

# SOLUBLE SEMAPHORIN 4D

(EN) ELISA FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF HUMAN  
SOLUBLE SEMAPHORIN 4D IN EDTA PLASMA, HEPARIN PLASMA, AND CITRATE  
PLASMA

Cat. No. BI-20405 . 12 x 8 TESTS

(DE) ELISA ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON HUMANEM  
LÖSLICHEM SEMAPHORIN 4D IN EDTA PLASMA, HEPARIN PLASMA UND CITRAT  
PLASMA

Kat. Nr. BI-20405 . 12 x 8 TESTE

FOR RESEARCH USE ONLY  
NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES

rev.no. 190107 (replacing 180116)

This kit was developed and manufactured by:  
Biomedica Medizinprodukte GmbH, A-1210 Wien, Divischgasse 4  
Tel. +43/1/291 07 45, Fax +43/1/291 07 6389, E-mail [info@bmgrp.com](mailto:info@bmgrp.com)



## **CONTENT / INHALT**

**ENGLISH** Page 3  
**DEUTSCH** Seite 8

*Detailed information on the assay characteristics including the validation data can be found on our website.*

*Detaillierte Informationen zu den Testmerkmalen einschließlich der Validierungsdaten finden Sie auf unserer Website.*

**[www.bmgrp.com](http://www.bmgrp.com)**

## 1) INTRODUCTION

Semaphorin 4D (SEMA4D or CD100) is a member of a family of transmembrane and secreted proteins that regulates key cellular functions and is involved in cell-cell communication (1-3). Most of the effects of SEMA4D is mediated by plexins (4, 5). SEMA4D participates in numerous physiological processes such as axon guidance, immune regulation, angiogenesis, tumor progression, and bone metabolism (6-9). Cleavage of SEMA4D near the cell membrane through matrix metalloproteinases leads to the biologically active soluble SEMA4D with a molecular weight of 120 kD consisting of 713 amino acids (3, 5, 10). SEMA4D has emerged to a novel therapeutic target in cancer and in bone diseases (11, 12). Semaphorin 4D is widely studied for its role in neural connectivity, vascularization, cell migration, the immune response, tumor progression, and bone remodeling. This sSEMA4D ELISA utilizes two monoclonal anti-human Semaphorin 4D antibodies, both recognizing conformational epitopes on Semaphorin 4D. The epitopes have been mapped by overlapping cyclic peptides and shown to involve amino acids AA30-AA34 and amino acids AA238-AA241, respectively (for further information on antibody characterization please visit our website [www.bmgrp.com](http://www.bmgrp.com); see Validation Data).

### Areas of interest:

- Osteology
- Immunology
- Neurology
- Oncology

## 2) CONTENTS OF THE KIT

CONT	KIT COMPONENTS	QUANTITY
PLATE	Monoclonal mouse anti-human Semaphorin 4D antibody pre-coated microtiter strips in a strip holder, packed in an aluminium bag with desiccant	12 x 8 tests
WASHBUF	Wash buffer concentrate 20x, natural cap	1 x 50 ml
STD	Standards 1-7, (0; 62.5; 125; 250; 500; 1,000; 2,000 pmol/l), recombinant human soluble Semaphorin 4D in human plasma, white caps, lyophilised	7 vials
CTRL	Controls A and B, yellow caps, lyophilised, exact concentrations see labels	2 vials
ASYBUF	Assay buffer, red cap, ready to use	1 x 13 ml
CONJ	Conjugate (bivalent Fab bacterial alkaline phosphatase fusion antibody - HRP), amber bottle, amber cap, ready to use	1 x 13 ml
SUB	Substrate (TMB solution), amber bottle, blue cap, ready to use	1 x 13 ml
STOP	Stop solution, white cap, ready to use	1 x 7 ml

## 3) ADDITIONAL MATERIAL IN THE KIT

- 2 self-adhesive plastic films
- Quality control protocol
- Protocol sheet
- Instruction for use

## 4) MATERIAL AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Precision pipettes calibrated to deliver 10 µl, 50 µl, 100 µl and 200 µl incl. disposable tips
- Distilled or deionised water
- Plate washer is recommended for washing, alternative multichannel pipette or manifold dispenser
- Refrigerator with 4°C (2-8°C)
- ELISA reader capable of measuring absorbance at 450 nm (with correction wavelength at 630 nm)
- Graph paper or software for calculation of results

## 5) REAGENTS AND SAMPLE PREPARATION

All reagents as supplied in the kit are stable at 4°C (2-8°C) until expiry date stated on the label of each reagent.

EDTA plasma, citrate plasma and heparin plasma are suitable for use in this assay. We do not recommend serum as sample matrix due to coagulation-induced sSEMA4D shedding (13). Do not change sample type during studies.

### Sample preparation/dilution:

Collect venous blood samples by using standardized blood collection tubes for plasma. Perform plasma separation by centrifugation according to supplier's instructions of the blood collection devices and measure the acquired plasma samples as soon as possible. For longer storage aliquot samples and store at -25°C or lower. Samples are stable for 4 freeze-thaw cycles. Lipemic or haemolysed samples may give erroneous results. Samples should be mixed well before assaying. We recommend duplicates for all values. Samples with values above highest STD can be diluted with ASYBUF (Assay buffer).

For further information on sample stability please visit our website [www.bmgrp.com](http://www.bmgrp.com) (see Validation Data) or contact our customer service by e-mail [info@bmgrp.com](mailto:info@bmgrp.com) or by phone +43/ 1/ 29107-45.

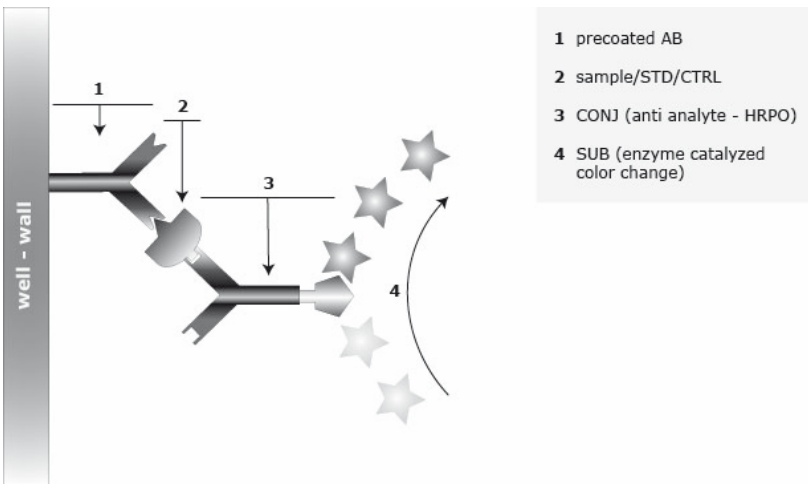
### Reconstitution/Handling:

**WASHBUF (Wash buffer):** Dilute the concentrate 1:20, e.g. 50 ml WASHBUF + 950 ml distilled water. Crystals in the buffer concentrate will dissolve at room temperature. The undiluted WASHBUF is stable at 4°C (2-8°C) until expiry date stated on label. The diluted WASHBUF is stable up to one month at 4°C (2-8°C). Only use diluted WASHBUF when performing the assay.

**STD (Standards) + CTRL (Controls):** Pipette 200 µl of distilled or deionised water into each vial. Leave at room temperature (18-26°C) for 15 min. Vortex gently. Make sure that lyophilisate is completely dissolved. The exact concentration is printed on the label. Reconstituted STDs and CTRLs are stable at -25°C or lower until expiry date stated on the label. STDs and CTRLs are stable for 4 freeze-thaw cycles.

## 6) PRINCIPLE OF THE ASSAY

This kit is a sandwich enzyme immunoassay for the direct determination of soluble Semaphorin 4D in human plasma samples. In a first step, STD/sample/CTRL are pipetted into the wells of the microtiter strips, which are pre-coated with anti Semaphorin 4D antibody. Semaphorin 4D present in the STD/sample/CTRL binds to the pre-coated antibody in the well. In the washing step all non-specific unbound material is removed. In a next step, the conjugate (bivalent Fab bacterial alkaline phosphatase fusion antibody-HRP) is pipetted into the wells and reacts with the soluble Semaphorin 4D forming a sandwich. After another washing step, the substrate (TMB Tetramethylbenzidine) is pipetted into the wells. The enzyme catalysed colour change of the substrate is directly proportional to the amount of Semaphorin 4D. This colour change is detectable with a standard microtiter plate ELISA reader. A dose response curve of the absorbance (optical density, OD at 450 nm) versus standard concentration is generated, using the values obtained from the standards. The concentration of Semaphorin 4D in the sample is determined directly from the dose response curve.



## 7) ASSAY PROTOCOL

All reagents and samples must be at room temperature (18-26°C) before use in the assay.

Mark position for STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) on the protocol sheet.

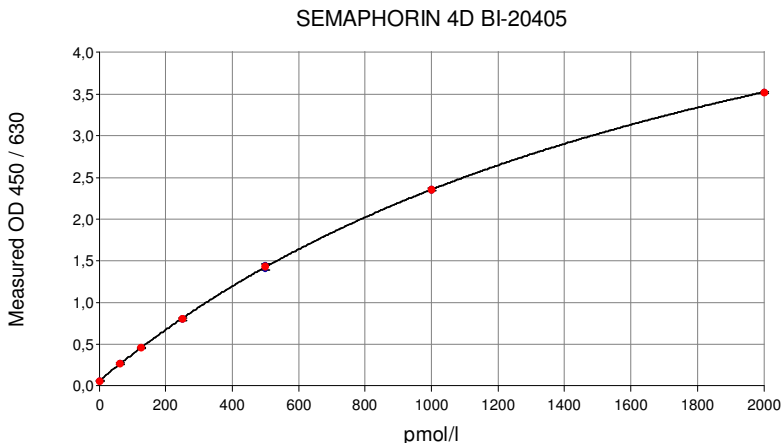
Take microtiter strips out of the aluminium bag. Store unused strips with desiccant at 4°C (2-8°C) in the aluminium bag. Strips are stable until expiry date stated on the label.

1. Pipette 100 µl ASYBUF (Assay buffer, red cap) into each well.
2. Add 10 µl STD/CTRL/SAMPLE (Standard/Control/Sample) in duplicate into respective wells, swirl gently.
3. **Cover tightly and incubate for 3 hours at room temperature (18-26°C).**
4. Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer). After final wash, remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel.
5. Add 100 µl CONJ (Conjugate, amber cap) into each well, swirl gently.
6. **Cover tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) in the dark.**
7. Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer). After final wash, remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel.
8. Add 100 µl SUB (Substrate, blue cap) into each well, swirl gently.
9. **Incubate for 30 min at room temperature (18-26°C) in the dark.**
10. Add 50 µl STOP (Stop solution, white cap) into each well, swirl gently.
11. Measure absorbance immediately at 450 nm with reference 630 nm, if available.

## 8) CALCULATION OF RESULTS

Read the optical density (OD) of all wells on a plate reader using 450 nm wavelength (correction wavelength 630 nm). Construct the standard curve from the OD values of the STD. Use commercially available software or graph paper. Obtain sample concentration from this standard curve. The assay was evaluated with logit-log and 4PL algorithm curve fitting. Different curve fitting methods need to be evaluated by the user. Respective dilution factors have to be considered when calculating the final concentration of the sample.

**Example typical STD-curve:**



The quality control (QC) protocol supplied with the kit shows the results of the final release QC for each kit lot. Data for OD obtained by customers may differ due to various influences and/or due to the normal decrease of signal intensity during shelf life. However, this does not affect validity of results as long as an OD of 1.50 or more is obtained for the STD with the highest concentration and the values of the CTRLs are in range (target ranges see labels).

## 9) ASSAY CHARACTERISTICS

Method:	Sandwich ELISA, HRP/TMB, 12x8-well strips		
Sample type:	EDTA plasma, citrate plasma and heparin plasma		
Standard range:	0 to 2,000 pmol/l (0 / 62.5 / 125 / 250 / 500 / 1,000 / 2,000) 7 standards and 2 controls in a human plasma matrix.		
Conversion factor:	soluble Semaphorin 4D: 1 pg/ml = 0.0127 pmol/l; 1 pmol/l=78.9 pg/ml (MW: 78.9 kDa)		
Sample volume:	10 µl / well		
Incubation time:	3 h / 1 h / 30 min		
Sensitivity:	LOD: (0 pmol/l + 3 SD): 12 pmol/l; LLOQ: 31 pmol/l		
Specificity:	This assay recognizes endogenous and recombinant human soluble Semaphorin 4D.		
Precision:	Intra-assay (n=5) ≤ 8% , Inter-assay (n=11) ≤ 11%		
Spike/Recovery (200 + 1,000 pmol/l Semaphorin 4D)	<u>Average % recovery</u>	<u>200 pmol/l</u>	<u>1,000 pmol/l</u>
	EDTA plasma (n=6):	116	92
	Heparin plasma (n=2)	94	109
	Citrate plasma (n=2)	79	83
Dilution of endogenous soluble Semaphorin 4D:	<u>Average % of expected of dilution</u>	<u>1+1</u>	<u>1+3</u>
	EDTA plasma (n=4)	106	92
	Citrate plasma (n=2)	103	93
	Heparin plasma (n=2)	111	106
Values from apparently healthy individuals:	Median EDTA plasma (n=44): 245 pmol/l Median citrate plasma (n=43): 192 pmol/l Median heparin plasma (n=28): 201 pmol/l  Each laboratory should establish its own reference range for the samples under investigation. Do not change sample type during the study.		

For further information on assay characteristics please visit our website [www.bmgrp.com](http://www.bmgrp.com) (see Validation Data) or contact our customer service by e-mail [info@bmgrp.com](mailto:info@bmgrp.com) or by phone +43/ 1/ 29107-45.

## 10) PRECISION

Intra-assay: 2 samples of known concentration were tested 5 times within 1 kit lot by 1 operator.

Inter-assay: 2 samples of known concentration were tested 11 times within 2 different kit lots by 4 different operators.

Intra-assay (n=5)	Sample 1	Sample 2
Mean (pmol/l)	126	1,003
SD (pmol/l)	10.4	63.8
CV (%)	8	6

Inter-assay (n= 11)	Sample 1	Sample 2
Mean (pmol/l)	134	1,012
SD (pmol/l)	14.5	55.1
CV (%)	11	5

## 11) TECHNICAL HINTS

- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- Do not mix stoppers and caps from different reagents or use reagents between lots.
- Do not use reagents beyond expiration date.
- Protect reagents from direct sunlight.
- Substrate solution should remain colourless until added to the plate.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.

## 12) PRECAUTIONS

All test components of human source were tested against HIV-Ab, HCV-Ab and HBsAg and were found negative. Nevertheless, they should be handled and disposed as if they were infectious.

All liquid reagents contain  $\leq 0.1\%$  Proclin 950 as preservative. Avoid contact with skin and mucous membrane. Proclin 950 is not toxic in concentrations used in this kit. It may cause allergic skin reactions – avoid contact with skin or eyes.

- Do not pipette by mouth.
- Do not eat, drink, smoke, or apply cosmetics where reagents are used.
- Wear gloves, glasses, and lab coat while performing this assay.
- Sulfuric acid is irritating to the eyes and skin. Avoid contact with skin and mucous. Irritations are possible. Flush with water if contact occurs!

## 13) LITERATURE

1. Semaphorins command cells to move. Kruger RP et al., *Nature Rev Mol Cell Biol*, 2005; 6:789-800.
2. The semaphorins. Yazdani U and Terman JR, *Genome Biol*, 2006; 7(3): 211.
3. Biology and function of neuroimmune semaphorins 4A and 4D. Nkyimbeng-Takwi EH and Chapoval SP, *Immunol Res*, 2011; 50 (1):10-21.
4. Structural basis of semaphorin-plexin signalling B.J.C. Janssen BJC et al., *Nature*, 2010; 467:1118-1122.
5. Semaphorins and their receptors in immune cell interactions. Suzuki K et al., *Nature Immunology*, 2007; 9:17-23.
6. Sema4D induces angiogenesis through Met recruitment by Plexin B1. Conrotto P et al., *Blood*, 2005; 105:4321-4329.
7. Diverse roles for semaphorin-plexin signaling in the immune system. Takamatsu H et al., *Trends Immunol*, 2012; 33(3):127-135.
8. Bone cell communication factors and Semaphorins. Negishi-Koga T and Takayanagi H, *Bonekey Rep*, 2012; 1:183.
9. Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. Negishi-Koga T et al., *Nat Med*, 2011; 17(11):1473-1480.
10. Soluble SEMA4D/CD100: A novel immunoregulator in infectious and inflammatory diseases. Maleki KT et al., *Clinical Immunology*, 2016; 163:52-59.
11. Anabolic bone formation via a site specific bone targeting delivery system by interfering with semaphorin 4D expression. Zhang Y et al., *J Bone Miner Res*, 2015; 30(2): 286-296.
12. Generation and preclinical characterization of an antibody specific for SEMA4D. Fisher TL et al., *Mabs*, 2016; 8(1):150-162.
13. Coagulation-induced elevated sSEMA 4D concentrations in human serum versus plasma measured by sandwich ELISA. Laber et al., 2018; submitted.

## 1) EINLEITUNG

Semaphorin 4D (SEMA4D bzw. CD100) ist ein Mitglied der Familie von Transmembran- und sezernierten Proteinen, das wichtige zelluläre Funktionen reguliert und an der Zell-Zell-Kommunikation beteiligt ist (1-3). Die meisten Effekte von SEMA4D werden durch Plexine vermittelt (4, 5). SEMA4D ist an zahlreichen physiologischen Prozessen wie axonale Wegführung, Immunregulation, Angiogenese, Tumorprogression und Knochenstoffwechsel beteiligt (6-9).

Die Spaltung von SEMA4D nahe der Zellmembran durch Matrix-Metalloproteinasen führt zu dem biologisch aktiven, löslichen SEMA4D mit einem Molekulargewicht von 120 kD, das aus 734 Aminosäuren besteht (3, 5, 10). Die Blockierung von SEMA4D hat sich zu einem neuartigen therapeutischen Ansatz bei Krebs und Knochenkrankungen entwickelt (11, 12). Semaphorin 4D wird in Bezug auf seine Rolle in neuronaler Konnektivität, Vaskularisierung, Zellmigration, Immunantwort, Tumorprogression und Knochenumbau untersucht.

Dieser sSEMA4D ELISA verwendet zwei monoklonale anti-human Semaphorin 4D Antikörper, die beide Konformationsepitope auf Semaphorin 4D erkennen. Die Epitope wurden durch überlappende zyklische Peptide analysiert. Es wurde gezeigt, dass die Aminosäuren AA30-AA34 bzw. Aminosäuren AA238-AA241 von den Antikörpern erkannt werden. Weitere Informationen zur Antikörpercharakterisierung finden Sie auf unserer Website [www.bmgrp.com](http://www.bmgrp.com), siehe Validation Data.

## 2) INHALT DES KITS

CONTENTS	KIT KOMPONENTEN	MENGE
PLATE	Monoklonaler Maus-anti-human Semaphorin 4D Antikörper beschichtet auf Mikrotiterplattenstreifen im Streifenhalter. Verpackt im Aluminium Beutel mit Trockenmittel.	12 x 8 Tests
WASHBUF	Waschpuffer, 20fach Konzentrat, durchsichtiger Schraubverschluss	1 x 50 ml
STD	Standards 1-7 (0; 62,5; 125; 250; 500; 1.000; 2.000 pmol/l), rekombinantes humanes lösliches Semaphorin 4D in humanem Plasma, weißer Schraubverschluss, lyophilisiert	7 Fläschchen
CTRL	Kontrollen A + B, gelber Schraubverschluss, lyophilisiert, genaue Konzentrationen siehe Etiketten	2 Fläschchen
ASYBUF	Assaypuffer, roter Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 13 ml
CONJ	Konjugat (Bivalenter Fab Antikörper-HRP, fusioniert an bakterielle alkalische Phosphatase-HRP), braune Flasche, brauner Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 13 ml
SUB	Substrat (TMB Lösung), braune Flasche, blauer Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 13 ml
STOP	Stopp Lösung, weißer Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 7 ml

## 3) ZUSÄTZLICHES MATERIAL IM KIT

- 2 selbstklebende Abdeckfolien
- QC Protokoll
- Protokoll Blatt
- Arbeitsanleitung (Beipacktext)

## 4) ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL UND GERÄTE

- Kalibrierte Präzisionspipetten für 10 µl, 50 µl, 100 µl und 200 µl inkl. Pipettenspitzen
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Mikrotiterplatten Wascher wird empfohlen, Alternativen: Mehrkanalpipetten oder Dispenser
- Kühlschranks mit 4°C (2-8°C)
- Mikrotiterplattenphotometer mit 450 nm Filter (630 nm Referenz)
- Millimeterpapier oder Software



## 5) REAGENZEN UND PROBENVORBEREITUNG

Alle Reagenzien des Kits sind bei 4°C (2-8°C) bis zum Ablaufdatum (siehe Etikett des Reagenz) haltbar. EDTA Plasma, Citrat Plasma und Heparin Plasma sind zur Verwendung in diesem Test geeignet. Serum wird als Probenmatrix nicht empfohlen aufgrund koagulationsinduziertem sSEMA4D-Shedding (13). Die Probenmatrix sollte innerhalb einer Studie nicht gewechselt werden.

### Probenvorbereitung:

Abnahme von venösem Blut mittels standardisierter Blutabnahmeröhrchen zur Gewinnung von Plasma. Durchführung der Zentrifugation des Blutes laut Herstellerangaben der Probenentnahmebehälter, so schnell wie möglich. Das gewonnene Plasma soll so schnell wie möglich gemessen werden. Für Langzeit Lagerung sollen die Proben aliquotiert und bei -25°C oder tiefer gelagert werden. Bis zu 4 Frier/Tau-Zyklen verändern die Messwerte nicht. Lipämische und hämolytische Proben können falsche Ergebnisse liefern. Proben vor Verwendung gut mischen. Wir empfehlen Doppelbestimmung für alle Werte.

Proben mit Werten höher als STD7 können mit ASYBUF (Assaypuffer) verdünnt und erneut getestet werden.

Nähere Informationen zur Probenstabilität finden Sie auf unserer Website unter [www.bmgrp.com](http://www.bmgrp.com) (s. Validation Data) oder kontaktieren Sie unseren Kundenservice per Email an [info@bmgrp.com](mailto:info@bmgrp.com) oder telefonisch unter +43/ 1/ 29107-45.

### Rekonstitution/Handhabung:

**WASHBUF (Waschpuffer):** Das mitgelieferte Konzentrat wird 1:20 verdünnt (zB. 50 ml WASHBUF + 950 ml destilliertes Wasser). Kristalle im Pufferkonzentrat lösen sich bei Raumtemperatur auf. Das Konzentrat ist bei 4°C (2-8°C) bis zum Ablaufdatum haltbar. Der verdünnte Puffer ist bei 4°C (2-8°C) bis zu einem Monat haltbar. Im Testsystem darf nur verdünnter WASHBUF (Waschpuffer) verwendet werden.

**STD (Standards) und CTRL (Kontrollen):** Lösen Sie das Lyophilisat in jeweils 200 µl destilliertem oder deionisiertem Wasser bei Raumtemperatur (18-26°C) für 15 min. Achten Sie auf vollständige Lösung des Lyophilisates. Gut mischen. Die genaue Konzentration ist am Etikett vermerkt. Rekonstituierte STD und CTRL sind bei -25°C oder tiefer bis zum Ablaufdatum haltbar. STD und CTRL sind für 4 Frier/Tau-Zyklen stabil.

## 6) TESTPRINZIP

Schema siehe Kapitel 6) *PRINCIPLE OF THE ASSAY* im englischen Teil des Beipacktextes.

## 7) TESTPROTOKOLL

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen.

Markieren Sie die Positionen für STD/PROBE/CTRL (Standard/Probe/Kontrolle) am Protokoll Blatt.

Nehmen Sie die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Aluminium Beutel. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können mit Trockenmittel im Aluminium Beutel auf 4°C (2-8°C) bis zum angegebenen Ablaufdatum gelagert werden.

- 1) Pipettieren Sie 100 µl ASYBUF (Assaypuffer, roter Schraubverschluss) in die Mikrotiterstreifen.
- 2) Pipettieren Sie 10 µl STD /PROBE/CTRL (Standard/Probe/Kontrolle) in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen, gut mischen.
- 3) Streifen abdecken und bei Raumtemperatur (18-26°C) für 3 Stunden inkubieren.**
- 4) Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
- 5) Pipettieren Sie 100 µl CONJ (Konjugat, brauner Schraubverschluss) in alle Wells, gut mischen.
- 6) Streifen abdecken und bei Raumtemperatur (18-26°C) für 1 Stunde im Dunkeln inkubieren.**
- 7) Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
- 8) Pipettieren Sie 100 µl SUB (Substrat, blauer Schraubverschluss) in alle Wells, gut mischen.
- 9) Bei Raumtemperatur (18-26°C) für 30 Minuten im Dunkeln inkubieren.**
- 10) Pipettieren Sie 50 µl STOP (Stopplösung, weißer Schraubverschluss) in alle Wells, gut mischen.

11) Extinktion unmittelbar bei 450 nm messen, mit 630 nm als Referenz, falls möglich.

## 8) BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Messen Sie die optische Dichte (OD) von allen Wells mit einem Mikrotiterplattenphotometer mit einem 450 nm Filter (Referenz 630 nm). Konstruieren Sie eine Standardkurve aus den OD Werten der STD unter Verwendung von kommerziell erhältlichem Millimeterpapier oder einer geeigneten Software. Das Testsystem wurde mittels Logit-Log sowie einem 4 Parameter Algorithmus evaluiert. Andere Auswerte Algorithmen müssen vom Verwender evaluiert werden. Die Konzentration der Proben wird aus der Standardkurve abgelesen. Eventuelle Verdünnungen müssen berücksichtigt werden.

### Typische STD-Kurve:

Siehe Kapitel 8) *CALCULATION OF RESULTS* im englischen Teil des Beipacktextes.

In dem beige packten QC Protokoll sind die Resultate der QC Freigabe der entsprechenden Kit Lot vermerkt. Vom Verwender erhaltene Daten der OD können abweichend sein, bedingt durch verschiedene Einflüsse und/oder dem normalen Signalverlust des Kits während der Laufzeit. Dieser mögliche Signalverlust hat keinen Einfluss auf die Gültigkeit der Resultate, so lange die OD von STD7 den Wert 1,50 oder höher erreicht und die Werte der CTRL im gültigen Bereich sind (Bereiche siehe Etiketten).

## 9) TESTMERKMALE

Methode:	Sandwich ELISA, HRP/TMB, 12x8-well Streifen		
Probentyp:	EDTA Plasma, Citrat plasma und Heparin plasma		
Standardbereich:	0 – 2000 pmol/l (0 / 62,5 / 125 / 250 / 500 / 1.000 / 2.000) (7 Standards und 2 Kontrollen in humaner Plasma Matrix)		
Umrechnungsfaktor:	soluble Semaphorin 4D: 1 pg/ml = 0,0127 pmol/l; 1 pmol/l=78,9 pg/ml (MW: 78,9 kDa)		
Probenvolumen:	10 µl / well		
Inkubationszeiten:	3 h / 1 h / 30 min		
Sensitivität:	LOD: (0 pmol/l + 3 SD): 12 pmol/l; LLOQ: 31 pmol/l		
Spezifität:	Dieser Assay erkennt endogenes und rekombinantes, humanes lösliches Semaphorin 4D.		
Präzision:	Intra-assay (n=5) ≤ 8% , Inter-assay (n=11) ≤ 11%		
Wiederfindung (200 + 1.000 pmol/l Semaphorin 4D)	<u>Wiederfindung %</u>	<u>200 pmol/l</u>	<u>1.000 pmol/l</u>
	EDTA plasma (n=6):	116	92
	Heparin plasma (n=2)	94	109
	Citrat plasma (n=2)	79	83
Verdünnungslinearität von endogenem, löslichem Semaphorin 4D:	<u>Durchschnittle Wiederfindung (%) nach Verdünnung</u>	<u>1+1</u>	<u>1+3</u>
	EDTA plasma (n=4)	106	92
	Citrat plasma (n=2)	103	93
	Heparin plasma (n=2)	111	106
Werte von anscheinend gesunden Spendern:	Median EDTA plasma (n=44): 245 pmol/l Median Citrat plasma (n=43): 192 pmol/l Median Heparin plasma (n=28): 201 pmol/l  Jedes Labor sollte den Normalbereich für seine Proben evaluieren. Wechseln Sie nicht die Probenmatrix innerhalb einer Studie.		

Nähere Informationen zu den Testmerkmalen und der Antikörperspezifität finden Sie auf unserer Website unter [www.bmgrp.com](http://www.bmgrp.com) (s. Validation Data) oder kontaktieren Sie unseren Kundenservice per Email an [info@bmgrp.com](mailto:info@bmgrp.com) oder telefonisch unter +43/ 1/ 29107-45.

## 10) PRÄZISION

Intra-assay: 2 Proben bekannter Konzentration wurden 5 mal in 1 Kit lot von 1 Operator getestet.

Inter-assay: 2 Proben bekannter Konzentration wurden 11 mal in 2 Kit Lots von 4 verschiedenen Operatoren getestet.

Intra-assay (n=5)	Probe 1	Probe 2
Durchschnitt (pmol/l)	126	1.003
SD (pmol/l)	10,4	63,8
VK (%)	8	6

Inter-assay (n= 11)	Probe 1	Probe 2
Durchschnitt (pmol/l)	134	1.012
SD (pmol/l)	14,5	55,1
VK (%)	11	5

## 11) TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien von verschiedenen Lots oder Tests dürfen nicht gemischt werden.
- Stöpsel und Verschlüsse von verschiedenen Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Abgelaufene Reagenzien dürfen nicht verwendet werden.
- Reagenzien sind vor direktem Sonnenlicht zu schützen.
- Substratlösung muss vor Verwendung farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen bei den Inkubationen mit Abdeckfolie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.

## 12) VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Bestandteile humanen Ursprunges wurden auf HIV-Ak, HCV-Ak und HBsAg getestet und negativ gefunden. Trotzdem sollten die Reagenzien als potentiell infektiös behandelt werden.

Alle flüssigen Reagenzien enthalten 0,01% Proclin 950 als Konservierungsmittel. Vermeiden Sie Kontakt mit Augen, Haut und Schleimhaut. Proclin 950 ist in der verwendeten Konzentration nicht toxisch. Allergische Reaktionen sind möglich.

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Nicht Rauchen, Essen, Trinken oder Kosmetika benutzen während der Verwendung der Testreagenzien.
- Verwenden Sie Handschuhe, Schutzbrillen und Laborkleidung während der Testdurchführung.
- Schwefelsäure reizt Augen und Haut. Bei Berührung gründlich mit Wasser spülen.

## 13) LITERATUR

Siehe Kapitel 13) *LITERATURE* im englischen Teil des Beipacktextes.

Notes:

Notes:

Notes:

# SYMBOLS



Expiry date / Verfallsdatum / Date de péremption / Data di scadenza / Fecha de caducidad / Data de validade / Uiterste gebruiksdatum / Udløbsdato / Utgångsdatum / Termin Ważności / Lejárati idő / Doba expirácie / Doba expirace



Consider instructions for use / Bitte Gebrauchsanweisung beachten / Consultez la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las instrucciones de utilización / Consulte as instruções de utilização / Raadpleeg de gebruiksaanwijzing / Se brugsanvisningen / Läs anvisningarna före användning / Proszę przeczytać instrukcję wykonania / Vegyük figyelembe a használati utasításban foglaltakat / Postupujte podľa pokynov na použitie / Postupujte dle návodu k použití



Lot-Batch Number / Charge-Chargennummer / Lot-Code du lot / Lotto-Numero di lotto / Lote-Código de lote / Lote-Código do lote / Lot-Partijnummer / Lot-Batchkode / Lot-Satskod / Numer serii / Lot-Batch szám / Číslo šarže / Číslo šarže



Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por / Vervaardigd door / Fabrikation af / Tilberkad av / Wyprodukowane pr / Gyártotta / Vyrobené / Vyrobeno



Catalogue Number / Bestellnummer / Numéro de référence / Numero di riferimento / Número de referencia / Número de referência / Referentienummer / Referencenummer / Katalognummer / Numer katalogowy / Katalógusszám / Katalógové číslo / Katalogové číslo



Store at between / Lagerung bei zwischen / Conserver à entre / Conservare a tra / Conservar a temp. entre / Armazene a entre / Bewaar bij tussen / Opbevares mellem / Förvaras vid / Przechowywać w / Tároljuk ..... között / Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí



Contains sufficient for x tests / Inhalt ausreichend für x Tests / Contient suffisant pour x tests / Contenuto sufficiente per x test / Contiene suficiente para x pruebas / Contém suficiente para x testes / Bevat voldoende voor x bepalingen / Indeholder tilstrækkeligt til x prøver / Innehållet räcker till x analyser / Zawartość na x testów / Tartalma X teszt elvégzésére elegendő / Obsahuje materiál pre x testov / Obsahuje materiál pro x testů

# ***BI-20405 soluble SEMAPHORIN 4D ELISA ASSAY PROTOCOL AND CHECKLIST***

## ***PREPARATION OF REAGENTS:***

- Bring all reagents to room temperature (18-26°C).
- Prepare reagents and samples as instructed.
- Bring unused and prepared components to the storage temperature mentioned in the package insert.
- Take microtiter strips out of the aluminium bag and mark positions on the protocol sheet.

## ***TEST PROCEDURE:***

- Step 1) Pipette 100 µl ASYBUF (Assay buffer) into all wells.
- Step 2) Pipette 10 µl STD/SAMPLE/CTRL (standard/sample/control) into respective wells, swirl gently.
- Step 3) Cover tightly and incubate 3 hours at room temperature (18-26°C).**
- Step 4) Aspirate and wash wells with 300 µl WASHBUF (Wash buffer) five times. Remove remaining buffer by strongly tapping plate against paper towel after the last wash.
- Step 5) Add 100 µl CONJ (Conjugate, amber cap) into each well, swirl gently.
- Step 6) Cover tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C), in the dark.**
- Step 7) Aspirate and wash wells with 300 µl WASHBUF (Wash buffer) five times. Remove remaining buffer by strongly tapping plate against paper towel after the last wash.
- Step 8) Add 100 µl SUB (Substrate, blue cap) into each well, swirl gently.
- Step 9) Incubate for 30 minutes at room temperature (18-26°C), in the dark.**
- Step 10) Add 50 µl STOP (Stop solution, white cap) into each well, swirl gently.
- Step 11) Read Optical Density at 450 nm with reference 630 nm, if available.