

BAFF ELISA Kit

Zur in vitro Bestimmung des BAFF(B Cell Activating Factor belonging to the TNF family, Blys, TALL-1) löslich (human) in Serum und Zellkulturüberständen

BAFF, Soluble (human) ELISA Kit

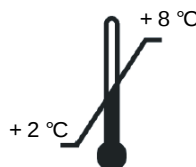
For the in vitro Determination of BAFF (B Cell Activating Factor belonging to the TNF family, Blys, TALL-1) soluble (human) in serum and cell culture supernatant

Nur zu wissenschaftlichen Zwecken / For research use only

Gültig ab / Valid from 14.07.2005



K 9410



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

Inhalt / Content

1. Deutsch
2. English

Weitere Informationen zu unseren Produkten finden Sie auf unserer
Homepage

Additional information about our products is available on our homepage

www.immundiagnostik.com

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) Kit ist für die quantitative Bestimmung von löslichem humanem BAFF (B cell activating factor belonging to the TNF- α -family) in Serum und Zellkulturüberständen geeignet. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Das zur TNF-Superfamilie zählende BAFF (B cell activating factor, bekannt auch als BLyS oder TALL1) ist ein Zytokin, welches vorwiegend von Zellen des Immunsystems wie Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen, Dendriten-Zellen, follikulären dendritischen Zellen, aktivierten T-Zellen sowie von manchen malignen B-Zellen exprimiert wird. BAFF bindet drei verschiedene Rezeptoren (BAFFR, TACI und BCMA), die hauptsächlich auf B-Zellen exprimiert werden, obwohl auch aktivierte T-Zellen BAFFR produzieren. BAFF wirkt als Hauptregulator beim Überleben von B-Zellen im peripheren Blut und als "Schalter" bei der Synthese von Immunoglobulin-Isotypen bzw. bei der Kostimulation von B-Zellen. Parallel zu seiner Hauptrolle in der Biologie der B-Zellen kostimuliert BAFF aktivierte T-Zellen. Eine deregulierte Expression von diesem membrangebundenen Protein, welches durch proteolytische Spaltung in löslicher Form freigesetzt wird, führt zu Autoimmunerkrankungen bei Mäusen. Erhöhte Spiegel des löslichen BAFF wurden im Serum von Menschen mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoide Arthritis (RA), Sjögren's Syndrom (SS) und Systemischer Lupus Erythematosus (SLE) detektiert. BAFF-Konzentrationen sind erhöht auch in Patienten mit Multiple Myeloma und chronisch-lymphatischer B-Zellen-Leukämie (B-CCL).

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K9410MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 9410WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	100 ml
K 9410AP	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	16 ml
K 9410KP	CONJBUF	Konjugat-Verdünnungspuffer, gebrauchsfertig	25 ml
K 9410	STDBUF	Standardverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	16 ml
K 9410ST	STD	BAFF Standards, lyophilisiert (Bereich siehe Spezifikation oder Etikett)	2 x 8 vials
K 9410A	AB	Detektionsantikörper, monoklonaler anti-BAFF Antikörper, Konzentrat	250 µl
K 9410K	CONJ	Konjugat, Peroxidase markiert Konzentrat	200 µl
K 9410TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	2 x 15 ml
K 9410AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	7 ml

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 5 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 oder 405 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 2x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml aqua bidest), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. 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 Standards (STD) sind bei **2 - 8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Standards werden mit **500 µl Standardverdünnungspuffer** (STDBUF) rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. Rekonstituierte Standards können **nicht gelagert** werden.
- Der **Detektionsantikörper** (AB) wird **1:100** in **Waschpuffer** (WASHBUF) verdünnt (100 µl AB + 10 ml WASHBUF). Der **unverdünnte Antikörper** ist bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Die verdünnte Antikörperlösung kann nicht aufbewahrt werden.**
- Das **Konjugat** (CONJ) wird **1:150** in **Konjugat-Verdünnungspuffer** (CONJBUF) verdünnt (65 µl CONJ + 10 ml CONJBUF). Unverdünntes Konjugat ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konjugat ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG

Serum und Zellkulturüberstände

Frisch abgenommenes Blut sollte innerhalb einer Stunde abzentrifugiert werden. Es kann entweder am gleichen Tag im Test eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden. Lipämische oder hämolysierte Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.

Zentrifugation der Zellkulturüberstände wird empfohlen. Vor dem Einsatz im Test sollten die Proben gut gemischt werden. Wir empfehlen alle Proben in Doppelbestimmungen zu analysieren.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf der "Sandwich"-ELISA Technik. Es werden zwei ausgewählte monoklonale Antikörper, die humanes BAFF erkennen, verwendet.

Standards, Kontrollen und Proben, die BAFF enthalten, werden in eine Mikrotiterplatte pipettiert, deren Vertiefungen mit einem hochaffinen monoklonalen anti-human BAFF Antikörper beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das BAFF aus der Probe von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Es folgt die Zugabe des Detektionsantikörpers (monoklonaler anti-BAFF Antikörper) in alle Vertiefungen. In einem weiteren Inkubationsschritt bindet der Detektionsantikörper an das BAFF. Dann wird das Konjugat (ein Peroxidase markierter Antikörper) zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper - humanes BAFF – Detektionsantikörper - Peroxidase Konjugat. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem BAFF-Gehalt direkt proportional. Parallel dazu wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

Pipettierschema

1. Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen
2. Positionen für STD/SAMPLE (Standard/Probe) in Doppelbestimmung im Protokollblatt markieren
3. Benötigte Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden
4. Mikrotiterstreifen 5x mit je 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
5. 50 µl STD /SAMPLE in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen pipettieren
6. 150 µl ASYBUF (Assaypuffer) in alle Vertiefungen pipettieren
7. Streifen abdecken und 2 Stunden bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren
8. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen

9. 200 µl AB (Detektionsantikörper) in alle Vertiefungen pipettieren
10. Streifen abdecken und 1,5 Stunden bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren
11. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
12. 200 µl CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren
13. Streifen abdecken und 2 Stunden bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren
14. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
15. 200 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren
16. 10 - 20 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren*
17. 50 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen

18. Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden wird nur bei 450 nm gelesen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden

*Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

8. 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

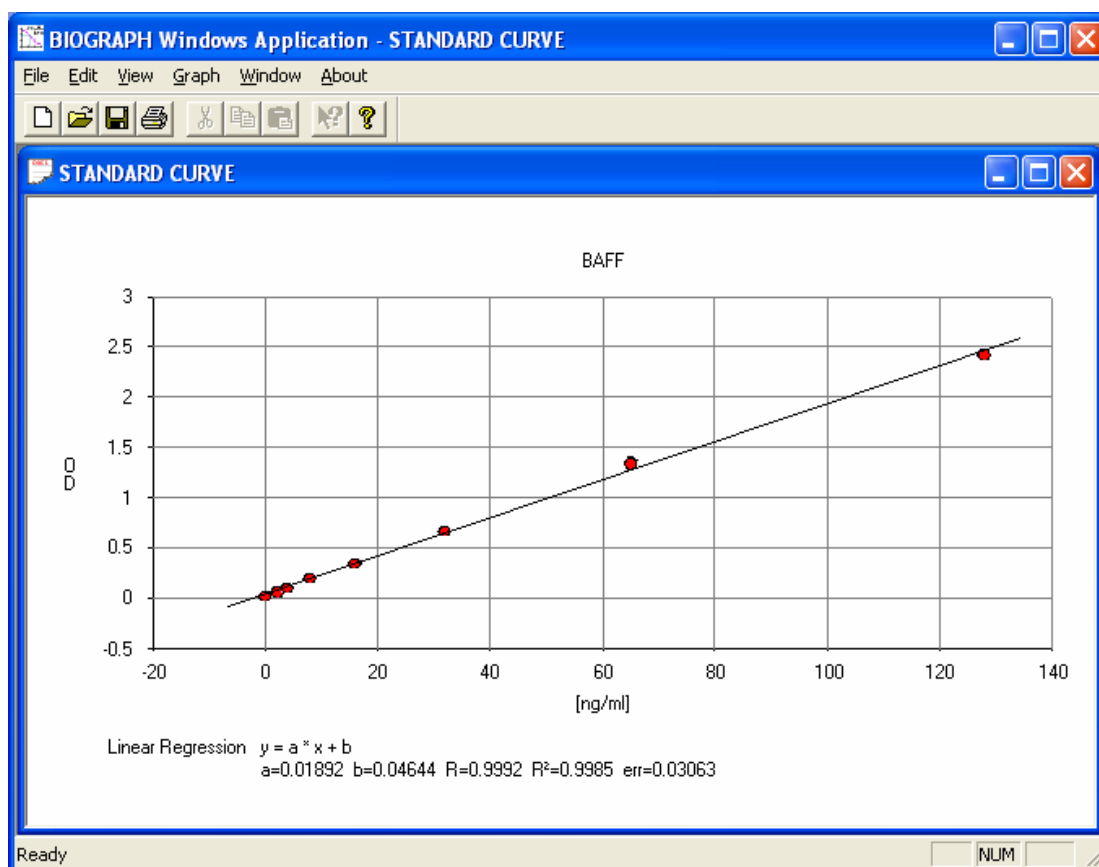
Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

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.

Mustereichkurve



STD	OD1	OD2	Mittlere OD	CV (%)	Konz. [ng/ml]
1	0.027	0.023	0.025	11.3	0
2	0.068	0.060	0.064	8.8	2
3	0.112	0.107	0.110	3.2	4
4	0.204	0.195	0.200	3.2	8
5	0.350	0.356	0.353	1.2	16
6	0.673	0.672	0.673	0.1	32
7	1.372	1.314	1.343	3.1	64
8	2.435	2.422	2.429	0.4	128

Diese Daten sind als Beispiel für eine Standardkurve aufgeführt und dürfen nicht zur Auswertung von Kundenergebnissen verwendet werden.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit hohen BAFF Konzentrationen, die außerhalb der Standardkurve liegen, werden mit Standardverdünnungspuffer verdünnt und nochmals bestimmt.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von kommerziell erhältlichen Kontrollen (wenn vorhanden) für die interne Qualitätskontrolle.

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

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde als $B_0 + 3 \text{ SD}$ festgelegt. Gemessen wurde 20 mal der Standard null.

Probe	BAFF Mittelwert [OD]	Standardabweichung (SD)	Nachweisgrenze [ng/ml]
1	0.030	0.006	0.95

12. VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in vitro* Diagnostik verwendet 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 AG 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 AG zurück zu senden.

15. LITERATUR

1. Krumbholz, M., Theil, D., Derfuss, T., Rosenwald, A., Schrader, F., Monoranu, C. M., Kalled, S. L., Hess, D. M., Serafini, B., Aloisi, F., *et al.* (2005). BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *J Exp Med* **201**, 195-200.
2. Lavie, F., Miceli-Richard, C., Quillard, J., Roux, S., Leclerc, P., and Mariette, X. (2004). Expression of BAFF (BLyS) in T cells infiltrating labial salivary glands from patients with Sjogren's syndrome. *J Pathol* **202**, 496-502.
3. Mackay, F., Sierro, F., Grey, S. T., and Gordon, T. P. (2005). The BAFF/APRIL system: an important player in systemic rheumatic diseases. *Curr Dir Autoimmun* **8**, 243-265.
4. Novak, A. J., Darce, J. R., Arendt, B. K., Harder, B., Henderson, K., Kindsvogel, W., Gross, J. A., Greipp, P. R., and Jelinek, D. F. (2004). Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival. *Blood* **103**, 689-694.
5. Schneider, P. (2005). The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* **17**, 282-289.
6. Sutherland, A. P., Ng, L. G., Fletcher, C. A., Shum, B., Newton, R. A., Grey, S. T., Rolph, M. S., Mackay, F., and Mackay, C. R. (2005). BAFF Augments Certain Th1-Associated Inflammatory Responses. *J Immunol* **174**, 5537-5544.

This assay was developed by
Immundiagnostik, Bensheim, Germany and Apotech Corporation, Epalinges,
Switzerland



18.01.2006 14072005_BAFF.doc

BAFF, Soluble (human) ELISA Kit

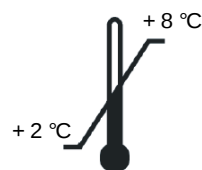
*For the in vitro Determination of BAFF (B Cell Activating Factor
belonging to the TNF family, Blys, TALL-1) soluble (human) in
serum and cell culture supernatant*

For research use only

Valid from July 14th, 2005



K 9410



1. INTENDED USE

The BAFF, Soluble (human) Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) Kit is intended for the quantitative determination of soluble (human) BAFF in serum and cell culture supernatant. It is for *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

BAFF (B cell activating factor belonging to the TNF family, also known as BLyS or TALL1) is a cytokine expressed predominantly by cells of the immune system such as neutrophils, monocytes, macrophages, dendritic cells, follicular dendritic cells, activated T cells and some malignant B cells. BAFF binds three distinct receptors (BAFFR, TACI and BCMA) predominantly expressed on B cells, although activated T cells also express BAFFR. BAFF is a master regulator of peripheral B cell survival, and also acts in processes such as immunoglobulin isotype switch and B cell co-stimulation. Beside its major role in B cell biology, BAFF co-stimulates activated T cells. Deregulated expression of this membrane-bound protein, which can readily be released in a soluble form by proteolytic cleavage, leads to autoimmune disorders in mice. In the human, elevated levels of soluble BAFF have been detected in the serum of patients with various autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis (RA), Sjögren's syndrome (SS) and systemic lupus erythematosus (SLE). BAFF levels are also elevated in patients with multiple myeloma and B-cell chronic lymphoid leukemia (B-CCL).

3. MATERIAL SUPPLIED

Catalogue No	Content	Kit Components	Quantity
K 9410MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 9410WB	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	100 ml
K 9410AP	ASYBUF	Assay buffer, ready-to-use	16 ml
K 9410	CONJBUF	Conjugate dilution buffer, ready-to-use	25 ml
K 9410	STDBUF	Standard dilution buffer, ready-to-use	16 ml
K 9410ST	STD	BAFF Standards, lyophilized (for range see specification or label)	2 x 8 vials
K 9410	AB	Detection antibody, monoclonal anti BAFF antibody, concentrate	250 µl
K 9410K	CONJ	Conjugate, peroxidase-labeled, concentrate	200 µl
K 9410TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	2 x 15 ml
K 9410AC	STOP	ELISA stop solution, ready-to-use	7 ml

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Precision pipettors calibrated and tips to deliver 5-1000 µl
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 or 405 nm (reference wave length 620 or 690 nm)

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 4 times 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 wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml concentrate + 900 ml aqua bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or at 37°C 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 **standards** (STD) are stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label. The standards must be reconstituted with **500 µl standard dilution buffer** (STDBUF). Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. Reconstituted standards are **not stable**.
- The **detection antibody** (AB) must be diluted **1:100** in wash buffer (WASHBUF) (100 µl AB + 10 ml WASHBUF). The antibody is stable at **2-8 °C** until expiry date stated on the label. **Diluted antibody solution is not stable and can not be stored.**
- The **conjugate** (CONJ) must be diluted **1:150** in conjugate dilution buffer (CONJBUF) (65 µl CONJ + 10 ml CONJBUF). The undiluted conjugate is stable at **2-8 °C** until expiry date stated on the label. **Diluted conjugate is not stable and can not be stored.**
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8°C**.

6. SAMPLE PREPARATION

Serum and cell culture supernatant

Centrifugation of serum or cell culture supernatant is recommended before apply to kit.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This assay is a sandwich (ELISA) for the direct measurement of human BAFF in serum and cell culture supernatants.

Standards, controls and samples containing human BAFF are added to wells of microplate coated with a high affinity monoclonal anti-human BAFF antibody. During the first incubation period, the antibody immobilized on the wall of the microtiter wells captures BAFF in the patient samples or in the cell culture supernatants. After washing away the unbound components from samples, a detection antibody (monoclonal anti-BAFF antibody) is added to each well. During the incubation step, the detection antibody is bound to the captured BAFF. A peroxidase-conjugated antibody is then added to each microtiter well and a “sandwich” of capture antibody - human BAFF – detection antibody - Peroxidase conjugate is formed. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as a substrate for peroxidase. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The intensity of the yellow color is directly proportional to the BAFF concentration of sample. A dose response curve of absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated; using the values obtained from standard. BAFF present in the patient samples or cell culture supernatants, is determined directly from this curve.

Test procedure

1. Bring all reagents and samples to room temperature (18-26 °C) and mix well
2. Mark the positions of STD /SAMPLE (Standards/Sample) in duplicate on a protocol sheet
3. Take as many microtiter strips as needed from kit. Store unused strips covered at 2-8° C. Strips are stable until expiry date stated on the label
4. Wash each well 5 times by dispensing 300 µl of diluted WASHBUF (Wash buffer) into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper
5. Add 50 µl of STD/SAMPLE (Standard/Sample; see section 5) in duplicate into respective well
6. Add 150 µl ASYBUF (Assay buffer) into each well
7. Cover the plate tightly and incubate for 2 hours at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer
8. Aspirate the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 300 µl of diluted WASHBUF (Wash buffer) into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution
9. Add 200 µl AB (detection antibody) (1:100, see section 5) into each well

10. Cover plate tightly and incubate for 1,5 hours at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer
11. Aspirate the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 300 µl of diluted WASHBUF (Wash buffer) into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution
12. Add 200 µl CONJ (conjugate) (1:150, see section 5) into each well
13. Cover plate tightly and incubate for 2 hours at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer
14. Aspirate the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 300 µl of diluted WASHBUF (Wash buffer) into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution
15. Add 200 µl of SUB (substrate) into each well
16. Incubate for 10 - 20 minutes at room temperature (18-26°C) in the dark*
17. Add 50 µl of STOP (stop solution) into each well, mix thoroughly

18. Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference

*The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend to observe the procedure of the color change and to stop the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

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

1. 4-parameter-algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for 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

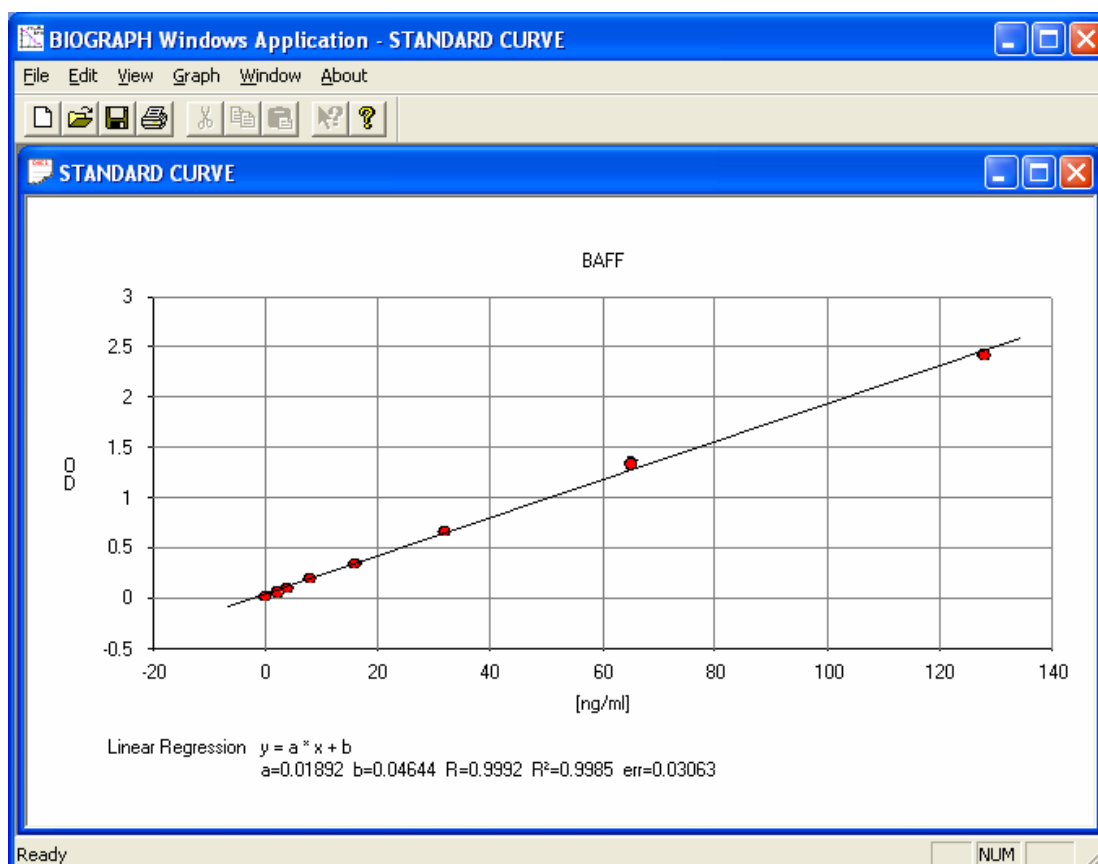
We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for concentration.

3. Spline-algorithm

We recommend a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for 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.

Typical calibration curve



STD	OD1	OD2	mean OD	CV (%)	Conc. [ng/ml]
1	0.027	0.023	0.025	11.3	0
2	0.068	0.060	0.064	8.8	2
3	0.112	0.107	0.110	3.2	4
4	0.204	0.195	0.200	3.2	8
5	0.350	0.356	0.353	1.2	16
6	0.673	0.672	0.673	0.1	32
7	1.372	1.314	1.343	3.1	64
8	2.435	2.422	2.429	0.4	128

The data is for demonstration only and cannot be used for the evaluation of test results.

9. LIMITATIONS

Cell culture supernatant or serum with BAFF levels greater than the highest standard value, should be diluted with the corresponding cell culture medium or STDBUF, respectively and re-assayed.

10. 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.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Sensitivity

The sensitivity was set as $B_0 + 3SD$. The zero-standard was measured 20 times.

Sample	BAFF mean value [OD]	Standard variation (SD)	Detection limit [ng/ml]
1	0.030	0.006	0.95

12. 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.

13. TECHNICAL HINTS

- 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.

14. 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.

15. REFERENCES

7. Krumbholz, M., Theil, D., Derfuss, T., Rosenwald, A., Schrader, F., Monoranu, C. M., Kalled, S. L., Hess, D. M., Serafini, B., Aloisi, F., *et al.* (2005). BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *J Exp Med* **201**, 195-200.
8. Lavie, F., Miceli-Richard, C., Quillard, J., Roux, S., Leclerc, P., and Mariette, X. (2004). Expression of BAFF (BLyS) in T cells infiltrating labial salivary glands from patients with Sjogren's syndrome. *J Pathol* **202**, 496-502.
9. Mackay, F., Sierro, F., Grey, S. T., and Gordon, T. P. (2005). The BAFF/APRIL system: an important player in systemic rheumatic diseases. *Curr Dir Autoimmun* **8**, 243-265.
10. Novak, A. J., Darce, J. R., Arendt, B. K., Harder, B., Henderson, K., Kindsvogel, W., Gross, J. A., Greipp, P. R., and Jelinek, D. F. (2004). Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival. *Blood* **103**, 689-694.
11. Schneider, P. (2005). The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* **17**, 282-289.
12. Sutherland, A. P., Ng, L. G., Fletcher, C. A., Shum, B., Newton, R. A., Grey, S. T., Rolph, M. S., Mackay, F., and Mackay, C. R. (2005). BAFF Augments Certain Th1-Associated Inflammatory Responses. *J Immunol* **174**, 5537-5544.

This assay was developed by
Immundiagnostik, Bensheim, Germany and Apotech Corporation, Epalinges,
Switzerland



18.01.2006 14072005_BAFF.doc