

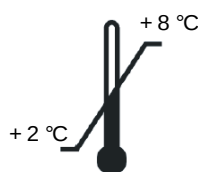
GST- π ELISA Kit

***Zur in vitro Bestimmung der Glutathion-S-Transferase π in
Serum, Plasma und Tumorgewebe***

***For the in vitro determination of Glutathion-S-Transferase π in
Serum, Plasma and tumor tissue extract***

Gültig ab / valid from 09.12.2010

K 7960



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com

Inhaltsverzeichnis	Seite/Page
Table of contents	2
1. VERWENDUNGSZWECK	3
2. EINLEITUNG	3
3. TESTPRINZIP	3
4. INHALT DER TESTPACKUNG	4
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	5
7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	5
8. PROBENVORBEREITUNG	6
9. TESTDURCHFÜHRUNG	6
HINWEISE	6
PIPETTIERSCHEMA	7
10. ERGEBNISSE	8
11. EINSCHRÄNKUNGEN	8
12. QUALITÄTSKONTROLLE	8
ERWARTETE ERGEBNISSE	8
13. TESTCHARAKTERISTIKA	9
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	9
SENSITIVITÄT	9
14. LITERATUR	10
15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	10

Table of content	Page
1. INTENDED USE	13
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	13
3. PRINCIPLE OF THE TEST	13
4. MATERIAL SUPPLIED	14
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	14
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	15
7. PRECAUTIONS	15
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	16
9. ASSAY PROCEDURE	16
PROCEDURAL NOTES	16
TEST PROCEDURE	17
10. RESULTS	18
11. LIMITATIONS	18
12. QUALITY CONTROL	18
EXPECTED VALUES	18
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	19
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	19
SENSITIVITY	19
14. LITERATURE	20
15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	20

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von **GST-pi** aus Serum, Plasma und Tumorgewebe. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Glutathion-S-Transferasen (GST) sind eine Gruppe weit verbreiteter Enzyme in eukaryotischen Zellen. Man teilt heute in fünf Familien ein: Alpha, Mu, Pi, Teta und mikrosomale. Die Klassen unterscheiden sich in ihrem physikochemischen, immunologischen, enzymatischen und strukturellen Eigenschaften und sind in unterschiedlichen Genorten lokalisiert. Ihre Funktion im Zellmetabolismus ist die Kopplung elektrophiler Agenzien, zu denen auch die meisten Karzinogene gehören, mit Glutathion (GSH). Die GST-pi sind die Hauptklasse in den Erythrozyten und einigen Leukozyten. Die GST-pi sind Dimere mit einem Molekulargewicht von 46000 Da und einem Isoelektrischen Punkt von circa 4,7.

In allen neoplastischen Geweben (fötal, maligne) konnten erhöhte Werte der GST detektiert werden. Besonders deutlich ist diese Erhöhung (2-3-fach) im Serum von Patienten mit post-operativen Rezidiven zu messen. Erhöhte Serumwerte findet man auch bei hämatologischen Erkrankungen (Hämolytische Anämie, sub-Formen der Leukämie). Außerdem können GST-pi Konzentrationen den multi-drug-resistance-Status eines Tumors anzeigen und die Relevanz der Chemotherapie klären.

Indikationen

- Tumormarker
- Multi-Drug-Resistance
- Potentieller Marker für die Quecksilberausschleusung
- Antioxidatives Enzym

3. TESTPRINZIP

Dieser Enzyme-Immuno-Assay (EIA) dient zur quantitativen Bestimmung der humanen GST-pi.

In diesem EIA werden polyklonale Kaninchenantikörper gegen humanes GST-pi eingesetzt. Das Testprinzip beruht auf einer Kompetitionsreaktion zwischen dem freien Antigen in der Probe oder Standard und dem an die Festphase gekoppeltem Antigen. Nach Ablauf zweier Inkubationsschritte, einer kalten Vorinkubation des Antikörpers mit der Probe bzw. den Standards und der Kompetitionsreaktion, erfolgt mittels eines peroxidase-markierten 2. Antikörpers und nachfolgender Substratumsetzung die Detektion. Als Substrat wird TMB eingesetzt. Die gebildete, chromogene Verbindung kann photometrisch bei 450 nm gemessen werden.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 7960MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	1 Platte/96 wells
K 7960WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	1 x 100 ml
K 7960AP	ASSAYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	1 x 11 ml
K 7960A1	1.AB	1. Antikörper (Kaninchen anti hGST-pi), lyophilisiert	1 x 12 ml
K 7960K	CONJ	POD Antikörper, (Esel anti Kaninchen, Peroxidase-markiert), gebrauchsfertig	1 x 11 ml
K 7960ST	STD	Standards, lyophilisiert	2 x 5 vials
K 7960KO1	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	2 vials
K 7960KO2	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	2 vials
K 7960TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 7960AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Auf Wunsch erhalten Sie bei Bedarf 1 weiteres Standardset kostenlos. Jedes weitere Standardset wird berechnet.

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenreader mit Filter 450 nm

*Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25°C (≤18,2 MΩ cm).

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bei mehrfachen Ansätzen werden **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt und die entsprechende Anzahl an Mikrotiterstreifen verwendet**. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen und Reagenzien werden wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert. Die Reagenzien reichen für 4 Ansätze innerhalb der Mikrotiterplatte und des angegebenen Haltbarkeitsdatums.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- Der **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnen (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die lyophilisierten **STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrollen) **werden mit dem in der Spezifikation bzw. auf dem Fläschchen angegebenen Volumen Reinstwasser rekonstituiert**. Um eine vollständige Lösung der rekonstituierten Standards und Kontrollen zu gewährleisten, müssen sie **mindestens 10 min** bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Mischen stehen bleiben. Die lyophilisierten Standards und Kontrollen sind bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) haltbar. Rekonstituierte Standards und Kontrollen können einmal eingefroren und wieder aufgetaut werden.
- Der lyophilisierte **1. AB** (1. Antikörper) wird bei 4-8 °C gelagert. Der lyophilisierte **1. AB** (1. Antikörper) wird in 12 ml Reinstwasser rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. Der rekonstituierte 1. Antikörper wird bei -20 °C gelagert. Er kann bis zu 4x aufgetaut und wieder eingefroren werden und ist bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) haltbar.
- Alle anderen Testreagenzien werden gebrauchsfertig geliefert und sind bis zum angegebenen Verfalldatum (siehe Etikett der Testpackung) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Komponenten die auf Humanserum aufgebaut sind, sind auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.

- Die Stopplösung besteht aus H_2SO_4 . H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht behandelt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

Plasma und Serum

Plasma oder Serum: Venöses Blut in Plasma- oder Serumröhrchen abnehmen (kein Heparin-Röhrchen verwenden), mischen und nach 15 - 30 Minuten 10 Minuten bei $1800 \times g$ zentrifugieren. Das entstehende Serum bzw. Plasma bis zur Messung bei -20°C tiefgefroren lagern.

Es dürfen keine hämolytischen Proben verwendet werden.

Gewebe

Gewebe nach Entnahme homogenisieren (z.B. mit einem Dismembrator: 1500 rpm, 5 min.) und in Phosphatpuffer aufnehmen. 1 Stunde bei $100000 \times g$ zentrifugieren und Überstand (cytosolische Fraktion) bei -20°C lagern.

Der Proteingehalt der cytosolischen Fraktion wird nach Lowry et al. oder mit dem BCA Protein Assay [Pierce] bestimmt.

Alternativ kann das Gewebematerial nach der Homogenisierung in Phosphatpuffer mit 1% Triton X100 aufgenommen werden. Nach kräftigem Schütteln für mindestens 2 Stunden wird das Lysat bei $10\,000 \times g$ für 10 Minuten zentrifugiert. Nach der Proteinbestimmung wird der Überstand im EIA eingesetzt.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung abzuarbeiten.

Pipettierschema

Vorinkubation von Standard/Kontrolle/Probe mit Antikörper:

1. **25 µl STD** (Standards), **CTRL** (Kontrolle), Patientenproben oder Gewebe (aufgearbeitet) und **25 µl ASSAYBUF** (Assaypuffer) in ein Teströhrchen geben.
2. **200 µl 1.AB** (1.Antikörper) pro Teströhrchen pipettieren.
3. **16 h** bei **4 – 8 °C** inkubieren.
4. Die vorbeschichtete Mikrotiterplatte vor Gebrauch **5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen**. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen. Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.
5. **100 µl** des vorinkubierten Ansatzes gut vortexen (mischen) und in die entsprechenden Vertiefungen der vorgewaschenen Mikrotiterplatte pipettieren.
6. **4 h** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
7. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
8. **100 µl CONJ** (Konjugat, POD-markiert) pro Vertiefung pipettieren.
9. **45 min** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
10. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
11. **100 µl SUB** (TMB-Substrat) pro Vertiefung pipettieren
12. **10-20 Minuten** (entsprechend der Farbdifferenzierung) bei Raumtemperatur inkubieren.
13. **50 µl STOP** (Stopplösung) pro Vertiefung pipettieren.
14. **Extinktion** sofort im Mikrotiterplattenphotometer mit einer Messwellenlänge von **450 nm** messen. Sofern die höchste Extinktion der Standards (**STD**) den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte die Messung sofort bei einer Messwellenlänge von **405 nm** wiederholt und diese Ergebnisse für eine Auswertung herangezogen werden. Wenn möglich, sollten bei jeder Messung die Extinktionen der Messwellenlänge mit den Extinktionen einer Referenzwellenlänge verglichen werden. Zulässige Referenzwellenlängen sind z.B.: 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm und 690 nm.

10. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter Funktion:

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer GST-pi Konzentration > 600 ng/ml sollten in ASSYBUF (Assaypuffer) verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden.

12. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen Kontrollen oder Plasma/Serum Pools, bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Proben nicht gewährleisten.

Erwartete Ergebnisse

Plasma / Serum

90 – 280 ng/ml

13. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben innerhalb einer Mess-Serie wurde geprüft. Eine Probe wurde 10-mal in einem GST-pi ELISA von einer Person angesetzt.

Intra-Assay VK n= 10

Probe	GST-pi Mittelwert [ng/ml]	Intra-Assay Vk [%]
1	50	12

Inter-Assay-Variation

Es wird die Reproduzierbarkeit von einer Proben an unterschiedlichen Tagen geprüft. Eine Probe wurden an verschiedenen Tagen und von verschiedenen Personen im GST-pi ELISA gemessen.

Inter-Assay VK n= 10

Probe	GST-pi Mittelwert [ng/ml]	Inter-Assay Vk [%]
1	84	15

Sensitivität

Der Null-Standard wurde mehrfach (n=20) vermessen. Von der ermittelten Optischen Dichte wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 - 2SD$.

Probe	GST-pi Mittelwert [OD]	Standardab- weichung	Nachweis- grenze [ng/ml]
Blank	2.33	0.12	10.7

14. LITERATUR

1. Sundberg et al. *Nephron* 1994; 66:162-169
2. Hayes, Pickett, Mantle, *Proceedings of 3rd International GST Conference*, Edinburgh, Scotland 1989
3. Sundberg et al. *Nephron* 1994; 67:308-316

15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Falls für die Herstellung der Testkomponenten Humanseren verwendet wurde, sind diese auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Testkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid/ Thimerosal sind giftig. Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit der Haut oder der Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Alle im Test enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken oder, wenn vermerkt, zur *in vitro* Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Datums nicht mehr verwendet werden. Einzelkomponenten verschiedener Chargen dürfen nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller- der Immundiagnostik zurück zu senden.

09.12.2010 20032003_GST-pi.DOC

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung



Nur für Forschungszwecke

Manual

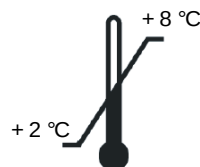
GST- π ELISA Kit

***For the in vitro determination of Glutathion-S-Transferase π in
Serum, Plasma and tumor tissue extract***

Gültig ab / valid from 09.12.2010



K 7960



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com

1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is intended for the quantitative determination of **GST- π** in serum and tumor tissue extract. For *in vitro* diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Glutathion-S-transferases (GST) are a group of enzymes, which are involved in detoxification processes. The GSTs are divided in 5 subgroups: Alpha, Mu, Pi, Teta and microsomal. The classes differ in their physicochemical, immunological, enzymatic and structural properties. Their function in cellular metabolism is the coupling of electrophile compounds, for example most of the carcinogens, to Glutathion (GSH). The GST Pi is the main group in erythrocytes and in some leucocytes, moreover they are found in most tissues except liver. The GST Pi are dimeric molecules with a molecular weight of 46000 Da and an isoelectric point of about 4.7. High GST Pi levels were found in all neoplastic tissue (fetal, maligne) and in serum of patients with post-operative relapse. Increased serum levels were also found in haematological diseases (haemolytic anaemia and sub-groups of leukemia). Moreover GST Pi concentrations give information about the multi-drug-resistance-status of tumours.

Indications

- Tumor marker
- Multi-drug resistance
- Potential marker for mercury excretion
- Antioxidative enzyme

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This Enzyme-Immuno Assay (EIA) allows the quantitative determination of human GST Pi. GST Pi is first coated to the surface of the microtiter plates. After a blocking step and a preincubation of calibrators and samples with a polyclonal rabbit antibody the GST Pi in the controls and samples compete with the GST Pi on the plate for the antibody binding. After a washing step the detection of the bound rabbit antibody is performed by a peroxidase labeled goat anti rabbit antibody (POD-antibody). The amount of converted substrate (TMB) is indirectly proportional to the amount of GST Pi antigen in the sample and can be determined photometrically at 450 nm.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K 7960MTP	PLATE	One holder with precoated strips	1 plate / 96 wells
K 7960WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	100 ml
K 7960AP	ASSAYBUF	Assay buffer, ready-to-use	11 ml
K 7960A1	1.AB	1 st Antibody (rabbit anti hGST-pi), lyophilized	12 ml
K 7960K	CONJ	POD antibody, (goat anti rabbit, Peroxidase-labeled), ready-to-use	11 ml
K 7960ST	STD	Calibrators, lyophilized	2 x 5 vials
K 7960KO1	CTRL	Control, lyophilized	2 vials
K 7960KO2	CTRL	Control, lyophilized	2 vials
K 7960TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine)	1 x 15 ml
K 7960AC	STOP	ELISA stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

On demand we will send you 1 calibrator set free of charge. Any further calibrator sets will be charged.

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Precision pipettors calibrated to deliver 50-100 µl
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Microplate reader 450 nm

*Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25°C (≤18.2 MΩ cm).

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, **prepare only the appropriate amount necessary for each assay and take the number of microtiter plate strips required.** Store unused strips and reagents at the conditions stated on the label. The reagents are enough for 4 runs with one microtiter plate and within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The ELISA **WASHBUF** (wash buffer concentrate) must be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at 37 °C in water bath before dilution of the buffer solutions. The **buffer concentrate** is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month.**
- The lyophilized **STD** (standards) and **CTRL** (controls) **must be reconstituted with ultra pure water; the exact volume is given in the specification as well as on the label of corresponding vial.** Allow the vial contents to dissolve **for 10 minutes** at room temperature, and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. The undiluted standards and controls are stable at **2-8 °C** until expiry date stated on the label. Reconstituted standards and controls can be frozen and thawed once.
- The lyophilized **1.AB** (1. antibody, rabbit anti-GST Pi) must be stored at **2-8 °C**. The lyophilized **1.AB** must be reconstituted with **12 ml** ultra pure water. Allow the vial to stand for minimum 10 minutes and then mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. The reconstituted 1. antibody must be stored at **-20°C**. The reconstituted 1. antibody can be frozen and thawed up to 4 times and is stable at **-20°C** until the expiry date stated on the label.
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date stated on the label of test package when stored at **2-8 °C**.

7. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- Quality control guidelines should be observed.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.

- Kit reagents contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Plasma or serum: Collect blood in plasma- or serum tubes (don't use heparin tubes), mix and incubate 15-30 minutes at 2-8°C, then centrifuge 10 minutes at 1800xg. Store serum or plasma at -20°C.

Caution - Don't use haemolytic serum or plasma -

Tissue material must be homogenized (e.g. mechanically with a dismembrator) and then resuspended in phosphate buffer, followed by an ultracentrifugation step (1h at 100.000 x g). The supernatant represents the cytosolic fraction. Protein in the supernatant should be determined according to Lowry et al. or with BCA Protein Assay [Pierce].

Alternatively, the tissue material can be resuspended after the homogenization in phosphate buffer with 1% Triton X100. After mixing for at least 2 hours the tissue lysate must to be centrifuged at 10 000 x g for 10 minutes. After determination of protein content, the supernatant can be used for the EIA.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Test procedure

Preincubation of standard/control/ sample with antibody:

1. Pipette **25 µl STD** (standards), **CTRL** (control) and patient samples and **25 µl ASSAYBUF** (Assay buffer) into test tubes.
2. Add **200 µl** of the **1.AB** (1st antibody).
3. Incubate for **16h** at **2 - 8°C**
4. Wash the precoated microtiter plate 5 x with 250 µl ELISA wash buffer. Carry out the tests in duplicate.
5. Shake the preincubated solution well and pipette **100 µl** of the solution in each well of washed microtiter plate.
6. Incubate for **4h** at room temperature °C, shaking on a horizontal mixer.
7. Decant the content of plate and wash the wells **5 x with 250 µl** ELISA wash buffer
8. Pipette **100 µl CONJ** (peroxidase labeled antibody) into each well.
9. Incubate for **45 min** at room temperature, shaking on a horizontal mixer.
10. Decant content of plate and wash the wells **5 x with 250 µl** ELISA wash buffer
11. Pipette **100 µl SUB** (TMB substrate solution) into each well
12. Incubate **10-20 minutes** at room temperature until sufficient colour differences are visible.
13. Add **50 µl STOP** (stop solution) and mix shortly.
14. Determine **absorption** immediately with an ELISA reader at **450 nm**. If the highest extinction of the standards (**STD**) is above the range of the photometer, absorption must be measured immediately at **405 nm** and the obtained results used for evaluation. If possible, the extinctions from each measurement should be compared with extinctions obtained at a reference wavelength, e. g. 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm and 690 nm can be used.

10. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the "4-Parameter-algorithm".

1. 4-Parameter-algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

2. Point-to-point-calculation

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

3. Spline-algorithm

We recommend a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

11. LIMITATIONS

Samples with GST-pi levels > 600 ng/ml should be diluted in ASSYBUF (assay buffer) and re-assayed.

12. QUALITY CONTROL

Control samples should be analyzed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid, if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

Expected values

Plasma / Serum

90 – 280 ng/ml

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

The precision (intra-assay variation) of the Immundiagnostik GST-pi ELISA test was calculated from 10 replicate determinations on each of the samples.

Intra-Assay CV n= 10

Sample	GST-pi Mean value [ng/ml]	Intra-Assay CV [%]
1	50	12

The total precision (inter-assay variation) of the Immundiagnostik GST-pi ELISA test was calculated from data on 2 samples obtained in 10 different assays by three technicians on two different lots of reagents over a period of 3 months.

Inter-Assay CV n= 10

Sample	GST-pi Mean value [ng/ml]	Inter-Assay CV [%]
1	84	15

Sensitivity

The Zero-standard was measured 20 times. Based on the measured Optical Density values, the mean value and the standard deviation were calculated. The sensitivity limit was set as $B_0 - 2 \text{ SD}$.

Sample	GST-pi Mean value [OD]	Standard variation	Detection limit [ng/ml]
Blank	2.33	0.12	10.7

14. LITERATURE

1. Sundberg et al. *Nephron* 1994; 66:162-169
2. Hayes, Pickett, Mantle, *Proceedings of 3rd International GST Conference*, Edinburgh, Scotland 1989
3. Sundberg et al. *Nephron* 1994; 67:308-316

15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG or Apotech Corporation along with a written complaint.

14.07.2009_GST-pi.DOC

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		Contains sufficient for <n> tests
	Manufacturer		Use by
	Lot number		For research use only