

PRODUCT INFORMATION & MANUAL

Human sCD40L Platinum ELISA

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



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

REF *BMS293CE*

BMS293TENCE

 *96 TESTS*



*Human sCD40L
Platinum ELISA
Extra Sensitive*

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	18
11	Calculation of Results	23
12	Limitations	26
13	Performance Characteristics	27
14	Ordering Information	33
15	Reagent Preparation Summary	34
16	Test Protocol Summary	35
	PRODUK TINFORMATION UND HANDBUCH (Deutsch)	36
1.	Mitgelieferte Reagenzien	36
2.	Lagerhinweise	38
3.	Sicherheitsvorkehrungen für den Gebrauch	39
4.	Vorbereitung der Reagenzien	41
5.	Testprotokoll	46
	INFORMACIÓN Y MANUAL DEL PRODUCTO (Espanol)	51
1.	Reactivos Suministrados	51
2.	Instrucciones de Conservación	53
3.	Precauciones de uso	54
4.	Preparación de los Reactivos	56
5.	Protocolo de Ensayo	61
	INFORMATIONS SUR LE PRODUIT ET MANUEL (Français)	66
1.	Réactifs Fournis	66
2.	Instruction de Stockage	68

3.	Preventions de Sécurité pour l'Usage	69
4.	Préparation des Réactifs	71
5.	Protocole de Test	75

INFORMAZIONI SUL PRODOTTO E MANUALE (Italiano)	80
---	-----------

1.	Reagenti Forniti	80
2.	Istruzioni di Conservazione	82
3.	Precauzioni per l'Uso	83
4.	Preparazione dei Reagenti	85
5.	Procedura del Test	89

1 Intended Use

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

2 Summary

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

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

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

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

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

CD40 Ligand is expressed on the surface of activated CD4+ T cells, basophils, and mast cells. Binding of CD40L to its receptor, CD40, on

the surface of B cells stimulates B-cell proliferation, adhesion and differentiation. A soluble isoform of CD40L has been shown to exist in the circulation. This soluble molecule is a homotrimer of a 18kDa protein exhibiting full activity in B cell proliferation and differentiation assays, is able to rescue B cells from apoptosis and binds soluble CD40.

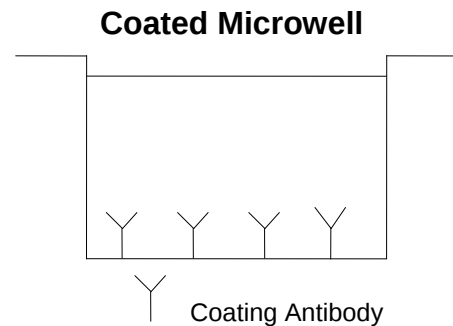
CD40L is discussed in relation to a potential role in supporting B cell tumors and it has been discovered that the molecular defect in the X-linked Hyper-IgM-Syndrome is targeted to the CD40L gene, it is functional involved in B cell hybridomas and chronic lymphocytic leukemia as well as several autoimmune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

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

3 Principles of the Test

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

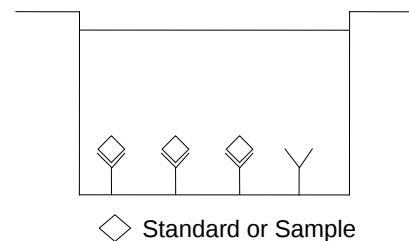
Figure 1



Human sCD40L present in the sample or standard binds to antibodies adsorbed to the microwells.

Figure 2

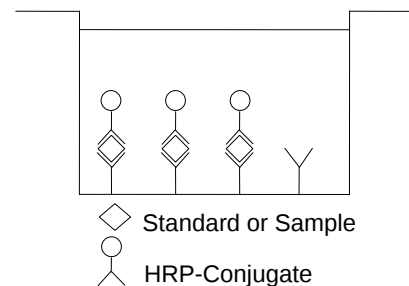
First Incubation



Following incubation unbound biological components are removed during a wash step and a HRP-conjugated anti-human sCD40L antibody is added and binds to human sCD40L captured by the first antibody.

Figure 3

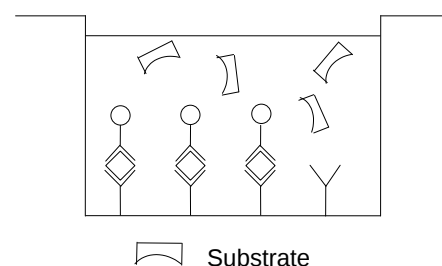
Second Incubation



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

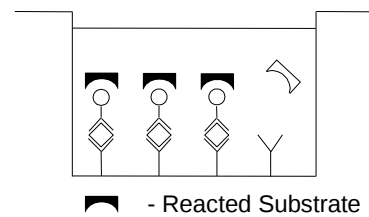
Figure 4

Third Incubation



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

Figure 5



4 Reagents Provided

4.1 Reagents for human sCD40L Platinum ELISA (extra sensitive) BMS293CE (96 tests)

- 1 aluminium pouch with a **Microwell Plate coated** with monoclonal antibody to human sCD40L
- 1 vial (150 µl) **HRP-Conjugate** anti-human sCD40L monoclonal antibody
- 2 vials human sCD40L **Standard** lyophilized, 20 ng/ml upon reconstitution
- 1 vial **Control high**, lyophilized
- 1 vial **Control low**, lyophilized
- 1 vial (12 ml) **Sample Diluent**

(Please note: In some cases the Sample Diluent contains an insoluble precipitate which does not interfere in any way with the test performance. Use according to protocol.)

- 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**
- 4 **Adhesive Films**

4.2 Reagents for human sCD40L Platinum ELISA (extra sensitive) BMS293TENCE (10x96 tests)

10 aluminium pouches with a **Microwell Plate coated** with monoclonal antibody to human sCD40L

10 vials (150 µl) **HRP-Conjugate** anti-human sCD40L monoclonal antibody

10 vials human sCD40L **Standard** lyophilized, 20 ng/ml upon reconstitution

10 vials **Control high**, lyophilized

10 vials **Control low**, lyophilized

10 vials (12 ml) **Sample Diluent**

(Please note: In some cases the Sample Diluent contains an insoluble precipitate which does not interfere in any way with the test performance. Use according to protocol.)

2 vials (5 ml) **Assay Buffer Concentrate 20x**
(PBS with 1% Tween 20 and 10% BSA)

4 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**

20 **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), controls 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.

The standard has to be used immediately after reconstitution and cannot be stored.

6 Specimen Collection and Storage Instructions

Cell culture supernatant, serum and plasma (EDTA, citrate, heparin) were tested with this assay. Other body fluids 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 sCD40L. If samples are to be run within 24 hours, they may be stored at 2° to 8°C (for sample stability refer to 13.5).

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

7 Materials Required But Not Provided

- 5 ml and 10 ml graduated pipettes
- 5 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)
- 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 chemicals 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) 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) able for 30 days.

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

Number of Strips	Wash Buffer Concentrate (20x)	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)	Distilled Water (ml)
1 - 6	2.5	47.5
1 - 12	5.0	95.0

9.3 HRP-Conjugate

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

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

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

9.4 Human sCD40L Standard

Reconstitute **human sCD40L standard** by addition of distilled water.

Reconstitution volume is stated on the label of the standard vial. Swirl or mix gently to insure complete and homogeneous solubilization (concentration of reconstituted standard = 20 ng/ml).

Allow the standard to reconstitute for 10-30 minutes. Mix well prior to making dilutions.

Further dilute standard 1:2 by adding the same volume Sample Diluent as the reconstitution volume to the reconstituted standard (concentration of prepared standard = 10 ng/ml).

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 9.4.1).

9.4.1 External Standard Dilution

Label 7 tubes, one for each standard point.

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

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

Pipette 225 μ l of Sample Diluent into each tube.

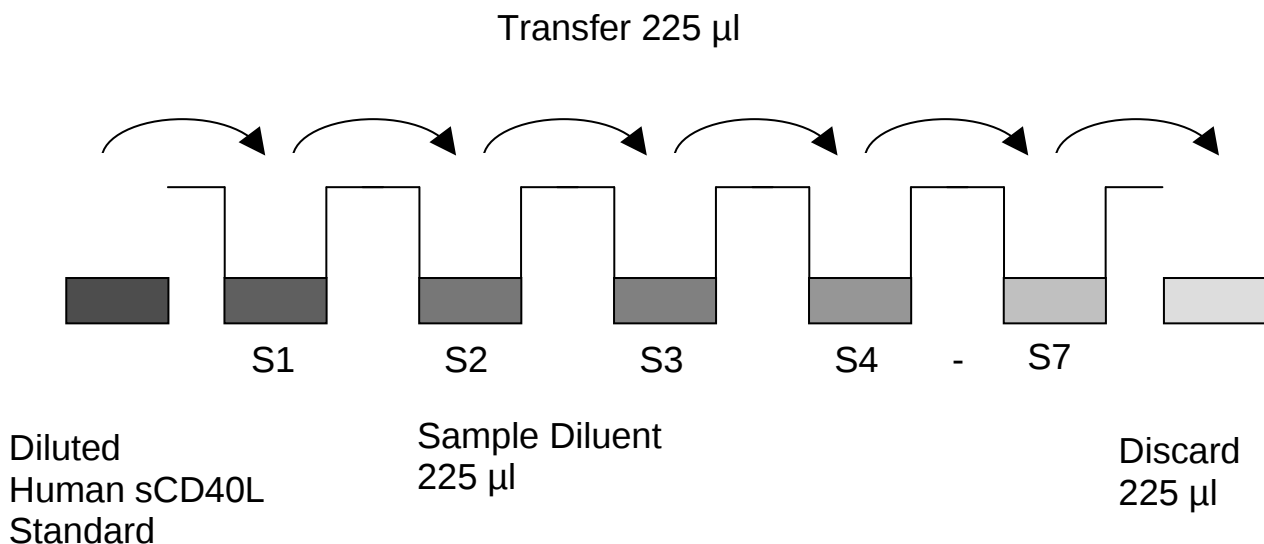
Pipette 225 μ l of diluted standard (concentration = 10 ng/ml) into the first tube, labelled S1, and mix (concentration of Standard 1 = 5 ng/ml).

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

Repeat serial dilutions 5 more times thus creating the points of the standard curve (see Figure 6).

Sample Diluent serves as blank.

Figure 6



9.5 Control

Reconstitute by adding 200 μ l distilled water to lyophilized **control** (10-30 minutes). Swirl or mix gently to ensure complete and homogeneous solubilization. Further treat the control like your **serum** samples in the assay. For control range please refer to certificate of analysis or vial label. Store reconstituted control aliquoted at -20°C. Avoid repeated freeze and thaw cycles.

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

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

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

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

1. Diluent:

Before standard 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. HRP-Conjugate:

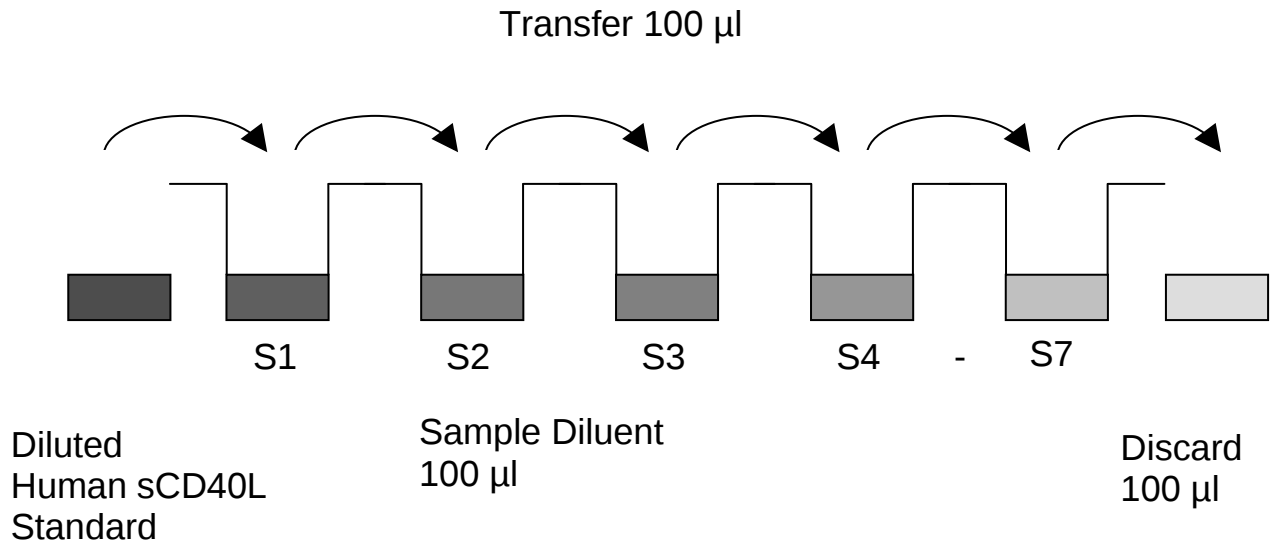
Before dilution of the concentrated HRP-Conjugate add the **Green-Dye** at a dilution of 1:100 (see table below) to the Assay Buffer (1x) used for the final conjugate dilution. Proceed after addition of **Green-Dye** according to the instruction booklet: Preparation of HRP-Conjugate.

6 ml Assay Buffer (1x)	60 µl Green-Dye
12 ml Assay Buffer (1x)	120 µl Green-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 9.4.1):
Add 100 µl of Sample Diluent in duplicate to all **standard wells**.
Pipette 100 µl of prepared **standard** (see Preparation of Standard 9.4.1, concentration = 10.00 ng/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 = 5.00 ng/ml), and transfer 100 µl to wells B1 and B2, respectively (see Figure 7). Take care not to scratch the inner surface of the microwells.
Continue this procedure 5 times, creating two rows of human sCD40L standard dilutions, ranging from 5.00 to 0.08 ng/ml. Discard 100 µl of the contents from the last microwells (G1, G2) used.

Figure 7



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

Table 1

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

	1	2	3	4
A	Standard 1 (5.00 ng/ml)	Standard 1 (5.00 ng/ml)	Sample 1	Sample 1
B	Standard 2 (2.50 ng/ml)	Standard 2 (2.50 ng/ml)	Sample 2	Sample 2
C	Standard 3 (1.25 ng/ml)	Standard 3 (1.25 ng/ml)	Sample 3	Sample 3
D	Standard 4 (0.63 ng/ml)	Standard 4 (0.63 ng/ml)	Sample 4	Sample 4
E	Standard 5 (0.31 ng/ml)	Standard 5 (0.31 ng/ml)	Sample 5	Sample 5
F	Standard 6 (0.16 ng/ml)	Standard 6 (0.16 ng/ml)	Sample 6	Sample 6
G	Standard 7 (0.08 ng/ml)	Standard 7 (0.08 ng/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 80 µl of **Sample Diluent** to the **sample wells** designated for **serum** and **control samples**.
Add 50 µl of **Sample Diluent** to the **sample wells** designated for **plasma samples**.
- f. Add 20 µl of each **serum** and **control sample** in duplicate to the **designated sample wells**.
Add 50 µl of each **plasma sample** in duplicate to the **designated sample wells**.
- g. Cover with an adhesive film and incubate at room temperature (18 to 25°C) for 2 hours, if available on a microplate shaker set at 400 rpm.
- h. Prepare **HRP-Conjugate** (see Preparation of HRP-Conjugate 9.3).
- i. Remove adhesive film and empty wells. Wash microwell strips 3 times according to point b. of the test protocol. Proceed immediately to the next step.
- j. Add 100 µl of **HRP-Conjugate** to all wells.
- k. Cover with an adhesive film and incubate at room temperature (18 to 25°C) for 1 hours, if available on a microplate shaker set at 400 rpm.
- l. Remove adhesive film and empty wells. Wash microwell strips 3 times according to point b. of the test protocol. Proceed immediately to the next step.
- m. Pipette 100 µl of **TMB Substrate Solution** to all wells.
- n. Incubate the microwell strips at room temperature (18° to 25°C) for about 10 min. Avoid direct exposure to intense light.

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

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

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

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

11 Calculation of Results

- Calculate the average absorbance values for each set of duplicate standards and samples. Duplicates should be within 20 per cent of the mean value.
- Create a standard curve by plotting the mean absorbance for each standard concentration on the ordinate against the human sCD40L concentration on the abscissa. Draw a best fit curve through the points of the graph (a 5-parameter curve fit is recommended).
- To determine the concentration of circulating human sCD40L for each sample, first find the mean absorbance value on the ordinate and extend a horizontal line to the standard curve. At the point of intersection, extend a vertical line to the abscissa and read the corresponding human sCD40L concentration.
- **If instructions in this protocol have been followed serum and control samples have been diluted 1:5 (20 µl sample + 80 µl Sample Diluent), the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor (x 5). Plasma 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 human sCD40L levels. Such samples require further external predilution according to expected human sCD40L values with Sample Diluent in order to precisely quantitate the actual human sCD40L level.**
- It is suggested that each testing facility establishes a control sample of known human sCD40L concentration and runs this additional control with each assay. If the values obtained are not within the expected range of the control, the assay results may be invalid.
- A representative standard curve is shown in Figure 8. This curve cannot be used to derive test results. Each laboratory must prepare a standard curve for each group of microwell strips assayed.

Figure 8

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

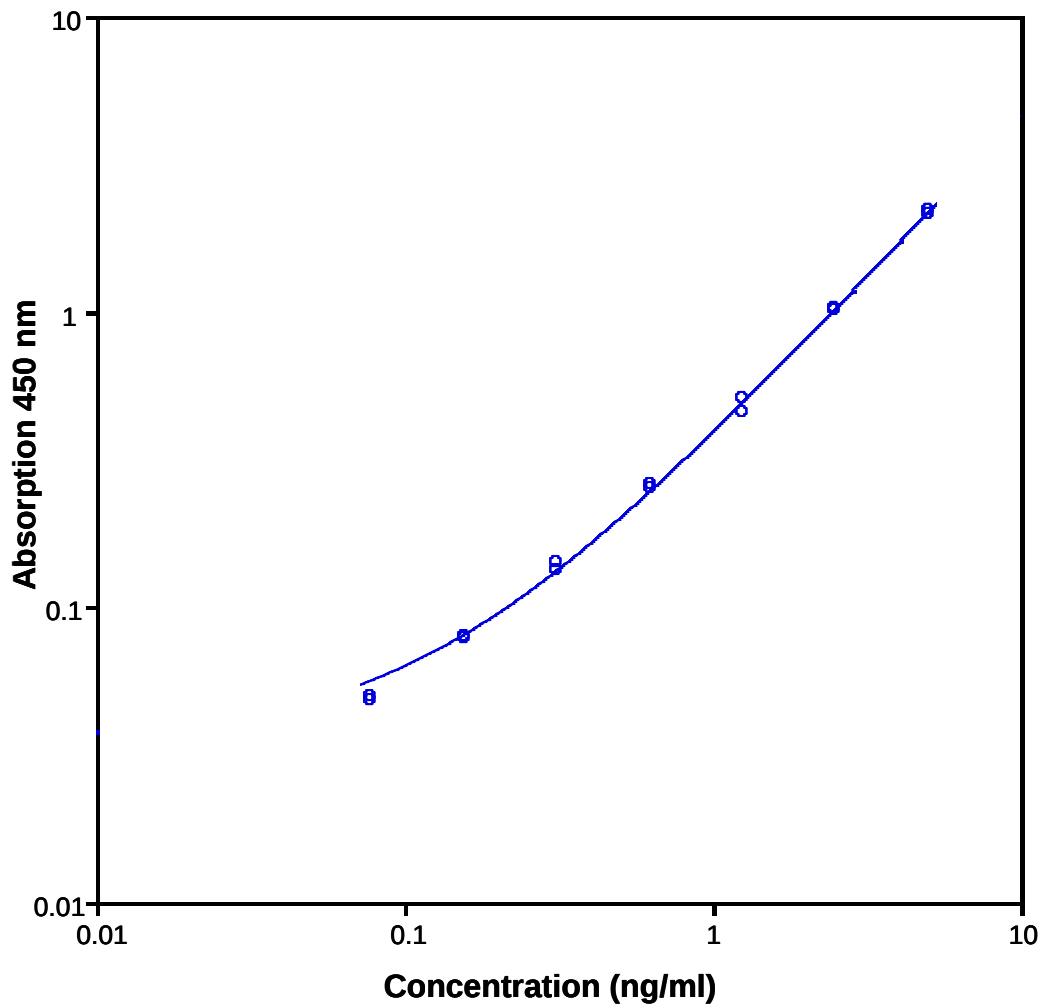


Table 2

Typical data using the human sCD40L Platinum ELISA (extra sensitive)

Measuring wavelength: 450 nm

Reference wavelength: 620 nm

Standard	Human sCD40L Concentration (ng/ml)	O.D. at 450 nm	Mean O.D. at 450 nm	C.V. (%)
1	5.00	2.189 2.136	2.163	1.2
2	2.50	1.013 1.021	1.017	0.4
3	1.25	0.508 0.458	0.483	5.2
4	0.63	0.260 0.254	0.257	1.2
5	0.31	0.141 0.134	0.138	2.5
6	0.16	0.080 0.078	0.079	1.3
7	0.08	0.050 0.048	0.049	2.0
Blank	0.00	0.022 0.016	0.019	15.8

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

12 Limitations

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

13 Performance Characteristics

13.1 Sensitivity

The limit of detection of human sCD40L defined as the analyte concentration resulting in an absorbance significantly higher than that of the dilution medium (mean plus 2 standard deviations) was determined to be less than 0.01 ng/ml (mean of 6 independent assays).

13.2 Reproducibility

13.2.1 Intra-assay

Reproducibility within the assay was evaluated in 3 independent experiments. Each assay was carried out with 6 replicates of 8 serum samples containing different concentrations of human sCD40L. 2 standard curves were run on each plate. Data below show the mean human sCD40L concentration and the coefficient of variation for each sample (see Table 3). The calculated overall intra-assay coefficient of variation was 5.5%.

Table 3

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

Sample	Experiment	Mean Human sCD40L Concentration (ng/ml)	Coefficient of Variation (%)
1	1	28.4	9.5
	2	25.8	9.3
	3	23.3	5.2
2	1	22.8	4.8
	2	20.7	5.4
	3	21.5	3.0
3	1	15.7	6.9
	2	12.2	8.7
	3	13.1	6.1
4	1	10.1	4.7
	2	8.8	4.9
	3	8.8	4.0
5	1	5.1	5.1
	2	4.2	8.4
	3	4.5	8.9
6	1	12.9	3.1
	2	12.6	5.1
	3	10.5	2.2
7	1	9.9	1.3
	2	9.5	5.1
	3	10.1	6.3
8	1	6.2	5.2
	2	6.5	7.0
	3	6.7	1.5

13.2.2 Inter-assay

Assay to assay reproducibility within one laboratory was evaluated in 3 independent experiments. Each assay was carried out with 6 replicates of 8 serum samples containing different concentrations of human sCD40L. 2 standard curves were run on each plate. Data below show the mean human sCD40L concentration and the coefficient of variation calculated on 18 determinations of each sample (see Table 4). The calculated overall inter-assay coefficient of variation was 6.6%.

Table 4

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

Sample	Mean Human sCD40L Concentration (ng/ml)	Coefficient of Variation (%)
1	25.8	8.1
2	21.7	3.8
3	13.7	10.5
4	9.2	6.8
5	4.6	8.7
6	12.0	8.8
7	9.8	2.7
8	6.5	3.3

13.3 Spike Recovery

The spike recovery was evaluated by spiking 4 levels of human sCD40L into serum and plasma. Recoveries were determined in 3 independent experiments with 6 replicates each.

The unspiked serum and plasma was used as blank in these experiments.

The recovery ranged from 87% to 112% with an overall mean recovery of 99%.

13.4 Dilution Parallelism

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

The recovery ranged from 84% to 114% with an overall recovery of 97% (see Table 5).

Table 5

Sample	Dilution	Expected Human sCD40L Concentration (ng/ml)	Observed Human sCD40L Concentration (ng/ml)	Recovery of Expected Concentration (%)
1	1:5	--	25.2	--
	1:10	12.6	14.3	114
	1:20	7.2	6.7	94
	1:40	3.4	3.5	104
2	1:5	--	23.5	--
	1:10	11.7	12.0	103
	1:20	6.0	5.1	85
	1:40	2.5	2.3	92
3	1:5	--	27.5	--
	1:10	13.7	13.5	98
	1:20	6.7	7.3	109
	1:40	3.7	3.6	97
4	1:5	--	28.1	--
	1:10	14.1	11.7	84
	1:20	5.9	5.5	94
	1:40	2.8	2.6	93

13.5 Sample Stability

13.5.1 Freeze-Thaw Stability

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

13.5.2 Storage Stability

Aliquots of serum samples (spiked or unspiked) were stored at -20°C, 2-8°C, room temperature (RT) and at 37°C, and the human sCD40L level determined after 24 h. A significant loss of human sCD40L immunoreactivity was detected during storage at RT (57% immunoreactivity) and at 37°C (4% immunoreactivity) after 24 h.

13.6 Comparison of Serum and Plasma

From two individuals, serum as well as EDTA and citrate plasma samples, obtained at the same time point, were evaluated. Human sCD40L concentrations were significantly different, but if the uniformity of blood preparations is assured, all these body fluids are suitable for the assay.

13.7 Specificity

The interference of circulating factors of the immune system was evaluated by spiking these proteins at physiologically relevant concentrations into a human sCD40L positive serum. There was no crossreactivity detected.

13.8 Expected Values

Panels of 40 serum as well as EDTA, citrate and heparin plasma samples from randomly selected apparently healthy donors (males and females) were tested for human sCD40L. The levels measured may vary with the sample collection used.

Elevated human sCD40L levels depend on the type of immunological disorder.

For detected human sCD40L levels see Table 6.

Table 6

Sample Matrix	Number of Samples Evaluated	Range (ng/ml)	% Detectable	Mean of Detectable (ng/ml)
Serum	40	nd *- 29.1	32.5	4.2
Plasma (EDTA)	40	nd *- 10.6	72.5	2.9
Plasma (Citrate)	40	nd *- 7.5	80	2.0
Plasma (Heparin)	40	nd *- 7.5	77.5	1.8

* 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 HRP-Conjugate

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

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

15.4 Human sCD40L Standard

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

Dilute reconstituted standard 1:2 by adding the same volume as the reconstitution volume of Sample Diluent to the reconstituted standard.

15.5 Controls

Add 200 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 9.4.1): Pipette 100 µl of these standard dilutions in the microwells strips.
4. Add 100 µl Sample Diluent, in duplicate, to the blank wells.
5. Add 80 µl Sample Diluent to all wells designated for **serum** and **control** samples.
Add 50 µl Sample Diluent to all wells designated for **plasma** samples.
6. Add 20 µl of each **serum** and **control** sample in duplicate to designated sample wells.
Add 50 µl of each **plasma** sample in duplicate to designated sample wells.
7. Cover microwell strips and incubate 2 hours at room temperature (18° to 25°C).
8. Prepare HRP-Conjugate.
9. Empty and wash microwell strips 3 times with Wash Buffer.
10. Add 100 µl HRP-Conjugate to all wells.
11. Cover microwell strips and incubate 1 hour at room temperature (18° to 25°C).
12. Empty and wash microwell strips 3 times with Wash Buffer.
13. Add 100 µl of TMB Substrate Solution to all wells.
14. Incubate the microwell strips for about 10 minutes at room temperature (18°to 25°C).
15. Add 100 µl Stop Solution to all wells.
16. Blank microwell reader and measure colour intensity at 450 nm.

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

Plasma 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 sCD40L ELISA (extra sensitive) BMS293CE (96 Tests)

- 1 Aluminiumbeutel mit **Mikrotiterplatte**, **beschichtet** mit Antikörper (monoklonal) gegen human sCD40L
- 1 Fläschchen (150 µl) **HRP-Konjugat**, monoklonaler anti-human sCD40L Antikörper
- 2 Fläschchen human sCD40L-**Standard**, lyophilisiert, 20.00 ng/ml nach Rekonstitution
- 1 Fläschchen lyophilisierte **Kontrolle**, **hoch konzentriert**
- 1 Fläschchen lyophilisierte **Kontrolle**, **niedrig konzentriert**
- 1 Fläschchen (12 ml) **Verdünnungslösung**

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

- 1 Fläschchen (5 ml) **Probenpufferkonzentrat** 20x (PBS mit 1% Tween 20 und 10% BSA)
- 1 Flasche (50 ml) **Waschpufferkonzentrat** 20x (PBS mit 1% Tween 20)
- 1 Fläschchen (15 ml) **Substratlösung** (Tetramethylbenzidin)
- 1 Fläschchen (15 ml) **Stopplösung** (1 M Phosphorsäure)
- 1 Fläschchen (0.4 ml) **Farbstoff**, **blau**
- 1 Fläschchen (0.4 ml) **Farbstoff**, **grün**

2 Klebefolien

BMS293CE and BMS293TENCE human sCD40L (extra sensitive)

1.2. Mitgelieferte Reagenzien für human sCD40L ELISA (extra sensitive) BMS293TENCE (10x96 Tests)

- 10 Aluminiumbeutel mit **Mikrotiterplatte, beschichtet** mit Antikörper (monoklonal) gegen human sCD40L
- 10 Fläschchen (150 µl) **HRP-Konjugat**, monoklonaler anti-human sCD40L Antikörper
- 10 Fläschchen human sCD40L-**Standard**, lyophilisiert, 20.00 ng/ml nach Rekonstitution
- 10 Fläschchen lyophilisierte **Kontrolle, hoch konzentriert**
- 10 Fläschchen lyophilisierte **Kontrolle, niedrig konzentriert**
- 10 Fläschchen (12 ml) **Verdünnungslösung**

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

- 2 Fläschchen (5 ml) **Probenpufferkonzentrat 20x** (PBS mit 1% Tween 20 und 10% BSA)
- 4 Flasche (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**
- 20 **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 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. HRP-Konjugat

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

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

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

4.4. Human sCD40L-Standard

Rekonstituieren Sie den **human sCD40L -Standard** durch Zugabe von destilliertem Wasser. Das Rekonstitutionsvolumen ist auf dem Standardfläschchen angegeben. Rühren oder mischen Sie vorsichtig um eine vollständige und homogene Auflösung zu erzielen (Konzentration des rekonstituierten Standards = 20.00 ng/ml).

Den rekonstituierten Standard nach 10-30 min verdünnen und davor gut mischen.

Der rekonstituierte human **sCD40L Standard** muss vor Verwendung 1:2 durch die Zugabe von Sample Diluent verdünnt werden. Hierfür dasselbe Volumen wie für die Rekonstitution einsetzen (Konzentration des verdünnten Standards = 10.00 ng/ml)

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 4.4.1) hergestellt werden.

4.4.1. 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.

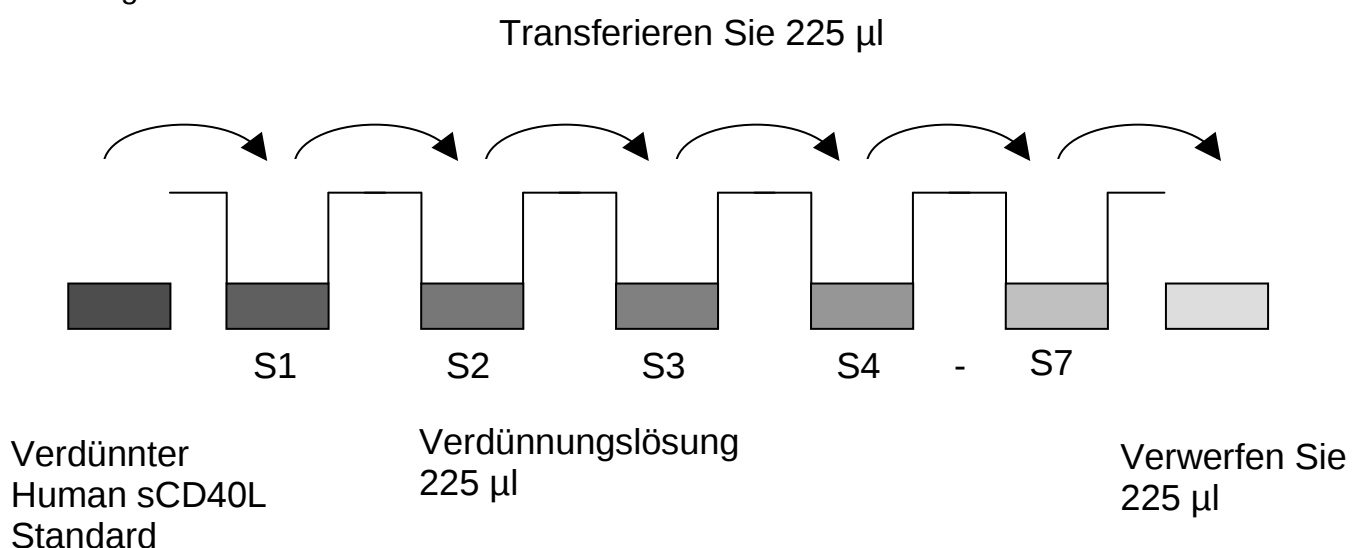
Pipettieren Sie 225 µl des verdünnten Standards (Konzentration des Standards = 10.00 ng/ml) in das erste Gefäß mit der Beschriftung S1 und mischen Sie (Konzentration des Standard 1 = 5.00 ng/ml).

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

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

Verdünnungslösung dient als Blindwert.

Abbildung 1



4.5. Kontrollen

Lösen Sie die **Kontrollen** durch Zugabe von 200 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 **Serum-Proben**. Der Konzentrationsbereich der Kontrollen ist am Analysenzertifikat oder am Flaschenetikett angegeben.

Lagern sie die rekonstituierten Kontrollen aliquotiert bei -20°C. Vermeiden Sie wiederholtes Frieren und Tauen.

4.6. Zugabe von Farbstoffen (blau, grün)

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

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

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

1. Verdünnung

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

5 ml Verdünnungslösung	20 µl blauer Farbstoff
12 ml Verdünnungslösung	48 µl blauer Farbstoff
50 ml Verdünnungslösung	200 µl blauer Farbstoff

2. HRP-Konjugat

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

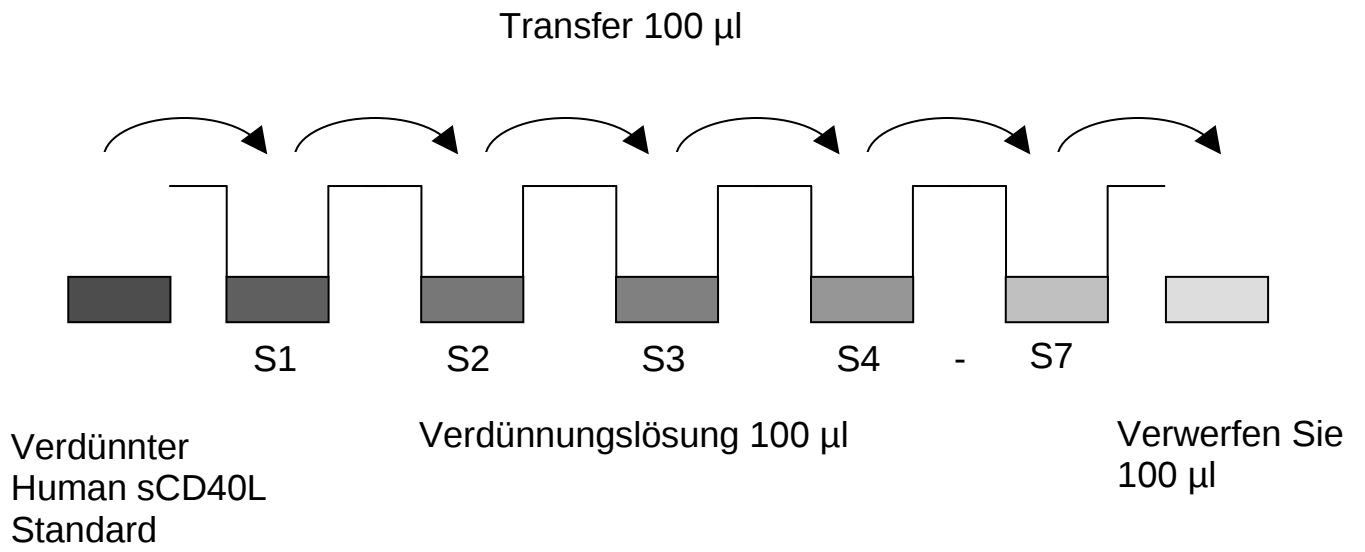
Nach der Zugabe des **grünen Farbstoffes** fahren Sie entsprechend der Anleitung fort: Präparation des HRP-Konjugats.

6 ml Probenpuffer (1x)	60 µl grüner Farbstoff
12 ml Probenpuffer (1x)	120 µl grüner 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 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 4.4.1)
 Pipettieren Sie 100 µl Verdünnungslösung in alle **Standardvertiefungen**. Pipettieren Sie 100 µl des verdünnten **Standards** (siehe Herstellung des Standards, Konzentration des Standards = 10.00 ng/ml) in die Vertiefungen A1 und A2 (Doppelbestimmung, siehe Tabelle 1). Mischen Sie den Inhalt der Vertiefungen A1 und A2 durch wiederholtes Aufsaugen und Zugeben gut durch (Konzentration des Standards S1 = 5.00 ng/ml) und transferieren Sie 100 µl in die Probenvertiefungen B1 und B2 (siehe Abbildung 2). Achten Sie darauf, die Oberfläche der Vertiefungen nicht zu zerkratzen. Wiederholen Sie diese Verdünnungsschritte 5 x, wodurch zwei human sCD40L Verdünnungsreihen mit den Konzentrationen von 5.00 bis 0.08 ng/ml hergestellt werden. Verwerfen Sie 100 µl aus den letzten Standardvertiefungen (G1/2). Die so hergestellten Verdünnungsreihen dienen zur Erstellung der Standardkurve.

Abbildung 2



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

Tabelle 1

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

	1	2	3	4
A	Standard 1 (5.00 ng/ml)	Standard 1 (5.00 ng/ml)	Probe 1	Probe 1
B	Standard 2 (2.50 ng/ml)	Standard 2 (2.50 ng/ml)	Probe 2	Probe 2
C	Standard 3 (1.25 ng/ml)	Standard 3 (1.25 ng/ml)	Probe 3	Probe 3
D	Standard 4 (0.63 ng/ml)	Standard 4 (0.63 ng/ml)	Probe 4	Probe 4
E	Standard 5 (0.31 ng/ml)	Standard 5 (0.31 ng/ml)	Probe 5	Probe 5
F	Standard 6 (0.16 ng/ml)	Standard 6 (0.16 ng/ml)	Probe 6	Probe 6
G	Standard 7 (0.08 ng/ml)	Standard 7 (0.08 ng/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 **Vertiefungen für Serumproben** sowie **Kontrollen** 80 µl **Verdünnungslösung**.

Pipettieren Sie in alle **Vertiefungen für Plasmaproben** 50 µl **Verdünnungslösung**.

- f. Pipettieren Sie je 20 µl von jeder **Serum-Probe** und **Kontrolle** (Doppelbestimmung) in die **Probenvertiefungen** und mischen Sie den Inhalt durch.

Pipettieren Sie je 50 µl von jeder **Plasma-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, wenn möglich auf einem Schüttler bei 400 rpm.
- h. Stellen Sie das **HRP-Konjugat** (siehe: Vorbereitung der Reagenzien HRP-Konjugat 4.3) her.
- i. Entfernen Sie die Klebefolie und leeren Sie die Vertiefungen. **Waschen** Sie die Mikrowellstreifen 3 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 **HRP-Konjugat**.
- k. Mit einer Klebefolie abdecken und bei Raumtemperatur (18° bis 25°C) für 1 Stunde inkubieren, wenn möglich auf einem Schüttler bei 400 rpm.
- l. Entfernen Sie die Klebefolie und entleeren Sie die Vertiefungen. **Waschen** Sie die Mikrowellstreifen 3 mal wie in Punkt b. des Testprotokolls beschrieben. Verwenden Sie die Mikrowellstreifen sofort nach dem Waschen.
- m. Pipettieren Sie in alle Vertiefungen, einschließlich der Blindwertvertiefungen, 100 µl **TMB-Substratlösung**.
- n. Inkubieren Sie die Mikrowellstreifen bei Raumtemperatur (18° bis 25°C) für ca. 10 Minuten. Vermeiden Sie direkte, starke Lichteinstrahlung.
Die Farbentwicklung innerhalb der einzelnen Vertiefungen muss beobachtet und die Substratreaktion gestoppt werden (siehe nächster Protokollpunkt), bevor die gefärbten Vertiefungen nicht mehr richtig gemessen werden können. Die optimale Inkubationszeit für die Farbentwicklung muss bei jedem Versuch neu bestimmt werden.

Es wird empfohlen, die Stopplösung zuzugeben, wenn der höchste Standardpunkt eine dunkelblaue Farbe angenommen hat.

Alternativ kann die Farbentwicklung auch mit einem Photometer bei 620 nm verfolgt werden. Die Substratreaktion sollte gestoppt werden, wenn der höchste Standardpunkt eine OD von 0.9 -0.95 erreicht.

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

Serum-Proben und Kontrollen wurden im Zuge der Testdurchführung 1:5 verdünnt. Daher muss der aus der Standardkurve berechnete Wert mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden (x 5).

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

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

INFORMACIÓN Y MANUAL DEL PRODUCTO (Español)

1. Reactivos Suministrados

1.1. Reactivos Suministrados para human sCD40L ELISA (extra sensitive) BMS293CE (96 tests)

- 1 bolsa de aluminio con **una placa de micropocillos recubiertos** con anticuerpos monoclonales anti-human sCD40L
- 1 vial (150 µl) con **conjugado de HRP** (anticuerpos monoclonales anti-human sCD40L)
- 2 viales con **Estándar** human sCD40L liofilizado 20.00 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**

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

- 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**
- 4 **tapas para placas**, adesive

1.2. Reactivos Suministrados para human sCD40L ELISA (extra sensitive) BMS293TENCE (10x96 tests)

- 10 bolsas de aluminio con **una placa de micropocillos recubiertos** con anticuerpos monoclonales anti-human sCD40L
- 10 viales (150 µl) con **conjugado de HRP** (anticuerpos monoclonales anti-human sCD40L)
- 10 viales con **Estándar** human sCD40L liofilizado 20.00 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**

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

- 2 viales (5 ml) de **concentrado de tampón de ensayo** 20x (PBS con Tween 20 al 1% y BSA al 10%)
- 4 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**
- 20 **tapas para placas**, adesive

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 HRP

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

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

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

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

4.4. Dilución estándar human sCD40L

Reconstituir el estándar human sCD40L por la adición de agua destilada. El volumen de reconstitución está indicado en la etiqueta del vial del estándar. Girar o mezclar cuidadosamente para garantizar una completa y homogénea solubilización (concentración del estándar reconstituido = 20.00 ng/ml).

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

El **estándar human sCD40L** reconstituido debe ser diluido 1:2 con Diluyente de muestra. Añjada lo mismo volumen que en la reconstitución.

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 4.4.1).

4.4.1. Dilución Estándar Externa

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

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

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

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

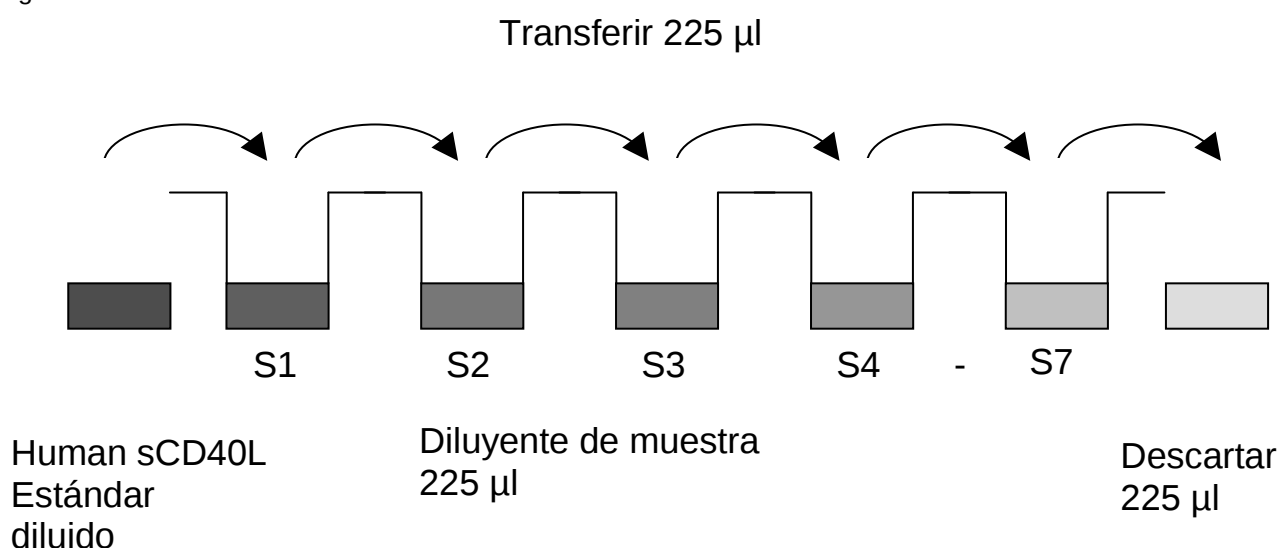
Pipetear 225 µl de estándar diluido (concentración del estándar = 10.00 ng/ml) en el primer tubo, etiquetado como S1, y mezclar (concentración del estándar 1 = 5.00 ng/ml).

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

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

Diluyente de muestra sirve como blanco.

Figura 1



4.5. Controles

Solubilizar añadiendo 200 µl de agua destilada al **controles** liofilizados. Permitir que el 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 el controles de la misma forma que las **muestras del sero**. El rango del control viene indicado en el certificado de calidad y en la etiqueta del vial. Almacenar el controles reconstituidos y alicuotado a -20°C. Evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación.

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

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

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

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

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

5 ml de Diluyente de muestra	20 µl de 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 HRP: Antes de diluir el conjugado concentrado, añada el **Colorante verde** diluido en una proporción de 1:100 (véase la tabla siguiente) al Tampón de ensayo (1x) utilizado para la dilución final del conjugado. Después de añadir el **Colorante verde**, siga las instrucciones del manual: Conjugado de HRP.

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

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 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.
- 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 4.4.1)
Añadir 100 µl de diluyente de muestra a todos los **pocillos estándar**. Pipetear 100 µl de **estándar** preparado (véase Preparación del Estándar, concentración = 10.00 ng/ml) por duplicado en los pocillos A1 y A2 (véase Tabla 1). Mezclar el contenido de los pocillos A1 y A2 por repetidas aspiraciones y expulsiones del contenido con la pipeta (concentración del estándar 1, S1 = 5.00 ng/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 sCD40L ordenadas des de 5.00 a 0.08 ng/ml. Descartar 100 µl de los contenidos de los últimos micropocillos (G1, G2) usados.

Figura 2

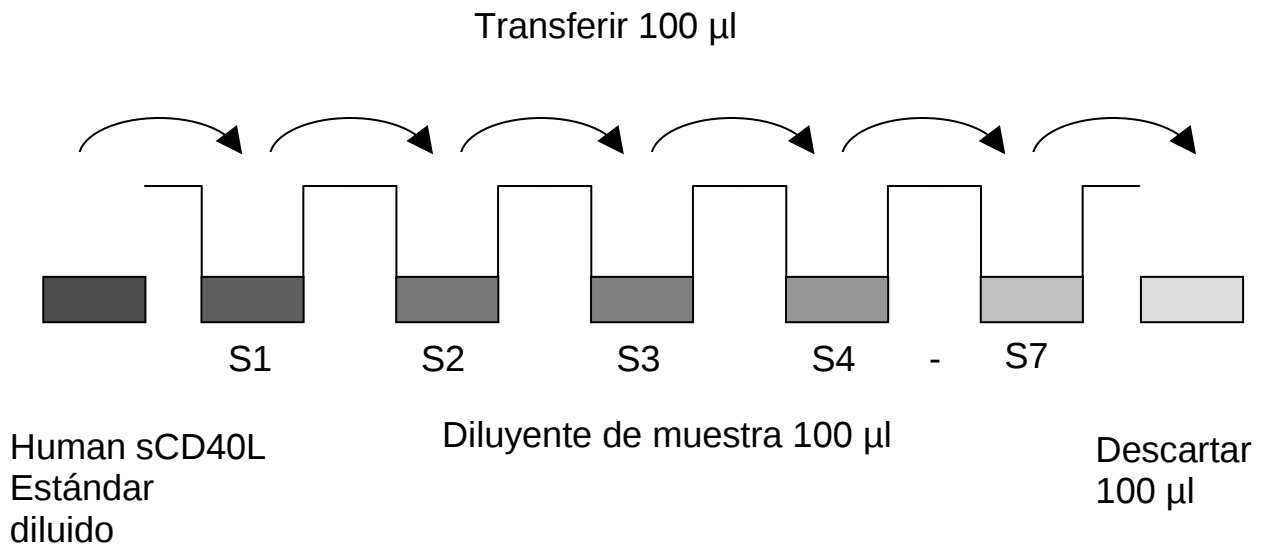


Tabla 1

En caso de **una dilución estándar externa** (véase 4.4.1), pipetear 100 µl de estas diluciones estándar (S1 - S7) en los pocillos correspondientes al estándar de acuerdo con la Tabla 1.

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 (5.00 ng/ml)	Estándar 1 (5.00 ng/ml)	Muestra 1	Muestra 1
B	Estándar 2 (2.50 ng/ml)	Estándar 2 (2.50 ng/ml)	Muestra 2	Muestra 2
C	Estándar 3 (1.25 ng/ml)	Estándar 3 (1.25 ng/ml)	Muestra 3	Muestra 3
D	Estándar 4 (0.63 ng/ml)	Estándar 4 (0.63 ng/ml)	Muestra 4	Muestra 4
E	Estándar 5 (0.31 ng/ml)	Estándar 5 (0.31 ng/ml)	Muestra 5	Muestra 5
F	Estándar 6 (0.16 ng/ml)	Estándar 6 (0.16 ng/ml)	Muestra 6	Muestra 6
G	Estándar 7 (0.08 ng/ml)	Estándar 7 (0.08 ng/ml)	Muestra 7	Muestra 7
H	Blanco	Blanco	Muestra 8	Muestra 8

- d. Añada 100 µl **diluyente de muestra** a los **pocillos del blanco**, por duplicado.
- e. Añada 80 µl de **diluyente de muestra** a los **pocillos con muestras del sero y de los controles**.

Añada 50 µl de **diluyente de muestra** a los **pocillos con muestras del plasma**.

- f. Por duplicado, añada 20 µl de cada **muestra del sero** y del **control** a los **pocillos designados**.

Por duplicado, añada 50 µl de cada **muestra del plasma** a los **pocillos designados**.

- 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, si es posible).
- h. Prepare **conjugado de HRP** (véase la preparación de conjugado de HRP 4.3.)
- i. Retire la tapa y vacíe los pocillos. **Lavar** los micropocillos de las tiras 3 veces de acuerdo al punto b. del protocolo del test. Proseguir inmediatamente después al próximo paso.
- j. Añada 100 µl **conjugado de HRP** 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, si es posible)
- l. Retire la tapa y vacíe los pocillos. **Lavar** los micropocillos de las tiras 3 veces de acuerdo al punto b. del protocolo del test. Proseguir inmediatamente después al próximo paso.
- m. Pipetee 100 µl de **solución de sustrato TMB** y viértalos en todos los pocillos, incluidos los del blanco.
- n. Incube las tiras a temperatura ambiente (18°C - 25°C) durante aproximadamente 10 minutos. Evite la exposición directa a la luz intensa.
Deben monitorizarse los valores DO de la placa para detener la reacción del sustrato (véase el siguiente punto de este protocolo) antes de que deje de ser posible registrar

correctamente los pocillos positivos.

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

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

- o. Detenga la reacción enzimática pipeteando rápidamente 100 µl de **solución de parada** en cada pocillo, incluidos los del blanco. Es importante dispensar la solución de parada de forma rápida y uniforme en todos los pocillos para inactivar totalmente la enzima. Los resultados deben leerse inmediatamente después de añadir la solución de parada o, como máximo, en el plazo de 1 hora si las tiras se conservan a una temperatura entre 2 - 8°C en un lugar oscuro.
- p. Lea la absorbancia de cada pocillo en un espectrofotómetro utilizando 450 nm como longitud de onda principal (opcionalmente 620 nm como longitud de onda de referencia; los valores comprendidos entre 610 nm y 650 nm son aceptables). Utilizando los pocillos de blanco, haga el blanco del lector de placas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Determine la absorbancia de las muestras y de los human sCD40L.

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

Las muestras del plasma 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).

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

INFORMATIONS SUR LE PRODUIT ET MANUEL (Français)

1. Réactifs Fournis

1.1. Reactifs pour ELISA de human sCD40L ELISA (extra sensitive) BMS293CE (96 essais)

- 1 pochette en aluminium contenant **une plaque de microtitration** recouverte d'anticorps monoclonaux anti-human sCD40L
- 1 flacon (150 µl) de **conjugué HRP** anti-human sCD40L (anticorps monoclonaux anti-human sCD40L)
- 2 flacons d'étalon **human sCD40L**, lyophilisé, 20.00 ng/ml après reconstitution
 - 1 flacon de **contrôle élevé**, lyophilisé
 - 1 flacon de **contrôle bas**, lyophilisé
 - 1 flacon (12 ml) **diluant d'échantillon**

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

- 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**
- 4 **couvre-plaques** adhésifs

**1.2. Reactifs pour ELISA (extra sensitive) de human sCD40L
BMS293TENCE
(10x96 essais)**

10 pochettes en aluminium contenant **une plaque de microtitration** recouverte d'anticorps monoclonaux anti-human sCD40L

10 flacons (150 µl) de **conjugué HRP** anti-human sCD40L (anticorps monoclonaux anti-human sCD40L)

10 flacons d'étalon **human sCD40L**, lyophilisé, 20.00 ng/ml après reconstitution

10 flacons de **contrôle élevé**, lyophilisé

10 flacons de **contrôle bas**, lyophilisé

10 flacons (12 ml) **diluant d'échantillon**

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

2 flacons (5 ml) **tampon d'essai concentré** 20 x
(PBS avec Tween 20 1% et de la sérumalbumine bovine 10%)

4 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**

20 **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 dissoudre la dissolution des cristaux totale.

4.1. Tampon de Lavage (1x)

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

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

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

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

4.2. Tampon d'Essai (1x)

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

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

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

4.3. Préparation du conjugué HRP

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

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

Le conjugué HRP peut être préparé selon le tableau suivant :

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

4.4. Étalon human sCD40L

Reconstituer **étalon** human sCD40L en ajoutant 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 = 20.00 ng/ml). Laisser reconstituer l'étalon pendant 10-30 min.

L' **étalon human sCD40L** reconstitué doit être dilué 1:2 avec Diluant d'échantillon. Ajouter le même volume que dans les reconstitution.

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 4.4.1).

4.4.1. Dilution d' étalon externe

Étiquetter 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 dilué (concentration d' étalon = 10.00

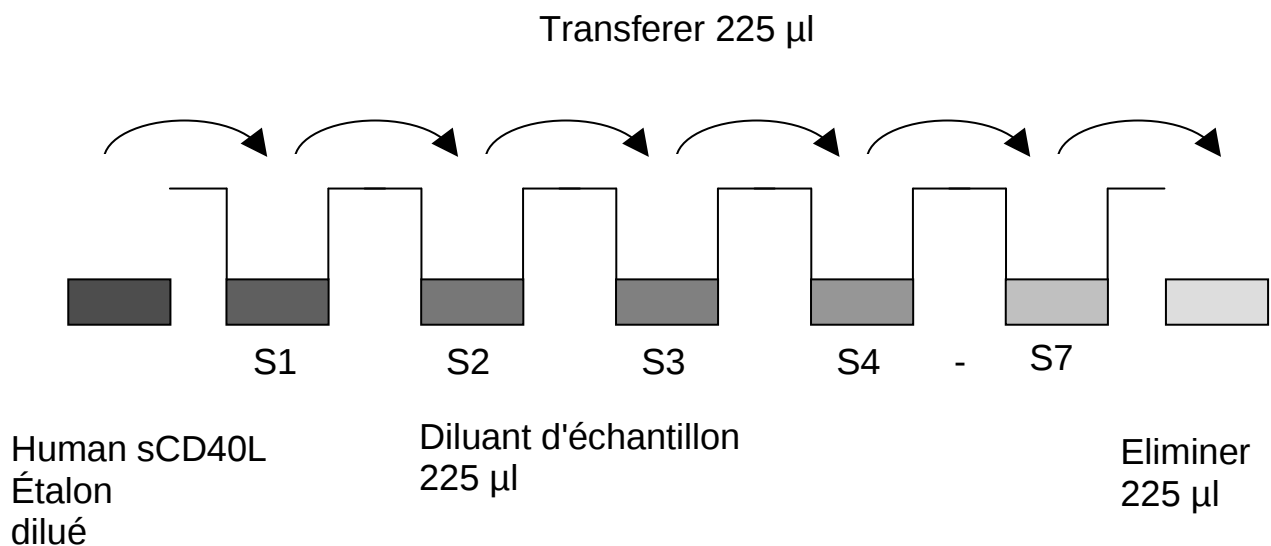
ng/ml) dans un premier tube marqué S1 et agiter (concentration d'étalon 1 = 5.00 ng/ml).

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

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

Diluant d'échantillon sert comme contrôle vide.

Figure 1



4.5. Contrôles

Solubiliser en ajoutant 200 µl d'eau distillée aux **contrôles** lyophilisés. Laisser reconstituer les contrôles pendant 10-30 min. Agiter doucement jusqu'à la dissolution complète et homogène. Traiter ensuite les contrôles comme **les échantillons sérique** dans le test. Pour la gamme étalon référez au certificat d'analyse ou l'étiquette de l'ampoule. Conserver les contrôles reconstitués aliquotés à -20°C. Eviter la congélation et le dégel répété.

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

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

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

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

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

5 ml Diluant d'échantillon	20 µl Colorant bleu
12 ml Diluant d'échantillon	48 µl Colorant bleu
50 ml Diluant d'échantillon	200 µl Colorant bleu

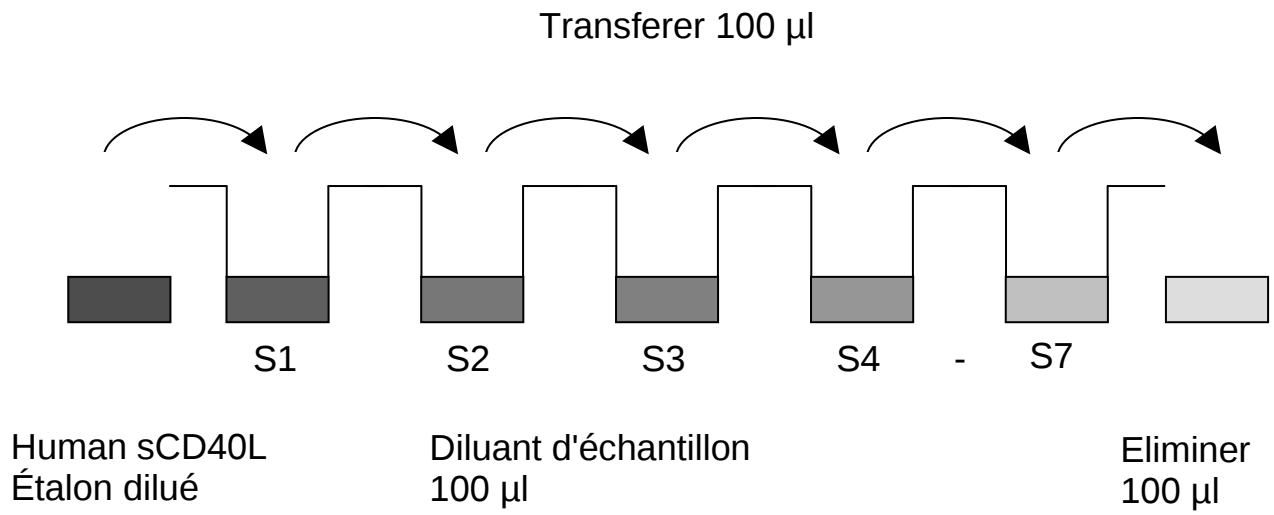
- 2. Conjugué HRP:** Avant la dilution du Conjugué HRP concentré, ajouter le **Colorant vert** à une dilution de 1:100 (voir le tableau ci-dessous) au Tampon d'essai (1x) utilisé pour la dilution finale du conjugué. Après l'ajout du **Colorant vert**, suivre le guide d'utilisation : préparation Conjugué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

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

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 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 4.4.1)
Ajouter en double 100 µl de diluant d'échantillon dans tous les **puits d'étalon**. Pipeter en double 100 µl d'**étalon** préparé (voir Preparation d'étalon, concentration = 10.00 ng/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 = 5.00 ng/ml), et transférer 100 µl dans les puits B1 et B2, respectivement (voir Figure 2). Veiller à ne pas rayer la surface des puits de microtitration. Continuer la procédure 5 fois en préparant deux séries de dilutions d'étalon human sCD40L, de 5.00 à 0.08 ng/ml. Eliminer 100 µl du contenu des derniers puits (G1, G2).

Figure 2



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

Tableau 1

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

	1	2	3	4
A	Étalon 1 (5.00 ng/ml)	Étalon 1 (5.00 ng/ml)	Échantillon 1	Échantillon 1
B	Étalon 2 (2.50 ng/ml)	Étalon 2 (2.50 ng/ml)	Échantillon 2	Échantillon 2
C	Étalon 3 (1.25 ng/ml)	Étalon 3 (1.25 ng/ml)	Échantillon 3	Échantillon 3
D	Étalon 4 (0.63 ng/ml)	Étalon 4 (0.63 ng/ml)	Échantillon 4	Échantillon 4
E	Étalon 5 (0.31 ng/ml)	Étalon 5 (0.31 ng/ml)	Échantillon 5	Échantillon 5
F	Étalon 6 (0.16 ng/ml)	Étalon 6 (0.16 ng/ml)	Échantillon 6	Échantillon 6
G	Étalon 7 (0.08 ng/ml)	Étalon 7 (0.08 ng/ml)	Échantillon 7	Échantillon 7
H	Contrôle vide	Contrôle vide	Échantillon 8	Échantillon 8

d. Ajouter 100 µl de Diluant d'échantillon dans tous les puits de contrôle vide.

e. Ajouter 80 µl de **diluant d'échantillon** dans tous les **puits d'échantillon de sérum** et de **contrôles**.

Ajouter 50 µl de **diluant d'échantillon** dans tous les **puits d'échantillon de plasma**.

f. Ajouter 20 µl de chaque **échantillon de sérum** et de **contrôle**, en double, dans **les puits d'échantillon**.

Ajouter 50 µl de chaque **échantillon de plasma**, en double, dans **les puits d'échantillon de plasma**.

g. Recouvrir avec un couvre-plaque et incuber à température ambiante (entre 18° et 25°C) pendant 2 heures, si possible sur un agitateur rotateur réglé à 400 rpm.

h. Préparer du **Conjugué HRP** (se reporter à la préparation des réactifs Conjugué HRP 4.3).

i. Retirer le couvre-plaque et vider les puits. **Laver** 3 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 **Conjugué HRP** dans tous **les puits**.

k. 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 rpm.

l. Retirer le couvre-plaque et vider les puits. **Laver** 3 fois les barrettes de puits de microtitration comme indiqué à point b. de ce protocole. Utiliser les barrettes de micropuits immédiatement après le lavage.

m. Pipeter 100 µl de **solution de substrat TMB** dans chaque puits, y compris les puits de contrôle vide.

n. Incuber les puits de microtitration à température ambiante (entre 18 et 25 C) pendant environ 10 minutes. Éviter toute exposition directe à une source de lumière intense.

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

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

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

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

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

Les échantillons de plasma 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).

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

INFORMAZIONI SUL PRODOTTO E MANUALE (Italiano)

1. Reagenti Forniti

1.1. Reagenti Forniti per human sCD40L ELISA (extra sensitive) **BMS293CE** (96 tests)

- 1 busta d'alluminio con **Piastra Micropozzetti rivestita** con anticorpo monoclonale anti-human sCD40L
- 1 flaconcino (150 µl) di anticorpo **HRP-Coniugato** (anticorpo monoclonale human sCD40L)
- 2 flaconcini human sCD40L **Standard** liofilizzato, 20.00 ng/ml previa ricostituzione diluizione
- 1 flaconcino di **Controllo basso**, liofilizzato
- 1 flaconcino di **Controllo alto**, liofilizzato
- 1 flaconcino (12 ml) con **Diluente del Campione**
- 1 flaconcino (5 ml) con **Tampone del Saggio concentrata 20x** (PBS con 1% Tween 20 e 10% BSA)
- 1 bottiglia (50 ml) con **Tampone di Lavaggio concentrato 20x** (PBS con 1% Tween 20)
- 1 flaconcino (15 ml) di **Soluzione Substrato** (tetrametilbenzidina)
- 1 flaconcino (15 ml) di **Soluzione bloccante** (acido fosforico 1M)
- 1 flaconcino (0.4 ml) **Colorante blu**
- 1 flaconcino (0.4 ml) **Colorante verde**
- 2 **Copripiastra** adesivi

**1.2. Reagenti Forniti per human sCD40L ELISA (extra sensitive)
BMS293TENCE
(10x96 tests)**

- 10 buste d'alluminio con **Piastra Micropozzetti rivestita** con anticorpo monoclonale policlonale anti-human sCD40L
- 10 flaconcini (150 µl) di anticorpo **HRP-Coniugato** (anticorpo monoclonale policlonale human sCD40L)
- 10 flaconcini human sCD40L **Standard** liofilizzato, 20.00 ng/ml previa ricostituzione diluizione
- 10 flaconcini di **Controllo basso**, liofilizzato
- 10 flaconcini di **Controllo alto**, liofilizzato
- 10 flaconcini (12 ml) con **Diluente del Campione**
- 2 flaconcini (5 ml) con **Tampone del Saggio concentrata 20x** (PBS con 1% Tween 20 e 10% BSA)
- 4 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**
- 10 **Copripiastra** 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 tampone** 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. HRP-Coniugato

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

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

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

4.4. Human sCD40L Standard

Ricostituire lo **human sCD40L standard** aggiungendo con acqua distillata. Il volume di ricostituzione è indicato sull'etichetta della flaconcino. Girare o mescolare gentilmente per garantire la completa ed omogenea solubilizzazione (concentrazione dello standard ricostituito = 20.00 ng/ml). Permettere allo standard ricostituito di riposare per 10-30 minuti. Prima di fare le diluizione mescolare bene.

Lo **human sCD40L standard** ricostituito devre essere diluito 1:2 con Diluente del campione. Dispensare lo stesso volume usato per il ricostituzione.

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

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

4.4.1. Diluizione degli Standard esterni

Etichettare 7 tubi, uno per ogni punto dello standard.

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

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

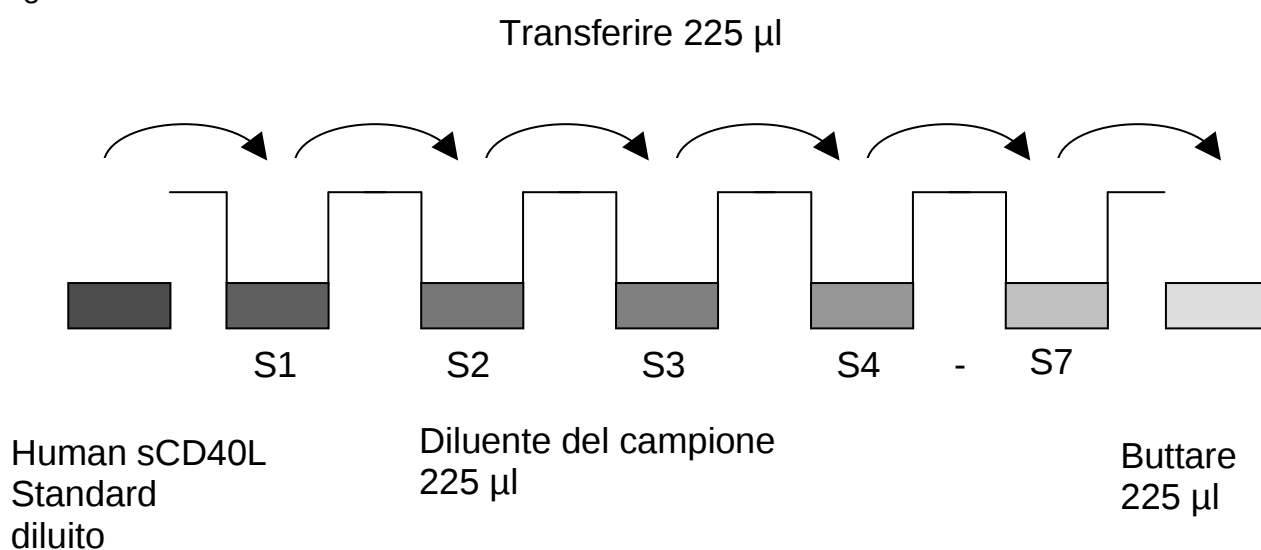
Pipettare 225 ul di Diluente del campione nei tutti tubi.

Pipettare 225 μ l di diluito standard (concentrazione dello standard = 10.00 ng/ml) nel primo tubo, etichettato S1, e mescolare (concentrazione dello standard 1 = 5.00 ng/ml).

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

Diluente del campione serve come bianco.

Figura 1



4.5. Controlli

Solubilizzare aggiungendo 200 μ l di acqua distillata al **controlli** liofilizzati. Permettere al 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 siero**. Per il range dei valori del controllo si rimanda al certificato di analysis o all'etichetta presente sulla fiala. Conservare i controlli ricostituiti in aliquote a -20°C. Evitare ripetuti cicli di scongelamento.

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

Per aiutare i clienti ad evitare errori di pipettamento con i kit Platinum ELISA, eBioscience offre ora un 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 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

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 il 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 4.4.1)
 Aggiungere 100 ul di diluente del campione in duplicato a tutti i **pozzetti dello standard**. Pipettare 100 ul **standard** preparato (vedi preparazione dello standard, concentrazione 10.00 ng/ml) in duplicato nei pozzetti A1 e A2 (vedi Tabella 1). Mescolare il contenuto dei pozzetti A1 e A2 attraverso ripetute aspirazione ed iniezioni (concentrazione dello standard 1, S1 = 5.00 ng/ml) e trasferire 100 ul, 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 5.00 a 0.08 ng/ml. Buttare 100 µl del contenuto degli ultimi pozzetti (G1 e G2).

Figura 2

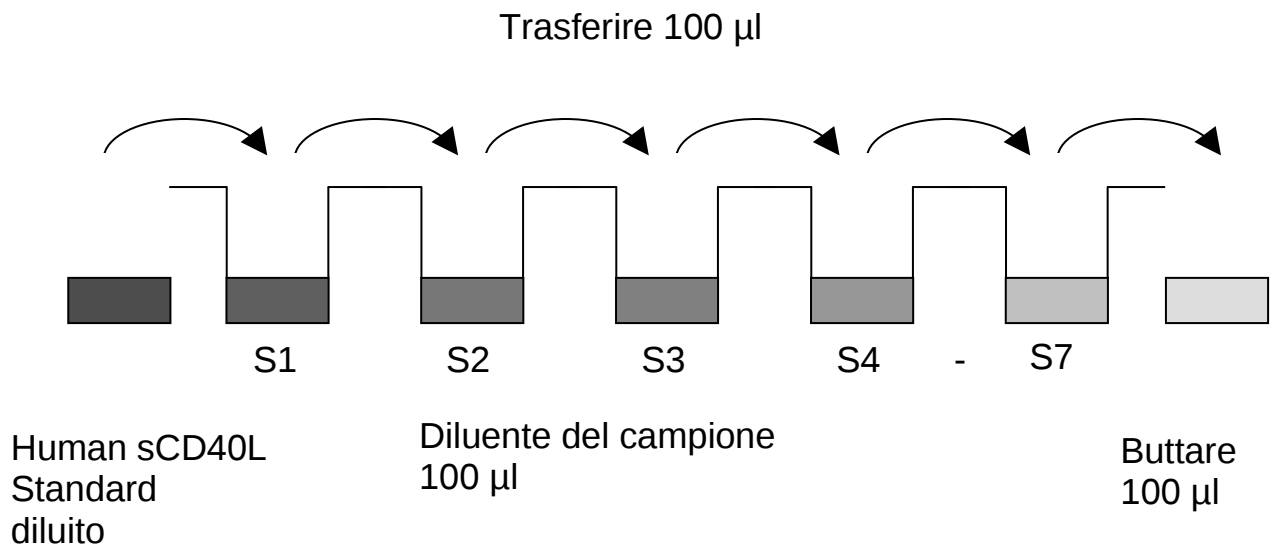


Tabella 1

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

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

	1	2	3	4
A	Standard 1 (5.00 ng/ml)	Standard 1 (5.00 ng/ml)	Campione 1	Campione 1
B	Standard 2 (2.50 ng/ml)	Standard 2 (2.50 ng/ml)	Campione 2	Campione 2
C	Standard 3 (1.25 ng/ml)	Standard 3 (1.25 ng/ml)	Campione 3	Campione 3
D	Standard 4 (0.63 ng/ml)	Standard 4 (0.63 ng/ml)	Campione 4	Campione 4
E	Standard 5 (0.31 ng/ml)	Standard 5 (0.31 ng/ml)	Campione 5	Campione 5
F	Standard 6 (0.16 ng/ml)	Standard 6 (0.16 ng/ml)	Campione 6	Campione 6
G	Standard 7 (0.08 ng/ml)	Standard 7 (0.08 ng/ml)	Campione 7	Campione 7
H	Bianco	Bianco	Campione 8	Campione 8

d. Dispensare 100 µl di **Diluente del campione** in duplicato ai **pozzetti de bianco**.

e. Dispensare 80 µl di **Diluente del campione** in duplicato ai **pozzetti dei campioni del siero** e dei **controlli**.

Dispensare 50 µl di **Diluente del campione** in duplicato ai **pozzetti dei campioni de plasma**.

f. Dispensare 20 µl di **campione del siero** e dei **controlli** in duplicato ai **pozzetti dei campioni**.

Dispensare 50 µl di **campione de plasma** in duplicato ai **pozzetti dei campioni**.

g. Coprire con un copripiastra e incubare a temperatura ambiente (18°-25°C) per 2 ore utilizzando, se disponibile, un vortex a 400 rpm.

h. Preparare la **HRP-coniugato** (consultare la sezione HRP-coniugato 4.3 sulla preparazione dei reagenti).

i. Rimuovere il copripiastra e svuotare i pozzetti. **Lavare** le strip della pozzeti 3 volte come descritto in punto b. del protocollo. Procedere immediatamente al punto successivo.

j. Dispensare 100 µl di **HRP-coniugato** a ciascun pozzetto.

k. Coprire con un copripiastra e incubare a temperatura ambiente (18-25°C) per 1 ora utilizzando, se disponibile, un vortex a 400 rpm.

l. Rimuovere il copripiastra e svuotare i pozzetti. **Lavare** le strip della pozzeti 3 volte come descritto in punto b. del protocollo. Procedere immediatamente al punto successivo.

m. Pipettare 100 µl di **soluzione substrato TMB** in tutti i pozzetti, inclusi quelli del blank.

n. Incubare le strip a temperatura ambiente (18°-25° C) per circa 10 minuti. Evitare l'esposizione diretta a luci intense.

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

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

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

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

- o. Interrompere la reazione enzimatica pipettando rapidamente 100 µl di **soluzione bloccante** in ciascun pozzetto, inclusi i pozzetti del bianco. È importante che la soluzione bloccante si diffonda rapidamente e uniformemente attraverso i micropozzetti per inattivare completamente l'enzima. I risultati devono essere letti immediatamente dopo l'aggiunta della soluzione bloccante o entro 1 ora se le strip sono conservate in un luogo buio a 2°-8° C.
- p. Leggere l'assorbanza di ciascun micropozzetto su uno spettrofotometro che utilizza 450 nm come lunghezza d'onda primaria (620 nm come lunghezza d'onda di riferimento alternativa; valori da 610 nm a 650 nm sono accettabili). Azzerare il lettore della piastra secondo le istruzioni del produttore e utilizzando i pozzetti del bianco. Determinare l'assorbanza sia dei campioni, sia degli standard di human sCD40L.

I campioni di siero e dei controlli sono stati diluiti 1:5, quindi la concentrazione dalla curva standard risultante deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione (x 5).

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

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