

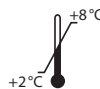
Thymosin α 1 ELISA

*Zur in-vitro-Bestimmung von Thymosin α 1
in Serum und Thymusextrakt*

*For the in vitro determination of thymosin α 1
in serum and thymus extract*

Gültig ab / Valid from 2020-11-19

REF KR9510



RUO



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	2
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	3
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	4
7. TESTDURCHFÜHRUNG	4
<i>Testprinzip</i>	4
<i>Pipettierschema</i>	5
8. ERGEBNISSE	6
9. EINSCHRÄNKUNGEN	7
10. QUALITÄTSKONTROLLE	7
<i>Referenzwerte</i>	7
11. VORSICHTSMASSNAHMEN	8
12. TECHNISCHE MERKMALE	8
13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	9
14. LITERATUR	9

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von Thymosin α 1 aus Serum und Thymusextrakt geeignet. Nur für wissenschaftliche Forschung. Nicht für diagnostische Zwecke.

2. EINLEITUNG

Thymosin α 1 war das erste Einzelpeptid, das aus der Thymusfraktion 5 isoliert wurde. Es wirkt auf die T-Helfer- und NK-Zellen. Außerhalb des Immunsystems sind Einflüsse auf Hypothalamus-regulatorische Hormone beschrieben (1). Das Thymosin α 1 hat sich in tierexperimentell induzierten Tumormodellen bei Lebermetastasen nach Kolonkarzinom (2) oder Leukämien (3) bewährt. In humanen Modellen u.a bei Kolonkarzinom (4) wird es als Prognosefaktor diskutiert. Thymosin α 1 wird ferner bei Bronchialkarzinom im Rahmen einer kombinierten Chemotherapie erfolgreich eingesetzt (5).

Mögliche Forschungsgebiete

- Immunstörungen
- Kontrolle des Immunstatus in Verbindung mit einer Chemotherapie
- Störungen des Endokriniums
- Qualitätskontrolle von Thymuspräparaten

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KR9510	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
KR0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10 x	1 x 100 ml
KR9510	CONJ	Konjugat (Ziege-anti-Kaninchen, peroxidase markiert), gebrauchsfertig	1 x 22 ml
KR9510	STD	Standardkonzentrat, lyophilisiert (Konzentration der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
KR9510	AB	Antikörper (Kaninchen anti-Thymosin- α 1), gebrauchsfertig	3 x 3,5 ml
KR9510	STDBUF	Standardverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 50 ml

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KR0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	2 x 15 ml
KR0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

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

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 μ l
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln $> 0,2 \mu\text{m}$) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von $0,055 \mu\text{S/cm}$ bei 25°C ($\geq 18,2 \text{M}\Omega \text{cm}$).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 3 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 μ l** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Das **WASHBUF** kann

bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

- Der **Antikörper** (AB) ist gebrauchsfertig. Er kann bis zu 4 Wochen bei 2–8 °C gelagert werden. Zur Langzeitlagerung muss der Antikörper bei **–20 °C** eingefroren werden.
- **Das lyophilisierte Standardkonzentrat** (STD) ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die **Rekonstitutionsvorgaben, Herstellung der Standardkurve sowie die Konzentrationen und Bereiche** sind dem **Spezifikationsdatenblatt** zu entnehmen. **Die Standards S1–S5 sind nicht stabil und können nicht gelagert werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Serum

Serumproben werden **unverdünnt** eingesetzt. Das Probenmaterial bis zur Verwendung bei **–20 °C** lagern.

Thymusextrakte

Thymusextrakte sind in der Zusammensetzung unterschiedlich. Bei Verwendung von Thymusextraktmaterial bitten wir, mit dem Hersteller in Kontakt zu treten.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von Thymosin α 1 (Ta1).

Es werden polyklonale Kaninchenantikörper gegen synthetisches Ta1 eingesetzt. Das Testprinzip beruht auf einer Kompetitionsreaktion zwischen dem freien Antigen der Probe und dem immobilisierten Antigen auf der Mikrotiterplatte. Die Detektion erfolgt über einen peroxidasemarkierten Sekundärantikörper. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem Ta1-Gehalt umgekehrt proportional. Anhand einer mitgeführten

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

Pipettierschema

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

Markieren Sie die Positionen für Standards und Proben im Protokollblatt.

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

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

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

Vorinkubation

1.	Je 400 μl Standard (S1–S6) bzw. Probenmaterial in ein Eppendorfprobengefäß vorlegen.
2.	Anschließend 200 μl Antikörper (AB) in jedes Eppendorfprobengefäß pipettieren.
3.	18 Stunden bei 2–8 °C unter Schütteln* inkubieren.

Die angegebenen Volumina sind für Bestimmungen in Doppelwerten ausgelegt.

Inkubation auf der Mikrotiterplatte (PLATE)

4.	Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen 5x mit je 250 μl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Resten von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	200 μl des Vorinkubationsansatzes in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 90 min bei 2–8 °C im Dunkeln unter Schütteln* inkubieren.

7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 μl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	200 μl Konjugat (CONJ) in alle Vertiefungen pipettieren.
9.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln* inkubieren.
10.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 μl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
11.	200 μl Substrat (SUB) in alle Vertiefungen pipettieren.
12.	10–20 min** bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
13.	50 μl Stopplösung (STOP) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen.
14.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

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

** Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen, den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion:

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z.B. 0,001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

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

3. Gewichtete Spline-Funktion

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

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Thymusextrakt

Die ermittelte Konzentration wird mit dem gewählten Verdünnungsfaktor multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu erhalten.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

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

10. QUALITÄTSKONTROLLE

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

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

Referenzwerte

Die Referenzwerte bei gesunden Menschen sind stark altersabhängig, die höchsten Werte zeigen sich bei Neugeborenen; ab dem 20. Lebensjahr sinken die Serumwerte ab. Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzwertbereich für verschiedene Altersgruppen zu etablieren.

11. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur wissenschaftlichen Forschung verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

12. TECHNISCHE MERKMALE

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












13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

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

14. LITERATUR

1. Melatonin is responsible for the nocturnal increase observed in serum and thymus of thymosin α 1 and thymulin concentrations: observation in rats and humans. Molinero P et al. (2000) *J Neuroimmunol* 103:180-188
2. Effect of Thymosin α 1 on Hypothalamic Hormone Release. Milenkovic et al. (1992): *Neuroendocrinol* 56: 674-679
3. Anti-Tumor Effect of Combined Treatment with Thymosin α 1 and Interleukin-2 after 5-Fluorouracil in Liver Metastases from Colorectal Cancer in Rats. Rasi et al. (1994) *Int J Cancer* 57:701-705
4. Antitumor Effect of Thymosin α 1/Interleukin-2 or Thymosin α 1/Interferon α , β Following Cyclophosphamide in Mice Injected with Highly Metastatic Friend Erythroleukemia Cells. Garaci et al. (1993) *J Immunotherapy* 13:7-17
5. Determination of Thymosin α 1 with enzyme-immunoassay in colorectal cancer patients. Jevromovic et al. (1997) *Archive of Oncology* 5:193
6. A randomized trial to evaluate the immunorestorative propertise of synthetic Thymosin α 1 in patients with lung cancer. Schulof et al. (1985) *J Biol resp Med* 4:147-158

Verwendete Symbole:

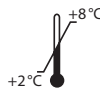
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	Nur für Forschungszwecke		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		

Thymosin α 1 ELISA

*For the in vitro determination of thymosin α 1
in serum and thymus extract*

Valid from 2020-11-19

REF KR9510



RUO



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	13
2. INTRODUCTION	13
3. MATERIAL SUPPLIED	13
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	14
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	14
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	15
7. ASSAY PROCEDURE	15
<i>Principle of the test</i>	15
<i>Test procedure</i>	15
8. RESULTS	17
9. LIMITATIONS	17
10. QUALITY CONTROL	17
<i>Reference range</i>	18
11. PRECAUTIONS	18
12. TECHNICAL HINTS	18
13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	19
14. REFERENCES	19

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of thymosin α 1 in serum and thymus extract. For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

2. INTRODUCTION

Thymosin α 1 was the first single peptide isolated from thymus fraction 5. It acts on T-helper and NK-cells. Thymosin α 1 has been reported for exert effects on hormon regulating the hypothalamus (1). Thymosin α 1 has been demonstrated to have beneficial effects in animal models of liver and colon carcinoma (2) or leukaemia (3). Its use as a prognostic factor in human studies, e.g. colon carcinoma (4) has been discussed. Thymosin α 1 has been successfully used as component combined chemotherapy in bronchial carcinoma (5).

Possible research areas

- Disorder of immune system
- Control of immune status in association with a chemotherapy
- Disorder of endocrinium
- Quality control of thymus extracts

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KR9510	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
KR0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml
KR9510	CONJ	Conjugate (goat anti rabbit, peroxidase-labelled), ready-to-use	1 x 22 ml
KR9510	STD	Standard concentrate, lyophilised (see specification for concentration)	4 x 1 vial
KR9510	AB	Antibody (rabbit anti thymosin α 1), ready-to-use	3 x 3.5 ml
KR9510	STDBUF	Standard dilution buffer, ready-to-use	1 x 50 ml
KR0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	2 x 15 ml
KR0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

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

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 μ l single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 *g*
- Vortex
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure water (water type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 μ m) with an electrical conductivity of 0.055 μ S/cm at 25 °C (\geq 18.2 M Ω cm).

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 3 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 μ l** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for 1 month**.
- The **antibody (AB)** is ready to use. It can be stored at 2–8 °C up to 4 weeks. Long time storage until the expiry date given on the label has to be at **-20 °C**.
- The **lyophilised standard concentrate (STD)** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Reconstitution details, preparation of the standard curve** as well as **concentrations and ranges** are given in the **specification data sheet**. **Standards S1–S5 are not stable and cannot be stored.**
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2–8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Serum

Serum can be used **without dilution**. Store samples at -20°C .

Thymusextract

Thymus extracts have varying compositions. Please contact the supplier when using thymus extracts.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of thymosin α 1 (Ta1).

In this test, polyclonal rabbit antibodies directed against synthetic Ta1 are used. The test principle is based on a competition between antigen in the sample or standards and the antigen coated on the wells of microplate. A peroxidase-conjugated 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 standard. Ta1, present in the samples, is determined directly from this curve.

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** ($15\text{--}30^{\circ}\text{C}$) and mix well.

Mark the positions of standards and samples on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips as needed from the kit. Store unused strips together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging at $2\text{--}8^{\circ}\text{C}$. Strips are stable until the expiry date stated on the label.

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

We recommend to carry out the tests in duplicate.

Preincubation

1.	Pipet each 400 μl standard (S1–S6) or sample into a test tube.
2.	Add 200 μl antibody (AB) into each test tube.

- | | |
|----|--|
| 3. | Incubate for 18 hours at 2–8 °C on a horizontal shaker* . |
|----|--|

The given volumes are for tests in duplicate.

Incubation on the microtiter plate (PLATE)

4.	Wash each well 5 times with 250 μl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add 200 μl of the preincubated mixture into the respective wells.
6.	Cover the strips and incubate for 90 min at 2–8 °C in the dark on a horizontal shaker* .
7.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 μl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
8.	Add 200 μl conjugate (CONJ) in each well.
9.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker* .
10.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 μl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
11.	Add 200 μl substrate (SUB) in each well.
12.	Incubate for 10–20 minutes** at room temperature (15–30 °C) in the dark .
13.	Add 50 μl stop solution (STOP) and mix well.
14.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.

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

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

8. RESULTS

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

1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero standard must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

2. Point-to-point calculation

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

3. Spline algorithm

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

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

Thymus extract

The obtained results have to be multiplied with the selected dilution factor to get the actual concentrations.

9. LIMITATIONS

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

10. QUALITY CONTROL

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

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

Reference range

The values in healthy people are strongly age-dependent. Newborns show the highest values, and from the age of 20 onwards the serum values are falling. We recommend each laboratory to establish its own reference range for different age ranges.

11. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for research use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still should be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

12. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.












13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- The guidelines for laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

14. REFERENCES

1. Melatonin is responsible for the nocturnal increase observed in serum and thymus of thymosin alpha1 and thymulin concentrations: observation in rats and humans. Molinero P et al. (2000) *J Neuroimmunol* 103:180-188
2. Effect of Thymosin α 1 on Hypothalamic Hormone Release. Milenkovic et al. (1992): *Neuroendocrinol* 56: 674-679
3. Anti-Tumor Effect of Combined Treatment with Thymosin alpha 1 and Interleukin-2 after 5-Fluorouracil in Liver Metastases from Colorectal Cancer in Rats. Rasi et al. (1994) *Int J Cancer* 57:701-705
4. Antitumor Effect of Thymosin α 1/Interleukin-2 or Thymosin α 1/Interferon α , β Following Cyclophosphamide in Mice Injected with Highly Metastatic Friend Erythroleukemia Cells. Garaci et al. (1993) *J Immunotherapy* 13:7-17
5. Determination of Thymosin α 1 with enzyme-immunoassay in colorectal cancer patients. Jevromovic et al. (1997) *Archive of Oncology* 5:193
6. A randomized trial to evaluate the immunorestorative propertise of synthetic Thymosin α 1 in patients with lung cancer. Schulof et al. (1985) *J Biol resp Med* 4:147-158

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	For research use only		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		