



Distribuito in ITALIA da
Li StarFish S.r.l.

Via Cavour, 35
20063 Cernusco S/N (MI)
telefono 02-92150794
fax 02-92157285
info@listarfish.it
www.listarfish.it



M30 Apoptosense® ELISA

REF 10011

Instructions for Use

Bruksanvisning

Gebrauchsanweisung

Mode d'emploi

Istruzioni per l'uso

Instrucciones de uso

Instruções de utilização

In USA, Canada and Japan

**For research and laboratory use only.
Not for human or diagnostic use.**

M30 Apoptosense® ELISA

Instructions for Use	English:	page 5 – 15
Bruksanvisning	Svenska:	sida 17 – 27
Gebrauchsanweisung	Deutsch:	Seite 29 – 39
Mode d'emploi	Français:	pages 41 – 51
Istruzioni per l'uso	Italiano:	pagina 53 – 63
Instrucciones de uso	Español:	página 65 – 75
Instruções de utilização	Português	páginas 77 – 87

En

Sv

De

Fr

It

Es

Pt

Instructions for Use of the M30 Apoptosense® ELISA

Contents

Explanation of Symbols Used on Labels	6
Trademarks	6
Patents	6
Shipping and Storage	6
Assay Description	7
Intended Purpose	7
Summary and Explanation of the Test	7
Principle of the Method	7
Materials Provided for 96 Determinations	8
Materials Required but not Provided	9
Assay Protocol	9
Warnings and Precautions	9
Collection and Preparation of Blood Samples	9
Collection and Preparation of <i>in vitro</i> Samples for Research Use Only	10
Component Preparation	11
Storage and Shelf Life After First Opening	11
Assay Procedure	12
Flow Chart	13
Calculation of Analytical Results	13
Assay Performance	14
Performance Characteristics	14
Traceability of Standard	14
Internal Quality Control	14
Limitations of the Method	15
Literature References	15
Warranty	15

Explanation of Symbols Used on Labels



Catalogue number



Contains sufficient for <n> tests



Batch code



Manufacturer



Temperature limitation



Use by



Consult Instructions for Use

Trademarks

M30[®], Apoptosense[®], M65[®], EpiDeath[®] and PEVIVA[®] are registered trademarks of VLVbio (Vivalavida AB).

Patents

European patent number EP 1 019 438.

U.S. patents number 6,296,850 and 6,716,968 and 6,706,488.

Canadian patent number 2305681.

Japanese patent number 4372340.

Shipping and Storage

The M30 Apoptosense[®] ELISA is shipped in cooled conditions and should be stored at 2–8 °C. *Note!* Do not freeze!

Assay Description

Intended Purpose

The M30 Apoptosense® ELISA is a one-step *in vitro* immunoassay for the quantitative determination of the apoptosis-associated caspase-cleaved keratin 18 (ccK18, K18Asp396 or M30 neo-epitope) in serum and plasma.

Summary and Explanation of the Test

Caspases cleave various cellular proteins during apoptosis. In epithelial cells, one of those substrates is the intermediate filament protein keratin 18 (K18). The M30 antibody recognises a neo-epitope exposed after caspase cleavage of K18 after the aspartic acid residue 396 (ref. 1). Cleavage at this position occurs early during apoptosis by caspase 9 and during the execution phase by caspase 3 and caspase 7 (ref. 2).

The M30 Apoptosense ELISA measures the levels of soluble caspase-cleaved K18 (ccK18) fragments containing the K18Asp396 neo-epitope. After induction of apoptosis of epithelial cells, ccK18 increases are first observed in cell extracts. Release of antigen into the extracellular compartment occurs later and is due to secondary necrosis of apoptotic bodies. The ccK18 increase during apoptosis is inhibited by the caspase-inhibitor zVAD-fmk (ref. 3).

The M30 Apoptosense ELISA can be used in combination with the M65® ELISA (PEVIVA Prod. No. 10020) which measures total K18. Combining the two assays is useful for assessment of cell death mode (ref. 4).

The M30 Apoptosense ELISA detects human caspase-cleaved K18, but does not detect caspase-cleaved mouse, rat or canine K18 (ref. 5). The M30 Apoptosense ELISA will specifically detect tumour apoptosis in mice or rats carrying human tumour xenografts (ref. 5).

M30 Apoptosense ELISA is intended for use in research, clinical diagnostics and clinical trials in the fields of oncology, hepatology and transplantation.

Principle of the Method

The M30 Apoptosense ELISA is a solid-phase sandwich enzyme immunoassay. Standards, controls and samples react with a solid phase capture antibody M5 directed against K18 and the HRP-(horseradish peroxidase) conjugated M30 antibody directed against the K18Asp396 neo-epitope. Unbound conjugate is removed by a washing step. TMB Substrate is added. The colour development is stopped and the absorbance is read. The resulting colour is directly proportional to the concentration of the analyte.

By plotting a standard curve from known concentrations versus measured absorbance, the amount of antigen in the sample can be calculated. The concentration of the antigen is expressed as units per litre (U/L).

Materials Provided for 96 Determinations

M5 Coated Microstrips: One microplate, 12 strips with 8 wells each, 96 dry wells in total. The wells are coated with mouse monoclonal K18 antibody M5. The microplate is sealed in an aluminium bag, which contains a desiccating device. If not all the strips are used, reseal the bag and keep the desiccating device inside.
Ready for use!

M30 Conjugate: Concentrate (24 × conc). One vial containing 0.4 mL of mouse monoclonal M30 antibody (anti-K18Asp396 neo-epitope) conjugated with horseradish peroxidase (HRP) in phosphate buffer with protein stabilizers. Preservative added. Should be diluted with M30 Conjugate Dilution Buffer.
Note! Do not expose to light!

M30 Conjugate Dilution Buffer: One vial containing 11 mL of phosphate buffer with protein stabilizers for dilution of the M30 Conjugate. Preservative added. Blue coloured.

M30 Standard A – G: Standard A containing 2 mL of phosphate buffer with foetal calf serum (FCS). Standard B–G, 0.5 mL each, containing standard material in phosphate buffer with FCS. The values of Standard A – G are 0, 75, 150, 250, 500, 750 and 1 000 U/L, respectively. Preservative added. Yellow coloured. *Ready for use!* Standard A can be used for dilutions of samples > 1 000 U/L.

M30 Control Low & High: Two vials containing 0.5 mL of reactive components in phosphate buffer with FCS. The values of M30 Control Low and M30 Control High are stated on the respective vials. Preservative added. Yellow coloured.
Ready for use!

Wash Tablet: One tablet for 500 mL of prepared wash solution. Dissolve the Wash Tablet in 500 mL of fresh deionised water.

TMB Substrate: One bottle containing 22 mL of TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) Solution. *Note!* Do not expose to light! *Ready for use!*

Stop Solution: One vial containing 7 mL of 1.0 M sulphuric acid. *Ready for use!*

Sealing Tape: One (1) sheet.

Instructions for Use.

Certificate of Analysis.

Materials Required but not Provided

- Microplate reader (wavelength: 450 nm; linear 0–3 OD)
- Microplate shaker (oscillation: 600 rpm, orbit: 1.5–4 mm)
- 96-well microtiter plate washer or multichannel pipette (volume 250 µL)
- Vortex mixer
- Precision pipettes: 25, 50, 75 and 200 µL
- Cylinder (500 mL)
- Deionised water

Assay Protocol

Warnings and Precautions

1. M30 Apoptosense ELISA kit is intended for *in vitro* use only.
2. Do not mix reagents from different kit lots.
3. All patient specimens should be regarded as contagious and handled and disposed of according to appropriate regulations.
4. Do not use samples that are contaminated.
5. The Stop Solution contains 1.0 M sulphuric acid, which will cause irritation of the skin and is harmful to the eyes. In case of contact, flush with plenty of water and seek medical advice.
6. Material Safety Data Sheets (MSDS) are available on www.peviva.com or by request.

Collection and Preparation of Blood Samples

The sample volume should be sufficient for measuring each sample in duplicate (test volume $2 \times 25 \mu\text{L}$). Donors do not need to be fasting prior to blood collection.

Serum: Collect blood by venipuncture, avoiding haemolysis, into plain tubes (without anti-coagulant), allow blood to clot and collect serum after centrifugation.

Plasma: The M30 Apoptosense ELISA can also be used for plasma samples (EDTA or heparin).

Note! The same type of material, i.e. serum or plasma collected by one method, should be used for a specific project. For further information on the performance of the M30 Apoptosense ELISA using different types of samples, please consult www.peviva.com.

Store samples at 2–8 °C up to 4 hours. For longer periods, store samples frozen at -20 °C or lower. Samples can be freeze-thawed without loss of activity (ref. 6, 7), but it is recommended that repeated freeze-thawing should be avoided. For dilution of samples see sections “Component Preparation” and “Performance Characteristics”.

Collection and Preparation of *in vitro* Samples for Research Use Only

M30 Apoptosense ELISA has been used for cell-culture applications in a number of published studies (see www.peviva.com for references). Peviva has developed a specific product for *in vitro* cell cultures, *M30 CytoDeath™ ELISA* (PEVIVA Prod. No. 10900). This product has a dynamic range and sensitivity suitable for *in vitro* work.

The following protocols can be used for detection of apoptosis of cultured epithelially derived cells using the M30 Apoptosense ELISA.

Sample preparation from cell cultures

For many applications, it is advantageous to measure total M30 reactivity (cck18) at a single, late time point. Such measurements reflect an integrated assessment of apoptosis. To assay total cck18 fragments in cell culture media and cell extracts, add non-ionic detergent directly to the cells in the tissue culture medium.

Day 1: Seed the cells. The seeding density needs to be determined for the specific cell type and the type of cytotoxic agent; 5 000–10 000 cells per well in a 96-well plate is usually adequate.

Day 2: Wash the cells once with PBS and add fresh medium (200 µL/well). Expose the cells to the desired agent(s).

Day 2–4: For 96-well plates containing 200 µL of medium per well, add 10 µL of 10% NP 40 per well. Allow lysis to occur on a rotatory shaker for 5 minutes at room temperature. Mix gently by pipetting up and down, careful not to create air bubbles, and transfer 2 × 25 µL of the medium/lysate to the wells of M5 Coated Microstrips.

Sample preparation from cell culture supernatants

The M30 Apoptosense ELISA and M65® ELISA can be used to assess cell death mode by calculation of an M30:M65 ratio (ref. 3). Such measurements should be performed using medium supernatants! The ratio should be calibrated for each carcinoma cell line using appropriate controls, i.e. agents known to induce apoptosis (e.g. genotoxic agents, staurosporine) and/or mainly necrosis (e.g. oligomycin/glucose starvation or hydrogen peroxide).

Day 1/Day 2: Seed the cells, wash and add agents as described above.

Day 2–4: Collect the sample medium from each well. To avoid drying effects, collecting multiple samples from the same well is not recommended. Centrifuge the medium and collect the cell-free supernatant. *Note!* Avoid collecting cells. $2 \times 25 \mu\text{L}$ cell-free supernatant samples are used for each assay.

If the assay is to be performed the same day, the samples can be stored at $2-8^\circ\text{C}$. Samples to be analysed later should be stored at -20°C or lower. Avoid repeated freeze-thawing.

Component Preparation

Dilution of M30 Conjugate

Dilute the M30 Conjugate with M30 Conjugate Dilution Buffer. The M30 Conjugate vial contains exactly 0.4 mL. Add 9.2 mL of the M30 Conjugate Dilution Buffer directly to the M30 Conjugate vial and mix.

Dissolving of Wash Tablet

Dissolve one Wash Tablet in 500 mL of fresh deionised water.

Dilution of Samples

Samples higher than Standard G (1 000 U/L) should be diluted with Standard A or blood donor serum. Since dilution in the assay is linear, the original concentration is calculated by multiplying the measured concentration with the dilution factor. In case blood donor serum/plasma was used as sample diluent, its concentration (U/L) must be accounted for.

Storage and Shelf Life After First Opening

If the entire kit is not used, store reagents in their original containers at $2-8^\circ\text{C}$. If not all strips are used, reseal the microstrips bag. Remember to include the desiccating device.

The TMB Substrate and the M30 Conjugate are sensitive to light and metal ions and should be stored in the original amber bottles at $2-8^\circ\text{C}$ at all times between uses. If a new container is used it has to be protected from light! TMB Substrate cannot be used after exposure to light.

If the kit is used at several occasions, store the diluted M30 Conjugate in the vial at $2-8^\circ\text{C}$. Do not expose to light. The diluted M30 Conjugate solution is stable for 3 weeks.

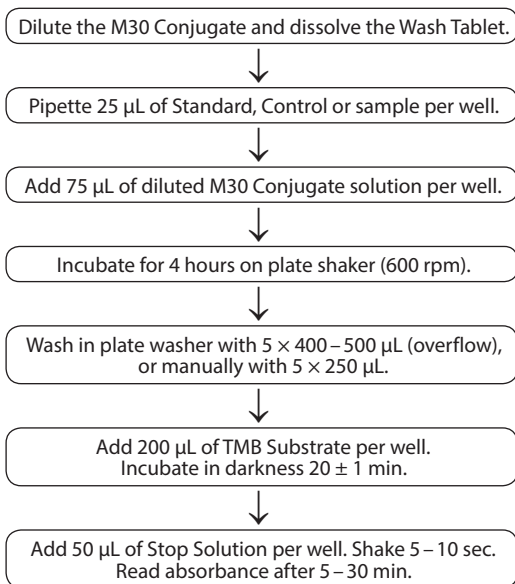
The Wash Tablet solution is stable for 5 weeks when stored at $2-8^\circ\text{C}$.

Assay Procedure

The M30 Apoptosense ELISA should be performed at room temperature (24 ± 3 °C).

1. Allow all reagents to reach room temperature before performing the assay. Vortex all reagents prior to use.
2. Dissolve the Wash Tablet in fresh deionised water (see “Component Preparation”).
3. Dilute the M30 Conjugate with M30 Conjugate Dilution Buffer (see “Component Preparation”) and mix.
4. Pipette 25 μ L of M30 Standard (A–G), M30 Control Low, M30 Control High or sample per well (duplicates are recommended).
5. Add 75 μ L of the diluted M30 Conjugate solution to each well.
Note! Steps 4 and 5 should be performed sequentially without interruption within 20 minutes.
6. Cover the wells with sealing tape or a microtiter plate lid.
7. Incubate on shaker for four (4) hours. Speed setting: 600 rpm.
8. Wash the plate in a plate washer five (5) times with 400–500 μ L/well of Wash Tablet solution (overflow wash)
or
Wash the plate manually, discarding the incubation solution and washing the wells five (5) times with 250 μ L of Wash Tablet solution. Avoid contamination between wells.
9. Add 200 μ L of TMB Substrate to each well. Incubate in darkness at room temperature for 20 ± 1 minutes.
10. Add 50 μ L of Stop Solution to each well. To ensure complete mixing of the TMB Substrate and the Stop Solution, shake the microplate for 5–10 seconds. Leave the microplate for 5 minutes before reading the absorbance.
11. Determine the absorbance at 450 nm in a microplate reader within 30 minutes and record the results.
12. Calculate the results as described in section “Calculation of Analytical Results”.

Flow Chart



Calculation of Analytical Results

The M30 Apoptosense ELISA results are calculated using computer-assisted methods. Evaluate the values of controls and samples using a suitable program for handling ELISA-type data. Fitting algorithm: Cubic Spline. x-axis: concentration (U/L); y-axis: absorbance at 450 nm (A450).

Note! If samples have been diluted, the observed concentration must be multiplied by the dilution factor, and in case blood donor serum/plasma was used as sample diluent, its concentration (U/L) must be accounted for.

Assay Performance

Performance Characteristics

Measuring range: The measuring range is 0–1 000 U/L.

High Dose Effect: No High Dose effect occurs until 195 000 U/L.

Reproducibility: Within assay (WA % CV) variation is $\leq 10\%$, between assay (BA % CV) variation is $\leq 10\%$ and total variation is $\leq 10\%$ for samples over 200 U/L.

Sensitivity: The minimum detectable concentration of K18Asp396 neo-epitope in the M30 Apoptosense ELISA is 20 U/L, defined as the concentration of cck18 that corresponds to the absorbance being two standard deviations from the absorbance of the Standard A (0 U/L).

Lower Limit of Quantification: The lowest concentration at which an analyte in the sample matrix can be measured with acceptable level of accuracy and precision is 40 U/L.

Spiking Recovery: Recovery of high standard when spiked into human blood samples: 109 % (average) and 98–120 % (range).

Linearity/Dilution: Recovery of human sera when diluted in M30 Standard A (0 U/L): 107 % (average) and 99–122 % (range).

Reference range: In serum from 200 Swedish blood donors, the median was 94 U/L and the 95th percentile was 251 U/L. It is recommended that each laboratory establishes its own reference range.

Traceability of Standard

The units measured by the M30 Apoptosense ELISA are defined against native antigen spiked into serum. Native antigen is calibrated against a recombinant protein standard. 1 U/L = 1.24 pM. *Note!* Due to different assay buffers, standard material cannot be exchanged between different Peviva kits.

Internal Quality Control

The supplied M30 Control Low and High with their given concentrations should be sufficient to secure the assay performance and should be used, at least, in duplicate each time the assay is performed.

If this procedure is not sufficient, each laboratory needs to establish its own controls by the guidelines in section "Collection and Preparation of *in vitro* Samples for Research Use Only" or by individual laboratory routine. These controls should be frozen in aliquots and treated in the same way each time the assay is performed.

Limitations of the Method

The clinical utility of cck18 measurement in human blood samples as a prognostic indicator and in the management of patients on therapy regimens has not been fully established.

Grossly lipemic ($\leq 1\,250$ mg/dL), icteric (≤ 12.5 mg/dL) or haemolysed (≤ 50 mg/dL) samples do not interfere in the assay.

Literature References

1. Leers *et al.*, J Pathol. 187, 1999, 567.
2. Schütte *et al.*, Exp Cell Res. 297, 2004, 11.
3. Hägg *et al.*, Invest New Drugs 20, 2002, 253.
4. Kramer *et al.*, Cancer Res 64, 2004, 1751.
5. Olofsson *et al.*, Cancer Biomarkers 5, 2009, 117.
6. Greystoke *et al.*, Ann Oncol 19, 2008, 990.
7. Olofsson *et al.*, Clin Cancer Res 13, 2007, 3198.
8. Ueno *et al.*, Eur J Cancer 39, 2003, 769.

For further references, please consult www.peviva.com/literature.

Warranty

The performance data presented here were obtained using the procedure indicated. Any change or modification in this procedure as recommended by the manufacturer may affect the results. In such event, the manufacturer disclaims all warranties expressed, implied or statutory, including the implied warranty of merchantability and the fitness for use. The manufacturer and its authorized distributors, in such event, shall not be liable for damages indirect or consequential.

Istruzioni per l'uso del kit ELISA M30 Apoptosense®

Indicazione del contenuto

Spiegazione dei simboli utilizzati sulle etichette	54
Marchi	54
Brevetti	54
Trasporto e conservazione	54
Descrizione del test	55
Scopo proposto	55
Sommaro e spiegazione del test	55
Principio del procedimento	55
Reagenti forniti per 96 determinazioni	56
Materiale occorrente non incluso	57
Procedimento del test	57
Precauzioni e avvertenze	57
Prelievo e preparazione dei campioni di sangue	57
Prelievo e preparazione dei campioni <i>in vitro</i> solo per uso ricerca	58
Preparazione del componente	59
Conservazione e durata dopo la prima apertura	59
Procedimento del test	60
Schema del procedimento	61
Calcolo dei risultati analitici	61
Prestazioni del test	62
Caratteristiche delle prestazioni	62
Tracciabilità dello standard	62
Controllo di qualità interno	62
Limitazioni del procedimento	63
Letteratura di riferimento	63
Garanzia	63

Spiegazione dei simboli utilizzati sulle etichette



Numero di catalogo



Contenuto sufficiente per "n" saggi



Codice del lotto



Fabbricante



Limiti di temperatura



Utilizzare entro



Consultare le istruzioni per l'uso

Marchi

M30[®], Apoptosense[®], M65[®], EpiDeath[®] e PEVIVA[®] sono marchi registrati di VLVbio (Vivalavida AB)

Brevetti

Numero di brevetto europeo EP 1 019 438.

Numero di brevetto USA 6,296,850 e 6,716,968 e 6,706,488.

Numero di brevetto Giapponese 4372340.

Numero di brevetto canadese 4372340.

Trasporto e conservazione

Il kit ELISA M30 Apoptosense[®] viene spedito in condizioni di raffreddamento e deve essere conservato ad una temperatura tra i 2–8 °C. **Nota!** Non congelare!

Descrizione del test

Scopo proposto

Il kit ELISA M30 Apoptosense® è un metodo immunologico diretto *in vitro* per la determinazione quantitativa del neoepitopo cck18, K18Asp396 o M30, associato ad apoptosi, nel siero e nel plasma.

Sommario e spiegazione del test

Durante l'apoptosi, le caspasi separano diverse proteine cellulari. Nelle cellule epiteliali, uno di quei substrati è la cheratina 18 (K18), una proteina dei filamenti intermedi. L'anticorpo M30 riconosce un neoepitopo di K18 esposto a seguito di clivaggio ad opera di caspasi dopo il residuo di acido aspartico 396 (Ref. 1). Il taglio proteolitico in questa posizione è eseguito dalla caspasi9, nella fase iniziale dell'apoptosi, e dalle caspasi3 e 7, nella fase di esecuzione (Ref. 2).

Il kit ELISA M30 Apoptosense misura il livello dei frammenti solubili tagliati dalla caspasi della K18 (cck18) contenenti il neoepitopo K18Asp396. Dopo l'induzione dell'apoptosi nelle cellule epiteliali, si osservano in prima istanza aumenti di cck18 negli estratti cellulari. Il rilascio dell'antigene nel compartimento extracellulare si verifica in un secondo tempo ed è dovuto alla necrosi secondaria dei corpi apoptotici. L'aumento di cck18 nel corso dell'apoptosi è inibito dall'inibitore della caspasi zVAD-fmk (Ref. 3).

ELISA M30 Apoptosense può essere usato in combinazione con ELISA M65® (PE-VIVA Prod. No 10020) che quantifica la K18 totale. La combinazione delle due analisi è utile per una valutazione della modalità di morte cellulare (Ref. 4).

ELISA M30 Apoptosense individua il neoepitopo di K18 prodotto nell'uomo dal clivaggio della caspasi, ma non riconosce quello formatosi in topi, ratti o cani (Ref. 5). ELISA M30 Apoptosense individuerà, nello specifico, l'apoptosi del tumore nei topi o ratti portatori di tumore xenotrapiantato (Ref. 5).

ELISA M30 Apoptosense è utilizzato per la ricerca e la sperimentazione clinica nei campi dell'oncologia, epatologia, trapianti e sepsi.

Principio del procedimento

ELISA M30 Apoptosense è un test immunoenzimatico tipo 'sandwich' in fase solida. Gli standard, i controlli e i campioni reagiscono con un anticorpo di cattura "M5" in fase solida, diretto contro K18, e con l'anticorpo M30 coniugato con HRP (perossidasi di rafano), diretto contro il neoepitopo K18Asp396. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. Si aggiunge il substrato

TMB. Si blocca lo sviluppo del colore e si legge l'assorbanza. Il colore risultante è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'analita.

La quantità di antigene nel campione può essere calcolata da una curva standard sulla quale sono riportate concentrazioni note in funzione dell'assorbanza misurata. La concentrazione dell'antigene è espressa in Unità per litro (U/L).

Reagenti forniti per 96 determinazioni

M5 Coated Microstrips: una micropiastra, 96 pozzetti asciutti (12 × 8). I pozzetti sono rivestiti di anticorpo monoclonale K18 di topo, "M5". La micropiastra è chiusa ermeticamente in una busta di alluminio, contenente un essiccante. Se non si usano tutte le strisce, richiudere ermeticamente la busta, senza rimuovere l'agente essiccante. *Pronto per l'uso!*

M30 Conjugate: concentrato (24 × conc). Una fiala contiene 0,4 ml di anticorpo monoclonale M30 di topo (anti-K18Asp396 neoepitopo) coniugato con perossidasi di rafano (HRP) in tampone fosfato con stabilizzante di proteine. Deve essere diluito con M30 Conjugate Dilution Buffer. Conservanti aggiunti. *Nota!* Non esporre alla luce!

M30 Conjugate Dilution Buffer: una fiala contiene 11 ml di tampone fosfato con stabilizzanti di proteine per la diluizione di M30 HRP Conjugate. Conservanti aggiunti. Di colore blu. *Pronto per l'uso!*

M30 Standards A–G: lo Standard A contiene 2 ml di tampone fosfato con siero fetale bovino. Gli Standards B–G, 0,5 ml ciascuno, contengono materiale standard in tampone fosfato con siero fetale bovino. I valori degli Standard A–G sono 0, 75, 150, 250, 500, 750 e 1.000 U/L, rispettivamente. Conservanti aggiunti. Di colore giallo. *Pronto per l'uso!* Lo Standard A può essere utilizzato per diluizioni dei campioni > 1.000 U/L.

M30 Control Low & High: due fiale da 0,5 ml contenenti componenti reattivi in tampone fosfato con siero fetale bovino. I valori dei M30 Controls Low e High sono indicati sulle rispettive fiale. Conservanti aggiunti. Di colore giallo. *Pronto per l'uso!*

TMB Substrate: Una bottiglia contiene 22 ml di substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). *Nota!* Non esporre alla luce! *Pronto per l'uso!*

Stop Solution: una fiala contiene 7 ml di 1,0 M acido solforico. *Pronto per l'uso!*

Wash Tablet: una pastiglia per 500 ml di wash solution preparata. Dissolvere la Wash Tablet in 500 ml di acqua fresca deionizzata.

Sealing Tape: un (1) foglio.

Istruzioni per l'uso.

Certificato di analisi.

Materiale occorrente non incluso

- Lettore di micropiastre (lunghezza d'onda 450 nm, densità ottica lineare da 0–3)
- Agitatore per micropiastre (oscillazioni: 600 rpm, orbita: 1,5–4 mm)
- Dispositivo per il lavaggio di micropiastre a 96 pozzetti o pipetta multicanale (volume 250 µl)
- Scuotitore Vortex
- Pipette di precisione: 25, 50, 75 e 200 µL
- Cilindro (500 ml)
- Acqua deionizzata

Procedimento del test

Precauzioni e avvertenze

1. Il kit ELISA M30 Apoptosense è previsto unicamente per l'uso *in vitro*.
2. Non mescolare i reagenti di differenti lotti del kit.
3. Tutti i campioni prelevati da pazienti devono essere considerati come contagiosi e quindi manipolati ed eliminati in modo appropriato.
4. Non usare campioni contaminati.
5. La Stop Solution contiene acido solforico 1,0 M che può causare irritazione della pelle ed è dannoso per gli occhi. In caso di contatto, risciacquare abbondantemente con acqua e consultare un medico.
6. Le schede di sicurezza (MSDS) sono disponibili al sito www.peviva.com o su richiesta.

Prelievo e preparazione dei campioni di sangue

Il volume del campione dovrebbe essere sufficiente per misurare ogni campione in duplicato (volume del test $2 \times 25 \mu\text{l}$). I donatori non devono essere a digiuno prima del prelievo di sangue.

Siero: conservare il sangue venoso prelevato, evitando l'emolisi, in provette normali (senza anticoagulante) e separare il siero dalle cellule.

Plasma: ELISA M30 Apoptosense può essere usato anche per campioni di plasma (EDTA o eparina).

Nota! Lo stesso tipo di materiale, per esempio siero o plasma prelevato con lo stesso metodo, dovrebbe essere usato per un progetto specifico. Per ulteriori informazioni sulle prestazioni di ELISA M30 Apoptosense con diversi tipi di campione, si prega di consultare www.peviva.com.

Conservare i campioni a 2–8 °C fino a 4 ore. Per periodi più lunghi, conservare i campioni congelati a -20 °C o a temperature inferiori. I campioni possono

essere congelati-scongelati senza perdita di attività (Ref. 6, 7), ma si raccomanda di evitare cicli ripetuti e non necessari di ricongelamento-scongelamento. Per la diluizione dei campioni, si veda la sezione "Caratteristiche delle prestazioni".

Prelievo e preparazione dei campioni *in vitro* solo per uso ricerca

ELISA M30 Apoptosense è stato utilizzato per applicazioni di colture cellulari in un certo numero di studi pubblicati (per i riferimenti andar al sito www.peviva.com). Peviva ha sviluppato un prodotto specifico per la coltura delle cellule *in vitro*, *M30 CytoDeath™ ELISA* (PEVIVA Prod No 10900). Questo prodotto ha un intervallo dinamico e una sensibilità tali da essere adatto per i lavori *in vitro*.

Per il rilevamento dell'apoptosi di cellule derivate da colture epiteliali con ELISA M30 Apoptosense, si possono utilizzare i seguenti procedimenti.

Preparazione del campione da colture cellulari

Per molte applicazioni conviene misurare la reattività totale a M30 (ccK18) in un singolo punto tardivo. Queste misure riflettono una valutazione integrata dell'apoptosi. Per determinare i frammenti cck18 totali nei mezzi di coltura cellulare e negli estratti cellulari, aggiungere un detergente non-ionico direttamente alle cellule nel mezzo di coltura.

Giorno 1: piastrare le cellule. La densità iniziale deve essere determinata per ogni tipo di cellula e agente citotossico; solitamente, sono sufficienti 5.000–10.000 cellule per pozzetto in una piastra da 96 pozzetti.

Giorno 2: lavare le cellule una sola volta con PBS e aggiungere mezzo fresco (200 µl/pozzetto). Esporre le cellule all'agente (o agli agenti) desiderato (i).

Giorno 2–4: Per piastre da 96 pozzetti contenenti 200 µl di mezzo per pozzetto, aggiungere 10 µl di NP 40 10 % per pozzetto. Lasciare lisare le cellule agitando la piastra con un agitatore a rotazione per 5 minuti a temperatura ambiente. Si raccomanda di miscelare delicatamente, pipettando i campioni, facendo attenzione a non creare bolle d'aria; trasferire quindi 2 × 25 µl di mezzo/lisato nei pozzetti di un M30 Coated Microstrips.

Preparazione del campione da sovranatanti di colture cellulari

ELISA M30 Apoptosense e ELISA M65® possono essere impiegati per stabilire la modalità di morte cellulare mediante il calcolo di un "rapporto M30:M65" (Ref. 3). Tali misurazioni devono essere eseguite usando i sovranatanti! Il rapporto deve essere calibrato per ogni linea cellulare di carcinoma mediante controlli appropriati: noti induttori di apoptosi (p. es. agenti genotossici, staurosporina) e/o principalmente di necrosi (p. es. oligomicina/privazione del glucosio o acqua ossigenata).

Giorno 1/Giorno 2: piastrare le cellule, lavare e aggiungere gli agenti come descritto sopra.

Giorno 2-4: prelevare il mezzo del campione da ogni pozzetto. Per evitare che il pozzetto vada a secco, si sconsiglia di prelevare più campioni dallo stesso pozzetto. Centrifugare il mezzo e prelevare il sovranatante privo di cellule. Nota! Evitare di prelevare cellule.

Per ogni test si usano campioni di $2 \times 25 \mu\text{l}$ di sovranatante privo di cellule.

Se il saggio viene eseguito lo stesso giorno, i campioni possono essere conservati a $2-8^\circ\text{C}$. I campioni che verranno analizzati in un secondo tempo devono essere conservati a -20°C o a temperature inferiori. Evitare cicli ripetuti di congelamento-scongelo.

Preparazione del componente

Diluizione di M30 HRP Conjugate

Diluire M30 HRP Conjugate con M30 Conjugate Dilution Buffer. Una fiala di M30 HRP Conjugate contiene esattamente $400 \mu\text{l}$ di prodotto. Aggiungere $9,2 \text{ ml}$ di M30 Conjugate Dilution Buffer direttamente alla fiala di M30 HRP Conjugate, quindi miscelare.

Dissoluzione della Wash Tablet

Dissolvere una Wash Tablet in 500 ml di acqua fresca deionizzata.

Diluizione dei campioni

I campioni superiori allo Standard G ($1\,000 \text{ U/l}$) devono essere diluiti con lo Standard A o con il siero di un donatore. Siccome la diluizione nel test è lineare, la concentrazione originale viene calcolata moltiplicando la concentrazione misurata per il fattore di diluizione. Nel caso sia stato utilizzato siero/plasma di un donatore, bisogna tener conto della concentrazione del donatore.

Conservazione e durata dopo la prima apertura

Se non si utilizza l'intero kit, conservare i reagenti nei loro contenitori originali a $2-8^\circ\text{C}$. Se non si utilizzano tutte le strisce, richiudere ermeticamente la busta di microstrisce. Ricordarsi di includere l'essiccante.

TMB Substrate e M30 HRP Conjugate sono sensibili alla luce e agli ioni metallici e devono essere costantemente conservati nelle bottiglie ambrate originali a $2-8^\circ\text{C}$, quando non sono usati. Se si utilizza un nuovo contenitore, questo deve essere protetto dalla luce! TMB Substrate non può essere utilizzato dopo l'esposizione alla luce.

Se il kit viene utilizzato più volte, conservare M30 HRP Conjugate diluito nella fiala a 2–8 °C. Non esporre alla luce. La soluzione diluita M30 Conjugate è stabile per 3 settimane.

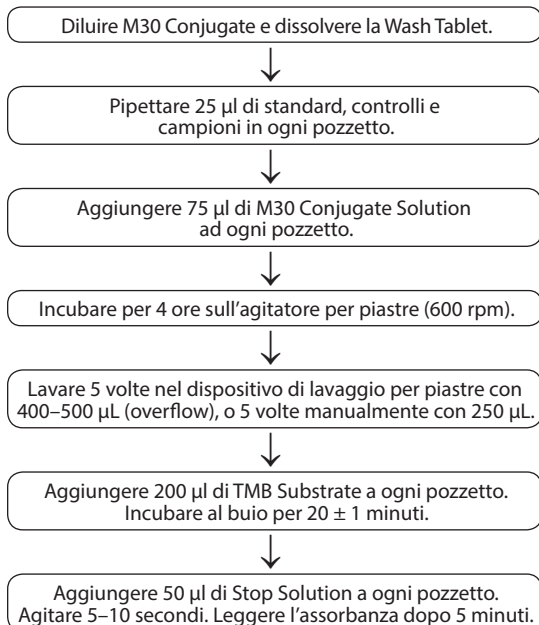
La soluzione preparata della Wash Tablet rimane stabile per 5 settimane se conservata a 2 – 8 °C.

Procedimento del test

Il test con ELISA M30 Apoptosense deve essere eseguito a temperatura ambiente (24 ± 3 °C).

1. Tutti i reagenti devono essere a temperatura ambiente prima di eseguire il test. Agitare tutti i reagenti con scuotitore Vortex prima dell'uso.
2. Dissolvere la Wash Tablet in acqua fresca deionizzata (vedi "Preparazione del componente").
3. Diluire M30 HRP Conjugate con M30 Conjugate Dilution Buffer e mescolare (vedi "Preparazione del componente").
4. Pipettare 25 µl di M30 Standards (A–G), M30 Control Low, M30 Control High e campione per pozzetto (si raccomandano duplicati).
5. Aggiungere 75 µl della soluzione diluita di M30 HRP Conjugate a ogni pozzetto. *Nota! I passaggi 4 e 5 dovrebbero essere eseguiti sequenzialmente senza interruzioni, entro 20 minuti.*
6. Coprire i pozzetti con del nastro sigillante o un coperchio apposito per micropiastre.
7. Incubare sull'agitatore per quattro (4) ore. Velocità di agitazione: 600 rpm.
8. Lavare cinque volte la piastra nell'apposito dispositivo di lavaggio delle micropiastre con 400–500 µl/pozzetto (lavaggio overflow)
oppure
lavare la piastra manualmente, scartando la soluzione di incubazione e lavando i pozzetti cinque (5) volte con 250 µl della soluzione preparata della Wash Tablet. Evitare contaminazioni tra i pozzetti.
9. Aggiungere 200 µl di TMB Substrate a ogni pozzetto. Incubare al buio e a temperatura ambiente per 20 ± 1 minuti.
10. Aggiungere 50 µl di Stop Solution a ogni pozzetto. Per consentire la miscelazione completa di TMB Substrate con Stop Solution, agitare la micropiastra per 5–10 secondi. Attendere 5 minuti prima di procedere alla lettura dell'assorbenza.
11. Entro 30 minuti, determinare l'assorbenza a 450 nm mediante un lettore di micropiastre e prendere nota dei risultati.
12. Calcolare i risultati come descritto nella sezione "Calcolo dei risultati analitici".

Schema del procedimento



Calcolo dei risultati analitici

I risultati del test ELISA M30 Apoptosense vengono calcolati utilizzando dei metodi computerizzati. Calcolare i valori dei controlli e dei campioni con un programma adatto all'elaborazione dei dati del test ELISA. Algoritmo di approssimazione: Cubic Spline. Asse-x: concentrazione (U/L). Asse-y: assorbanza a 450 nm (A450).

Nota! Se i campioni sono stati diluiti, la concentrazione determinata deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione e, nel caso sia stato utilizzato siero/plasma di un donatore come campione diluente, si dovrà tener conto della loro concentrazione (U/L) di "M30".

Prestazioni del test

Caratteristiche delle prestazioni

Intervallo di determinazione: l'intervallo di determinazione è 0–1.000 U/L.

Effetto dovuto a dose alta: non è stato riscontrato alcun effetto da dose alta fino a 195.000 U/L.

Riproducibilità: la variazione all'interno di un test è < 10 % (CV) e la variazione tra test è < 10 % (CV) per campioni > 200 U/L.

Sensibilità: la concentrazione minima misurabile di neoepitopo K18Asp396 con ELISA M30 Apoptosense è 20 U/L, definita come la concentrazione di "M30" corrispondente a un'assorbanza superiore di due deviazioni standard all'assorbanza dello Standard 0 U/L.

Spiking recovery: recupero dello standard alto quando introdotto nei campioni di sangue umano: 109 % (media) e 98 – 120 % (intervallo).

Linearità/Diluizione: recupero da sieri umani diluiti in M30 Standard A (0 U/L): 107 % (media) e 99–120 % (intervallo).

Intervallo di riferimento: nel siero di 200 donatori svedesi, la media era di 94 U/L e il 95° percentile era 251 U/L. Si consiglia che ogni laboratorio definisca il proprio intervallo di riferimento.

Tracciabilità dello standard

Le unità determinate da ELISA M30 Apoptosense sono definite contro antigene nativo introdotto nel siero. L'antigene nativo è calibrato contro uno standard di proteina ricombinante. 1 U/l = 1,24 pM (Ref. 8). **Nota!** A causa di buffer di test diversi, il materiale standard non può essere scambiato tra kit Peviva diversi.

Controllo di qualità interno

I controlli Low e High inclusi con le loro concentrazioni dovrebbero essere sufficienti per garantire la prestazione del test e dovrebbero essere impiegati almeno in duplicato ogni volta che si esegue il test.

Se questo procedimento non fosse sufficiente, ciascun laboratorio dovrebbe stabilire i propri controlli, secondo quanto indicato alla sezione "Prelievo e preparazione dei campioni *in vitro* solo per uso ricerca" o secondo le tecniche di routine del laboratorio. Tali controlli dovrebbero essere congelati in aliquote e trattati nello stesso modo ogni volta che si esegue il test.

Limitazioni del procedimento

L'utilità clinica della misurazione di cck18 in campioni di sangue umano come indicatore prognostico e nella cura dei pazienti sottoposti a regimi di terapia non è stata completamente stabilita.

I campioni fortemente lipemici (= 1.250 mg/dl), itterici (= 12.5 mg/dl) o emolizzati (= 50 mg/dl) non interferiscono con il test.

Letteratura di riferimento

1. Leers *et al.*, *J Pathol.* 187, 1999, 567.
2. Schütte *et al.*, *Exp Cell Res.* 297, 2004, 11.
3. Hägg *et al.*, *Invest New Drugs* 20, 2002, 253.
4. Kramer *et al.*, *Cancer Res* 64, 2004, 1751.
5. Olofsson *et al.*, *Cancer Biomarkers* 5, 2009, 117.
6. Greystoke *et al.*, *Ann Oncol* 19, 2008, 990.
7. Olofsson *et al.*, *Clin Cancer Res* 13, 2007, 3198.
8. Ueno *et al.*, *Eur J Cancer* 39, 2003, 769.

Per ulteriori informazioni, consultare il sito www.peviva.com/literature (in lingua inglese e tedesca).

Garanzia

I dati di prestazione presentati sono stati ottenuti usando il procedimento qui descritto. Qualsiasi cambiamento o modifica rispetto al procedimento raccomandato dal produttore potrebbe alterare i risultati. In tal caso, il produttore annulla qualsiasi garanzia esplicita, implicita o prevista per legge, inclusa la garanzia della commerciabilità e dell'idoneità del prodotto all'uso. In tale eventualità, il produttore e i suoi distributori autorizzati declinano ogni responsabilità per danni diretti o indiretti.

Products

Assays

M30 Apoptosense® ELISA

Prod. No. 10011

M65® ELISA

Prod. No. 10020

M30 CytoDeath™ ELISA

Prod. No. 10900

M65 EpiDeath® ELISA

Prod. No. 10040

Antibodies

M30 CytoDEATH™

- Unconjugated Prod. No. 10700
- Biotin Prod. No. 10750
- Fluorescein Prod. No. 10800
- Orange Prod. No. 10830

M5 Keratin 18

Prod. No. 10600

M6 Keratin 18

Prod. No. 10650



Distribuito in ITALIA da

Li StarFish S.r.l.

Via Cavour, 35

20063 Cernusco S/N (MI)

telefono 02-92150794

fax 02-92157285

info@listarfish.it

www.listarfish.it