

APRIL ELISA Kit

Zur in vitro Bestimmung des APRIL (A Proliferation-Inducing Ligand) in Zellkulturüberständen und Plasma

APRIL ELISA Kit

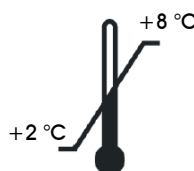
For the in vitro Determination of APRIL (A Proliferation-Inducing Ligand) from cell culture supernatant and plasma

Nur zu wissenschaftlichen Zwecken / For research use only

Gültig ab/valid from 08.06.2010



K 9411



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) ist für die quantitative Bestimmung von APRIL (A Proliferation-Inducing Ligand) aus Zellkulturüberständen geeignet. Nur zu wissenschaftlichen Zwecken.

2. EINLEITUNG

APRIL, ein Typ II Transmembran-Protein [250 aa, zytoplasmatischer Bereich: 28 aa, Transmembran-Bereich: 21 aa und extrazelluläre Domäne: 201 aa] soll sowohl bei Autoimmun- als auch bei Tumor Erkrankungen eine Rolle spielen.

Es stimuliert die Proliferation von Tumor Zell-Linien and scheint in der Tumor-Genese beteiligt zu sein. Allgemein begleitet es die B- und T-Zell Proliferation, löst humorale Immun-Antworten aus, aktiviert NF- κ B und induziert Zell-Tod. TACI (transmembrane activator und CAML-interactor) und BCMA (B-cell maturation antigen) gelten als Rezeptoren für APRIL.

APRIL gehört zur TNF-Superfamilie, welche in Immun-Reaktionen und in Apoptose involviert ist.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 9411MTP	PLATE	Mikrotitermodul (nicht beschichtet!)	12 x 8 Vertiefungen
K 9411WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	1 x 100 ml
K 9411A1	COATAB	Beschichtungsantikörper, Kaninchen-anti-APRIL, Konzentrat	10 µl
K 9411BeP	COATBUF	Beschichtungspuffer, gebrauchsfertig	20 ml
K 9411BP	BLOCKBUF	Blockierungspuffer, gebrauchsfertig	25 ml
K 9411ST	STDKONZ	Standardstocklösung	10 µl
K 9411STP	STDBUF	Standard-Verdünnungspuffer, gebrauchsfertig	40 ml
K 9411A2	AB	Detektionsantikörper, monoclonaler Maus-anti-APRIL, Konzentrat	10 µl
K 9411VP	ABBUF	Detektionsantikörper-Verdünnungspuffer, gebrauchsfertig	40 ml
K 9411K	CONJ	Konjugat, Peroxidase-markiert, gebrauchsfertig	15 ml
K 9411TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml
K 9411AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	15 ml

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 0,5 - 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 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 3 x 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 WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), 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** (WASHBUF) 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.
- Der **Beschichtungsantikörper** (COATAB) ist bei 2-8 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Zur Herstellung der Beschichtungslösung für den Schritt 3 (7. Testdurchführung, Pipettierschema) wird der **COATAB** mit **Beschichtungspuffer** (COATBUF) verdünnt, z. B.: **3 µl COATAB + 10 ml COATBUF**. Achten Sie darauf, nur die für den jeweiligen Ansatz benötigte Lösung herzustellen, da die verdünnte Lösung nicht stabil ist.
- Das **Standardkonzentrat** (STDKONZ) ist 2 Wochen bei 2-8 °C stabil. Für längere Zeit wird das STDKONZ bei -20 °C gelagert. Für den Test wird das **STDKONZ** mit dem **Standard-Verdünnungspuffer** (STDBUF) verdünnt.

Die Lösungen für die Standardkurve werden aus **0.5 µl STDKONZ** (empfohlene APRIL Konzentration 1 mg/ml) und **4 ml STDBUF** hergestellt, gut mischen. Die Konzentration beträgt 125 ng/ml = Standard 1.

0.5 µl STDKONZ + 4 ml STDBUF = S1	(125 ng/ml)
0.5 ml S1 + 0.5 ml STDBUF = S2	(62,5 ng/ml)
0.5 ml S2 + 0.5 ml STDBUF = S3	(31.3 ng/ml)
0.5 ml S3 + 0.5 ml STDBUF = S4	(15.6 ng/ml)
0.5 ml S4 + 0.5 ml STDBUF = S5	(7.8 ng/ml)
0.5 ml S5 + 0.5 ml STDBUF = S6	(3.9 ng/ml)
0.5 ml S6 + 0.5 ml STDBUF = S7	(1.95 ng/ml)

Als Standard S8 (0 ng/ml) wird Standard-Verdünnungspuffer (STDBUF) verwendet.

- Der **Detektionsantikörper** (AB) ist bei 2-8 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Der **AB** wird für den Test mit dem **Detektionsantikörper-Verdünnungspuffer** (ABBUF) verdünnt.
Die Endkonzentration des **Detektionsantikörpers** (AB) ist **1 : 60 000**. Achten Sie darauf, nur die für den jeweiligen Ansatz benötigte Lösung herzustellen, da die verdünnte Lösung nicht stabil ist.

Die Verdünnung wird in zwei Schritten durchgeführt, z. B.:

Verdünnung I: Verdünnung 1 : 100

1 µl AB (Detektionsantikörper) + 100 µl ABBUF (Detektionsantikörper-Verdünnungspuffer)

Verdünnung II: Verdünnung 1 : 600

16.6 µl Verdünnung I + 10 ml ABBUF (Detektionsantikörper-Verdünnungspuffer)

Endverdünnung: 1 : 60 000

Pro Vertiefung werden **100 µl der Verdünnung II** im Test eingesetzt.

- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG

Zellkulturüberstände

Es wird empfohlen den Zellkulturüberstand vor Gebrauch zu zentrifugieren. Eventuell enthaltendes FCS im Zellkulturmedium kann zu einer Erhöhung der optischen Dichte (OD) und damit zur Ermittlung von falsch niedrigen Konzentrationen führen. Daher empfehlen wir FCS enthaltende Proben mindestens **1:10 in FCS freien Zellkulturmedium zu verdünnen**.

Plasmaproben

Plasmaproben werden unverdünnt im Test eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf der "Sandwich"-ELISA Technik. Es werden zwei ausgewählte Antikörper (polyklonale und monoklonale), die humanes APRIL erkennen, verwendet.

Standards und Proben, die auf APRIL zu untersuchen sind, werden in eine Mikrotiterplatte pipettiert, deren Vertiefungen mit einem hochaffinen anti-human APRIL Antikörper beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das APRIL aus der Probe von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Es folgt die Zugabe des Detektionsantikörpers (monoklonaler anti-APRIL Antikörper). In einem weiteren Inkubationsschritt bindet der Detektionsantikörper an das APRIL. Dann wird das Konjugat, ein Peroxidase markierter Antikörper, zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper - humanes APRIL – Detektionsantikörper – Peroxidase-Konjugat. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch folgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem APRIL-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.	Vor Gebrauch alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (18-26°C) bringen, gut mischen.
2.	Die Positionen für STD/SAMPLE (Standards/Proben) in Doppelbestimmung im Protokollblatt markieren.
3.	Die benötigten Mikrotiterstreifen aus der PLATE nehmen und 100 µl Beschichtungslösung pro Vertiefung pipettieren.
4.	Streifen abdecken und über Nacht (ca. 16 h) bei 2 – 8°C inkubieren .
5.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen. Mikrotiterstreifen 3x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
6.	200 µl BLOCKBUF (Blockierungspuffer) pro Vertiefung pipettieren.
7.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) inkubieren .

8.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen. Mikrotiterstreifen 3x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
9.	100 µl STD 1 – 8/SAMPLE (Standard 1-8/Probe) in Doppelbestimmung in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren.
10.	Streifen abdecken und 2 Stunden bei Raumtemperatur (18-26°C) unter moderatem Schütteln inkubieren .
11.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen. Mikrotiterstreifen 3x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
12.	100 µl verdünnten Detektionsantikörper (Maus-anti-APRIL) in alle Vertiefungen pipettieren.
13.	Streifen abdecken und 2 Stunden bei Raumtemperatur (18-26°C) unter moderatem Schütteln inkubieren .
14.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen. Mikrotiterstreifen 3x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
15.	100 µl CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren.
16.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter moderatem Schütteln inkubieren .
17.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen. Mikrotiterstreifen 3x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
18.	100 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren und bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln 5 – 15 min* inkubieren . Eine Farbveränderung tritt auf.
19.	50 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen.
20.	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.

*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.

Zur Ermittlung der APRIL-Konzentration verdünnter Zellkulturüberstände werden die Ergebnisse mit dem Verdünnungsfaktor **10** multipliziert.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Zellkulturüberstände mit hohen APRIL Konzentrationen, die außerhalb der Standardkurve liegen, werden mit dem entsprechenden Zellkulturmedium weiter verdünnt und nochmals bestimmt.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen 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. VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur zu wissenschaftlichen Zwecken.
- 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 eingesetzt 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.

12. 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.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken 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.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



Nur für Forschungszwecke



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

APRIL ELISA Kit

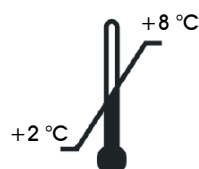
For the in vitro Determination of APRIL (A Proliferation-Inducing Ligand) from cell culture supernatant and plasma

For research use only

Valid from 08.06.2010



K 9411



1. INTENDED USE

The described Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) is intended for the quantitative determination of APRIL (A Proliferation-Inducing Ligand) in cell culture supernatant. It is for research use only.

2. INTRODUCTION

APRIL - a type II transmembrane protein [250 aa, cytoplasmatic domain: 28aa, transmembrane domain: 21aa, extracellular domain: 201aa] - is considered to be involved in autoimmune and cancer diseases. It stimulates proliferation of tumor cell lines and seems to play a role in tumorigenesis. In general it is involved in B and T cell proliferation, triggers humoral immune responses, activates NF- κ B and induces cell death.

TACI (transmembrane activator) and BCMA (B-cell maturation antigen) are considered to be receptors for APRIL.

APRIL belongs to the TNF-Superfamily which is involved in immune responses and apoptosis.

3 MATERIAL SUPPLIED

Catalogue No	Content	Kit Components	Quantity
K 9411MTP	PLATE	Microtiter plate, one holder with strips (no precoating!)	12 x 8 wells
K 9411WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	100 ml
K 9411A1	COATAB	Coating antibody, rabbit-anti-APRIL, concentrate	10 µl
K 9411BeP	COATBUF	Coating buffer, ready to use	20 ml
K 9411BP	BLOCKBUF	Blocking buffer, ready to use	25 ml
K 9411ST	STDKONZ	Standard stock solution	10 µl
K 9411STP	STDBUF	Standard dilution buffer, ready to use	40 ml
K 9411A2	AB	Detection antibody, monoclonal mouse-anti-APRIL, concentrate	10 µl
K 9411VP	ABBUF	Detection antibody dilution buffer, ready to use	40 ml
K 9411K	CONJ	Conjugate, peroxidase-labeled, ready to use	15 ml
K 9411TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	15 ml
K 9411AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	15 ml

4 MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Precision pipettors calibrated and tips to deliver 0,5 - 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 nm (reference wave length 620 or 690 nm)

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than one time, make sure that the reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare just the appropriate amount necessary for the assay.** The kit can be used up to 3 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 WASHBUF + 900 ml a. bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals have to be redissolved at 37° C using a water bath before dilution of the buffer solutions. The **buffer concentrate** (WASHBUF) 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 coating antibody** (COATAB) is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. The COATAB is diluted in **coating buffer** (COATBUF) to prepare the coating solution used in Step 3 (7. Assay procedure, Test procedure), e.g. **3 µl of COATAB + 10 ml of COATBUF**. Make sure to produce only the amount of coating solution needed, as the diluted solution is not stable.
- **The standard concentrate** (STDKONZ) is stable at **2-8 °C** for 2 weeks. For longer periods of time, the STDKONZ should be stored at -20° C. The **STDKONZ** is diluted with **standard dilution buffer** (STDBUF).

For the preparation of the standards used in the calibration curve, add **0.5 µl STDKONZ** (recommended APRIL concentration 1 mg/ml) to **4 ml STDBUF**, mix well. The concentration is equivalent to 125 ng/ml = standard 1.

0.5 µl STDKONZ + 4 ml STDBUF = S1	(125 ng/ml)
0.5 ml S1 + 0.5 ml STDBUF = S2	(62,5 ng/ml)
0.5 ml S2 + 0.5 ml STDBUF = S3	(31.25 ng/ml)
0.5 ml S3 + 0.5 ml STDBUF = S4	(15.6 ng/ml)
0.5 ml S4 + 0.5 ml STDBUF = S5	(7.8 ng/ml)
0.5 ml S5 + 0.5 ml STDBUF = S6	(3.9 ng/ml)
0.5 ml S6 + 0.5 ml STDBUF = S7	(1.95 ng/ml)

Standard dilution buffer is used as a standard S8, (0 ng/ml).

- The **detection antibody (AB)** is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. The **AB** is diluted in **detection antibody dilution buffer** (ABBUF) to a final concentration of **1 : 60 000**. Make sure to prepare only the amount of solution needed, as the diluted antibody solution is not stable.

The dilution is performed in two steps, e.g.:

Dilution I: Dilution 1 : 100

1 µl of AB (detection antibody) + **100 µl of ABBUF** (detection antibody dilution buffer)

Dilution II: Dilution 1 : 600

16.6 µl of Dilution I + **10 ml of ABBUF** (detection antibody dilution buffer)

Final dilution: 1 : 60 000

For analysis, pipette **100 µl** of **Dilution II** per well.

- All other test reagents are ready to use. The test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8°C**.

6. SAMPLE PREPARATION

Cell culture supernatant

It is recommended to centrifuge the cell culture supernatant before the determination is performed.

Cell culture media containing FCS may lead to lower results. Therefore, it is recommended to **dilute FCS-containing samples 1:10** with FCS-free cell culture medium.

Plasma samples

Plasma samples are analyzed without any dilution.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

The assay utilizes the two-site “sandwich” technique with two selected antibodies (polyclonal and monoclonal) that bind to human APRIL.

Assay standards and samples to be tested for human APRIL are added to wells of microplate that was coated with an anti-human APRIL antibody. After the first incubation period, antibodies immobilized on the wall of microtiter wells capture human APRIL in the samples. A detection antibody (monoclonal anti-APRIL antibody) is added to each well. In an incubation step, the detection antibody binds to APRIL. Then a peroxidase-conjugated antibody is added to each microtiter well and a “sandwich” of a capture antibody - human APRIL – detection antibody - Peroxidase conjugate is formed. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as a substrate for the peroxidase. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The color changes from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of APRIL. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standards. APRIL present in the samples, is determined directly from this curve.

Test procedure

1.	Bring all reagents and samples to room temperature (18 – 26°C) and mix well before use.
2.	Mark positions for STD/SAMPLE (standards/samples) in duplicates on the protocol sheet.
3.	Remove the needed strips from the PLATE (microtiter plate) and coat with 100 µl of coating solution per well.
4.	Cover the plate tightly and incubate over night (ca. 16 h) at 2 – 8°C.
5.	Discard the content of wells and wash 3x with 250 µl of diluted wash buffer. Tap plate to an absorbent paper after the last washing step to remove remaining wash buffer.
6.	Pipette 200 µl of BLOCKBUF (blocking buffer) to all wells.
7.	Cover the plate tightly and incubate for 1 h at room temperature (18-26°C).

8.	Discard the content of wells and wash 3x with 250 µl of diluted wash buffer. Tap plate to an absorbent paper after the last washing step to remove remaining wash buffer.
9.	Transfer 100 µl of STD 1 – 8/SAMPLE (Standard 1-8/Samples) in duplicates into the corresponding well.
10.	Cover the plate tightly and incubate for 2 h at room temperature (18-26°C) under moderate shaking.
11.	Discard the content of wells and wash 3x with 250 µl of diluted wash buffer. Tap plate to an absorbent paper after the last washing step to remove remaining wash buffer.
12.	Pipette 100 µl of the diluted detection antibody solution (mouse-anti-APRIL) into all wells.
13.	Cover the plate tightly and incubate for 2 h at room temperature (18-26°C) under moderate shaking.
14.	Discard the content of wells and wash 3x with 250 µl of diluted wash buffer. Tap plate to an absorbent paper after the last washing step to remove remaining wash buffer.
15.	Transfer 100 µl of CONJ (conjugate) into all wells.
16.	Cover the plate tightly and incubate for 1 h at room temperature (18-26°C) under moderate shaking.
17.	Discard the content of wells and wash 3x with 250 µl of diluted wash buffer. Tap plate to an absorbent paper after the last washing step to remove remaining wash buffer.
18.	Pipette 100 µl of SUB (Substrat) into all wells and incubate for 5 – 15 min* at room temperature (18-26°C) in the dark. A colour change will occur.
19.	Add 50 µl of STOP (Stop solution) into all wells, mix well.
20.	Read the absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm.

*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 the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator has to be specified with a value smaller 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 for the optical density a linear ordinate and for the concentration a logarithmic abscissa. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator has to be specified with a value smaller 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.

For the calculation of the APRIL concentration in diluted cell culture supernatants, the results must be multiplied by a dilution factor of **10**.

9. LIMITATIONS

Cell culture supernatant with APRIL levels greater than the highest standard value, should be further diluted with the corresponding cell culture medium 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. PRECAUTIONS

- For research use only.
- The quality control guidelines should be observed.
- Human material used in the kit components was 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.
- Reagents of the kit package contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. The 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 spill should be wiped out immediately with copious quantities of water.

12. 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.

13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- All reagents in the kit package are for research use only.
- The 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 lodged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



For research use only



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number