

Arbeitsanleitung / Manual

Bone Sialoprotein (BSP) ELISA Kit

Zur in vitro Bestimmung von unterglykosyliertem Bone Sialoprotein in Serum

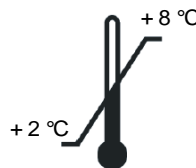
For the in vitro determination of underglycosylated bone sialoprotein in serum

Nur zu wissenschaftlichen Zwecken/ For research use only

Gültig ab 25.08.2009



K 4222



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com

| Inhaltsverzeichnis | Seite/Page |
|-----------------------------------------------------|------------|
| 1. VERWENDUNGSZWECK | 2 |
| 2. EINLEITUNG | 2 |
| 3. TESTPRINZIP | 2 |
| 4. INHALT DER TESTPACKUNG | 3 |
| 5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL | 3 |
| 6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN | 4 |
| 7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN | 4 |
| 8. PROBENVORBEREITUNG | 5 |
| 9. TESTDURCHFÜHRUNG | 5 |
| HINWEISE | 5 |
| PIPETTIERSCHEMA | 6 |
| 10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE | 7 |
| 11. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST | 7 |

| Table of content | Page |
|---------------------------------------------------------|-----------|
| 1. INTENDED USE | 9 |
| 2. INTRODUCTION | 9 |
| 3. PRINCIPLE OF THE TEST | 9 |
| 4. MATERIAL SUPPLIED | 10 |
| 5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED | 10 |
| 6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS | 11 |
| 7. PRECAUTIONS | 11 |
| 8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION | 12 |
| 9. ASSAY PROCEDURE | 12 |
| PROCEDURAL NOTES | 12 |
| TEST PROCEDURE | 13 |
| 10. RESULTS | 14 |
| 14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE | 14 |

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von **unterglykosyliertem Bone Sialoprotein** in Serum geeignet. Nur zu wissenschaftlichen Zwecken.

2. EINLEITUNG

Bone Sialoprotein ist ein phosphoryliertes Glykoprotein welches 12 % der nichtkollagenen Proteinen 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 skeletassozierten Zelltypen synthetisiert wie Fibroblasten, hypertrophen Chondrozyten, Osteoblasten, Osteoklasten sowie Trophoblasten.

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. TESTPRINZIP

Dieser **Bone Sialoprotein** sandwich ELISA dient zur quantitativen Erfassung von **unterglykosyliertem Bone Sialoprotein** aus Serum.

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 Peroxidase-markierten Sekundärantikörper und der entsprechenden Substratumsetzung. Es wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

| Art. Nr. | Abkürzung | Kit Komponenten | Menge |
|-----------|-----------|-----------------------------------------------------|---------------------|
| K 4222MTP | MTP | Mikrotitermodul, vorbeschichtet | 12 x 8 Vertiefungen |
| K 4222WP | WASHBUF | ELISA Waschpufferkonzentrat 10x | 100 ml |
| K 4222PV | SAMPLEBUF | Probenverdünnungspuffer | 15 ml |
| K 4222K | CONJ | Konjugat (Maus-anti-BSP, Peroxidase-markiert) | 200 µl |
| K 4222ST | STD | Standards | 2 x 6 vials |
| K 4222KO | CTRL | Kontrolle, lyophilisiert | 2 x 1 vial |
| K 4222TMB | SUB | TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig | 15 ml |
| K 4222AC | STOP | ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig | 15 ml |

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

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

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Den **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnen (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Der **WASHBUF** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die lyophilisierten **STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrolle) sind bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die **STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrolle) werden mit **500 µl aqua bidest.** rekonstituiert. Um eine vollständige Lösung der rekonstituierten Standards zu gewährleisten, müssen sie mindestens 10 Minuten bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Mischen stehen bleiben. Die **rekonstituierten Standards und Kontrolle** können bei **-20°C** drei **Wochen** gelagert werden.
- Das **CONJ** (Konjugat) wird **1:100 in Waschpuffer** verdünnt.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- 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 Thimerosal. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

Serum

Serumproben werden **1:10 in SAMPLEBUF** (Probenverdünnungspuffer) verdünnt (z.B. 30 µl Probe + 270 µl SAMPLEBUF) und in den Test eingesetzt. Das Probenmaterial bis zur Verwendung bei –20 °C lagern.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen während den Inkubationen mit Folie abdecken.
- Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien vermeiden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

Pipettierschema

Die PLATE (vorbeschichtete Mikrotiterplatte) vor Gebrauch **5x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.

Die Bestimmungen sind in der PLATE (Mikrotiterplatte) in Doppelwerten durchzuführen.

1. **100 µl STD** (Standards), **CTRL** (Kontrolle) oder **Proben** in Doppelbestimmungen in die Vertiefungen pipettieren
2. **3 Stunden** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren
3. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen
4. **100 µl CONJ** (Konjugat) pro Vertiefung pipettieren
5. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren
6. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen
7. **100 µl SUB** (Substrat) pro Vertiefung pipettieren
8. **5-15 Minuten** (entsprechend der Farbentwicklung) bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
9. **50 µl STOP** (Stopplösung) pro Vertiefung pipettieren
10. Extinktion **sofort** im Mikrotiterplattenphotometer bei **450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Sollte die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigen, sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) messen

10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Zur Auswertung des Testes empfehlen wir die 4-Parameter-Funktion. Alternativ kann auch eine Punkt-zu-Punkt-Auswertung oder eine gewichtete Spline-Funktion gewählt werden. Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte diese der Operator durchführen.

11. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu Forschungszwecken verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller - der Immundiagnostik AG zurück zu senden.

Verwendete Symbole:

| | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
|  | Temperaturbegrenzung |  | Bestellnummer |
|  | Nur für Forschungszwecke |  | Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen |
|  | Hersteller |  | Verwendbar bis |
|  | Chargenbezeichnung | | |

Bone Sialoprotein (BSP) ELISA Kit

For the in vitro determination of underglycosylated bone sialoprotein in serum

For research use only

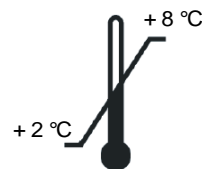
Valid from 25.08.2009



K 4222



96



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com

1. INTENDED USE

The described Assay is intended for the quantitative determination of **underglycosylated Bone Sialoprotein** in serum. It is for research use only.

2. INTRODUCTION

Bone Sialoprotein is a phosphorylated glycoprotein that comprises 12% of the total noncollagenous proteins in bone and is thought to be involved in bone mineralization 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 synthesized 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 metastasize 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. PRINCIPLE OF THE TEST

This sandwich ELISA is designed for the quantitative determination of **underglycosylated Bone Sialoprotein** in serum.

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 absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from the standards. Bone Sialoprotein present in the samples is determined directly from this curve.

4. MATERIAL SUPPLIED

| Cat. No | Label | Kit Components | Quantity |
|-----------|-----------|----------------------------------------------------|--------------|
| K 4222MTP | MTP | Microtiter plate, precoated | 12 x 8 wells |
| K 4222WP | WASHBUF | ELISA wash concentrate, 10 x | 100 ml |
| K 4222PV | SAMPLEBUF | Sample dilution buffer | 15 ml |
| K 4222K | CONJ | Conjugate (Mouse-anti-BSP, Peroxidase-labeled) | 200 µl |
| K 4222ST | STD | Standards | 2 x 6 vials |
| K 4222KO | CTRL | Control, lyophilized | 2 x 1 vial |
| K 4222TMB | SUB | TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use | 15 ml |
| K 4222AC | STOP | ELISA stop solution, ready to use | 15 ml |

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

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

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at 37°C in a water bath before dilution of the buffer solutions. The **WASHBUF** is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month**.
- The lyophilized **STD** (standards) and **CTRL** (control) are stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. The **STD** (standards) and **CTRL** (control) must be reconstituted with **500 µl aqua bidest**. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes at room temperature and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. **Reconstituted standards and controls** can be stored at **-20°C for three weeks**.
- The **CONJ** (conjugate) must be diluted **1: 100** in wash buffer.

7. PRECAUTIONS

- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulphuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum

Serum samples should be diluted **1:10 with SAMPLEBUF** (sample dilution buffer) before use (e.g. 30 µl sample + 270 µl SAMPLEBUF). Store samples at -20 °C until use.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Test procedure

Wash the PLATE (precoated microtiter plate) **5 x with 250 µl** of diluted wash buffer before use. After the final washing step, empty all liquid from the wells and firmly tap the plate upside down on adsorbent paper to remove any remaining wash buffer.

Run all standards and samples **in duplicate**.

1. Add **100 µl** of **STD** (standards), **CTRL** (control) or **samples** into each well in duplicate
2. Incubate for **3 hours** at room temperature shaking on a horizontal mixer
3. Aspirate and wash the wells **5 x with 250 µl** of diluted wash buffer. After the final washing step, empty all liquid from the wells and firmly tap the plate upside down on adsorbent paper to remove any remaining wash buffer
4. Add **100 µl** of **CONJ** (conjugate) into each well
5. Incubate for **1 hour** at room temperature shaking on a horizontal mixer
6. Aspirate and wash the wells **5 x with 250 µl** of diluted wash buffer. After the final washing step, empty all liquid from the wells and firmly tap the plate upside down on adsorbent paper to remove any remaining wash buffer
7. Add **100 µl** of **SUB** (substrate solution)
8. Incubate for **5-15 minutes** at room temperature in the dark
9. Add **50 µl** of **STOP** (stop solution)
10. 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

10. RESULTS

We recommend the use of the "4-Parameter-algorithm" for test evaluation. Alternatively, point-to-point-calculation or spline-function can be used.

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- All reagents in the kit package are for research use only.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

8/25/2009 14112003_Bone Sialoprotein .doc

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number