

English
Deutsch
Français
Italiana

IVD



General Protocol for ENZYME IMMUNOASSAY KIT

(range: 0-1000 ng/ml)



PHOENIX PHARMACEUTICALS, INC.

1. Kit Contents.....	2
2. Additional Materials, Not Included.....	2
3. Storage	3
4. Safety Precautions.....	3
5. Disposal of Reagents	3
6. Introduction.....	4
7. General Principle of Enzyme Immunoassay	4
8. Summary of Assay Protocol	5
9. Assay Protocol	6
A. Peptide and Antibody Rehydration	6
B. Standard Peptide Dilutions.....	7
C. Immunoplate Loading	8
D. Immunoplate Incubations.....	8
10. Additional Recommendations.....	10
11. Calculation of Results	11
12. Suggested Method for Peptide Extraction	12
A. Blood Withdrawal and Plasma Collection	12
B. General Tissue Preparation.....	13
C. Extraction of Peptides from Sample.....	13
13. References	14

1. EIA assay buffer concentrate (50ml, 20x)..... **Catalog no. EK-BUF**
2. Pre-coated EIA plate (96 wells, 1 plate)..... **Catalog no. EK-PLATE**
3. Acetate plate sealer (APS) (3 pieces)..... **Catalog no. EK-APS**
4. Primary antibody (rabbit anti-peptide IgG)
(1 vial, lyophilized)
5. Standard peptide (1 vial, lyophilized)
6. Biotinylated peptide (1 vial, lyophilized)
7. Streptavidin-horseradish peroxidase
(SA-HRP) (30µl)..... **Catalog no. EK-SA-HRP**
8. Positive control (2 vials, lyophilized)
9. Substrate solution (TMB) (12ml, ready to use)..... **Catalog no. EK-SS**
10. 2N HCL (15ml, ready to use) **Catalog no. EK-HCL**
11. General protocol (1 booklet)

ADDITIONAL MATERIALS, NOT INCLUDED

1. Microtiter plate reader (450nm) (required)
2. Micropipette with disposable pipette tips (required)
3. Absorbent material for blotting (required)
4. Vortex (required)
5. Curve-fitting software capable of
4 parameter logistics (recommended)
6. Orbital plate shaker (300-400rpm) (recommended)
7. Microtiter plate washer (recommended)
8. Multi-channel pipette (50-100µl) (recommended)
9. Solution reservoir (recommended)
10. Centrifuge (optional)
11. EDTA Lavender Vacutainer blood
collection tubes (optional)..... **Catalog no. VT-6450**
12. Aprotinin (30 TIU) (optional) **Catalog no. RK-APRO**
13. C18 SEP-COLUMN (optional)..... **Catalog no. RK-SEPCOL-1**
14. Buffer A (optional) **Catalog no. RK-BA-1**
15. Buffer B (optional) **Catalog no. RK-BB-1**

STORAGE

1. Store the kit at 4°C upon receipt. Do not freeze. Unopened test kits will remain stable until the expiration date, provided it is stored as previously described.
2. It is highly recommended that all solutions be used as soon as possible after reconstitution. Rehydrated solutions of the standard, biotinylated peptide, or primary antibody should be used within 5 days (4°C). Standard dilutions must be prepared immediately prior to performing the assay.
3. Any unused strips/columns may be removed from the pre-coated immunoplate. Please place strips back in the original zip-lock foil pouch with a dessicant, reseal, and store at 4°C. Do not allow moisture to accumulate on the wells.
4. If necessary, store the 1x assay buffer, any reconstituted solutions of standard peptide, biotinylated peptide, antibody and SA-HRP at 4°C.

SAFETY PRECAUTIONS

1. The kit contains 2N HCL and a preservative which may be an irritant. Wear gloves while working with or handling these reagents.
2. To minimize the risk of microbial contamination, safety goggles and/or gloves should be worn at all times.

DISPOSAL OF REAGENTS

Dispose of reagents according to local requirements.

Phoenix Pharmaceuticals, Inc. guarantees that its products conform to the information contained in this publication. The purchaser must determine the suitability of the product for their particular needs and establish optimum sample concentrations.

INTRODUCTION

This kit is designed to measure the concentration of a specific peptide and its related peptides based on the principle of a “competitive” enzyme immunoassay. The kit is used as an aid in the detection of various antigens in human samples.

GENERAL PRINCIPLE OF ENZYME IMMUNOASSAY

The immunoplate in this kit is pre-coated with a secondary antibody, whose nonspecific binding sites are blocked. The secondary antibody can bind to the Fc fragment of the primary antibody. This primary antibody's Fab fragment will then be competitively bound by both the biotinylated peptide and the targeted peptide in either the standard peptide solution or the unknown sample. The biotinylated peptide interacts with streptavidin-horseradish peroxidase (SA-HRP) which catalyzes the substrate solution. Addition of the stop solution should change the color in each well from blue to yellow. The intensity of the resulting yellow color is directly proportional to the amount of biotinylated peptide-SA-HRP complex, but inversely proportional to the amount of the targeted peptide (in either the standard peptide solution or the unknown sample). This is due to competition between the biotinylated peptide and the target peptide for binding with the primary antibody. A standard curve can be established by plotting the measured O.D. as a function of the various known standard peptide concentrations. Unknown peptide concentration in samples can then be determined via extrapolation based on this standard curve.

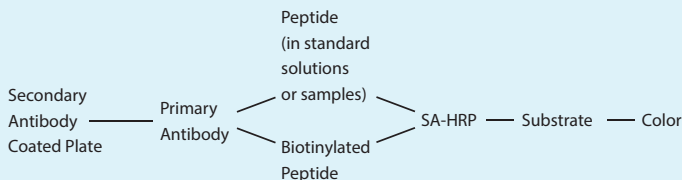


Figure 1. Diagram of the molecular interactions used in this kit

SUMMARY OF ASSAY PROTOCOL

Add 50µl/well of standard, sample, or positive control, 25µl primary antibody, and 25µl biotinylated peptide
except the Blank wells

▼
Incubate at room temperature (20-23°C) for 2 hours

▼
Wash immunoplate 4 times with 350µl/well of 1x assay buffer

▼
Add 100µl/well of SA-HRP solution

▼
Incubate at room temperature (20-23°C) for 1 hour

▼
Wash immunoplate 4 times with 350µl/well of **1x** assay buffer

▼
Add 100µl/well of TMB substrate solution

▼
Incubate at room temperature (20-23°C) for 1 hour

▼
Terminate reaction with 100µl/well of 2N HCL

▼
Read absorbance O.D. at **450nm** and calculate results

Note: Read this protocol in its entirety before starting the assay. Each kit contains reagents sufficient for 96 wells and is capable of assaying 40 duplicate samples.

ASSAY PROTOCOL

Note: The kit and all its components should be equilibrated to room temperature (20-23°C) before opening any vials and starting the assay. Before opening any microcentrifuge tubes for reconstitution, briefly centrifuge at ~3,000rpm for 5 seconds to ensure that all the lyophilized material is at the bottom of the tube.

1. Dilute the 20x EIA assay buffer concentrate with 950ml of distilled water. Mix thoroughly before use. This will be the 1x assay buffer solution used to dilute or reconstitute all other samples and reagents during the assay.

Note: If crystals appear in the 20x assay buffer, the bottle can be placed in a warm water bath for approximately 30 minutes or until no crystals are visible.

2. Reconstitute the standard peptide in 1ml of the 1x assay buffer and vortex thoroughly. Allow the solution to sit at least 10 minutes at room temperature (20-23°C) to completely dissolve in solution. This will be the standard stock solution. Vortex immediately before use.
3. Reconstitute the primary antibody in 5ml of 1x assay buffer and vortex thoroughly. Allow the solution to sit for at least 5 minutes at room temperature to completely dissolve. Vortex again before use.
4. Reconstitute the biotinylated peptide in 5ml of 1x assay buffer and vortex thoroughly. Allow the solution to sit for at least 5 minutes at room temperature to completely dissolve. Vortex again before use.
5. Reconstitute the positive control in 200µl of 1x assay buffer and vortex thoroughly. Allow the solution to sit for at least 5 minutes at room temperature to completely dissolve. Vortex again before use.

Prepare peptide standard solutions as follows:

Standard ID / Number	1x Assay Buffer Volume	Standard Peptide Volume	Concentration
Stock	1000µl	(powder)	1000ng/ml
#2	900µl	100µl of stock	100ng/ml
#3	900µl	100µl of #2	10ng/ml
#4	900µl	100µl of #3	1ng/ml
#5	900µl	100µl of #4	0.1ng/ml

Figure 2. Table of the standard dilutions

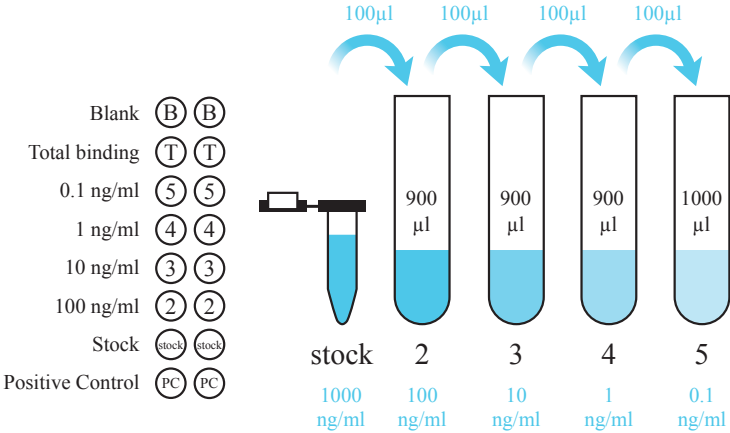


Figure 3. Immunoplate loading map

Figure 4. Visual guide of the standard dilutions

6. Prepare the standard dilutions from the rehydrated standard peptide as shown in Figure 2 and Figure 4 on the previous page. Vortex each tube thoroughly after each serial dilution.
7. Leave wells A1 and A2 on the immunoplate empty as blanks.
8. Add 50µl of 1x assay buffer into wells B1 and B2. These will represent the total binding.
9. Add 50µl of the least concentrated peptide standard solution (#5) to wells C1 and C2. Next, add peptide standard #4 into wells D1 and D2, and so forth, continuing in the opposite order of the standard dilution.
Note: Standard peptides should always be assayed in duplicate.
10. Add 50µl of rehydrated positive control into wells H1 and H2.
Note: Positive controls should always be assayed in duplicate.
11. Add 50µl of any unknown/prepared samples into their designated wells, again in duplicate.
Note: Each laboratory must determine the appropriate dilution factors and preparation for their samples to ensure that peptide levels are detectable and within the linear range of the standard curve.
12. Add 25µl of rehydrated primary antibody into each well **except** the blank wells (A1 and A2).
Note: A multi-channel pipette is **NOT** recommended to load the primary antibody.
13. Add 25µl of rehydrated biotinylated peptide into each well **except** the blank wells (A1 and A2).
Note: A multi-channel pipette is **NOT** recommended to load the biotinylated peptide.
14. Seal the immunoplate with an acetate plate sealer (APS). Incubate the immunoplate for 2 hours at room temperature (20-23°C).
Note: Orbital shaking at 300-400 rpm is recommended for the duration of all incubations.
15. Centrifuge the SA-HRP vial (3,000-5,000 rpm) for 5 seconds. Pipette 12µl of SA-HRP into 12ml of 1x assay buffer and vortex the solution thoroughly.

16. Remove the APS from the immunoplate and discard the contents of the wells. Wash each well with 350µl of 1x assay buffer, discard the buffer, invert the immunoplate, and blot the plate dry. Repeat 4 times.

17. Add 100µl of SA-HRP solution into each well.

18. Reseal the immunoplate with an APS. Incubate for 1 hour at room temperature (20-23°C).

Note: Orbital shaking at 300-400 rpm is recommended for the duration of the incubations.

19. Remove the APS from the immunoplate and discard the contents of the wells. Wash each well with 350µl of 1x assay buffer, discard the buffer, invert the immunoplate, and blot the plate dry. Repeat 4 times.

20. Add 100µl of the TMB substrate solution into each well.

Note: TMB is light-sensitive. After the addition of the TMB substrate solution, it is strongly recommended to cover the immunoplate to protect it from light.

21. Reseal the immunoplate with an APS. Incubate for 1 hour at room temperature (20-23°C).

Note: Orbital shaking at 300-400 rpm is recommended for the duration of the incubations.

22. Remove the APS from the immunoplate. Do **NOT** wash the immunoplate or discard the contents of the wells.

23. Add 100µl of 2N HCL into each well to stop the reaction. The color in the wells should change from blue to yellow. Gently tap the plate to ensure thorough mixing.

Note: Proceed to the next step within 20 minutes.

24. Load the immunoplate onto a microtiter plate reader and measure absorbance O.D. at 450nm.

1. Reagents of different lot numbers should never be mixed.
2. Plasma, serum, culture media, tissue homogenate, CSF, urine, or any biological fluid can be assayed as long as samples are prepared appropriately, and the level of peptide in the sample is high enough for the sensitivity of the specific kit.
3. High levels of interfering proteins may cause variations within sample results. Therefore, it is imperative to select the appropriate sample preparation procedure to obtain optimal results. Please consult literature for specific methodology.
4. When handling the plate, avoid touching the bottom. Any fingerprints or blots may affect the O.D. readings.
5. Manual washing may cause high duplicate coefficient variations. To reduce this factor, liquid from the plate should be removed by inverting and blotting the plate on an absorbent material.
6. Each time a new tip is used, make sure the tip is secure and free of air bubbles. For better intra-assay variation, aspirate and expel a reagent or sample back into its container a few times to wet the pipette walls prior to loading the pipette.
7. Avoid submerging the whole pipette tip into reagents and samples. Droplets can accumulate at the end of the tip, causing an excess of solution to be loaded into the well and affecting assay results.
8. Performing this procedure outside of the recommended room temperature (20-23°C) may affect assay results.
9. Any modifications to the existing protocol (i.e. standard dilutions, pipetting technique, washing technique, incubation time or temperature, storage conditions, and kit expiration) may affect the sensitivity, specificity and results of the assay.

CALCULATION OF RESULTS

1. Label the X-axis (log scale) with the concentration of standards #5 through stock (0.1 to 1000 ng/ml).
2. Label the Y-axis (linear scale) as absorbance (O.D.) at 450nm.
3. Average all duplicate readings (standards, positive control, samples) and subtract the average blank O.D. reading.
4. Plot the O.D. for each standard peptide concentration directly above its X-axis coordinate.
5. Draw the best fit curve through these data points. It should show an inverse relationship between peptide concentration and absorbance. As the standard peptide concentration increases, the yellow color decreases, thereby reducing absorbance (O.D.).

Note: Use of curve-fitting software capable of 4 parameter logistics or log-logit functionality is strongly recommended.

6. To determine the peptide concentration in any unknown samples, first locate its absorbance (O.D.) on the Y-axis. Draw a horizontal line across the graph from that absorbance to the intersection with the standard curve. The X-axis coordinate at this intersection point will correspond to the peptide concentration (ng/ml) in the assayed sample.

Note: Multiply the measured peptide concentration by any dilution factor(s) used while preparing the original sample.

7. Refer to the QC Data Sheet for acceptable values of the positive controls. If positive control values are not within the specified range as stated on QC Data Sheet, then the assay is invalid.

Note: For most samples, peptide extraction is recommended. This will help eliminate interfering molecules found in biological fluids, and allow for sample dilution or concentration.

General Blood Withdrawal and Plasma Collection:

1. Collect blood samples into Lavendar Vacutainer tubes (Catalog no. VT-6450), which contain EDTA and can hold up to 7ml of blood.
2. Gently rock the Lavendar Vacutainer tubes several times immediately after collection of blood to avoid coagulation.
3. Transfer the blood to centrifuge tubes containing Aprotinin (Catalog no. RK-APRO), and gently rock several more times to inhibit the activity of proteases.

Note: 0.6 TIU, or 100 μ l, of Aprotinin per 1ml of blood collected is recommended. If the Lavendar Vacutainer tubes are centrifuge-safe, the Aprotinin may be added directly to them.

4. Centrifuge the blood at 1,600 x g for 15 minutes at 4°C and collect the plasma.

Note: Plasma can be kept at -70°C and will remain stable for up to one month.

5. For peptide extraction from sample, acidify the plasma with an equal amount of Buffer A (Catalog no. RK-BA-1). Mix and centrifuge at 6,000 to 17,000 x g for 20 minutes at 4°C. This will be loaded onto the C-18 SEP-COLUMN.

Note: At least 1ml of plasma is recommended for peptide extraction. It may be possible to perform the extraction using smaller volumes as long as volumes of reconstituting and eluting buffer are adjusted accordingly.

General Tissue Preparation:

1. Boil tissue in 75% HoAc (Acetic Acid) for 20 minutes at 100°C.
2. Homogenize tissue in lysis buffer, usually with a low pH.
3. Centrifuge the tissue homogenate at 12,000rpm for 20 to 30 minutes at 4°C.
4. For peptide extraction from sample, take 1ml of supernatant and combine with 1ml of Buffer A (Catalog no. RK-BA-1) to acidify sample. Centrifuge at 6,000 to 17,000 x g for 20 minutes and collect the supernatant. This will be loaded onto the C-18 SEP-COLUMN. Performing the centrifugation on ice helps to inhibit peptidases.

Note: If a separate protein assay is required, designate and remove an aliquot before addition of Buffer A. This buffer contains materials which may interfere with protein analysis.

Extraction of Peptides from Sample:

1. Equilibrate a SEP-COLUMN containing 200mg of C18 (Catalog no. RK-SEPCOL-1). Wash with 1ml of Buffer B (Catalog no. RK-BB-1) once, followed by 3ml of Buffer A three (3) times.
2. Load the acidified sample (plasma, serum, tissue, etc.) solution onto the pre-equilibrated C-18 SEP-COLUMN.
3. Slowly wash the column with 3ml of Buffer A twice and discard the wash.
4. Elute the peptide slowly with 3ml of Buffer B once and collect the eluant into a polystyrene tube.

Note: Ensure there is a constant flow for all solutions during the extraction procedure. For optimal sample processing and recovery, do not allow air bubbles to enter the C-18 matrix.

5. Evaporate eluant to dryness in a centrifugal concentrator or by a suitable substitute method.

Note: A combination of a centrifugal concentrator (i.e. Speedvac) and a lyophilizer (freeze-dryer) produces the best results. First, use a centrifugal concentrator to dry the sample for approximately 15 minutes, removing the organic layer. Snap-freeze the remaining sample and freeze-dry overnight using a lyophilizer. If a centrifugal concentrator is not accessible, freeze-drying overnight using a lyophilizer will be sufficient.

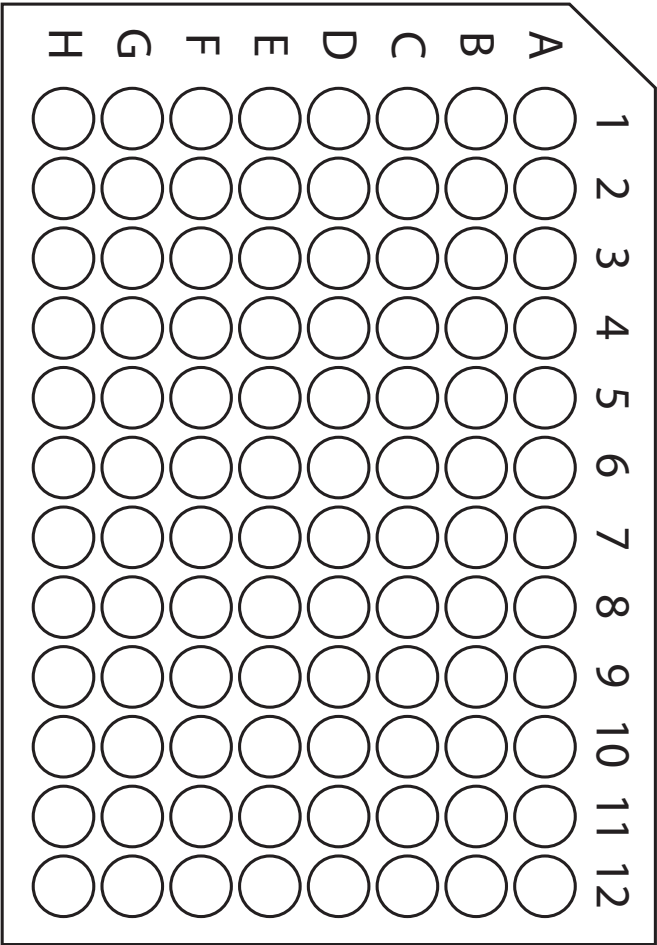
6. Keep the dried extract at -20°C and perform the assay as soon as possible. Use the 1x assay buffer to reconstitute the dried extract to the desired concentration. If the peptide value does not fall within the range of detection, dilute or concentrate the sample accordingly.

Note: For example, if 1ml of plasma was extracted, dried, and then reconstituted in 250µl of 1x assay buffer, then the original sample would have now have undergone a 4x concentration.

REFERENCES

1. Porstmann, T. and Kiessig, S.T., Enzyme Immunoassay Techniques, An Overview, *Journal of Immunological Methods*, 150: 5-21 (1992).
2. Avrameas, S., Amplification Systems in Immunoenzymatic Techniques, *Journal of Immunological Methods*, 150: 23-32 (1992).
3. Hofbauer KH, Jensen BL, Kurtz A, Sandner P. Tissue hypoxxygenation activates the adrenomedullin system in vivo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000 Feb;278(2):R513-9.

ASSAY DIAGRAM



USA

Phoenix Pharmaceuticals, Inc.

330 Beach Rd.
Burlingame, California 94010
Tel: 650-558-8898, 1-800-988-1205
Fax: 650-558-1686
info@phoenixpeptide.com
www.phoenixpeptide.com



Europe

Phoenix Europe GmbH

Viktoriastrasse 3-5
D-76133 Karlsruhe, Germany
Tel: +49 (721) 12 08 150
Fax: +49 (721) 12 08 15 15
europe@phoenixpeptide.eu

IVD



Allgemeines Protokoll Zum ENZYM-IMMUNOASSAY-SET

(Bereich: 0-1000 ng/ml)



PHOENIX PHARMACEUTICALS, INC.

1. Inhalt des Sets.....	2
2. Zusätzlich benötigtes Material.....	2
3. Lagerung.....	3
4. Vorsichtsmaßnahmen	3
5. Entsorgung der Reagenzien	3
6. Einleitung.....	4
7. Allgemeines Prinzip des Enzym-Immunoassays.....	4
8. Zusammenfassung des Assayprotokolls.....	5
9. Assayprotokoll.....	6
A. Rehydratation von Peptid und Antikörper	6
B. Standard-Peptidverdünnungen	7
C. Befüllen der Immunoplaten.....	8
D. Inkubation der Immunoplaten.....	8
10. Zusätzliche Empfehlungen.....	10
11. Berechnung der Ergebnisse.....	11
12. Empfohlene Methode zur Peptidextraktion	12
A. Blutentnahme und Plasmagewinnung.....	12
B. Allgemeine Gewebepreparation	13
C. Extraktion von Peptiden aus der Probe	13
13. Quellen	14

INHALT DES SETS

1. EIA-Assay-Pufferkonzentrat (50ml, 20x)..... **Katalog-Nr. EK-BUF**
2. Vorbeschichtete EIA-Platte (96 Wells, 1 Platte) **Katalog-Nr. EK-PLATE**
3. Plattenversiegelungsfolie (APS) (3 Stück)..... **Katalog-Nr. EK-APS**
4. Primärer Antikörper (Kaninchen-Anti-Peptid-IgG)
(1 Ampulle, lyophilisiert)
5. Standardpeptid (1 Ampulle, lyophilisiert)
6. Biotinyliertes Peptid (1 Ampulle, lyophilisiert)
7. Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase
(SA-HRP) (30µl).....**Katalog-Nr. EK-SA-HRP**
8. Positivkontrolle (2 Ampullen, lyophilisiert)
9. Substratlösung (TMB) (12ml, gebrauchsfertig)**Katalog-Nr. EK-SS**
10. 2N HCL (15ml, gebrauchsfertig)**Katalog-Nr. EK-HCL**
11. Allgemeines Protokoll (1 Heft)

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

1. Mikrotiterplatten-Reader (450nm) (erforderlich)
2. Mikropipette mit Einmalspitzen (erforderlich)
3. Saugfähiges Material als Löschpapier (erforderlich)
4. Vortex (erforderlich)
5. Software zur Kurvenanpassung mit Fähigkeit zur 4-Parameter-Logistik (empfohlen)
6. Orbitalplattenschüttler (300-400 rpm) (empfohlen)
7. Mikrotiterplatten-Waschgerät (empfohlen)
8. Mehrkanalpipette (50-100µl) (empfohlen)
9. Lösungsreservoir (empfohlen)
10. Zentrifuge (optional)
11. EDTA Lavendar Vacutainer Blutsammelröhrchen (optional)
.....**Katalog-Nr. VT-6450**
12. Aprotinin (30 TIU) (optional)**Katalog-Nr. RK-APRO**
13. C18 SEP-SÄULE (optional)**Katalog-Nr. RK-SEPCOL-1**
14. Puffer A (optional) **Katalog-Nr. RK-BA-1**
15. Puffer B (optional)..... **Katalog-Nr. RK-BB-1**

LAGERUNG

1. Set sofort nach dem Empfang bei 4 °C lagern. Nicht einfrieren. Ungeöffnete Testsets bleiben stabil bis zum Ablauf des Verfallsdatums, wenn wie beschrieben gelagert.
2. Es wird sehr empfohlen, alle Lösungen so bald wie möglich nach der Rekonstitution zu benutzen. Rehydrierte Lösungen des biotinylierten Standardpeptids oder primäre Antikörper sollten innerhalb von 5 Tagen (4 °C) benutzt werden. Standardverdünnungen müssen direkt vor Durchführung des Assays hergestellt werden.
3. Nicht gebrauchte Streifen/Säulen können von der vorbeschichteten Immunplatte entfernt werden. Bitte die Streifen zusammen mit einem Trockenmittel zurück in die wiederverschließbare Originalfolie geben, verschließen und das Ganze bei 4 °C lagern. Vermeiden, dass sich Feuchtigkeit in den Wells sammelt.
4. Falls nötig, den 1x-Assay-Puffer, rekonstituierte Lösungen des Standardpeptids, des biotinylierten Peptids, des Antikörpers und der SA-HRP bei 4 °C lagern.

VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Das Set enthält 2N HCL und ein Konservierungsmittel, das reizend wirken kann. Bei der Arbeit mit diesen Reagenzien oder deren Handhabung Handschuhe tragen.
2. Zur Minimierung des Risikos einer mikrobiellen Kontamination sollten stets eine Schutzbrille und/oder Handschuhe getragen werden.

ENTSORGUNG DER REAGENZIEN

Reagenzien sind nach den örtlichen Bestimmungen zu entsorgen.

Phoenix Pharmaceuticals, Inc. garantiert, dass seine Produkte den Informationen in dieser Publikation entsprechen. Der Käufer muss die Eignung des Produkts für den speziellen eigenen Bedarf bestimmen und optimale Probenkonzentrationen ermitteln.

EINLEITUNG

Dieses Enzym-Immunoassay-Set dient der Messung der Konzentration eines spezifischen Peptids und seiner verwandten Peptide im Plasma basierend auf dem Prinzip des „kompetitiven“ Enzym-Immunoassays. Das Set wird als Hilfsmittel zur Bestimmung verschiedener Antigene in menschlichen Proben verwendet.

ALLGEMEINES PRINZIP DES ENZYM-IMMUNOASSAYS

Die Immunoplatte in diesem Set ist mit einem sekundären Antikörper vorbeschichtet, dessen unspezifische Bindungsstellen blockiert sind. Der sekundäre Antikörper kann an das Fc-Fragment des primären Antikörpers (Peptidantikörper) binden. Das Fab-Fragment des primären Antikörpers bindet dann kompetitiv an das biotinylierte Peptid und das Zielpeptid in der Standardpeptidlösung oder der unbekannten Probe. Das biotinylierte Peptid interagiert mit Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (SA-HRP), was die Substratlösung katalysiert. Durch Zugabe der Stopplösung sollte sich die Farbe in jedem Well von blau in gelb umwandeln. Die Intensität der entstandenen gelben Farbe ist direkt proportional zur Menge des biotinylierten Peptid-SA-HRP-Komplexes, aber umgekehrt proportional zur Menge des Peptids (in der Standardlösung oder der unbekannten Probe). Dies liegt an der Konkurrenz zwischen dem biotinylierten Peptid und dem Zielpeptid bei der Bindung mit dem primären Antikörper. Eine Standardkurve lässt sich erstellen, wenn man die gemessene OD als Funktion der verschiedenen bekannten Standardpeptidkonzentrationen darstellt. Unbekannte Peptidkonzentrationen in Proben lassen sich dann durch Extrapolation aus dieser Standardkurve ableiten.

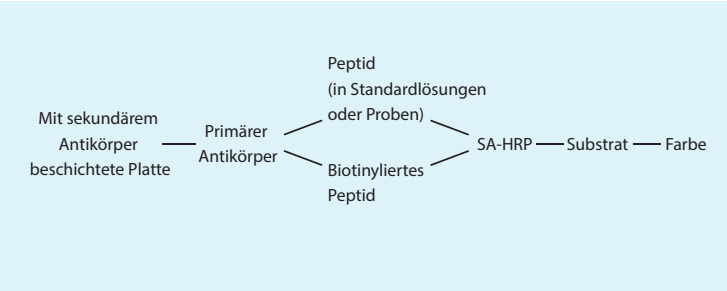


Abbildung 1. Diagramm der molekularen Wechselwirkungen, die in diesem Set genutzt werden

ZUSAMMENFASSUNG DES ASSAYPROTOKOLLS

50 μ l/Well Standard, Probe oder Positivkontrolle hinzufügen,
25 μ l primären Antikörper und 25 μ l biotinyliertes Peptid,
außer in den Leerwert (Blank)

Bei Raumtemperatur (20-23 °C) 2 Stunden lang inkubieren

Immunoplatte 4-mal mit 350 μ l/Well 1x-Assay-Puffer waschen

100 μ l/Well SA-HRP-Lösung hinzufügen

Bei Raumtemperatur (20-23 °C) 1 Stunde lang inkubieren

Immunoplatte 4-mal mit 350 μ l/Well 1x-Assay-Puffer waschen

100 μ l/Well TMB-Substratlösung hinzufügen

Bei Raumtemperatur (20-23 °C) 1 Stunde lang inkubieren

Reaktion mit 100 μ l/Well 2N HCL beenden

Extinktion (OD) bei 450 nm messen und Ergebnisse berechnen

Hinweis: Dieses Protokoll vor Durchführung des Assays vollständig durchlesen. Jedes Set enthält ausreichend Reagenzien für 96 Wells und kann 40 Duplikatproben testen.

ASSAYPROTOKOLL

Hinweis: Das Set und all seine Bestandteile sollten auf Raumtemperatur gebracht werden (20-23°C), bevor die Ampullen geöffnet werden und mit dem Assay begonnen wird. Vor dem Öffnen der Mikrozentrifugenröhrchen zur Rekonstitution 5 Sekunden lang bei ~3.000 rpm zentrifugieren, damit alles lyophilisierte Material am Boden des Röhrchens ist.

1. Das 20x-EIA-Assay-Pufferkonzentrat mit 950 ml destilliertem Wasser verdünnen. Vor Gebrauch gründlich mischen. Dies ist die 1x-Assay-Pufferlösung zur Verdünnung oder Rekonstitution aller anderen Proben und Reagenzien während des Assays.

Hinweis: Wenn im 20x-Assay-Puffer Kristalle vorhanden sind, kann die Flasche ca. 30 Minuten lang bzw. so lange, bis keine Kristalle mehr sichtbar sind, in ein warmes Wasserbad gegeben werden.

2. Das Standardpeptid in 1 ml des 1x-Assay-Puffers rekonstituieren und gründlich im Vortex mischen. Die Lösung mindestens 10 Minuten lang bei Raumtemperatur (20-23 °C) für eine vollständige Auflösung stehen lassen. Dies ist die Standard-Stammlösung. Sofort vor Gebrauch im Vortex mischen.
3. Den primären Antikörper in 5 ml des 1x-Assay-Puffers rekonstituieren und gründlich im Vortex mischen. Die Lösung mindestens 5 Minuten lang bei Raumtemperatur für eine vollständige Auflösung stehen lassen. Vor Gebrauch noch einmal im Vortex mischen.
4. Das biotinylierte Peptid in 5 ml des 1x-Assay-Puffers rekonstituieren und gründlich im Vortex mischen. Die Lösung mindestens 5 Minuten lang bei Raumtemperatur für eine vollständige Auflösung stehen lassen. Vor Gebrauch noch einmal im Vortex mischen.
5. Die Positivkontrolle in 200 µl des 1x-Assay-Puffers rekonstituieren und gründlich im Vortex mischen. Die Lösung mindestens 5 Minuten lang bei Raumtemperatur für eine vollständige Auflösung stehen lassen. Vor Gebrauch noch einmal im Vortex mischen.

Peptid-Standardlösungen wie folgt herstellen:

Standard ID / Nummer	1x-Assay-Puffer-Volumen	Standardpeptid-Volumen	Konzentration
Stamm	1000µl	(Pulver)	1000ng/ml
#2	900µl	100µl Stammlösung	100ng/ml
#3	900µl	100µl of #2	10ng/ml
#4	900µl	100µl of #3	1ng/ml
#5	900µl	100µl of #4	0.1ng/ml

Abbildung 2. Tabelle zu den Standardverdünnungen

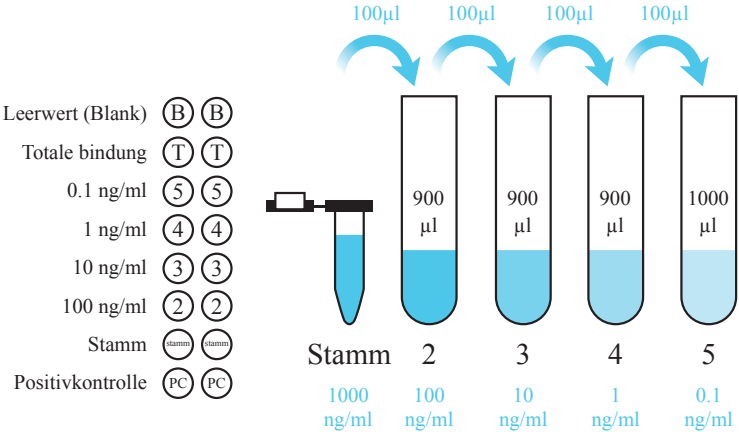


Abbildung 3. Diagramm zur Befüllung der Immunoplatte

Abbildung 4. Optische Darstellung der Standardverdünnungen

6. Standardverdünnungen aus dem rehydrierten Standardpeptid herstellen, wie in Abbildung 2 und 4 auf der vorherigen Seite dargestellt. Jedes Röhrchen nach jedem Verdünnungsschritt gründlich im Vortex mischen.
7. Well A1 und A2 auf der Immunoplatte als Leerwert leer lassen.
8. 50 µl des 1x-Assay-Puffers in Well B1 und B2 geben. Diese stellen die totale Bindung dar.
9. 50 µl der am wenigsten konzentrierten Peptid-Standardlösung (#5) in Well C1 und C2 geben. Dann Peptid-Standard #4 in Well D1 und D2, und so weiter in umgekehrter Reihenfolge wie bei der Standardverdünnung.

Hinweis: Standardpeptide sollten immer doppelt getestet werden.

10. 50 µl rehydrierte Positivkontrolle in Well H1 und H2 geben.

Hinweis: Positivkontrollen sollten immer doppelt getestet werden.

11. 50 µl der unbekannten/vorbereiteten Proben wieder doppelt in die entsprechenden Wells geben.

Hinweis: Jedes Labor muss die geeigneten Verdünnungsfaktoren sowie die Präparation für die Proben selbst so bestimmen, dass die Peptidwerte nachweisbar sind und sich im linearen Bereich der Standardkurve befinden.

12. 25 µl rehydrierten primären Antikörper in jeden Well geben, außer in die Blindvertiefungen (A1 und A2).

Hinweis: Eine Mehrkanalpipette wird NICHT empfohlen zur Befüllung mit dem primären Antikörper.

13. 25 µl rehydriertes, biotinyliertes Peptid in jeden Well geben, außer in die Leerwerte (A1 und A2).

Hinweis: Eine Mehrkanalpipette wird NICHT empfohlen zur Befüllung mit dem biotinylierten Peptid.

14. Die Immunoplatte mit einer Plattenversiegelungsfolie (APS) versiegeln. Die Immunoplatte 2 Stunden lang bei Raumtemperatur (20-23 °C) inkubieren.

Hinweis: Orbitales Schütteln bei 300-400 rpm wird für die Dauer jeder Inkubation empfohlen.

15. Die SA-HRP-Ampulle 5 Sekunden lang zentrifugieren (3.000-5.000 rpm). 12 µl SA-HRP in 12 ml 1x-Assay-Puffer pipettieren und die

Lösung gründlich im Vortex mischen.

16. Die APS von der Immunoplatte nehmen und den Inhalt der Wells entsorgen. Jeden Well mit 350 µl 1x-Assay-Puffer waschen, den Puffer entsorgen, die Immunoplatte umdrehen und mit Löschpapier trocknen. 4-mal wiederholen.

17. 100 µl SA-HRP-Lösung in jeden Well geben.

18. Die Immunoplatte erneut mit einer Plattenversiegelungsfolie versiegeln. 1 Stunde lang bei Raumtemperatur (20-23 °C) inkubieren.

Hinweis: Orbitales Schütteln bei 300-400 rpm wird für die Dauer jeder Inkubation empfohlen.

19. Die APS von der Immunoplatte nehmen und den Inhalt der Wells entsorgen. Jeden Well mit 350 µl 1x-Assay-Puffer waschen, den Puffer entsorgen, die Immunoplatte umdrehen und mit Löschpapier trocknen. 4-mal wiederholen.

20. 100 µl der TMB-Substratlösung in jeden Well geben.

Hinweis: TMB ist lichtempfindlich. Nach Hinzufügung der TMB-Substratlösung wird sehr empfohlen, die Immunoplatte abzudecken, um diese vor Licht zu schützen.

21. Die Immunoplatte erneut mit einer Plattenversiegelungsfolie versiegeln. 1 Stunde lang bei Raumtemperatur (20-23 °C) inkubieren.

Hinweis: Orbitales Schütteln bei 300-400 rpm wird für die Dauer jeder Inkubation empfohlen.

22. Die APS von der Immunoplatte nehmen. NICHT die Immunoplatte waschen oder den Inhalt der Wells entsorgen.

23. 100 µl 2N HCL in jedes Well geben, um die Reaktion zu stoppen. Die Farbe in den Wells sollte sich von blau in gelb umwandeln. Die Platte leicht antippen, um für eine gründliche Mischung zu sorgen.

Hinweis: Innerhalb von 20 Minuten mit dem nächsten Schritt fortfahren.

24. Die Immunoplatte auf einen Mikrotiterplatten-Reader geben und die Extinktion (OD) bei 450 nm messen.

1. Reagenzien mit verschiedenen Chargennummern sollten nie vermischt werden.
2. Es können Plasma, Serum, Kulturmedien, Gewebehomogenate, CSF, Urin oder jede andere biologische Flüssigkeit getestet werden, solange die Proben angemessen vorbereitet werden und der Peptidgehalt darin hoch genug ist für die Empfindlichkeit des jeweiligen Sets.
3. Hohe Anteile störender Proteine können Variationen im Probenergebnis verursachen. Deshalb ist es unerlässlich, das richtige Verfahren zur Probenvorbereitung zu wählen, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Spezifische Methoden finden Sie in der Literatur.
4. Vermeiden Sie bei der Handhabung der Platte das Berühren des Bodens. Jeder Fingerabdruck oder Fleck kann die OD-Ablesung beeinträchtigen.
5. Manuelles Waschen kann zu hohen Abweichungen im Koeffizienten der Duplikate führen. Um diesen Faktor zu verringern, sollten Flüssigkeiten aus der Platte entfernt werden, indem diese umgedreht und vorsichtig auf saugfähigem Material ausgeklopft wird.
6. Jedes Mal, wenn eine neue Spitze verwendet wird, muss überprüft werden, ob diese sicher sitzt und keine Luftblasen enthält. Für eine bessere Intraassay-Variation wird ein Reagens oder eine Probe einige Male aspiriert und zurück in den Behälter gegeben, um die Pipettenspitze anzufeuchten, bevor sie befüllt wird.
7. Ein Eintauchen der gesamten Pipettenspitze in die Reagenzien und Proben ist zu vermeiden. Tröpfchen können sich am Ende der Spitze sammeln, was zu einer übermäßigen Befüllung des Wells führen und das Assayergebnis beeinträchtigen kann.
8. Wird dieses Verfahren außerhalb des empfohlenen Raumtemperaturbereichs (20-23 °C) durchgeführt, kann dies die Assayergebnisse beeinträchtigen.
9. Modifikationen am vorhandenen Protokoll (d.h. an den Standardverdünnungen, der Pipettiertechnik, der Waschtechnik, der Inkubationszeit oder -temperatur, den Lagerbedingungen und dem Verfallsdatum) können die Empfindlichkeit, Genauigkeit und die Ergebnisse des Assays beeinträchtigen.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Auf die X-Achse (logarithmische Skala) die Konzentration von Standard #5 bis #1 auftragen (0,1 bis 1000 ng/ml).
2. Auf die Y-Achse (lineare Skala) die Extinktion (O.D.) bei 450 nm auftragen.
3. Den Durchschnitt aus allen Duplikatablesungen (Standard, Positivkontrolle, Proben) ermitteln und die durchschnittliche OD-Ablesung der Leerwerte (Blanks) abziehen.
4. Die OD für jede Standard-Peptidkonzentration direkt über der zugehörigen X-Achsen-Koordinate eintragen.
5. Die passendste Kurve durch diese Datenpunkte ziehen. Es sollte sich ein umgekehrtes Verhältnis zwischen Peptidkonzentration und Extinktion ergeben. Wenn die Standard-Peptidkonzentration steigt, vermindert sich die Gelbfärbung und damit auch die Extinktion (OD).

Hinweis: Der Gebrauch einer Software zur Kurvenanpassung mit Fähigkeit zur 4-Parameter-Logistik oder Log-Logit-Funktionalität wird sehr empfohlen.

6. Zur Bestimmung der Peptidkonzentration in unbekannten Proben wird zunächst die Extinktion (OD) an der Y-Achse lokalisiert. Dann wird eine horizontale Linie durch den Graphen von der Extinktion bis zur Schnittstelle mit der Standardkurve gezogen. Die X-Achsen-Koordinate an diesem Schnittpunkt entspricht der Peptidkonzentration (ng/ml) in der Assayprobe.

Hinweis: Die gemessene Peptidkonzentration wird mit dem/ den Verdünnungsfaktor(en) bei der Vorbereitung der Originalprobe multipliziert.

7. Siehe Datenblatt zur Qualitätskontrolle für akzeptable Werte der Positivkontrollen. Liegen die Werte der Positivkontrollen nicht innerhalb des im Datenblatt zur Qualitätskontrolle angegebenen Bereichs, so ist das Assay ungültig.

Hinweis: Für die meisten Proben wird eine Peptidextraktion empfohlen. Dies hilft bei der Eliminierung von störenden Molekülen in biologischen Flüssigkeiten und ermöglicht eine Verdünnung oder Konzentration der Probe.

Blutentnahme und Plasmagewinnung allgemein:

1. Blutproben werden in Lavendar Vacutainer Blutentnehmeröhrchen (Katalog-Nr. VT-6450) gesammelt, die EDTA enthalten und bis zu 7 ml Blut aufnehmen können.
2. Die Lavendar Vacutainer Röhrchen nach der Blutentnahme mehrmals leicht schütteln, um eine Koagulation zu vermeiden.
3. Dann wird das Blut in Zentrifugenröhrchen mit Aprotinin gegeben (Katalog-Nr. RK-APRO) und noch einmal mehrmals leicht geschüttelt, um die Aktivität von Proteasen zu hemmen.

Hinweis: 0,6 TIU oder 100 µl Aprotinin pro 1 ml Blut werden empfohlen. Sind die Lavendar Vacutainer Röhrchen zentrifugentauglich, kann das Aprotinin auch direkt hineingegeben werden.

4. Das Blut bei 1.600 x g 15 Minuten lang bei 4 °C zentrifugieren und das Plasma sammeln.

Hinweis: Plasma kann bei -70 °C aufbewahrt werden und bleibt bis zu einem Monat stabil.

5. Zur Peptidextraktion aus der Probe wird das Plasma mit der gleichen Menge Puffer A (Katalog-Nr. RK-BA-1) angesäuert. Mischen und bei 6.000 bis 17.000 x g 20 Minuten lang bei 4 °C zentrifugieren. Das Ganze kommt in die C-18 SEP-SÄULE.

Hinweis: Mindestens 1 ml Plasma wird zur Peptidextraktion empfohlen. Es kann möglich sein, die Extraktion mit geringerem Volumen durchzuführen, solange das Volumen des Rekonstitutions- und Elutions- Puffers entsprechend angepasst wird.

Extraktion von Peptiden aus der Probe:

1. Gewebe 20 Minuten lang bei 100 °C in 75%-iger HoAc (Essigsäure) kochen.
2. Gewebe im Lysepuffer, normalerweise mit niedrigem pH-Wert, homogenisieren.
3. Das Gewebehomogenat bei 12.000 rpm 20 bis 30 Minuten lang bei 4 °C zentrifugieren.
4. Zur Peptidextraktion aus der Probe wird 1 ml Überstand genommen und mit 1 ml Puffer A (Katalog-Nr. RK-BA-1) kombiniert und damit die Probe angesäuert. Bei 6.000 bis 17.000 x g 20 Minuten lang zentrifugieren und Überstand einsammeln. Das Ganze kommt in die C-18 SEP-SÄULE. Durch Zentrifugation auf Eis werden Peptidasen gehemmt.

Hinweis: Ist ein separates Proteinassay erforderlich, wird ein Aliquot weggenommen, bevor der Puffer A hinzugefügt wird. Dieser Puffer enthält Stoffe, die die Proteinanalyse stören könnten.

Extraktion von Peptiden aus der Probe:

1. Eine SEP-SÄULE mit 200 mg C18 (Katalog-Nr. RK-SEPCOL-1) äquilibrieren. Einmal mit 1 ml Puffer B waschen (Katalog-Nr. RK-BB-1) und danach dreimal (3) mit 3 ml Puffer A.
2. Die angesäuerte Probenlösung (Plasma, Serum, Gewebe etc.) kommt in die voräquilibrierte C-18 SEP-SÄULE.
3. Die Säule zweimal langsam mit 3 ml Puffer A waschen und die Waschflüssigkeit entsorgen.
4. Das Peptid einmal langsam mit 3 ml Puffer B eluieren und das Elutionsmittel in einem Polystyrolröhrchen sammeln.

Hinweis: Beim Extraktionsverfahren für einen konstanten Strom aller Lösungen sorgen. Für eine optimale Probenverarbeitung und Rückgewinnung dürfen keine Luftblasen in die C-18-Matrix gelangen.

5. Elutionsmittel in einem Zentrifugenkonzentrator oder durch eine geeignete Ersatzmethode bis zur Trockenheit verdampfen lassen.

Hinweis: Eine Kombination aus Zentrifugenkonzentrator (d.h. Speedvac) und Lyophilisator (Gefriertrockner) bringt die besten Ergebnisse. Zuerst wird die Probe im Zentrifugenkonzentrator ca. 15 Minuten lang getrocknet und die organische Schicht entfernt. Der Rest der Probe wird schockgefroren und über Nacht mit dem Lyophilisator gefriergetrocknet. Ist der Zentrifugenkonzentrator keine akzeptable Lösung, reicht die Gefriertrocknung über Nacht im Lyophilisator aus.

6. Das getrocknete Extrakt wird auf -20 °C gehalten und das Assay so bald wie möglich durchgeführt. Mit dem 1x-Assay-Puffer wird das getrocknete Extrakt auf die gewünschte Konzentration rekonstituiert. Fällt der Peptidwert nicht in den nachweisbaren Bereich, wird die Probe entsprechend verdünnt oder konzentriert.

Hinweis: Wurde beispielsweise 1 ml Plasma extrahiert, getrocknet und dann in 250 µl 1x-Assay-Puffer rekonstituiert, dann wurde die Originalprobe dadurch einer 4-fachen Konzentration unterzogen.

QUELLEN

1. Porstmann, T. and Kiessig, S.T., Enzyme Immunoassay Techniques, An Overview, *Journal of Immunological Methods*, 150: 5-21 (1992).
2. Avrameas, S., Amplification Systems in Immunoenzymatic Techniques, *Journal of Immunological Methods*, 150: 23-32 (1992).
3. Hofbauer KH, Jensen BL, Kurtz A, Sandner P. Tissue hypoxigenation activates the adrenomedullin system in vivo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000 Feb;278(2):R513-9.

DU

A	B	C	D	E	F	G	H	
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								



USA

Phoenix Pharmaceuticals, Inc.

330 Beach Rd.
Burlingame, California 94010
Tel: 650-558-8898, 1-800-988-1205
Fax: 650-558-1686
info@phoenixpeptide.com
www.phoenixpeptide.com



Europe

Phoenix Europe GmbH

Viktoriastraße 3-5
D-76133 Karlsruhe, Deutschland
Tel: +49 (721) 12 08 150
Fax: +49 (721) 12 08 15 15
europe@phoenixpeptide.eu

IVD



Protocole général pour
**LE KIT SERVANT A L'ESSAI IMMUNOEN-
ZYMATIQUE**

(Plage: 0-1000 ng/ml)



PHOENIX PHARMACEUTICALS, INC.

TABLE DES MATIERES

FR

1. Contenu du Kit.....	2
2. Matériel supplémentaire, non inclus	2
3. Stockage	3
4. Consignes de sécurité.....	3
5. Élimination des réactifs	3
6. Introduction.....	4
7. Le principe général de l'essai immunoenzymatique.....	4
8. Résumé du protocole de l'essai	5
9. Protocole d'essai.....	6
A. Réhydratation des peptides et des anticorps	6
B. Dilutions peptidiques standard	7
C. Chargement des plaques de microtitrage.....	8
D. Incubation des plaques de microtitrage.....	8
10. Recommandations supplémentaires.....	10
11. Évaluation des résultats.....	11
12. Méthode suggérée pour l'extraction peptidique	12
A. Prélèvement de sang et collecte de plasma	12
B. Préparation générale des tissus.....	13
C. Extraction des peptides à partir d'échantillons	13
13. Références	14

CONTENU DU KIT

1. Tampon concentré pour essais EIA (50ml, 20x) réf. catalogue: **EK-BUF**
2. Plaque IE pré-enduite (96 cupules, 1 plaque)..... réf. catalogue: **EK-PLATE**
3. Scellant pour plaques en acétate (APS) (3 pièces)..... réf. catalogue: **EK-APS**
4. Anticorps primaire (IgG anti-peptide de lapin)
(1 flacon, sous forme lyophilisée)
5. Peptide standard (1 flacon, sous forme lyophilisée)
6. Peptide biotinyté (1 flacon, sous forme lyophilisée)
7. Streptavidine-peroxydase de raifort
(SA-HRP) (30µl)..... réf. catalogue: **EK-SA-HRP**
8. Témoin positif (2 flacons, sous forme lyophilisée)
9. Solution de substrat (TMB) (12ml, prêt à l'emploi)..... réf. catalogue: **EK-SS**
10. 2N HCL (15ml, prêt à l'emploi)..... réf. catalogue: **EK-HCL**
11. Protocole général (1 livret)

MATERIEL SUPPLEMENTAIRE, NON INCLUS

1. Lecteur de plaques de microtitrage (450nm) (indispensable)
2. Micropipette avec embouts de pipette jetables (indispensable)
3. Matériau absorbant pour le séchage (indispensable)
4. Vortex (indispensable)
5. Logiciel à ajustement de courbe capable de logistiques de 4 paramètres (recommandé)
6. Agitateur orbital de plaques (300-400tr/min) (recommandé)
7. Nettoyeur pour les plaques de microtitrage (recommandé)
8. Pipettes multi-canaux (50-100µl) (recommandé)
9. Réservoir de solution (recommandé)
10. Centrifugeuse (en option)
11. Tube à prélèvement de sang vacutainer de couleur bleu lavande EDTA (en option)..... réf. catalogue: **VT-6450**
12. Aprotinine (30 TIU) (en option) réf. catalogue: **RK-APRO**
13. COLONNE DE SEP A C18 (en option) réf. catalogue: **RK-SEPCOL-1**
14. Tampon A (en option) réf. catalogue: **RK-BA-1**
15. Tampon B (en option) réf. catalogue: **RK-BB-1**

STOCKAGE

1. Dès réception, stocker le kit à 4°C. Ne pas congeler. Les kits de test non ouverts resteront stables jusqu'à la date d'expiration, à condition qu'ils aient été stockés comme décrit précédemment.
2. L'utilisation de toutes les solutions dans les meilleurs délais après la reconstitution est vivement conseillée. Les solutions réhydratées du peptide biotinylé standard ou les anticorps primaires doivent être utilisés dans les 5 jours (4°C). Les dilutions standards doivent être préparées immédiatement avant de procéder à l'essai.
3. Toutes les bandes/colonnes non utilisées peuvent être retirées de la plaque de microtitrage pré-enduite. Veuillez replacer les bandes dans le sachet métallique original à fermeture éclair avec un dessicant et le conserver à une température de 4°C. Ne laissez pas l'humidité s'accumuler dans les cupules.
4. Si nécessaire, stockez le tampon d'essai (1x), les solutions reconstituées du peptide biotinylé standard, les anticorps et la solution SA-HRP à 4°C.

CONSIGNES DE SÉCURITÉ

1. Le kit contient du 2N HCL et un agent conservateur qui peut provoquer des irritations. Portez des gants au travail et lors de la manipulation de ces réactifs.
2. Afin de minimiser le risque de contamination microbienne, des lunettes de sécurité et/ou des gants doivent être portés en permanence.

ÉLIMINATION DES RÉACTIFS

Éliminez les réactifs conformément aux prescriptions locales.

Phoenix Pharmaceuticals, Inc. garantit que ses produits sont conformes aux informations contenues dans cette publication. L'acheteur doit déterminer l'adéquation du produit à ses besoins particuliers et établir les concentrations d'échantillons optimales.

INTRODUCTION

Ce kit est conçu pour mesurer la concentration d'un peptide spécifique et de ses peptides connexes, fondée sur le principe d'un essai immunoenzymatique par «compétition». Ce kit est utilisé pour soutenir la détection de divers antigènes dans les échantillons humains.

LE PRINCIPE GENERAL DE L'ESSAI IMMUNOENZYMATIQUE

La plaque de microtitrage contenue dans ce kit est pré-enduite d'un anticorps secondaire, dont les sites non-spécifiques de liaison sont bloqués. L'anticorps secondaire peut se lier au fragment Fc de l'anticorps primaire. Le fragment Fab de cet anticorps primaire sera alors lié par compétition par à la fois le peptide biotinylé et le peptide ciblé soit dans la solution de peptide standard soit dans un échantillon inconnu. Le peptide biotinylé interagit avec la streptavidine-peroxydase de raifort (SA-HRP) qui catalyse la solution de substrat. L'ajout de la solution d'arrêt provoque un changement de couleur dans chaque cupule, passant du bleu au jaune. L'intensité de la couleur jaune est directement proportionnelle à la quantité du complexe peptide biotinylé-SA-HRP, mais inversement proportionnelle à la quantité du peptide ciblé (que ce soit dans la solution peptidique standard ou dans l'échantillon inconnu). Ce phénomène est dû à la compétition entre le peptide biotinylé et le peptide ciblé pour arriver à la liaison avec l'anticorps primaire. Une courbe standard peut être établie en retraçant l'O.D. mesurée en fonction des diverses concentrations peptidiques standards connues. La concentration peptidique inconnue peut alors être déterminée par extrapolation en se basant sur cette courbe standard.

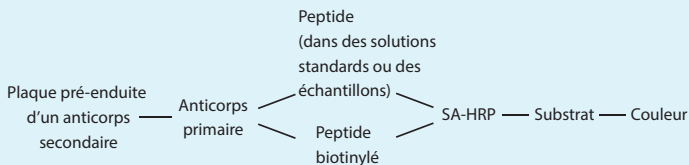


Illustration 1. Diagramme des interactions moléculaires utilisées dans ce kit

RESUME DU PROTOCOLE D'ESSAI

Ajoutez 50µl/cupule de solution standard, échantillon, ou témoin positif, 25µl de l'anticorps primaire, et 25µl du peptide biotinylé
sauf les cupules de contrôle à blanc



Laissez incuber à température ambiante (20-23°C) pendant 2 heures



Rincez la plaque de microtitrage 4 fois avec
350µl/cupule de tampon d'essai (1x)



Ajoutez 100µl/cupule de solution SA-HRP



Laissez incuber à température ambiante (20-23°C) pendant 1 heure



Rincez la plaque de microtitrage 4 fois avec
350µl/cupule de tampon d'essai (1x)



Ajoutez 100µl/cupule de solution de substrat TMB



Laissez incuber à température ambiante (20-23°C) pendant 1 heure



Terminez la réaction avec 100µl/cupule de 2N HCL



Surveillez l'absorption O.D. à 450nm et calculez les résultats

Remarque: Veuillez lire ce protocole dans son intégralité avant de commencer l'essai. Chaque kit contient suffisamment de réactifs pour 96 cupules; 40 échantillons dupliqués peuvent être passés à l'essai.

PROTOCOLE D'ESSAI

Remarque: Avant l'ouverture des flacons et le démarrage de l'essai, il faut porter le kit et tous ses composants à température ambiante (20-23°C). Avant d'ouvrir les microtubes à centrifuger pour la reconstitution, centrifuger brièvement à ~3 000 tr/min pendant 5 secondes pour s'assurer que toute la matière lyophilisée soit bien au fond du tube.

1. Diluez le concentré de tampon d'essai EIA (20x) avec 950 ml d'eau distillée. Mélangez soigneusement avant utilisation. Le mélange constituera la solution de tampon d'essai (1x) à utiliser pour diluer ou reconstituer tous les autres échantillons et réactifs pendant l'essai.

Remarque: Si des cristaux se forment dans le tampon d'essai (20x), le flacon peut être placé dans un bain d'eau chaude pendant environ 30 minutes ou bien jusqu'à ce que les cristaux aient disparu.

2. Reconstituez le peptide standard dans 1ml du tampon d'essai (1x) et mélangez soigneusement avec le vortex. Laissez reposer la solution pendant au moins 10 minutes à température ambiante (20-23°C) pour une dissolution complète. C'est la solution étalon standard. Passez-la au vortex juste avant de l'utiliser.
3. Reconstituez l'anticorps primaire dans 5ml du tampon d'essai (1x) et mélangez soigneusement avec le vortex. Laissez reposer la solution pendant au moins 5 minutes à température ambiante pour une dissolution complète. Passez-la de nouveau au vortex avant utilisation.
4. Reconstituez le peptide biotinylé dans 5ml du tampon d'essai (1x) et mélangez soigneusement avec le vortex. Laissez reposer la solution pendant au moins 5 minutes à température ambiante pour une dissolution complète. Passez-la de nouveau au vortex avant utilisation.
5. Reconstituez le témoin positif dans 200µl du tampon d'essai (1x) et mélangez soigneusement avec le vortex. Laissez reposer la solution pendant au moins 5 minutes à température ambiante pour une dissolution complète. Passez-la de nouveau au vortex avant utilisation.

Préparez la solution peptidique standard comme suit:

Standard ID / Numéro	Volume tampon d'essai (1x)	Volume peptidique standard	Concentration
Étalon	1000µl	(poudre)	1000ng/ml
#2	900µl	100µl de solution	100ng/ml
#3	900µl	100µl of #2	10ng/ml
#4	900µl	100µl of #3	1ng/ml
#5	900µl	100µl of #4	0.1ng/ml

Illustration 2. Tableau des dilutions standards

Blanc	(B)	(B)
Liaison totale	(T)	(T)
0.1 ng/ml	(5)	(5)
1 ng/ml	(4)	(4)
10 ng/ml	(3)	(3)
100 ng/ml	(2)	(2)
Étalon	(E)	(E)
Témoin positif	(PC)	(PC)

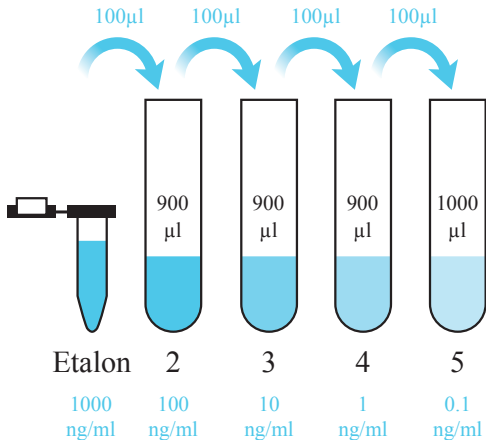


Illustration 3. Carte de chargement de la plaque de microtitrage

Illustration 4. Guide visuel des dilutions standards

6. Préparez les dilutions standards à partir du peptide standard réhydraté selon les illustrations 2 et 4 de la page précédente. Mélangez chaque tube soigneusement au vortex après chaque dilution sérielle.
7. Sur la plaque de microtitrage, laissez les cupules A1 et A2 vides. Elles serviront de cupules de contrôle à blanc.
8. Versez 50 µl de tampon d'essai (1x) dans les cupules B1 et B2. Celles-ci représenteront la liaison globale.
9. Versez 50 µl de la solution peptidique la moins concentrée (# 5) aux cupules C1 et C2. Ensuite, ajoutez le peptide standard #4 dans les cupules D1 et D2, et ainsi de suite, en continuant dans l'ordre inverse de la dilution standard.

Remarque: Les peptides standards doivent toujours être testés en double.

10. Versez 50 µl du témoin positif réhydraté dans les cupules H1 et H2.

Remarque: Les témoins positifs doivent toujours être testés en double.

11. Versez 50 µl de n'importe quel échantillon inconnu/préparé dans les cupules correspondantes, de nouveau en double.

Remarque: Chaque laboratoire doit déterminer les facteurs de dilution et la préparation de ses échantillons pour s'assurer que les niveaux peptidiques sont détectables et se trouvent dans la gamme linéaire de la courbe standard.

12. Versez 25 µl d'anticorps primaire réhydraté dans chaque cupule, **sauf dans les cupules de contrôle à blanc** (A1 et A2).

Remarque: L'utilisation d'une pipette multi-canaux pour charger l'anticorps primaire est **DECONSEILLÉE**.

13. Versez 25 µl du peptide biotinylé réhydraté dans chaque cupule, **sauf dans les cupules de contrôle à blanc** (A1 et A2).

Remarque: L'utilisation d'une pipette multi-canaux pour charger le peptide biotinylé est **DECONSEILLÉE**.

14. Scellez la plaque de microtitrage avec le scellant d'acétate (APS). Laissez incuber les plaques de microtitrage pendant 2 heures à température ambiante (20-23°C).

Remarque: Une agitation orbitale à 300-400 tr/min pendant toute la durée des incubations est conseillée.

15. Centrifugez le flacon avec la solution SA-HRP (3 000 à 5000 tr/min) pendant 5 secondes. Versez 12µl de la solution SA-HRP dans 12ml de tampon d'essai (1x) à l'aide de la pipette et mélangez soigneusement la solution au vortex.

16. Retirez le scellant APS de la plaque de microtitrage et jetez le contenu des cupules. Rincez chaque cupule avec 350 µl de tampon d'essai (1x), jetez le tampon, inversez la plaque de microtitrage et faites-la sécher en tamponnant. Répétez l'opération 4 fois.

17. Versez 100 µl de la solution SA-HRP dans chaque cupule.

18. Scellez de nouveau la plaque de microtitrage avec le scellant APS. Laissez incuber pendant 1 heure à température ambiante (20-23°C).

Remarque: Une agitation orbitale à 300-400 tr/min pendant toute la durée des incubations est conseillée.

19. Retirez le scellant l'APS de la plaque de microtitrage et jetez le contenu des cupules. Rincez chaque cupule avec 350 µl de tampon d'essai (1x), jetez le tampon, inversez la plaque de microtitrage et faites-la sécher en tamponnant. Répétez l'opération 4 fois.

20. Versez 100 µl de la solution de substrat TMB dans chaque cupule.

Remarque: Le TMB est sensible à la lumière. Après l'ajout de la solution de substrat TMB, il est fortement recommandé de couvrir la plaque de microtitrage pour la protéger de la lumière.

21. Scellez de nouveau la plaque de microtitrage avec le scellant APS. Laissez incuber pendant 1 heure à température ambiante (20-23°C).

Remarque: Une agitation orbitale à 300-400 tr/min pendant toute la durée des incubations est conseillée.

22. Retirez le scellant APS de la plaque de microtitrage. Ne PAS rincer la plaque de microtitrage ni jeter le contenu des cupules.

23. Versez 100 µl de 2N HCL dans chaque cupule pour couper la réaction. La couleur dans les cupules doit passer du bleu au jaune. Tapotez la plaque en douceur pour assurer un bon mélange.

Remarque: Passez à l'étape suivante dans les 20 minutes.

24. Introduisez la plaque de microtitrage dans un lecteur de plaques de microtitrage et mesurez la capacité d'absorption O.D. à 450 nm.

1. Les réactifs provenant de lots avec des numéros différents ne doivent jamais être mélangés.
2. Les substances telles le plasma, le sérum, les milieux de culture, l'homogénat de tissus, le liquide cébrospinal (CSF), l'urine ou tout fluide biologique peuvent faire l'objet d'un essai tant que les échantillons soient préparés de manière appropriée et le niveau peptidique de l'échantillon soit suffisamment élevé pour la sensibilité de ce kit spécifique.
3. Des taux importants de protéines interférentes peuvent entraîner des variations en ce qui concerne les résultats de l'échantillon. Par conséquent, il est impératif de sélectionner la procédure de préparation de l'échantillon appropriée pour obtenir des résultats optimaux. Veuillez consulter la documentation relative à la méthodologie spécifique.
4. Lors de la manipulation de la plaque, évitez de toucher le fond. Toute trace de doigts ou tache peut affecter la lecture de l'O.D.
5. Le rinçage manuel peut provoquer de grandes variations dans les coefficients de duplication. Afin de réduire ce facteur, le liquide provenant de la plaque devrait être retiré en inversant la plaque et en la faisant sécher sur un matériau absorbant.
6. Chaque fois qu'un nouvel embout est utilisé, assurez-vous qu'il soit intact et libre de bulles d'air. Pour une meilleure variation au sein d'une même série d'essais, aspirez et expulsez plusieurs fois un réactif ou un échantillon dans son conteneur pour mouiller les parois de la pipette avant de la remplir.
7. Évitez de plonger tout l'embout de la pipette dans les réactifs et les échantillons. Des gouttelettes peuvent s'accumuler à l'extrémité de l'embout. Il y a risque qu'un excès de solution va s'accumuler dans la cupule et affecte les résultats de l'essai.
8. Si cette procédure est effectuée en dehors de la plage de température ambiante recommandée (20-23°C) les résultats de l'essai peuvent s'en trouver affectés.
9. Toutes les modifications apportées au protocole existant (c'est-à-dire dilutions standards, technique de pipetage, technique de rinçage, temps d'incubation ou température, conditions de stockage et date d'expiration du kit) peuvent affecter la sensibilité, la spécificité et les résultats de l'essai.

1. Désignez l'axe des X (échelle logarithmique) pour la concentration des standards #5 à #1 (0,1 à 1000 ng/ml).
2. Désignez l'axe des Y (échelle linéaire) pour la capacité d'absorption (O.D.) à 450 nm.
3. Faites la moyenne de tous les relevés dupliqués (standards, contrôle positif, échantillons) et soustrayez la moyenne des contrôles à blanc O.D.
4. Tracez l'O.D. de chaque concentration peptidique standard directement au-dessus de sa coordonnée sur l'axe X.
5. Tracez la courbe la mieux ajustée aux points de données. Elle doit mettre en évidence une relation inverse entre concentration peptidique et capacité d'absorption. Au fur et à mesure que la concentration peptidique standard augmente, la couleur jaune diminue, réduisant ainsi la capacité d'absorption (O.D.).

Remarque: L'usage d'un logiciel d'ajustement de courbe avec fonction 4PL ou log-logit est fortement conseillé.

6. Pour déterminer la concentration peptidique dans tout échantillon inconnu, recherchez d'abord sa capacité d'absorption (O.D.) sur l'axe des Y. Tracez une ligne horizontale sur le graphique à partir de ce point de capacité d'absorption jusqu'à l'intersection avec la courbe des standards. La coordonnée sur l'axe X à ce point d'intersection correspondra à la concentration peptidique (ng/ml) présente dans l'échantillon dosé.

Remarque: Multipliez la concentration peptidique mesurée par tout facteur de dilution(s) utilisé lors de la préparation de l'échantillon original.

7. Reportez-vous à la Feuille de données QC relative aux valeurs admissibles des témoins positifs. Si les valeurs des témoins positifs ne se situent pas dans la plage spécifiée sur la Fiche de Données QC, l'essai n'est pas considéré comme valide.

Remarque: Pour la plupart des échantillons, une extraction des peptides est recommandée. Elle aidera à éliminer toutes les interférences moléculaires présentes dans les fluides biologiques et permettra la dilution ou la concentration de l'échantillon.

Généralités concernant le prélèvement de sang et la collecte de plasma:

1. Prélevez des échantillons de sang dans des tubes Vacutainer de couleur bleu lavande (réf. catalogue VT-6450), qui contiennent un adjuvant EDTA et peuvent accueillir jusqu'à 7 ml de sang.
2. Agitez doucement les tubes Vacutainer de couleur bleu lavande plusieurs fois immédiatement après le prélèvement de sang pour éviter la coagulation.
3. Transférez le sang dans les tubes de centrifugation contenant de l'aprotinine (réf. catalogue RK-APRO), et agitez-les plusieurs fois avec précaution pour inhiber l'activité des protéases.

Remarque: Une quantité de 0,6 TIU, ou 100 µl, d'aprotinine pour 1ml de sang collecté est recommandée. Si les tubes Vacutainer de couleur bleu lavande sont résistants à la centrifugation, l'aprotinine y peut être déposé directement.

4. Centrifugez le sang à 1 600 x g pendant 15 minutes à 4° C et recueillez le plasma.

Remarque: Le plasma peut être conservé à -70°C et restera stable jusqu'à un mois.

5. Pour l'extraction peptidique de l'échantillon, acidifiez le plasma avec une quantité égale du tampon A (réf. catalogue RK-BA-1). Mélangez et centrifugez de 6 000 à 17 000 x g pendant 20 minutes à 4°C. Le mélange sera alors versé dans la COLONNE DE SEP A C-18.

Remarque: Une quantité d'au moins 1 ml de plasma est recommandée pour l'extraction peptidique. On peut éventuellement effectuer l'extraction en utilisant des volumes réduits tant que les volumes des tampons de reconstitution et d'élution soient ajustés en conséquence.

Préparation générale des tissus:

1. Faites bouillir les tissus dans 75% HoAc (acide acétique) pendant 20 minutes à 100°C.
2. Homogénéisez les tissus dans un tampon de lyse, généralement avec un faible pH.
3. Centrifugez l'homogénat tissulaire à 12 000 tr/min pendant 20 à 30 minutes à 4°C.
4. Pour l'extraction peptidique à partir d'un échantillon, prélevez 1ml du surnageant et combinez-le avec 1ml du tampon A (réf. catalogue RK-BA-1) pour acidifier l'échantillon. Centrifugez avec 6 000 à 17 000 x g pendant 20 minutes et recueillez le surnageant. Ce mélange sera versé dans la COLONNE DE SEP A C18. La centrifugation sur de la glace contribue à l'inhibition des peptidases.

Remarque: Si un autre essai protéique est nécessaire, désignez et retirez une partie aliquote avant l'ajout au tampon A. Ce tampon contient des matières susceptibles d'interférer avec l'analyse protéique.

Extraction des peptides à partir d'échantillons:

1. Équilibrez une COLONNE DE SEP contenant 200mg de C18 (réf. catalogue RK-SEPCOL-1). Rincez avec 1ml du tampon B (réf. catalogue RK-BB-1) une seule fois, et ensuite avec 3 ml du tampon A trois (3) fois.
2. Versez la solution d'échantillon acidifié (plasma, sérum, tissus, etc.) dans la COLONNE DE SEP A C-18 pré-équilibrée.
3. Rincez lentement la colonne avec 3 ml du tampon A deux fois et éliminez la solution de rinçage.
4. Éluez le peptide lentement avec 3 ml du tampon B une fois et recueillez l'éluant dans un tube en polystyrène.

Remarque: Assurez-vous qu'il y ait un flux constant de toutes les solutions au cours de la procédure d'extraction. Pour garantir un processus et une récupération de l'échantillon de manière optimale, ne laissez pas les bulles d'air pénétrer dans la matrice C-18.

5. Faites évaporer l'éluant jusqu'à dessiccation complète dans un concentrateur centrifuge ou bien par le biais d'une méthode similaire adaptée.

Remarque: La combinaison d'un concentrateur centrifuge (par ex. Speedvac) et d'un lyophilisateur produit les meilleurs résultats. Tout d'abord, utilisez un concentrateur centrifuge pour sécher l'échantillon pendant environ 15 minutes pour enlever la couche organique. Procédez au refroidissement ultra rapide de l'échantillon restant et lyophilisez-le pendant la nuit en utilisant un appareil à lyophiliser. Si vous ne disposez pas d'un concentrateur centrifuge, la lyophilisation pendant la nuit en utilisant un lyophilisateur sera suffisante.

6. Conservez l'extrait sec à -20°C et effectuez l'essai dès que possible. Utilisez le tampon d'essai (1x) pour reconstituer l'extrait sec à la concentration souhaitée. Si la valeur peptidique ne se situe pas dans la plage de détection, diluez ou concentrez l'échantillon en fonction des besoins.

Remarque: Par exemple, si 1ml de plasma a été extrait, séché, puis reconstitué dans 250 µl de tampon d'essai (1x), cela signifie que l'échantillon original aura subi une quadruple concentration maintenant.

REFERENCES

1. Porstmann, T. and Kiessig, S.T., Enzyme Immunoassay Techniques, An Overview, *Journal of Immunological Methods*, 150: 5-21 (1992).
2. Avrameas, S., Amplification Systems in Immunoenzymatic Techniques, *Journal of Immunological Methods*, 150: 23-32 (1992).
3. Hofbauer KH, Jensen BL, Kurtz A, Sandner P. Tissue hypoxxygenation activates the adrenomedullin system in vivo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000 Feb;278(2):R513-9.

DIAGRAMME DE L'ESSAI

A	B	C	D	E	F	G	H	
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								



USA

Phoenix Pharmaceuticals, Inc.

330 Beach Rd.
Burlingame, California 94010
Tél: 650-558-8898, 1-800-988-1205
Fax: 650-558-1686
info@phoenixpeptide.com
www.phoenixpeptide.com



Europe

Phoenix Europe GmbH

Viktoriastrasse 3-5
D-76133 Karlsruhe, Germany
Tél: +49 (721) 12 08 150
Fax: +49 (721) 12 08 15 15
europe@phoenixpeptide.eu

IVD



Protocollo generale per

KIT PER

SAGGIO IMMUNOENZIMATICO

(range: 0-1000 ng/ml)



PHOENIX PHARMACEUTICALS, INC.

1. Contenuto del kit.....	2
2. Materiali aggiuntivi, non inclusi.....	2
3. Conservazione	3
4. Precauzioni di sicurezza	3
5. Smaltimento dei reagenti.....	3
6. Introduzione	4
7. Principio generale del saggio immunoenzimatico	4
8. Riassunto del protocollo di dosaggio	5
9. Protocollo di dosaggio.....	6
A. Reidratazione del peptide e dell'anticorpo.....	6
B. Diluizioni del peptide standard	7
C. Caricamento dell'immunoplastra	8
D. Incubazione dell'immunoplastra.....	8
10. Ulteriori raccomandazioni	10
11. Calcolo dei risultati	11
12. Metodo proposto per l'estrazione dei peptidi.....	12
A. Prelievo del sangue e raccolta del plasma.....	12
B. Preparazione generale del tessuto	13
C. Estrazione dei peptidi dal campione.....	13
13. Bibliografia	14

CONTENUTO DEL KIT

1. Tampone di dosaggio EIA concentrato (50ml, 20x) **n. catalogo EK-BUF**
2. Piastra EIA pre-rivestita (96 pozzetti, 1 piastra) **n. catalogo EK-PLATE**
3. Sigillante acetico per le piastre (APS) (3 pezzi) **n. catalogo EK-APS**
4. Anticorpo primario (IgG anti-peptide di coniglio)
(1 flaconcino, liofilizzato)
5. Peptide standard (1 flaconcino, liofilizzato)
6. Peptide biotinilato (1 flaconcino, liofilizzato)
7. Perossidasi di rafano/streptavidina
(SA-HRP) (30µl)..... **n. catalogo EK-SA-HRP**
8. Controllo positivo (2 flaconcini, liofilizzato)
9. Soluzione di substrato (TMB) (12ml, pronta all'uso) **n. catalogo EK-SS**
10. HCl 2N (15ml, pronto all'uso) **n. catalogo EK-HCL**
11. Protocollo generale (1 opuscolo)

MATERIALI AGGIUNTIVI, NON INCLUSI

1. Lettore di piastre per microtitolazione (450nm) (necessario)
2. Micropipetta con puntali monouso (necessaria)
3. Materiale assorbente per blotting (necessario)
4. Agitatore a vortice (necessario)
5. Software di curve fitting per curva logistica a 4 parametri (consigliato)
6. Agitatore orbitale di piastre (300-400 rpm) (consigliato)
7. Lavatore per piastre per microtitolazione (consigliato)
8. Pipetta multicanale (50-100µl) (consigliata)
9. Serbatoio per soluzione (consigliato)
10. Centrifuga (opzionale)
11. Provette vacutainer EDTA tappo lilla per prelievi ematici (opzionale)
..... **n. catalogo VT-6450**
12. Aprotinina (30 TIU) (opzionale)..... **n. catalogo RK-APRO**
13. SEP-COLUMN C18 (opzionale) **n. catalogo RK-SEPCOL-1**
14. Tampone A (opzionale) **n. catalogo RK-BA-1**
15. Tampone B (opzionale)..... **n. catalogo RK-BB-1**

CONSERVAZIONE

1. Conservare il kit a 4°C dal momento della consegna. Non congelare. I kit non aperti restano stabili fino alla data di scadenza, purché vengano conservati come descritto.
2. Si consiglia fortemente di utilizzare tutte le soluzioni il prima possibile dopo la ricostituzione. Le soluzioni reidratate del peptide standard, biotinilato o dell'anticorpo primario dovrebbero essere utilizzate entro 5 giorni (4°C). Le diluizioni standard devono essere preparate subito prima di effettuare il test.
3. Tutte le strisce/colonne non utilizzate possono essere rimosse dall'immunoplastra pre-rivestita. Riporre le strisce, con un dissecante, nel sacchetto originale in alluminio con chiusura a zip, sigillare e conservare a 4° C. Evitare l'accumulo di umidità sui pozzetti.
4. Se necessario, conservare il tampone d'analisi 1x, le soluzioni ricostituite del peptide standard, del peptide biotinilato, dell'anticorpo e del SA-HRP a 4°C.

PRECAUZIONI DI SICUREZZA

1. Il kit contiene HCl 2N e un conservante che può essere irritante. Indossare i guanti quando si lavora o si maneggiano i reagenti.
2. Per minimizzare i rischi di contaminazione microbica, indossare sempre occhiali di sicurezza e/o guanti.

ENTSORGUNG DER REAGENZIEN

Smaltire i reagenti come previsto dalle disposizioni locali.

Phoenix Pharmaceuticals, Inc. garantisce che i prodotti sono conformi alle informazioni contenute in questa pubblicazione. L'acquirente deve verificare se il prodotto è adeguato ai suoi bisogni specifici e stabilire le concentrazioni ottimali di campione.

INTRODUZIONE

Questo kit è sviluppato per misurare la concentrazione di un peptide specifico e dei peptidi ad esso correlati in base al principio del saggio immunoenzimatico competitivo. Il kit è utilizzato come ausilio per identificare svariati antigeni in campioni umani.

PRINCIPIO GENERALE DEL SAGGIO IMMUNOENZIMATICO

L'immunoplastra di questo kit è pre-rivestita con un anticorpo secondario, i cui siti di legame non specifici sono bloccati. L'anticorpo secondario può legarsi al frammento Fc dell'anticorpo primario. Il peptide biotinilato sarà poi in competizione con il peptide target per il legame con il frammento Fab dell'anticorpo primario nella soluzione peptidica standard o nel campione sconosciuto. Il peptide biotinilato interagisce con la perossidasi di rafano/streptavidina (SA-HRP) che catalizza la soluzione del substrato. L'aggiunta della soluzione di arresto fa virare il colore di ogni pozzetto da blu a giallo. L'intensità del colore giallo risultante è direttamente proporzionale alla quantità di complesso peptide biotinilato/SA-HRP, ma inversamente proporzionale alla quantità di peptide target (nella soluzione peptidica standard o nel campione sconosciuto). Ciò è dovuto alla competizione tra il peptide biotinilato e il peptide target nel legame con l'anticorpo primario. Si può stabilire una curva standard tracciando il grafico delle O.D. misurate in funzione delle varie concentrazioni di peptide standard note. Si può determinare la concentrazione di peptide sconosciuto nei campioni tramite l'extrapolazione basata su questa curva standard.

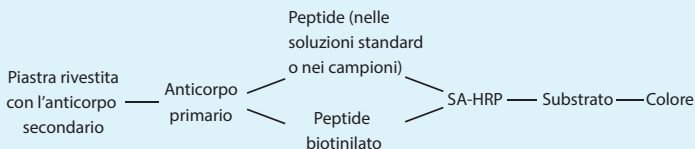


Figura 1. Diagramma delle interazioni molecolari utilizzate in questo kit

RIASSUNTO DEL PROTOCOLLO DI DOSAGGIO

Distribuire 50 μ l di standard, campione o controllo positivo e 25 μ l di anticorpo primario e 25 μ l di peptide biotinilato in ogni pozzetto, **tranne quelli del bianco**

▼
Incubare a temperatura ambiente (20-23°C) per 2 ore.

▼
Lavare l'immunoplastra 4 volte con 350 μ l di tampone di dosaggio 1x per pozzetto

▼
Distribuire 100 μ l di soluzione SA-HRP in ogni pozzetto

▼
Incubare a temperatura ambiente (20-23°C) per 1 ora

▼
Lavare l'immunoplastra 4 volte con 350 μ l di tampone di dosaggio 1x per pozzetto

▼
Distribuire 100 μ l di soluzione di substrato TMB in ogni pozzetto

▼
Incubare a temperatura ambiente (20-23°C) per 1 ora

▼
Concludere la reazione con 100 μ l di HCl 2N

▼
Leggere l'assorbanza O.D. a 450 nm e calcolare i risultati

Nota: leggere per intero il presente protocollo prima di iniziare il saggio. Ogni kit contiene reagenti sufficienti per 96 pozzetti e permette di saggiare 40 campioni in duplicato.

PROTOCOLLO DI DOSAGGIO

Nota: il kit e tutti i suoi componenti devono essere portati a temperatura ambiente (20-23°C) prima dell'apertura dei flaconcini e dell'inizio del saggio. Prima di aprire le provette da microcentrifuga per la ricostituzione, centrifugare brevemente a ~3.000rpm per 5 secondi per far sì che tutto il materiale liofilizzato sia sul fondo della provetta.

1. Diluire il tampone di dosaggio EIA concentrato 20x con 950 ml di acqua distillata. Mescolare bene prima dell'utilizzo. Questa sarà la soluzione tampone 1x che sarà utilizzata per diluire o ricostituire tutti gli altri campioni e reagenti durante il saggio.

Nota: se compaiono cristalli nel tampone 20x, immergere il flacone in acqua calda per circa 30 minuti o fino a quando i cristalli non saranno più visibili.

2. Ricostituire il peptide standard in 1 ml di tampone 1x e agitare bene nell'agitatore a vortice. Lasciare riposare la soluzione per almeno 10 minuti a temperatura ambiente (20-23°C) per permettere lo scioglimento completo. Questa sarà la soluzione madre standard. Agitare nell'agitatore a vortice subito prima dell'utilizzo.
3. Ricostituire l'anticorpo primario in 5 ml di tampone di dosaggio 1x e agitare bene nell'agitatore a vortice. Lasciare riposare la soluzione per almeno 5 minuti a temperatura ambiente per consentire il completo scioglimento. Agitare nuovamente nell'agitatore a vortice prima dell'utilizzo.
4. Ricostituire il peptide biotinilato in 5ml di tampone di dosaggio 1x e agitare bene nell'agitatore a vortice. Lasciare riposare la soluzione per almeno 5 minuti a temperatura ambiente per consentire il completo scioglimento. Agitare nuovamente nell'agitatore a vortice prima dell'utilizzo.
5. Ricostituire il controllo positivo in 200 µl di tampone di dosaggio 1x e agitare bene nell'agitatore a vortice. Lasciare riposare la soluzione per almeno 5 minuti a temperatura ambiente per consentire il completo scioglimento. Agitare nuovamente nell'agitatore a vortice prima dell'utilizzo.

Preparare le soluzioni standard del peptide come segue:

ID / numero standard	Volume tampone di dosaggio 1x	Volume peptide standard	Concentrazione
Soluzione madre	1000µl	(polvere)	1000ng/ml
#2	900µl	100µl di soluzione madre	100ng/ml
#3	900µl	100µl of #2	10ng/ml
#4	900µl	100µl of #3	1ng/ml
#5	900µl	100µl of #4	0.1ng/ml

Figura 2. Tabella delle diluizioni standard

Bianco	(B)	(B)
Legame totale	(T)	(T)
0.1 ng/ml	(5)	(5)
1 ng/ml	(4)	(4)
10 ng/ml	(3)	(3)
100 ng/ml	(2)	(2)
Soluzione madre	(S)	(S)
Controllo positivo	(PC)	(PC)

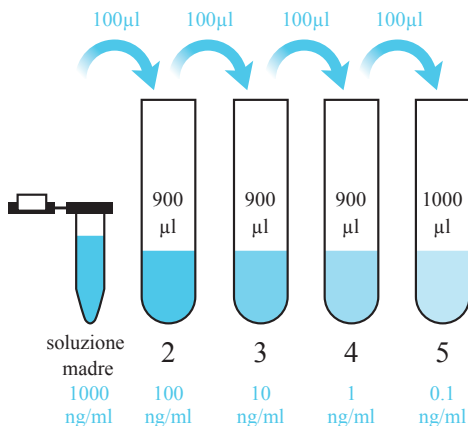


Figura 4. Guida visiva delle diluizioni standard

Figura 3. Mappa di caricamento dell'immunoplastra

6. Preparare le diluizioni standard con il peptide standard reidratato come mostrato nella Figura 2 e nella Figura 4 nella pagina precedente. Agitare bene ogni provetta nell'agitatore a vortice dopo ogni diluizione seriale.
7. Lasciare i pozzetti A1 e A2 vuoti per i bianchi.
8. Distribuire 50 µl di tampone di dosaggio 1x nei pozzetti B1 e B2. Questi rappresenteranno il legame totale.
9. Distribuire 50 µl della soluzione standard a minor concentrazione di peptide (#5) nei pozzetti C1 e C2. Successivamente, distribuire il peptide standard #4 nei pozzetti D1 e D2 e proseguire così nell'ordine opposto alla diluizione standard.

Nota: i peptidi standard devono essere sempre testati in duplicato.

10. Distribuire 50 µl di controllo positivo reidratato nei pozzetti H1 e H2.

Nota: i controlli positivi devono essere sempre testati in duplicato.

11. Distribuire 50 µl di campioni sconosciuti/preparati nei pozzetti designati, anche in questo caso in duplicato.

Nota: ogni laboratorio deve stabilire i fattori di diluizione appropriati e preparare i campioni in modo tale da assicurare che i livelli di peptidi siano identificabili e compresi nell'intervallo lineare della curva standard.

12. Distribuire 25 µl di anticorpo primario reidratato in tutti i pozzetti tranne quelli dei bianchi (A1 e A2).

Nota: si SCONSIGLIA l'utilizzo di una pipetta multicanale per caricare l'anticorpo primario.

13. Diluire 25 µl di peptide biotinilato reidratato in tutti i pozzetti tranne quelli dei bianchi (A1 e A2).

Nota: si SCONSIGLIA l'utilizzo di una pipetta multicanale per caricare il peptide biotinilato.

14. Sigillare l'immunoplastra con un sigillante acetico (APS). Incubare l'immunoplastra per 2 ore a temperatura ambiente (20-23°C).

Nota: si consiglia l'agitazione orbitale a 300-400 rpm durante tutte le incubazioni.

15. Centrifugare il flaconcino di SA-HRP (3.000-5.000 rpm) per 5 secondi. Pipettare 12 µl di SA-HRP in 12 ml di tampone di dosaggio 1x e agitare bene la soluzione nell'agitatore a vortice.

16. Rimuovere il sigillante acetico APS dall'immunoplastra e gettare il contenuto dei pozzetti. Lavare ogni pozzetto con 350 µl di tampone di dosaggio 1x, gettare il tampone, ribaltare l'immunoplastra e asciugarla tamponando. Ripetere 4 volte.

17. Distribuire 100 µl di soluzione SA-HRP in ogni pozzetto

18. Sigillare nuovamente l'immunoplastra con il sigillante acetico APS. Incubare per 1 ora a temperatura ambiente (20-23°C).

Nota: si consiglia l'agitazione orbitale a 300-400 rpm per la durata delle incubazioni.

19. Rimuovere il sigillante acetico APS dall'immunoplastra e gettare il contenuto dei pozzetti. Lavare ogni pozzetto con 350 µl di tampone di dosaggio 1x, gettare il tampone, ribaltare l'immunoplastra e asciugarla tamponando. Ripetere 4 volte.

20. Distribuire 100 µl di soluzione di substrato TMB in ogni pozzetto.

Nota: il TMB è fotosensibile. Si consiglia fortemente di coprire l'immunoplastra dopo aver aggiunto la soluzione di substrato TMB per proteggerla dalla luce.

21. Sigillare nuovamente l'immunoplastra con il sigillante acetico APS. Incubare per 1 ora a temperatura ambiente (20-23°C).

Nota: si consiglia l'agitazione orbitale a 300-400 rpm per la durata delle incubazioni.

22. Rimuovere il sigillante acetico APS dall'immunoplastra. NON lavare l'immunoplastra o gettare il contenuto dei pozzetti.

23. Distribuire 100 µl di HCl 2N in ogni pozzetto per fermare la reazione. Il colore nei pozzetti dovrebbe virare da blu a giallo. Picchiettare con delicatezza sulla piastra per facilitare il mescolamento.

Nota: effettuare i passi successivi nell'arco di 20 minuti.

24. Caricare l'immunoplastra nel lettore di piastre per microtitolazione e misurare l'assorbanza O.D. a 450 nm.

ULTERIORI RACCOMANDAZIONI

1. Non mescolare mai reagenti con numero di lotto differente.
2. Possono essere testati plasma, siero, terreni di coltura, omogenati di tessuto, liquido cefalorachidiano (CSF), urina o qualsiasi liquido biologico se i campioni sono preparati adeguatamente e il livello di peptidi nel campione è sufficientemente elevato per la sensibilità del kit specifico.
3. Livelli elevati di proteine interferenti possono causare variazioni nei risultati del campione. E' pertanto indispensabile selezionare la procedura di preparazione dei campioni adeguata per ottenere risultati ottimali. Si prega di consultare la letteratura in merito alla metodologia specifica.
4. Evitare di toccare il fondo quando si maneggia la piastra. Impronte digitali o macchie possono influire sulla lettura della O.D..
5. Il lavaggio a mano può causare grandi variazioni nel coefficiente dei duplicati. Per ridurre questo fattore, rimuovere il liquido dalla piastra ribaltando e tamponando la piastra su di un materiale assorbente.
6. Ogni volta che viene utilizzato un nuovo puntale, assicurarsi che questo sia fissato correttamente e privo di bolle d'aria. Per una miglior variazione intra-saggio, aspirare ed espellere più volte un reagente o un campione dal suo contenitore per inumidire le pareti della pipetta prima di caricarla.
7. Evitare di immergere l'intera punta della pipetta nei reagenti e nei campioni. All'apice della punta possono accumularsi goccioline che possono causare un caricamento eccessivo di soluzione nel pozzetto e influenzare i risultati del saggio.
8. Se questa procedura viene effettuata al di fuori della temperatura ambiente consigliata (20-23°C), i risultati del saggio possono subire alterazioni.
9. Eventuali modifiche al protocollo esistente (p.es. diluizioni standard, tecnica di pipettaggio, tecnica di lavaggio, tempi o temperatura di incubazione, condizioni di conservazione e scadenza del kit) possono influenzare la sensibilità, la specificità e i risultati del saggio.

1. Riportare sull'asse X (scala logaritmica) la concentrazione degli standard da #5 a #1 (da 0,1 a 1000 ng/ml).
2. Riportare sull'asse Y (scala lineare) l'assorbanza (O.D.) a 450 nm.
3. Inserire l'O.D. per ogni concentrazione peptidica standard direttamente sulla sua coordinata dell'asse X.
4. Die OD für jede Standard-Peptidkonzentration direkt über der zugehörigen X-Achsen-Koordinate eintragen.
5. Disegnare la curva di regressione (best fit) congiungendo questi punti. Essa dovrebbe mostrare una relazione inversa tra la concentrazione del peptide e l'assorbanza. All'aumento della concentrazione di peptide standard, il colore giallo diminuisce, riducendo così l'assorbanza (O.D.)

Nota: si consiglia fortemente l'utilizzo di un software di curve fitting per una curva logistica a 4 parametri o con funzione log-logit.

6. Per determinare la concentrazione di peptide in un campione sconosciuto, collocare inizialmente la sua assorbanza (O.D.) sull'asse Y. Disegnare nel grafico una linea orizzontale da quella assorbanza all'intersezione con la curva standard. La coordinata dell'asse X in questo punto di intersezione corrisponderà alla concentrazione di peptide (ng/ml) nel campione analizzato.

Nota: moltiplicare la concentrazione di peptide misurata per uno qualsiasi dei fattori di diluizione utilizzati nella preparazione del campione originale.

7. Fare riferimento ai valori accettabili per i controlli positivi presenti nella scheda di controllo qualità. Se i valori di controllo positivi non sono compresi nell'intervallo specificato nella scheda di controllo qualità, il saggio non è valido.

METODO PROPOSTO PER L'ESTRAZIONE DEI PEPTIDI

Nota: l'estrazione dei peptidi è consigliata per la maggior parte dei campioni. Questo permetterà di eliminare le molecole interferenti presenti nei liquidi biologici e permetterà la diluizione o la concentrazione dei campioni.

Prelievo generale del sangue e raccolta del plasma:

1. Raccogliere i campioni ematici in provette vacutainer con tappo lilla (n. catalogo VT-6450) con EDTA e in grado di contenere fino a 7 ml di sangue.
2. Agitare delicatamente le provette vacutainer più volte subito dopo aver raccolto il sangue per prevenire la coagulazione.
3. Trasferire il sangue nelle provette da centrifuga contenenti aprotinina (n. catalogo RK-APRO) e agitarle nuovamente più volte con delicatezza per inibire l'attività delle proteasi.

Nota: si consiglia di utilizzare 0,6 TIU, o 100 µl, di aprotinina per 1 ml di sangue raccolto. Se le provette vacutainer con tappo lilla sono a prova di centrifuga, l'aprotinina può essere aggiunta direttamente in esse.

4. Centrifugare il sangue a 1.600 x g per 15 minuti a 4°C e raccogliere il plasma.

Nota: il plasma può essere conservato a -70°C e resterà stabile per un massimo di un mese.

5. Per l'estrazione dei peptidi dal campione, acidificare il plasma con un pari quantitativo di tampone A (n. catalogo RK-BA-1). Mescolare e centrifugare da 6.000 a 17.000 x g per 20 minuti a 4°C. Questo sarà caricato nella SEP-COLUMN C-18.

Nota: si consiglia almeno 1 ml di plasma per l'estrazione dei peptidi. E' possibile effettuare l'estrazione utilizzando volumi più piccoli se si adeguano opportunamente i volumi di tampone ricostituente ed eluente.

Preparazione generale del tessuto:

1. Far bollire il tessuto in 75% di AcOH (acido acetico) per 20 minuti a 100°C.
2. Omogeneizzare il tessuto nel tampone di lisi, in genere con un basso pH.
3. Centrifugare l'omogenato di tessuto a 12.000 rpm per 20 o 30 minuti a 4°C.
4. Per estrarre i peptidi dal campione, prelevare 1 ml di supernatante e aggiungere 1 ml di tampone A (n. catalogo RK-BA-1) per acidificare il campione. Centrifugare da 6.000 fino a 17.000 x g per 20 minuti e raccogliere il supernatante. Questo sarà caricato nella C-18 SEP-COLUMN. La centrifugazione su ghiaccio consente di inibire le peptidasi.

Nota: se è necessario effettuare un saggio delle proteine separato, identificare e rimuovere un'aliquota prima di aggiungere il tampone A. Questo tampone contiene materiali che possono interferire con l'analisi delle proteine.

Estrazione dei peptidi dal campione:

1. Equilibrare una SEP-COLUMN contenente 200 mg di C18 (n. catalogo RK-SEPCOL-1). Lavare una volta con 1 ml di tampone B (n. catalogo RK-BB-1) e in seguito tre (3) volte con 3 ml di tampone A.
2. Caricare la soluzione campione acidificata (plasma, siero, tessuto, ecc.) nella SEP-COLUMN C-18 pre-equilibrata.
3. Lavare lentamente la colonna due volte con 3 ml di tampone A e gettare il liquido di lavaggio.
4. Eluire una volta il peptide lentamente con 3 ml di tampone B e raccogliere l'eluente in una provetta di polistirene.

Nota: garantire un flusso continuo di tutte le soluzioni durante la procedura di estrazione. Per un trattamento e un recupero ottimali dei campioni evitare che entrino bolle d'aria nella matrice C-18.

5. Far evaporare l'eluente fino a farlo essiccare in un concentratore centrifugo o con un metodo sostitutivo adeguato.

Nota: i risultati migliori si ottengono combinando un concentratore centrifugo (ad es. Speedvac) e un liofilizzatore (crio-essiccamento). Utilizzare prima un concentratore centrifugo per circa 15 minuti per essiccare il campione rimuovendo lo strato organico. Effettuare poi il congelamento rapido (snap-freezing) del campione restante, seguito dal crio-essiccamento durante la notte mediante un liofilizzatore. Se non è disponibile un concentratore centrifugo, effettuare il crio-essiccamento nelle ore notturne utilizzando il liofilizzatore. Ciò sarà sufficiente.

6. Mantenere l'estratto secco a -20°C ed effettuare il saggio il prima possibile. Utilizzare il tampone di dosaggio 1x per ricostituire l'estratto secco nella concentrazione desiderata. Se il valore del peptide non rientra nel range di identificazione, diluire o concentrare opportunamente il campione.

Nota: per esempio, se 1 ml di plasma è stato estratto, essiccato e poi ricostituito in 250 μl di tampone di dosaggio 1x, il campione originale avrà ora una concentrazione 4x.

BIBLIOGRAFIA

1. Porstmann, T. and Kiessig, S.T., Enzyme Immunoassay Techniques, An Overview, *Journal of Immunological Methods*, 150: 5-21 (1992).
2. Avrameas, S., Amplification Systems in Immunoenzymatic Techniques, *Journal of Immunological Methods*, 150: 23-32 (1992).
3. Hofbauer KH, Jensen BL, Kurtz A, Sandner P. Tissue hypoxxygenation activates the adrenomedullin system in vivo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000 Feb;278(2):R513-9.

SCHEMA DEL SAGGIO

A	B	C	D	E	F	G	H	
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								



USA

Phoenix Pharmaceuticals, Inc.

330 Beach Rd.
Burlingame, California 94010
Tel: 650-558-8898, 1-800-988-1205
Fax: 650-558-1686
info@phoenixpeptide.com
www.phoenixpeptide.com



Europe

Phoenix Europe GmbH

Viktoriastrasse 3-5
D-76133 Karlsruhe, Germany
Tel: +49 (721) 12 08 150
Fax: +49 (721) 12 08 15 15
europe@phoenixpeptide.eu