Arbeitsanleitung / Manual

BSP ELISA

Zur in-vitro-Bestimmung von unterglykosyliertem BSP (Bone Sialoprotein) in Serum und EDTA-Plasma

For the in vitro determination of underglycosylated BSP (bone sialoprotein) in serum and EDTA plasma

Gültig ab / Valid from 2021-06-25

REF **KR4222**

Σ 96

+8 °C
+2 °C

RUO

Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany
Tel.: +49 6251 70190-0 Fax: + 49 6251 70190-363
e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

FOR REFERENCE USE ONLY

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK 2

2. EINLEITUNG 2

3. INHALT DER TESTPACKUNG 2

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL 3

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN 3

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG 4

Probenlagerung 4

Probenverdünnung 4

7. TESTDURCHFÜHRUNG 4

Testprinzip 4

Pipettierschema 5

8. ERGEBNISSE 6

9. EINSCHRÄNKUNGEN 7

10. QUALITÄTSKONTROLLE 7

Referenzwerte 7

11. TESTCHARAKTERISTIKA 7

12. VORSICHTSMASSNAHMEN 7

13. TECHNISCHE MERKMALE 8

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST 8

FOR REFERENCE USE ONLY

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von unterglykosyliertem Bone Sialoprotein (BSP) in Serum und EDTA-Plasma geeignet. Nur für wissenschaftliche Forschung. Nicht für diagnostische Zwecke.

2. EINLEITUNG

Bone Sialoprotein (BSP) ist ein phosphoryliertes Glykoprotein, welches 12 % der nichtkollagenen Proteine im Knochen ausmacht. BSP hat ein Molekulargewicht von 35 kDa. Nach der posttranslationalen Modifikation wird das Molekulargewicht auf 70–80 kDa geschätzt. BSP wird von skelettassoziierten Zelltypen wie Fibroblasten, hypertrophen Chondrozyten, Osteoblasten, Osteoklasten sowie Trophoblasten synthetisiert.

BSP wird als unterglykosyliertes Protein in Krebszellen überexprimiert, die bevorzugt Knochenmetastasen bilden. Die BSP-Expression korreliert auch mit der Mikrokalzifikation in diesen Tumoren. Dieses Protein ermöglicht die Migration und Adhäsion der Tumorzellen im Knochengewebe.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KR4222	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
KR0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 50 x	1 x 100 ml
KR4222	CONJ	Konjugatkonzentrat, peroxidasemarkiert	1 x 150 µl
KR4222	STD	Standards, lyophilisiert (Konzentrationen der Spezifikation entnehmen)	2 x 6 vials
KR4222	CTRL 1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
KR4222	CTRL 2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
KR4222	SAMPLE-BUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

FOR REFERENCE USE ONLY

Art.-Nr.	Bezeich-nung	Kit-Komponenten	Menge
KR0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
KR0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* 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).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:50** in Reinstwasser verdünnt werden (20 ml WASHBUF + 980 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der

FOR REFERENCE USE ONLY

Waschpuffer (1:50 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

- **Die lyophilisierten Standards (STD)** und **Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. STD und CTRL werden mit **500 µl Reinstwasser** rekonstituiert und kurz geschwenkt, um eine vollständige Rekonstitution zu gewährleisten. Sie werden zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. **Standards und Kontrollen (**rekonstituierte STD und CTRL**) können 3 Wochen bei -20 °C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.**
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:101** in **Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das CONJ ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:101 verdünntes CONJ) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Probenlagerung

EDTA-Plasma bzw. Serum kann bei -20 °C gelagert werden.

Probenverdünnung

EDTA-Plasma- oder Serumproben werden vor dem Einsatz im Test **1:5** verdünnt,

z. B. **50 µl** Probe + **200 µl** Verdünnungspuffer (SAMPLEBUF), gut mischen.

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

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Erfassung von unterglykosyliertem Bone Sialoprotein aus Serum und EDTA-Plasma.

Das Testprinzip beruht auf der Interaktion zwischen dem Antigen in der Probe bzw. Standard und dem immobilisierten Antikörper auf der Mikrotiterplatte. Die Detektion und Quantifizierung erfolgt über einen peroxidasemarkierten Sekundärantikörper und der entsprechenden Substratumsetzung. Anhand einer mitgeführten Stan-

FOR REFERENCE USE ONLY

dardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

Vor Gebrauch **alle Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (15–30 °C) bringen, gut mischen.

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der verschlossenen Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automatenspezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Die Vertiefungen **vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer** waschen. Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	Je **100 µl Standards/Kontrollen/verdünnte Proben** in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und **2 h** bei Raumtemperatur (15–30 °C) **unter Schütteln*** inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und **5 x mit je 250 µl Waschpuffer** waschen. Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch gründliches Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	**100 µl Konjugat** (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen abdecken und **1 h** bei Raumtemperatur (15–30 °C) **unter Schütteln*** inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und **5 x mit je 250 µl Waschpuffer** waschen. Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch gründliches Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	**100 µl Substrat** (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	**10–20 min**** bei Raumtemperatur (15–30 °C) **im Dunkeln** inkubieren.

FOR REFERENCE USE ONLY

10.	**50 µl Stopplösung** (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen
11.	**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 gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei **405 nm** gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

* Wir empfehlen die Streifen bei 550 rpm (Umdrehungen pro Minute) mit einem Orbit von 2 mm zu schütteln.

** 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 Punkt-zu-Punkt-Auswertung:

1. **Punkt-zu-Punkt-Auswertung**

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

2. **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. 0,001).

3. **Gewichtete Spline-Funktion**

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

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.

Serum- und EDTA-Plasmaproben

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 5** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

FOR REFERENCE USE ONLY

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben, deren OD höher ist als die des höchsten Standards, sollten stärker verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden. Bei der folgenden Auswertung ist der veränderte Verdünnungsfaktor zu beachten.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

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

Referenzwerte

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Folgen.

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu Forschungszwecken verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

FOR REFERENCE ONLY

- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt 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 Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Für die Qualitätskontrolle sind die für Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundia-

FOR REFERENCE USE ONLY

gnostik 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, zurückzusenden.

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung

Nur für Forschungszwecke

Hersteller

Chargenbezeichnung

Achtung

Spezifikationsdatenblatt beachten

Bestellnummer

Zu verwenden mit

Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen

Verwendbar bis

Gebrauchsanweisung beachten

FOR REFERENCE USE ONLY

FOR REFERENCE USE ONLY

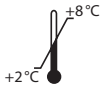
Manual

BSP ELISA

For the in vitro determination of underglycosylated BSP (bone sialoprotein) in serum and EDTA plasma

Valid from 2021-06-25

REF **KR4222**



RUO

Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany
Tel.: +49 6251 70190-0 Fax: + 49 6251 70190-363
e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

FOR REFERENCE USE ONLY

Table of Contents

1. INTENDED USE 13

2. INTRODUCTION 13

3. MATERIAL SUPPLIED 13

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED 14

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS 14

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES 15

Sample storage 15

Sample dilution 15

7. ASSAY PROCEDURE 15

Principle of the test 15

Test procedure 16

8. RESULTS 17

9. LIMITATIONS 18

10. QUALITY CONTROL 18

Reference range 18

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS 18

12. PRECAUTIONS 18

13. TECHNICAL HINTS 19

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE 19

FOR REFERENCE USE ONLY

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of underglycosylated bone sialoprotein (BSP) in serum and EDTA-plasma. For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

2. INTRODUCTION

Bone sialoprotein (BSP) is a phosphorylated glycoprotein that comprises 12 % of the total non-collagenous proteins in bone and is thought to be involved in bone mineralisation and remodelling. The polypeptide chain of BSP has a molecular weight of 35 kDa. Native BSP has an apparent molecular weight of 70–80 kDa due to complex posttranslational modifications involving glycosylation. BSP is synthesised mainly by skeletal-associated cell types, including fibroblasts, hypertrophic chondrocytes, osteoblasts, osteocytes, osteoclasts, as well as trophoblasts.

BSP is overexpressed and underglycosylated in human primary breast and prostate cancers that metastasise to the bone, whereby BSP expression correlates with the development of microcalcifications. Underglycosylated BSP is also expressed by other tumours, such as lung cancer, thyroid cancer, multiple myeloma and neuroblastoma, that predominantly metastasise to bones.

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KR4222	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
KR0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 50 x	1 x 100 ml
KR4222	CONJ	Conjugate concentrate, peroxidase-labelled	1 x 150 µl
KR4222	STD	Standards, lyophilised (see specification for concentrations)	2 x 6 vials
KR4222	CTRL 1	Control, lyophilised (see specification for range)	2 x 1 vial
KR4222	CTRL 2	Control, lyophilised (see specification for range)	2 x 1 vial
KR4222	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	1 x 15 ml

➔

FOR REFERENCE USE ONLY

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KR0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
KR0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure 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).

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** 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.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:50** before use (20 ml WASHBUF + 980 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:50 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for 1 month**.
- The **lyophilised standards (STD)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the STD and CTRL have

FOR REFERENCE USE ONLY

to be reconstituted with **500 µl of ultrapure water**. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly to ensure complete reconstitution. **Standards and controls** (reconstituted STD and CTRL) **can be stored at -20 °C for 3 weeks. Avoid repeated thawing and freezing.**

- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:101** in **wash buffer** (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The CONJ is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Conjugate** (1:101 diluted CONJ) **is not stable and cannot be stored.**
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2–8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Sample storage

EDTA-plasma or serum can be stored at -20 °C.

Sample dilution

EDTA plasma or serum samples must be diluted **1:5** before performing the assay,

e.g. **50 µl** sample + **200 µl** dilution buffer (SAMPLEBUF), mix well.

100 µl of the dilution are used in the test per well.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of underglycosylated bone sialoprotein in serum and EDTA plasma.

The test principle is based on interaction of the antigen in the samples or standards and with the antibody coated on the wells of the microtiter plate. A peroxidase-conjugated secondary antibody is used for detection and quantification, and tetramethylbenzidine (TMB) as a peroxidase substrate. The enzymatic reaction is terminated by an acidic stop solution. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. Bone sialoprotein, present in thesamples, is determined directly from this curve.

FOR REFERENCE USE ONLY

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15–30 °C) and mix well.

Mark the positions of standards/controls/samples on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips as needed from the kit. Store unused strips together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging at 2–8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	**Before use**, wash the wells **5 times** with **250 µl wash buffer**. After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add each **100 µl standards/controls/diluted samples** into the respective wells.
3.	Cover the strips and incubate for **2 h** at room temperature (15–30 °C) **on a horizontal shaker***.
4.	Discard the content of each well and wash **5 times** with **250 µl wash buffer**. After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add **100 µl conjugate** (diluted CONJ) into each well.
6.	Cover the strips and incubate for **1 h** at room temperature (15–30 °C) **on a horizontal shaker***.
7.	Discard the content of each well and wash **5 times** with **250 µl wash buffer**. After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
8.	Add **100 µl substrate** (SUB) into each well.
9.	Incubate for **10–20 minutes**** at room temperature (15–30 °C) in the dark.
10.	Add **50 µl stop solution** (STOP) and mix well.

FOR REFERENCE USE ONLY

11.	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.

* We recommend shaking the strips at 550 rpm with an orbit of 2 mm.

** The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour change and stopping the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

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

1. **Point-to-point calculation**

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

2. **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 standard must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.001).

3. **Spline algorithm**

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

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

Serum and EDTA samples

The obtained results have to be multiplied with the **dilution factor of 5** to get the actual concentrations.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result with the dilution factor used.

FOR REFERENCE USE ONLY

9. LIMITATIONS

Samples with an OD higher than the OD of the highest standard should be further diluted and re-assayed. For the following analysis, the changed dilution factor has to be taken into consideration.

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

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

Reference range

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Will follow.

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for research use only.
- 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 ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

FOR REFERENCE USE ONLY

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated 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.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- The guidelines for laboratories should be followed.
- 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 incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

FOR REFERENCE USE ONLY

Used symbols:

Temperature limitation

REF Catalogue number

RUO For research use only

→REF To be used with

Manufacturer

Contains sufficient for <n> tests

LOT Lot number

Use by

Attention

Consult instructions for use

Consult specification data sheet

FOR REFERENCE USE ONLY