



Arbeitsanleitung/Manual

Epidermal Growth Factor-Receptor ELISA Kit

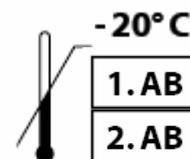
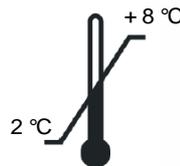
Zur in vitro Bestimmung des Epidermal Growth Factor-Receptor in Plasma und Gewebeextrakten

For the in vitro determination of Epidermal Growth Factor-Receptor in plasma and tissue extracts

Gültig ab / Valid from 13.02.2008



K 7110



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
Table of contents	2
1. VERWENDUNGSZWECK	3
2. EINLEITUNG	3
3. TESTPRINZIP	3
4. INHALT DER TESTPACKUNG	4
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	5
7. HINWEISE UND VORSICHTSMABNAHMEN	6
8. PROBENVORBEREITUNG	6
9. TESTDURCHFÜHRUNG	7
HINWEISE	7
PIPETTIERSCHEMA	7
10. ERGEBNISSE	9
11. EINSCHRÄNKUNGEN	9
12. QUALITÄTSKONTROLLE	10
13. TESTCHARAKTERISTIKA	10
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	10
SENSITIVITÄT	10
KREUZREAKTIVITÄT	11
LINEARITÄT	11
14. LITERATUR	11
15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11

TABLE OF CONTENTS	PAGE
1. INTENDED USE	14
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	14
3. PRINCIPLE OF THE TEST	14
4. MATERIAL SUPPLIED	15
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	15
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	16
7. PRECAUTIONS	16
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	17
9. ASSAY PROCEDURE	17
PROCEDURAL NOTES	17
TEST PROCEDURE	18
10. RESULTS	19
11. LIMITATIONS	19
12. QUALITY CONTROL	20
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	20
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	20
SENSITIVITY	21
CROSS REACTIVITY	21
SAMPLE DILUTION	21
14. REFERENCES	21
15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	21

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay dient zur Bestimmung von **EGF-R** in Plasma und Gewebeextrakten. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Der epidermale Wachstumsfaktor EGF hat vielfältige Wirkungen auf den Zellmetabolismus. In Zellkultur beeinflusst EGF die Proliferation und Differenzierung positiv oder negativ in Abhängigkeit des verwendeten Systems. Die biochemische Wirkung von EGF erfolgt über spezifische Rezeptoren. Der **EGF-Rezeptor (EGF-R)** ist ein transmembranes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 170.000 Dalton. Die Bindung von EGF erfolgt auf der extrazellulären Seite. Das Signal wird über die transmembrane Domäne in das Innere der Zelle weitergeleitet. Dies führt u. a. zur Aktivierung der zytoplasmatischen Tyrosinkinase und der Phospholipase C. Über die daraus resultierende Ca^{2+} - Freisetzung werden Calmodulin-abhängige Enzyme aktiviert. In Malignomen verschiedener Organe konnte eine erhöhte Rezeptorexpression nachgewiesen werden. Die Höhe der Rezeptorkonzentration korreliert dabei mit der Aggressivität des Tumors. **EGF-R** positive Tumoren sprechen bei Mammakarzinomen schlecht auf endokrine Therapie an und zeigen eine deutlich schlechtere Prognose. Die EGF-R Bestimmung erfolgte bisher mittels Rezeptorassay. Dem Vorteil dieser funktionellen Rezeptorbestimmung stehen dabei gravierende Nachteile gegenüber (z.B. radioaktives Material, hoher Probenverbrauch, schlechte Reproduzierbarkeit, starke Schwankung der Meßwerte bei niedrigen Tracermengen). Im vorliegenden Test wird der **EGF-R** mittels spezifischer Antikörper detektiert. Dieser Immunoassay führt zu besserer Reproduzierbarkeit bei geringerem Probenverbrauch und einfacherer Auswertung. Der **EGF-R** ist bis zu einer Konzentration von 0.4 fMol/ml im ELISA nachweisbar.

3. TESTPRINZIP

Dieser Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) dient zur quantitativen Bestimmung des humanen **EGF-Rezeptors (EGF-R)**.

In diesem ELISA wird der **EGF-R** aus den Proben an monoklonale, auf Mikrotiterplatten fixierte Antikörper gebunden. Die Quantifizierung des gebundenen EGF-R erfolgt nach einem Waschvorgang durch Zugabe eines 2. polyklonalen Antikörpers. Dieser wird mit einem Peroxidase markierten Antikörper (POD-AK) detektiert. Die Enzymmenge ist direkt proportional dem EGF-R Gehalt. Als Substrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die gebildete chromogene Verbindung kann photometrisch bei 450 nm gemessen werden.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 7110MTP	PLATE	Mikrotiterplatte	96
K 7110WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	100 ml
K 7110AP	ABBUF	Antikörperversdünnungspuffer, gebrauchsfertig	25 ml
K 7110A1	1.AB	1. Antikörper (Maus anti hEGF-R)	130 µl
K 7110A2	2.AB	2. Antikörper (Kaninchen anti hEGF-R)	80 µl
K 7110K	CONJ	Konjugat, (Ziege anti Kaninchen, Peroxidase- markiert), gebrauchsfertig	22 ml
K 7110BeP	COATBUF	Beschichtungspuffer, gebrauchsfertig	25 ml
K 7110PV	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	50 ml
K 7110BP	BLOCKBUF	Blockierungspuffer, gebrauchsfertig	25 ml
K 7110ST	STD	Standards, lyophilisiert (0; 3; 6; 12; 24 fmol/ml)	2 x 5 vial
K 7110KO	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	2 x 1 vial
K 7110TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	2 x 15 ml
K 7110AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	15 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenreader mit Filter 450 nm

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Beim Mehrfachansatz der Platte ist bitte darauf zu achten, daß die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert werden und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden** (z.B. Peroxidase-markierter Antikörper ist in der größten Verdünnungsstufe nicht haltbar). Der Kit kann so bis zu 2 x je nach Probenaufkommen (innerhalb des angegebenen Verfallsdatums) verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Der **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:10** in aqua dest. verdünnt werden (50 ml WASHBUF + 450 ml aqua dest). Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Konzentraten kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad 37 °C auf. Der **WASHBUF** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C 1 Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die lyophilisierten **STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrollen) sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Standards werden mit **500 µl SAMPLEBUF** (Probenverdünnungspuffer) rekonstituiert, vorsichtig mischen und zum Lösen mind. 10 Minuten stehen gelassen. Rekonstituierte Standards und Kontrollen können nicht gelagert werden.
- Der **1. AB** (1. Antikörper) wird **1:200** in **COATBUF** (Beschichtungspuffer) verdünnt (100 µl 1. AB + 20 ml COATBUF). Der **unverdünnte 1. Antikörper** ist bei **-20 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Die **verdünnte Antikörperlösung kann nicht aufbewahrt werden**.
- Der **2. AB** (2. Antikörper) wird **1:500** in **ABBUF** (Antikörperverdünnungspuffer) verdünnt (40 µl 2. AB + 20 ml ABBUF). Der **unverdünnte 2. Antikörper** ist bei **-20 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Die **verdünnte Antikörperlösung kann nicht aufbewahrt werden**.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Standards und Kontrollen sind auf Humanserum aufgebaut. Sie sind auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befunden worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Stopplösung besteht aus H_2SO_4 . H_2SO_4 ist eine starke Säure und muß auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht behandelt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muß die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

Plasma

Zu Forschungszwecken kann die extrazelluläre Domäne in Plasma bestimmt werden. Hierzu muß das Plasma 1:2 bis 1:10 mit Verdünnungspuffer verdünnt werden

Gewebe

Gewebe muß vor dem Einsatz im Test homogenisiert werden (z.B. mechanisch mittels Dismembrator). Danach folgt eine Ultra-Zentrifugation (1 Stunde 100000 x g). Der Überstand dieser Zentrifugation ist die zytosolische Fraktion und das Pellet beinhaltet die Membranfraktionen.

Zur Messung im **EGF-R ELISA** können die folgenden Probenmaterialien verwendet werden:

1. Das **Membranpellet** wird mit Phosphatpuffer (ca. 1 ml pro mg Protein 0.14M NaCl, 2.6 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 1.4 mM KH_2PO_4 , pH 7.4) 1% Tween20 versetzt und 2 min. mit einem Ultra Turrax homogenisiert. Anschließend wird bei Raumtemperatur unter Schütteln 30 Minuten inkubiert. Nach einer Zentrifugation (ca. 10-15000 x g) erfolgt die Proteinbestimmung im Überstand (Petersen-Lowry oder BCA Protein Assay [Pierce]). Die Proteinkonzentration wird auf 50 - 100 $\mu g/ml$ mit dem Phosphatpuffer 1% Tween20 eingestellt und 2 x 200 μl /Probe im Test verwendet.
2. Die **zytosolische Fraktion** muß auf 50 - 200 $\mu g/ml$ (Proteinbestimmung siehe oben) eingestellt werden und kann dann im Assay eingesetzt werden.
3. Für ein **Gesamtlysat** wird zuerst homogenisiert, wie oben und danach nicht zentrifugiert. Es wird mit dem Gesamthomogenisat weiter präpariert, wie im Punkt 1., Membranpellet, beschrieben.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung abzuarbeiten.

Pipettierschema

Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

1. **200 µl** verdünnten **1. AB** (1. Antikörper) in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren.
2. **1 Stunde** bei Raumtemperatur inkubieren.
3. Inhalt der Platte verwerfen.
4. **250 µl BLOCKBUF** (Blockierungspuffer) in die Vertiefungen pipettieren
5. **1 Stunde** bei Raumtemperatur inkubieren.
6. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
7. **200 µl STD** (Standards), **CTRL** (Kontrolle) und **Proben** in die Vertiefungen pipettieren.
8. **16-18 Stunden** (über Nacht) bei Raumtemperatur inkubieren.
9. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
10. **200 µl** verdünnten **2. AB** (2. Antikörper) pro Vertiefung pipettieren.

11. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
12. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
13. **200 µl CONJ** (Konjugat, POD-Antikörper) pro Vertiefung pipettieren
14. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
15. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
16. **200 µl SUB** (TMB-Substrat) pro Vertiefung pipettieren.
17. **15 - 20 Minuten** (entsprechend der Farbdifferenzierung) bei Raumtemperatur inkubieren.
18. **50 µl STOP** (Stopplösung) pro Vertiefung pipettieren.
19. Die Extinktion wird **sofort** im Mikrotiterplattenphotometer bei **450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) gemessen. Sollte die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigen, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

10. 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. 0.01).

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 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. 0.01).

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.

Berechnungsbeispiel

$$\frac{\text{Ergebnis in fMol / ml}}{\text{Proteinkonzentration in mg / ml}} = \text{EGF - Rezeptorkonzentration in fMol / mg Protein}$$

Es wird in der Probe eine EGF-R Konzentration von 4.5 fMol/ml anhand der Eichkurve bestimmt. Die Proteinkonzentration der Probe betrug 50 µg/ml.

Das Meßergebnis lautet:

$$\frac{4.5 \text{ fMol / ml}}{0.05 \text{ mg / ml}} = 90 \text{ fMol EGF - R / mg Protein}$$

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer EGF-R Konzentration größer dem größten Standard sollten verdünnt werden und nochmals im Assay eingesetzt werden.

12. QUALITÄTSKONTROLLE

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

13. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben innerhalb einer Meßserie wurde geprüft. Zwei Proben wurden 11-mal in einem EGF-R ELISA von einer Person angesetzt.

Intra-Assay VK n= 11

Probe	EGF-R [fmol/ml]	Intra-Assay Vk [%]
1	7.8	10.8
2	16.1	5.4

Inter-Assay-Variation

Es wird die Reproduzierbarkeit von zwei Proben an unterschiedlichen Tagen geprüft. Zwei Proben wurden an verschiedenen Tagen und von verschiedenen Personen im EGF-R ELISA gemessen.

Inter-Assay VK n= 11

Probe	EGF-R [fmol/ml]	Inter -Assay Vk [%]
1	7.8	14.8
2	16.1	9.6

Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 20-mal der Standard null. Sie beträgt 0.4 fmol/ml.

Kreuzreaktivität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu anderen Zellproteinen gefunden.

Linearität

Die Linearität dieses Testes wurde durch Verdünnen von EGF-R-haltigem Material mit Verdünnungspuffer ermittelt. Der lineare Bereich erstreckt sich von 3 - 24 fmol/ml.

14. LITERATUR

Tumor Necrosis Factor α Sensitizes Low Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-expressing Carcinomas for Anti_EGFR Therapy.
Hambeck M. et al. (2001) *Cancer Res* 61:1045-1049

15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Falls für die Herstellung der Testkomponenten Humanseren verwendet wurde, sind diese auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Testkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid/Thimerosal sind giftig. Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit der Haut oder der Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Alle im Test enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken oder, wenn vermerkt, zur in vitro Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Datums nicht mehr verwendet werden. Einzelkomponenten verschiedener Chargen dürfen nicht gemischt oder ausgetauscht 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 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 zurück zu senden.

13.02.2008 07102002_EGF-R.DOC

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Arbeitsanleitung/Manual

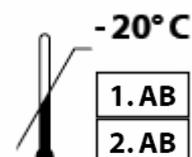
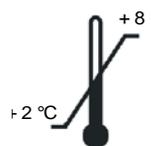
Epidermal Growth Factor- Receptor ELISA Kit

*For the in vitro determination of Epidermal Growth Factor-
Receptor in plasma and tissue extracts*

Gültig ab / Valid from 13.02.2008



K 7110



1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is intended for the quantitative determination of EGF-R in plasma and tissue extracts. For *in vitro* diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Polyclonal growth factors e.g. the epidermal growth factor (EGF) have been recognized as important determinants in the regulation of cellular proliferation and differentiation as shown in cell culture. EGF mediates its effects through receptors.

The EGF-receptor (EGF-R) is a glycoprotein of 170.000 Dalton. It consists of an extra cellular domain for EGF binding, a transmembrane domain for signal transduction and an intracellular domain with tyrosine-kinase activity. Binding of EGF leads to a Ca^{2+} release by activation of Calmodulin-dependent enzymes.

Overexpression or amplification of EGF-R in breast cancer is associated with autonomous tumor growth and poor clinical prognosis.

The most widely used method of receptor identification has been a radio ligand - assay with ^{125}I -labeled EGF. The advantage of the radio ligand assay is the measurement of native receptor. On the other hand, this test system is combined with a lot of disadvantages (e.g. great amount of tumor material, radioactivity, poor reproducibility, time-consuming calculation).

In the offered test system EGF-R is determined by specific antibodies. This immunoassay shows good reproducibility, small sample volume, and is easy to calculate. The sensitivity for h EGF-R in ELISA - technique is 0.4 fMol/ml.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) allows the quantitative determination of human Epidermal Growth Factor-Receptor (h EGF-R). The h EGF-Rs in the samples are bound to monoclonal mouse antibodies against h EGF-R immobilized on the surface of the microtiter plates. After a washing step, to remove all foreign substances, the quantification of bound h EGF-R is carried out by adding a rabbit anti human EGF-R antibody. Detection of the bound rabbit antibody is performed by a peroxidase labeled goat anti rabbit antibody (PO-antibody). The amount of converted substrate is directly proportional to the amount of bound h EGF-R and can be determined photometrically at 450 nm.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K 7110MTP	PLATE	One holder with strips	96
K 7110WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	100 ml
K 7110AP	ABBUF	Antibody dilution buffer, ready-to-use	25 ml
K 7110A1	1.AB	1 st Antibody (mouse anti hEGF-R)	130 µl
K 7110A2	2.AB	2 nd Antibody (rabbit anti hEGF-R)	80 µl
K 7110K	CONJ	Conjugate, (goat anti rabbit, peroxidase-labeled), ready to use	22 ml
K 7110BeP	COATBUF	Coating buffer, ready-to-use	25 ml
K 7110PV	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	50 ml
K 7110BP	BLOCKBUF	Blocking buffer, ready-to-use	25 ml
K 7110ST	STD	Calibrator (0; 3; 6; 12; 24 fmol/ml)	2 x 5 vial
K 7110KO	CTRL	Control, lyophilized	2 x 1 vial
K 7110TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	2 x 15 ml
K 7110AC	STOP	ELISA Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Deionized water
- Precision pipettors calibrated to deliver 10-1000 µl
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Microplate reader 450 nm

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- The **WASHBUF** (ELISA wash buffer concentrate) must be diluted with aqua dest. **1:10** before use (50 ml WASHBUF + 450 ml aqua dest.). Crystals could occur due to high salt concentration. The crystals must be resuspended **before dilution of the buffer solutions** using a water bath (37°C). The **WASHBUF** is stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label. Diluted solutions could be stored at 2-8°C for 1 month.
- The **STD** (calibrators) and **CTRL** (control) must be reconstituted with **500 µl SAMPLEBUF** (sample dilution buffer). Allow the vial to stand for minimum 10 minutes and then mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. Reconstituted Calibrators and Control can not be stored.
- The **1. AB** (1st Antibody) must be diluted **1:200** in **COATBUF** (coating buffer) (100 µl 1.ABi + 20 ml COATBUF). The **1. AB** is stable at -20 °C until expiry date given on the label. **Diluted antibody solution is not stable and can not be stored.**
- The **2. AB** (2nd Antibody) must be diluted **1:500** in **ABBUF** (antibody dilution buffer) (40 µl 2. AB + 20 ml ABBUF). The **2. AB** is stable at -20 °C until expiry date given on the label. **Diluted antibody solution is not stable and can not be stored.**

7. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- The calibrators and controls contain human source material which was tested and found to be non-reactive to HBsAg, anti-HIV-1/2, and anti-HCV. Since no method can offer complete assurance that hepatitis B virus, HIV-1/2, HCV or other infectious agents are absent, these reagents should be handled as if potentially infectious.
- Stop solution contains diluted sulfuric acid. This is a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped out immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapor and avoid inhalation.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Plasma

The **plasma** has to be diluted between 1/2 and 1/10 in dilution buffer to be in the range of standard curve and then measured directly.

Tissue

Tissue material has to be homogenised (e.g. mechanically with a dismembrator). Then, an ultra centrifugation step (1h, 100.000 x g) follows. The supernatant of the centrifugation is the cytosolic fraction (for oestrogen and progesterone receptor measurement) and the pellet includes membrane of the outer and nucleus walls.

For measurement of EGF-R by ELISA the following matrices could be used:

1. The **membrane pellet** has to be solubilized in PBS (approximate 1 ml per mg protein 0.14M NaCl, 2.6 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.4) 1% Tween 20 with an ultra turrax for 2 min. After incubation for 30 min. at room temperature with constant agitation the samples have to be centrifuged with 10 – 15000 x g for 10 min. Protein in the supernatant should be determined according to Lowry et al. or with BCA Protein Assay [Pierce]. Protein should be diluted to 50 – 100 µg protein / ml in PBS 1% Tween 20 and 2 x 200 µl/sample should be used for the ELISA.
2. The **cytosolic fraction** has to be diluted to 50-200 µg protein/ml and then be measured directly. Protein determination, see above.
3. To prepare the **total lysate** the tissue should be first homogenized as described above without centrifugation step. For further preparation see point 1.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the test results. Immundiagnostik can therefore not be held reliable for any damage resulting from this.
- Carry out the assay with the actual manual delivered with the kit.

Test procedure

Carry out the tests in duplicate.

1. Pipette **200 µl** of prediluted **1. AB** (1st antibody) solution into each well.
2. Incubate for **1 hour at room temperature (RT)**.
3. Decant the contents of the plate.
4. Pipette **250 µl** of **BLOCKBUF** (blocking buffer) into each well.
5. Incubate for **1 hour at room temperature** (in order to block remaining binding sites).
6. Decant the contents of the plate and wash the cavities **5 x with 250 µl** of ELISA wash buffer.
7. Pipette **200 µl** of **STD** (standards), **CTRL** (control) or **samples** into the wells of the microtitre plate.
8. Incubate (**16 – 18 h**) **over night at room temperature**.
9. Decant the contents of the plate and wash the cavities **5 x with 250 µl** of ELISA wash buffer.
10. Add **200 µl** of **2. AB** (2nd antibody)
11. Incubate for **1 hour at RT**
12. Decant the contents of the plate and wash the cavities **5x with 250 µl** of ELISA wash buffer.
13. Add **200 µl** of **CONJ** (conjugate, POD-antibody).
14. Incubate for **1 hour at RT**.
15. Decant the contents of the plate and wash the cavities **5x with 250 µl** of ELISA wash buffer.
16. Add **200 µl** of **SUB** (TMB substrate) solution
17. Incubate for **15 –20 minutes at room temperature**, shaking lightly, until sufficient coloring has been achieved.
18. Add **50 µl** of **STOP** (stop solution).
19. Determine absorption with an ELISA reader at **450 nm** against 620 nm as reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the measurement range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as reference.

10. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend to use the „4-Parameter-algorithm“.

1. 4-parameter-algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

2. Point-to-point-calculation

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

3. Spline-algorithm

We recommend a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

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.

Example for calculation

Example for calculation of the EGF-R content in an unknown sample

$$\frac{\text{Result in fMol / ml}}{\text{Protein concentration in mg / ml}} = \text{EGF - Receptor concentration in fMol / mg Protein}$$

Example:

An EGF-R concentration of 4.5 fMol/ml is determined by the calibration curve. The protein concentration of the sample is 50µg/ml.

The final result is:

$$\frac{4.5 \text{ fMol / ml}}{0.050 \text{ mg / ml}} = 90 \text{ fMol EGF - R / mg Protein}$$

11. LIMITATIONS

Samples with EGF-R levels greater than the highest calibrator, should be diluted and re-assayed.

12. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends commercial control samples for internal quality control.

Control samples or serum pools should be analyzed with each run of calibrators and patient samples. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. In assays in which one or more of the quality control sample values lie outside the acceptable limits, the results for the patient sample may not be valid.

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra Assay variation

The precision (intra-assay variation) of the Immundiagnostik EGF-R ELISA test was calculated from 11 replicate determinations on each of one samples.

Intra-Assay CV n = 11

Sample	EGF-R [fmol/ml]	Intra-Assay CV [%]
1	7.8	10.8
2	16.1	5.4

Inter Assay variation

The total precision (inter-assay variation) of the Immundiagnostik EGF-R ELISA test was calculated from data on 2 samples obtained in 11 different assays by three technicians on two different lots of reagents over a period of three months.

Inter-Assay CV n= 11

Sample	EGF-R [fmol/ml]	Inter-Assay -Assay CV [%]
1	7.8	14.8
2	16.1	9.6

Sensitivity

The detection limit of this ELISA was defined as $B_0 + 2SD$. The value is 0.4 fmol/ml

Cross reactivity

No cross reactions with other cellular proteins have been observed.

Sample dilution

The linearity was calculated from the dilution of EGF-R containing material with dilution buffer. Linearity was achieved in the range of 3-24 fmol/ml.

14. REFERENCES

Tumor Necrosis Factor α Sensitizes Low Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-expressing Carcinomas for Anti_EGFR Therapy.
Hambeck M. et al. (2001) *Cancer Res* 61:1045-1049

15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The test components which are made of human serum are tested for Australia antigen and HIV and found to be negative. However, since no test method can offer complete assurance that infectious agents are absent; these reagents should be handled as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen. The normal precautions for laboratory working should be observed.
- Reagents of the test package contain sodium azide as a bactericide. Contact with skin or mucous membranes has to be avoided.
- All reagents in the test package are to be used for in-vitro diagnostics only.
- The reagents should not be used after the date of expiry (see label on the test package).
- Single components with different lot numbers should not be mixed or exchanged.
- The guidelines for medical laboratories should be observed.

- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik can therefore not be held reliable for any damage resulting from this.

13.02.2008 23012004_EGF-R.DOC

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number