, um korrekte Daten zu erzielen.**).
- p. Entfernen Sie die Klebefolie und entleeren Sie die Vertiefungen. **Waschen** Sie die Mikrowellstreifen 6 mal wie in Punkt b des Testprotokolls beschrieben. Verwenden Sie die Mikrowellstreifen sofort nach dem Waschen.
- q. Pipettieren Sie in alle Vertiefungen, einschließlich der Blindwertvertiefungen, 100 µl **TMB-Substratlösung**.
- r. Inkubieren Sie die Mikrowellstreifen bei Raumtemperatur (18° bis 25°C) für ca. 30 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.

- s. 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 Beigabe der Stopplösung oder innerhalb einer Stunde nach Lagerung der Mikrowellstreifen in Dunkelheit bei 2-8°C gemessen werden.
- t. 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 der human VEGF-A-Standards.

Die Proben wurden im Zuge der Testdurchführung 1:2 verdünnt. Daher muß der aus der Standardkurve berechnete Wert mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden (x 2).

INFORMACIÓN Y MANUAL DEL PRODUCTO (Español)

1. Reactivos Suministrados

1.1. Reactivos Suministrados para human VEGF-A ELISA BMS277/2CE (96 tests)

- 1 bolsa de aluminio con **una placa de micropocillos recubiertos** con anticuerpos policlonales anti-human VEGF-A
- 1 vial (120 µl) con **conjugado de biotina** (anticuerpos policlonales anti-human VEGF-A)
- 1 vial (150 µl) con **estreptavidina-HRP**
- 2 viales con **Estándar** human VEGF-A liofilizado, 2 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**
- 1 vial (0.4 ml) **colorante rojo**
- 6 **tapas para placas**, adhesives

1.2. Reactivos Suministrados para human VEGF-A ELISA BMS277/2TENCE (10x96 tests)

- 10 bolsas de aluminio con **una placa de micropocillos recubiertos** con anticuerpos policlonales anti-human VEGF-A
- 10 viales (120 µl) con **conjugado de biotina** (anticuerpos policlonales anti-human VEGF-A)
- 10 viales (150 µl) con **estreptavidina-HRP**
- 10 viales con **Estándar** human VEGF-A liofilizado, 2 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**
- 3 viales (5 ml) de **concentrado de tampón de ensayo 20x** (PBS con Tween 20 al 1% y BSA al 10%)
- 8 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**
- 6 viales (0.4 ml) **colorante rojo**
- 30 **tapas para placas**, adhesives

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 temperatura (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 biotina

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

Justo antes de utilizar el **conjugado de biotina**, 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 biotina 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. Estreptavidina-HRP

Se utilizará el estreptavidina-HRP antes de transcurridos 30 minutos desde su dilución.

Se debe diluirlo la **estreptavidina-HRP** 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 la estreptavidina-HRP de acuerdo a la siguiente tabla:

Número de tiras	Estreptavidina-HRP (ml)	Tampón de ensayo (1x) (ml)
1 - 6	0.06	5.94
1 - 12	0.12	11.88

4.5. Dilución estándar human VEGF-A

Reconstituir el **estándar human VEGF-A** 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 = 2 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 multipocillo (véase 5.c) o alternativamente en tubos (véase 4.5.1).

4.5.1. 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 todos los tubos.

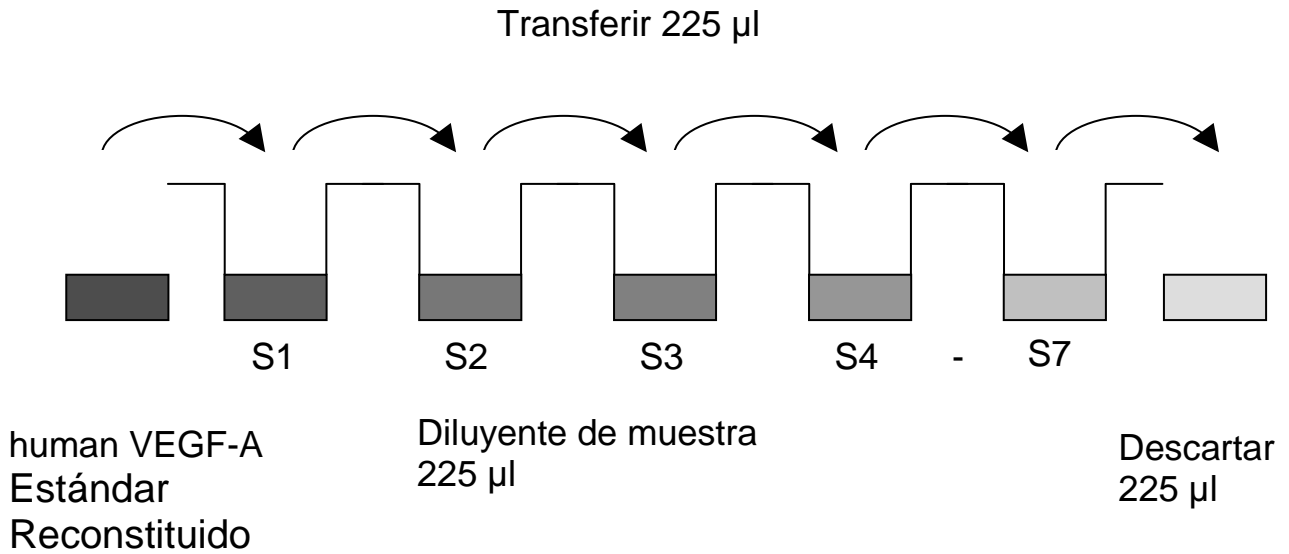
Pipetear 225 µl de estándar reconstituido (concentración del estándar = 2 ng/ml) en el primer tubo, etiquetado como S1, y mezclar (concentración del estándar S1 = 1 ng/ml).

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



4.6. Controles

Solubilizar añadiendo 500 μ l de agua destilada aux **controles** liofilizados. Permitir que el il controles liofilizados se asiente durante 10-30 minutos. Mezclar bien previamente a realizar las diluciones. Vortear concienzudamente para asegurar una solubilización homogénea y completa. A partir de aquí, tratar il controles 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 il controles reconstituido y alicuotado a -20°C . Evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación.

4.7. Adición de reactivos colorantes: Colorante azul, Colorante verde, Colorante rojo

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, colorante rojo**), conforme a las siguientes pautas:

- 1. Diluyente:** Antes de diluir el estándar y la muestra, 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 Colorante azul
12 ml de Diluyente de muestra	48 µl de Colorante azul
50 ml de Diluyente de muestra	200 µl de Colorante azul

- 2. Conjugado de bionta:** 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 bionta).

3 ml de Tampón de ensayo (1x)	30 µl de Colorante verde
6 ml de Tampón de ensayo (1x)	60 µl de Colorante verde
12 ml de Tampón de ensayo (1x)	120 µl de Colorante verde

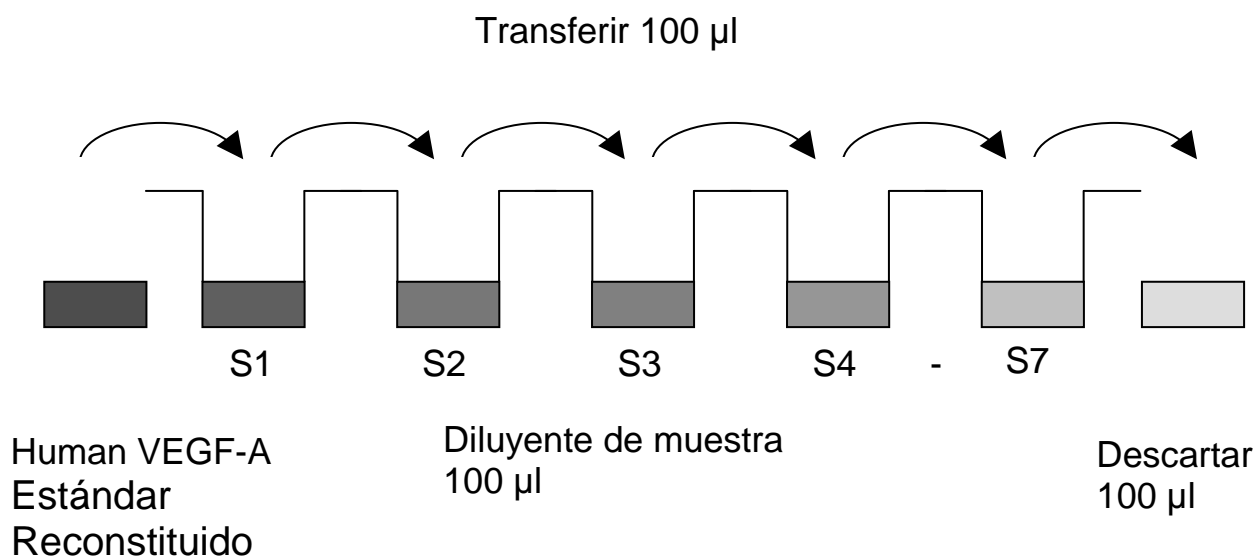
3. Estreptavidina-HRP: Antes de diluir el Estreptavidina-HRP concentrado, añade el **Colorante rojo** diluido en una proporción de 1:100 (véase la tabla siguiente) al Tampón de ensayo (1x) utilizado para la dilución final del Estreptavidina-HRP. Después de añadir el **Colorante rojo**, siga las instrucciones del manual (Estreptavidina-HRP).

6 ml de Tampón de ensayo (1x)	24 µl de Colorante rojo
12 ml de Tampón de ensayo (1x)	48 µl de Colorante rojo

5. Protocolo de Ensayo

- a. Determine el número de tiras necesarias para analizar el número deseado de muestras y además añada las tiras para blancos y patrones (de color). Todas las muestras, estándares, blancos y las posibles muestras de control deben ser analizadas por duplicado. 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. Coloque las tiras que contienen la curva de valoración en las posiciones A1/A2 a H1/H2 (véase la Tabla 1).
- b. 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.**
- c. **Dilución de los Estándars en la placa multipocillo**
(Alternativamente, la dilución de los estándares puede ser preparada en tubos – véase 4.5.1)
Añadir 100 µl de Diluyente de muestra a todos los **pocillos estándar**. Pipetear 100 µl de **estándar** no diluido (véase Preparación del Estándar 4.5, concentración = 2000.0 pg/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 =1000.0 pg/ml), y transferir 100 µl a los pocillos B1 y B2, respectivamente (véase Figura 2). Llevar cuidado de no rascar 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 VEGF-A ordenadas des de 1000.0 a 15.6 pg/ml. Descartar 100 µl de los contenidos de los últimos micropocillos (G1, G2) usados.

Figura 2



En caso de **una dilución estándar externa** (véase 4.5.1), pipetear 100 μ l de estas diluciones estándar (S1 - S7) en los pocillos correspondientes al estándar de acuerdo con la Tabla 1.

- d. Añada 100 μ l **Diluyente de muestra** a los **pocillos del blanco**, por duplicado.
- e. Añada 50 μ l de **Diluyente de muestra** a los **pocillos con muestras**.
- f. Por duplicado, añada 50 μ l de cada **muestra** a los **pocillos designados**.

Tabla 1

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

	1	2	3	4
A	Estándar 1 (1000.0 pg/ml)	Estándar 1 (1000.0 pg/ml)	Muestra 1	Muestra 1
B	Estándar 2 (500.0 pg/ml)	Estándar 2 (500.0 pg/ml)	Muestra 2	Muestra 2
C	Estándar 3 (250.0 pg/ml)	Estándar 3 (250.0 pg/ml)	Muestra 3	Muestra 3
D	Estándar 4 (125.0 pg/ml)	Estándar 4 (125.0 pg/ml)	Muestra 4	Muestra 4
E	Estándar 5 (62.5 pg/ml)	Estándar 5 (62.5 pg/ml)	Muestra 5	Muestra 5
F	Estándar 6 (31.3 pg/ml)	Estándar 6 (31.3 pg/ml)	Muestra 6	Muestra 6
G	Estándar 7 (15.6 pg/ml)	Estándar 7 (15.6 pg/ml)	Muestra 7	Muestra 7
H	Blanco	Blanco	Muestra 8	Muestra 8

- g. 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. **(La agitación es absolutamente necesaria para un desarrollo óptimo del test.)**
- h. Prepare la **conjugado de biotina** (véase la preparación de la conjugado de biotina 4.3).
- i. Retire la tapa y vacíe los pocillos. **Lavar** los micropocillos de las tiras 6 veces de acuerdo al punto b del protocolo del test. Proseguir inmediatamente después al próximo paso.
- j. Añada 100 µl **conjugado de biotina** a todos los pocillos.

- k. Cubra la placa con una tapa e incúbela a temperatura ambiente (18°C - 25°C) durante 1 hora en un agitador mecánico a 400 rpm. **(La agitación es absolutamente necesaria para un desarrollo óptimo del test.)**
- l. Prepare **estreptavidina-HRP** (véase la preparación de estreptavidina-HRP 4.4).
- m. Retire la tapa y vacíe los pocillos. **Lavar** los micropocillos de las tiras 6 veces de acuerdo al punto b del protocolo del test. Proseguir inmediatamente después al próximo paso.
- n. Añada 100 µl **estreptavidina-HRP** a todos los pocillos.
- o. Cubra la placa con una tapa e incúbela a temperatura ambiente (18°C - 25°C) durante 1 hora en un agitador mecánico a 400 rpm. **(La agitación es absolutamente necesaria para un desarrollo óptimo del test.)**
- p. Retire la tapa y vacíe los pocillos. **Lavar** los micropocillos de las tiras 6 veces de acuerdo al punto b del protocolo del test. Proseguir inmediatamente después al próximo paso.
- q. Pipetee 100 µl de **solución de sustrato TMB** y viértalos en todos los pocillos, incluidos los del blanco.
- r. Incube las tiras a temperatura ambiente (18°C - 25°C) durante aproximadamente 30 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.

- s. 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.
- t. 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 VEGF-A.

Las muestras han sido diluidas 1: 2, por tanto la concentración leída a partir de la curva estándar debe ser multiplicada por el factor de dilución (x 2).

INFORMATIONS SUR LE PRODUIT ET MANUEL (Français)

1. Réactifs Fournis

1.1. Reactifs pour ELISA de human VEGF-A BMS277/2CE (96 essais)

- 1 pochette en aluminium contenant **une plaque de microtitration** recouverte d'anticorps polyclonaux anti-human VEGF-A
- 1 flacon (120 µl) de **conjugué biotine** anti-human VEGF-A (anticorps polyclonaux anti-human VEGF-A)
- 1 flacon (150 µl) de **streptavidine-HRP**
- 2 flacons d'**étalon** human VEGF-A, lyophilisé, 2 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**
- 1 flacon (0.4 ml) de **colorant rouge**
- 6 **couvre-plaques** adhésifs

1.2. **Reactifs pour ELISA de human VEGF-A BMS277/2TENCE** (10x96 essais)

- 10 pochettes en aluminium contenant **une plaque de microtitration** recouverte d'anticorps polyclonaux anti-human VEGF-A
- 10 flacons (120 µl) de **conjugué biotine** anti-human VEGF-A (anticorps polyclonaux anti-human VEGF-A)
- 10 flacons (150 µl) de **streptavidine-HRP**
- 10 flacons d'**étalon** human VEGF-A, lyophilisé, 2 ng/ml après reconstitution
- 10 flacons de **contrôle élevé**, lyophilisé
- 10 flacons de **contrôle bas**, lyophilisé
- 10 flacons (12 ml) **diluant d'échantillon**
- 3 flacons (5 ml) **tampon d'essai concentré 20 x**
(PBS avec Tween 20 1% et de la sérumalbumine bovine 10%)
- 8 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**
- 6 flacons (0.4 ml) de **colorant rouge**
- 30 **couvre-plaques** adhésifs

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 dissoluer 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 biotine

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

Le **conjugué biotine** 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 biotine peut être préparé selon le tableau suivant :

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

4.4. Streptavidine-HRP

Noter que la Streptavidine-HRP doit être utilisée dans les 30 minutes qui suivent la dilution.

La **Streptavidine-HRP** doit être diluée au 1:100 avec le Tampon d'essai (1x) juste avant utilisation dans un tube à essais en plastique propre et mélanger doucement.

Le Streptavidine-HRP peut être préparé selon le tableau suivant :

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

4.5. Étalon human VEGF-A

Reconstituer **étalon human VEGF-A** en ajoutant d'eau distillée. 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 = 2 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 microtitration (voir 5.c) ou comme alternative dans des tubes (voir 4.5.1).

4.5.1. 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.

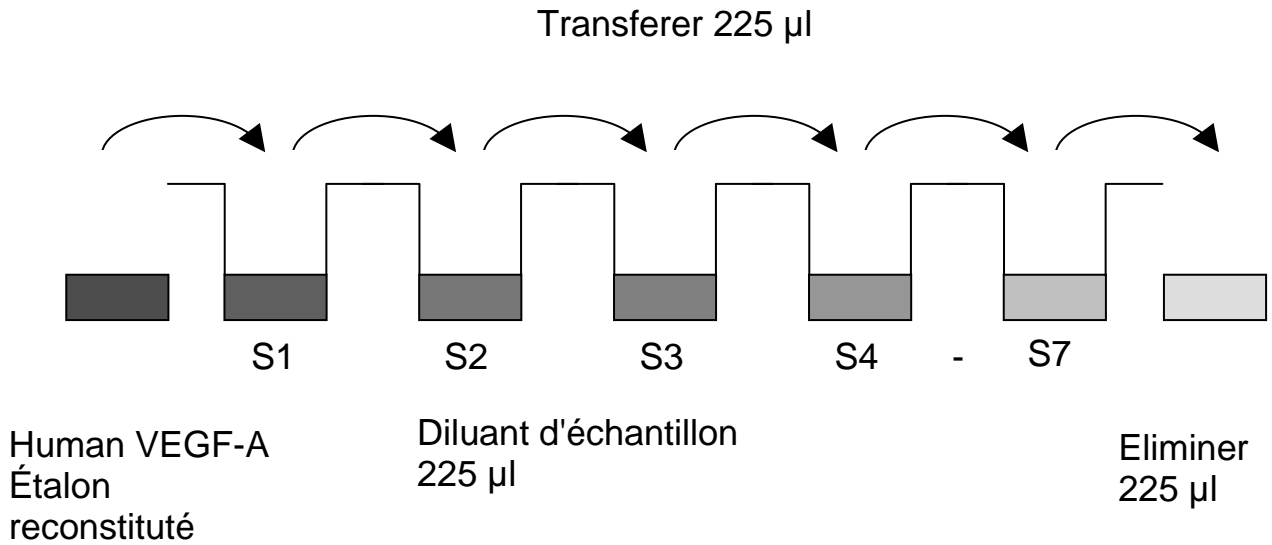
Pipeter 225 µl d'étalon reconstitué (concentration d'étalon = 2 ng/ml) dans un premier tube marqué S1 et agiter (concentration d'étalon 1 = 1 ng/ml).

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



4.6. Contrôles

Solubiliser en ajoutant 500 μ l 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 les contrôles 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 aliquoté à -20°C . Eviter la congélation et le dégel répété.

4.7. Ajout de réactifs colorants : colorant bleu, colorant vert, colorant rouge

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, colorant rouge**) peuvent être ajoutées aux réactifs conformément aux règles suivantes :

- 1. Diluant :** Avant la dilution de l'étalon et de l'échantillon, 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 Colorant bleu
12 ml Diluant d'échantillon	48 µl Colorant bleu
50 ml Diluant d'échantillon	200 µl Colorant bleu

- 2. Conjugué biotine:** Avant la dilution du Conjugué biotine, 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 du Conjugué biotine.

3 ml Tampon d'essai (1x)	30 µl Colorant vert
6 ml Tampon d'essai (1x)	60 µl Colorant vert
12 ml Tampon d'essai (1x)	120 µl Colorant vert

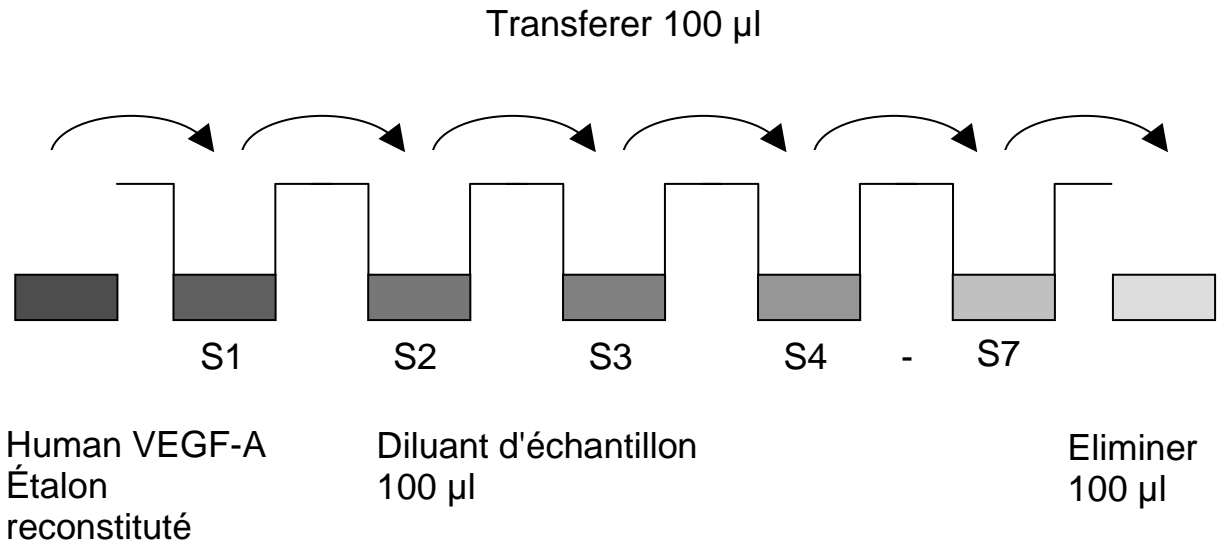
3. Streptavidine-HRP: Avant la dilution du Streptavidine-HRP concentré, ajouter le **Colorant rouge** à une dilution de 1:100 (voir le tableau ci-dessous) au Tampon d'essai (1x) utilisé pour la dilution finale du conjugué. Après l'ajout du **Colorant rouge**, suivre le guide d'utilisation : préparation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

3 ml Tampon d'essai (1x)	30 µl Colorant rouge
6 ml Tampon d'essai (1x)	60 µl Colorant rouge
12 ml Tampon d'essai (1x)	120 µl Colorant rouge

5. Protocole de Test

- a. Déterminer le nombre de barrettes de puits de microtitration nécessaires pour tester le nombre souhaité d'échantillons plus les barrettes nécessaires aux contrôles vides et aux étalons. Chaque échantillon, étalon, contrôle vide et contrôles doit être testé en double. Retirer les barrettes de microtitration inutiles du support et les stocker à 2°-8°C dans une pochette hermétiquement refermée, avec le dessiccant fourni.
- b. 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.**
- c. **Dilution d'étalon sur la plaque de microtitration** (Comme alternative des dilutions d'étalon peuvent être préparées dans des tubes –voir 4.5.1)
Ajouter en double 100 µl de Diluant d'échantillon dans tous les **puits d'étalon**. Pipeter en double 100 µl d'**étalon** non dilué (voir Préparation d'étalon 4.5, concentration = 2000.0 pg/ml) dans les puits A1 et A2 (voir Tableau 1). Mélanger bien le contenu des puits A1 et A2 par aspiration et ejection répétée (concentration d'étalon 1, S1 = 1000.0 pg/ml), et transférer 100 µl dans les puits B1 et B2, respectivement (voir Figure 4) 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 VEGF-A, de 1000.0 à 15.6 pg/ml. Eliminer 100 µl du contenu des derniers puits (G1, G2).

Figure 4



Dans le cas d'**une dilution d'étalon externe** (voir 4.5.1), pipeter 100 μ l de ces dilutions d'étalon (S1 – S7) dans les puits de façon montrée dans Tableau 1.

- d. Ajouter 100 μ l de **Diluant d'échantillon** dans tous les **puits de contrôle vide**.

Tableau 1

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

	1	2	3	4
A	Étalon 1 (1000.0 pg/ml)	Étalon 1 (1000.0 pg/ml)	Échantillon 1	Échantillon 1
B	Étalon 2 (500.0 pg/ml)	Étalon 2 (500.0 pg/ml)	Échantillon 2	Échantillon 2
C	Étalon 3 (250.0 pg/ml)	Étalon 3 (250.0 pg/ml)	Échantillon 3	Échantillon 3
D	Étalon 4 (125.0 pg/ml)	Étalon 4 (125.0 pg/ml)	Échantillon 4	Échantillon 4
E	Étalon 5 (62.5 pg/ml)	Étalon 5 (62.5 pg/ml)	Échantillon 5	Échantillon 5
F	Étalon 6 (31.3 pg/ml)	Étalon 6 (31.3 pg/ml)	Échantillon 6	Échantillon 6
G	Étalon 7 (15.6 pg/ml)	Étalon 7 (15.6 pg/ml)	Échantillon 7	Échantillon 7
H	Contrôle vide	Contrôle vide	Échantillon 8	Échantillon 8

- e. Ajouter 50 µl de **Diluant d'échantillon** dans tous les **puits d'échantillon**.
- f. Ajouter 50 µl de chaque **échantillon**, en double, dans **les puits d'échantillon**.
- g. 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. **(Il est indispensable d'utiliser un agitateur rotateur pour obtenir des résultats optimal.)**
- h. Préparer du **Conjugué Biotine** (se reporter à la préparation des réactifs Conjugué Biotine).

- i. Retirer le couvre-plaque et vider les puits. **Laver** 6 fois les barrettes de puits de microtitration comme indiqué à point b de ce protocole. Utiliser les barrettes de micropuits immédiatement après le lavage.
- j. Ajouter 100 µl de **Conjugué Biotine** dans tous **les puits**.
- k. Recouvrir avec un couvre-plaque et incuber à température ambiante (entre 18° et 25°C) pendant 1 heure, sur un agitateur rotateur réglé à 400 tr/min. **(Il est indispensable d'utiliser un agitateur rotateur pour obtenir des résultats optimal.)**
- l. Préparer du **Streptavidine-HRP** (se reporter à la préparation des réactifs 4.4)
- m. Retirer le couvre-plaque et vider les puits. **Laver** 6 fois les barrettes de puits de microtitration comme indiqué à point b de ce protocole. Utiliser les barrettes de micropuits immédiatement après le lavage.
- n. Ajouter 100 µl de **Streptavidine-HRP** dans tous **les puits**.
- o. Recouvrir avec un couvre-plaque et incuber à température ambiante (entre 18 et 25°C) pendant 1 heure, si possible sur un agitateur rotateur réglé à 400 tr/min. **(Il est indispensable d'utiliser un agitateur rotateur pour obtenir des résultats optimal.)**
- p. Retirer le couvre-plaque et vider les puits. **Laver** 6 fois les barrettes de puits de microtitration comme indiqué à point b de ce protocole. Utiliser les barrettes de micropuits immédiatement après le lavage.
- q. Pipeter 100 µl de **solution de substrat TMB** dans chaque puits, y compris les puits de contrôle vide.
- r. Incuber les puits de microtitration à température ambiante (entre 18 et 25 C) pendant environ 30 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.

- s. 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.
- t. 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 VEGF-A.

Les échantillons ont été dilués 1:2 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 2).

INFORMAZIONI SUL PRODOTTO E MANUALE (Italiano)

1. Reagenti Forniti

1.1. Reagenti Forniti per human VEGF-A ELISA BMS277/2CE (96 test)

- 1 busta d'alluminio con una **Piastra Micropozzetti rivestita** con anticorpo policlonale anti human VEGF-A
- 1 flaconcino (120 µl) di anticorpo **Biotina Coniugato** (anticorpo policlonale human VEGF-A)
- 1 flaconcino (150 µl) di **Streptavidina-HRP**
- 2 flaconcini human VEGF-A **Standard** liofilizzato, 2 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**
- 1 flaconcino (0.4 ml) **Colorante rosso**
- 6 **Copripietra** adesivi

1.2. Reagenti Forniti per human VEGF-A ELISA BMS277/2TENCE (10x96 test)

- 10 buste d'alluminio con **Piastra Micropozzetti rivestita** con anticorpo policlonale anti human VEGF-A
- 10 flaconcini (120 µl) di anticorpo **Biotina Coniugato** (anticorpo policlonale verso human VEGF-A)
- 10 flaconcini (150 µl) di **Streptavidina-HRP**
- 10 flaconcini human VEGF-A **Standard** liofilizzato, 2 ng/ml previa ricostituzione
- 10 flaconcini di **Controllo basso**, liofilizzato
- 10 flaconcini di **Controllo alto**, liofilizzato
- 10 flaconcini (12 ml) con **Diluyente del Campione**
- 3 flaconcini (5 ml) con **Tampone del Saggio concentrata 20x** (PBS con 1% Tween 20 e 10% BSA)
- 8 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)
- 6 flaconcini (0.4 ml) **Colorante blu**
- 6 flaconcini (0.4 ml) **Colorante verde**
- 6 flaconcini (0.4 ml) **Colorante rosso**
- 30 **Copripietra** adesivi

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 tamponi** presenta cristalli in sospensione, riscaldare lievemente i tamponi 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. Biotina Coniugato

Il biotina coniugato deve essere utilizzato entro 30 minuti dalla diluizione.

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

Numero di strip	Biotina coniugato (ml)	Tampone del saggio (1x) (ml)
1 - 6	0.06	5.94
1 - 12	0.12	11.88

4.4. Streptavidina-HRP

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

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

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

4.5. Human VEGF-A Standard

Ricostituire lo **human VEGF-A 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 = 2 ng/ml).

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

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

La diluizione dello standard può essere fatta direttamente nella piastra (vedi 5.c.) oppure nei tubi (vedi 4.5.1).

4.5.1. Diluizione degli Standard esterni

Etichettare 7 tubi, uno per ogni punto dello standard.

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

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

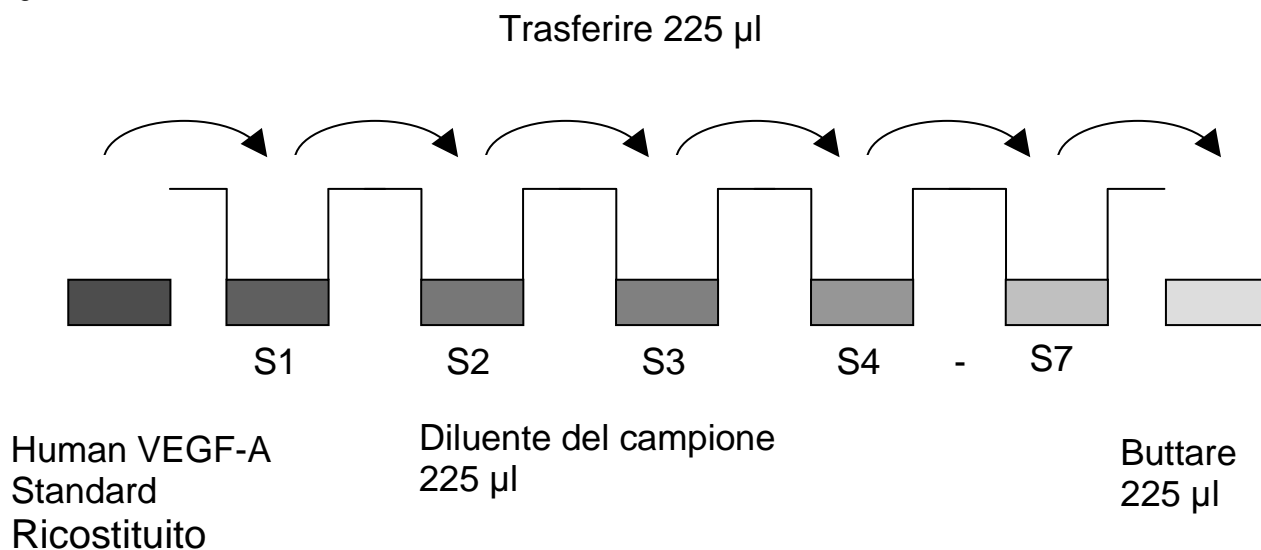
Pipettare 225 µl di Diluente del campione nei tutti tubi.

Pipettare 225 µl di standard ricostituito (concentrazione dello standard = 2 ng/ml) nel primo tubo, etichettato S1, e mescolare (concentrazione dello standard 1 = 1 ng/ml).

Pipettare 225 µl 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



4.6. Controlli

Solubilizzare aggiungendo 500 μ l di acqua distillata ai **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 analisi o all'etichetta presente sulla fiala. Conservare i controlli ricostituiti in aliquote a -20°C . Evitare ripetuti cicli di scongelamento.

4.7. Aggiunta di reagenti coloranti: colorante blu, colorante verde, colorante rosso

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, colorante rosso) attenendosi alle linee guida seguenti:

- 1. Diluente:** Prima di diluire il standard e il campione 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 Colorante blu
12 ml Diluente del campione	48 µl Colorante blu
50 ml Diluente del campione	200 µl Colorante blu

- 2. Biotina Coniugato:** prima di diluire il Biotina 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 Biotina Coniugato.

3 ml Tampone del saggio (1x)	30 µl Colorante verde
6 ml Tampone del saggio (1x)	60 µl Colorante verde
12 ml Tampone del saggio (1x)	120 µl Colorante verde

3. Streptavidina-HRP: prima di diluire il Streptavidina-HRP, aggiungere il **Colorante rosso** alla concentrazione di 1:250 (vedere la tabella seguente) alla Tampone del saggio (1x) utilizzata per la diluizione finale del Streptavidina-HRP. Procedere dopo l'aggiunta del **Colorante rosso** secondo il libretto di istruzioni e la preparazione del Streptavidina-HRP.

6 ml Tampone del saggio (1x)	24 μ l Colorante rosso
12 ml Tampone del saggio (1x)	48 μ l Colorante rosso

5. Procedura del Test

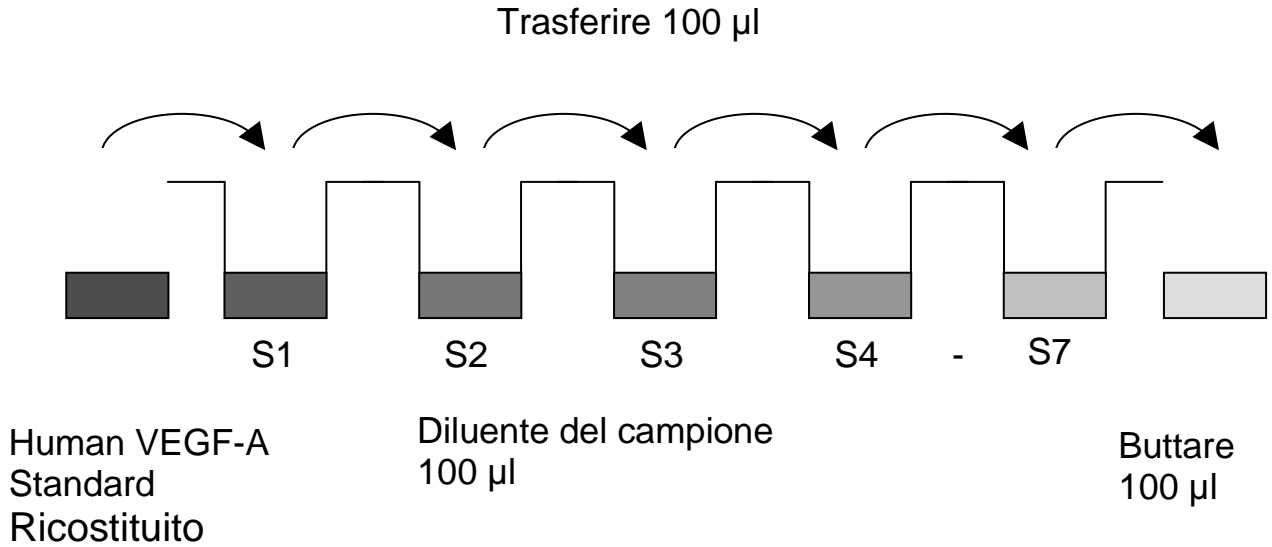
- a. Stabilire il numero di strip dei micropozzetti necessarie per analizzare la quantità desiderata di campioni più le strip per i bianchi e gli standard. Tutti i campioni, gli standard, il bianco e i campioni di controllo opzionali devono essere processati in duplicato. Rimuovere dal supporto le strip micropozzetti non utilizzate e conservarle nella bustina metallica contenente la polvere essiccante, mantenendole a 2°-8°C e perfettamente sigillate.
- b. 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.**

- c. **Diluizione dello standard in micropozzetti** (alternativamente la diluizione dello standard può avvenire in tubi – vedi 4.5.1)
Aggiungere 100 µl di Diluente del campione in duplicato a tutti i **pozzetti dello standard**. Pipettare 100 µl **standard** preparato (vedi preparazione dello standard 4.5.1, concentrazione = 2000.0 pg/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 = 1000.0 pg/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 1000.0 a 15.6 pg/ml. Buttare 100 µl del contenuto degli ultimi pozzetti (G1 e G2).

In caso di **diluizione esterna dello standard** (vedi 4.5.1) pipettare 100 µl di queste diluizioni standard (S1 – S7) nei pozzetti degli standard come da Tabella 1.

Figura 2



- d. Dispensare 100 μ l di **Diluyente del campione** in duplicato ai **pozzetti de bianco**.
- e. Dispensare 50 μ l di **Diluyente del campione** in duplicato ai **pozzetti dei campioni**.
- f. Dispensare 50 μ l di **campione** in duplicato ai **pozzetti dei campioni**.

Tabella 1

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

	1	2	3	4
A	Standard 1 (1000.0 pg/ml)	Standard 1 (1000.0 pg/ml)	Campione 1	Campione 1
B	Standard 2 (500.0 pg/ml)	Standard 2 (500.0 pg/ml)	Campione 2	Campione 2
C	Standard 3 (250.0 pg/ml)	Standard 3 (250.0 pg/ml)	Campione 3	Campione 3
D	Standard 4 (125.0 pg/ml)	Standard 4 (125.0 pg/ml)	Campione 4	Campione 4
E	Standard 5 (62.5 pg/ml)	Standard 5 (62.5 pg/ml)	Campione 5	Campione 5
F	Standard 6 (31.3 pg/ml)	Standard 6 (31.3 pg/ml)	Campione 6	Campione 6
G	Standard 7 (15.6 pg/ml)	Standard 7 (15.6 pg/ml)	Campione 7	Campione 7
H	Bianco	Bianco	Campione 8	Campione 8

- g. Coprire con un copripietra e incubare a temperatura ambiente (18°-25°C) per 2 ore utilizzando, un vortex a 400 rpm. **(E' assolutamente indispensabile l'agitazione per un ottimale performance del test.)**
- h. Preparare la **biotina coniugato** (consultare la sezione biotina coniugato 4.3 sulla preparazione dei reagenti).
- i. Rimuovere il copripietra e svuotare i pozzetti. **Lavare** le strip micropozzetti 6 volte come descritto in punto 5.b. del protocollo. Procedere immediatamente al punto successivo.
- j. Dispensare 100 µl di **biotina coniugato** a ciascun pozzetto.

- k. Coprire con un copripiastra e incubare a temperatura ambiente (18°-25°C) per 1 ora utilizzando, un vortex a 400 rpm. **(E' assolutamente indispensabile l'agitazione per un ottimale performance del test.)**
- l. Preparare la **streptavidina-HRP** (consultare la sezione streptavidina-HRP 4.4 sulla preparazione dei reagenti).
- m. Rimuovere il copripiastra e svuotare i pozzetti. **Lavare** le strip della pozzetti 6 volte come descritto in punto 5.b. del protocollo. Procedere immediatamente al punto successivo.
- n. Dispensare 100 µl di **streptavidina-HRP** a ciascun pozzetto.
- o. Coprire con un copripiastra e incubare a temperatura ambiente (18-25°C) per 1 ora utilizzando, un vortex a 400 rpm. **(E' assolutamente indispensabile l'agitazione per un ottimale performance del test.)**
- p. Rimuovere il copripiastra e svuotare i pozzetti. **Lavare** le strip della pozzetti 6 volte come descritto in punto 5.b. del protocollo. Procedere immediatamente al punto successivo.
- q. Pipettare 100 µl di **soluzione substrato TMB** in tutti i pozzetti, inclusi quelli del blank.
- r. Incubare le strip a temperatura ambiente (18°-25° C) per circa 30 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.

- s. Interrompere la reazione enzimatica pipettando rapidamente 100 μ l 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.
- t. 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 VEGF-A.

I campioni sono stati diluiti 1: 2, quindi la concentrazione dalla curva standard risultante deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione (x 2).