

S100A8/S100A9 ELISA Kit

Zur Bestimmung von S100A8/S100A9 (Calprotectin, MRP 8/14) in Stuhl, Serum, Plasma, Urin, Gewebeextrakt, Zellkulturüberstand

*Für tierexperimentelle Studien
(Maus, Ratte; nicht für humanes Probenmaterial geeignet)*

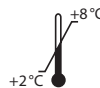
S100A8/S100A9 ELISA Kit

For the determination of S100A8/S100A9 (Calprotectin, MRP 8/14) in stool, serum, plasma, urine, tissue extract, cell culture supernatant

*For animal experimental studies
(mouse, rat; not suitable for human samples)*

Gültig ab / Valid from 2015-07-09

REF K 6936



RUO



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

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

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) ist für die quantitative Bestimmung von S100A8/S100A9 (Calprotectin, MRP 8/14) in Stuhl, Serum, Plasma, Urin, Gewebeextrakt und Zellkulturüberstand geeignet. Nur für wissenschaftliche Forschung. Nicht für diagnostische Zwecke.

2. EINLEITUNG

Alternative Namen:

Calgranulin A: MRP8, S100A8, CP-10

Calgranulin B: MRP14, S100A9

Calprotectin, MRP8/14: L1, (p8,14), p34

S100A8/S100A9 (MRP 8/14) ist ein Calcium-bindendes Protein, das von Neutrophilen und Monozyten gebildet wird. Fäkales S100A8/S100A9 ist ein Marker für gastrointestinale Erkrankungen entzündlicher und neo-plastischer Genese.

Die Unterscheidung zwischen Patienten mit Colon irritabel und solchen mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) fällt häufig schwer. Dies führt zu vielen nicht notwendigen Koloskopien. Mittels des S100A8/S100A9-Tests können diese beiden Patientengruppen jetzt deutlich voneinander unterschieden werden. Der Nachweis aus dem Stuhl korreliert sehr gut mit den histologischen und endoskopischen Befunden der Krankheitsaktivität bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, sowie mit dem bisherigen „Gold-Standard“ für die Aktivitätsbeurteilung bei CED, der Messung der fäkalen Exkretion 111-Indium-markierter neutrophiler Granulozyten. Der Indium-111-Granulozytentest ist jedoch kostenintensiv (Krankenhausaufenthalt, Isotopenbestimmung und Entsorgung) und durch die Radioaktivität belastend für die Patienten. Eine wiederholte Anwendung bei Kindern und Schwangeren ist daher nicht empfehlenswert.

Im Gegensatz zu den bisherigen Standardmarkern für entzündliche Vorgänge (CRP, ESR, HB) zeigen erhöhte S100A8/S100A9-Werte mit größerer Sicherheit ein Rezidiv an. S100A8/S100A9 (MRP 8/14) ist damit ein idealer Verlaufsmarker, z.B. bei M. Crohn oder nach Polypenabtragung. Vergleichende Messungen von S100A8/S100A9 und okkultem Blut zum Nachweis des Kolonkarzinoms ergaben einen eindeutigen diagnostischen Vorteil für S100A8/S100A9. Der Parameter hat eine hohe negative prädiktive Aussagekraft: Ist der S100A8/S100A9-Spiegel im Stuhl niedrig, liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit keine organische Erkrankung des Intestinaltrakts vor.

Indikationen

- Entzündungsmarker für akute entzündliche Erkrankungen
- Bewertung des Schweregrads einer Entzündung

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6936	PLATE	Mikrotitermodul	12 x 8 Vertiefungen
K 6936	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6936	EXBUF	Extraktionspufferkonzentrat 2,5x	90 ml
K 6936	AB	Detektionsantikörper (monoklonaler anti- S100A8/S100A9 (MRP 8/14)), lyophilisiert	250 µl
K 6936	STD	S100A8/S100A9-Standards, lyophilisiert (0; 0,25; 0,98; 3,9; 15,6 ng/ml)	2 x 5 vials
K 6936	CTRL	Kontrollen, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 2 vials
K 6936	CONJ	Konjugat (anti-Maus, peroxidase-markiert), Konzentrat	200 µl
K 6936	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml
K 6936	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig	15 ml

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

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler mit Inkubator für 37 °C
- 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 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von

0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 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 in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 μl** sollten vor Gebrauch kurz an-zentrifugiert 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 der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Der **WASH-BUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünnter WASHBUF) ist bei **2–8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Das **Extraktionspufferkonzentrat (EXBUF)** muss vor Gebrauch **1:2.5** mit Reinstwasser verdünnt werden (90 ml EXBUF + 135 ml Reinstwasser). Auf-grund der hohen Salzkonzentration in den Konzentraten kann es zu Kristall-bildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das Pufferkonzentrat kann bei 2–8 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung ist 3 Monate** in einem ge-schlossenen Gefäß bei **2–8 °C** haltbar.
- **Die lyophilisierten STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrollen) sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Standards und Kon-trollen werden mit **500 μl Reinstwasser** rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Standards und Kontrollen können 4 Wochen bei 2–8 °C gelagert werden**.
- Der **lyophilisierte Detektionsantikörper (AB)** ist bei **2–8 °C** bis zum ange-ggebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Der AB (lyophilisierter Detektions-antikörper) muss vor Gebrauch mit **250 μl Waschpuffer** rekonstituiert, vor-sichtig gemischt und zum Lösen mind. 10 Minuten stehen gelassen werden. Der rekonstituierte Detektionsantikörper wird **1:101 in Waschpuffer** weiter verdünnt (100 μl rekonstituierter Detektionsantikörper + 10 ml Waschpuffer).

Der rekonstituierte Detektionsantikörper ist bei **-20 °C 4 Wochen lang stabil**.
Verdünte Detektionsantikörperlösung kann nicht aufbewahrt werden.

- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:101** in **Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das CONJ ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:101 verdünntes CONJ) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG

Kotproben

Jede Probe wird 1:50 in Extraktionspuffer extrahiert (z. B. 100 mg Kot + 5 ml Extraktionspuffer) und anschließend bei 3000 g für 10 min zentrifugiert.

100 µl des Überstandes werden pro Vertiefung im Test eingesetzt.

EDTA-Plasma/Serumproben

Die Proben werden vor dem Einsatz im Test **1:100 mit Waschpuffer** verdünnt.

100 µl des Überstandes werden pro Vertiefung im Test eingesetzt.

Urinproben

Die Proben müssen vor dem Einsatz im Test mindestens **1:3 mit Waschpuffer** verdünnt werden.

100 µl des Überstandes werden pro Vertiefung im Test eingesetzt.

Zellkulturüberstand

Die Proben müssen vor dem Einsatz im Test mindestens **1:2 mit Waschpuffer** verdünnt werden. Das Medium wird als Leerwert mitbestimmt.

100 µl des Überstandes werden pro Vertiefung im Test eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf der Sandwich-ELISA-Technik. Es werden zwei ausgewählte Antikörper, die S100A8/S100A9 erkennen, verwendet.

Teststandards, Kontrollen und verdünnte Proben, die auf S100A8/S100A9 zu unter-

suchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit hochaffinen anti-S100A8/S100A9 Antikörpern beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das S100A8/S100A9 aus der Probe von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Im nächsten Inkubationsschritt wird der Detektionsantikörper, ein monoklonaler anti-S100A8/S100A9 Antikörper, an das S100A8/S100A9 gebunden. Dann wird das Konjugat (Anti-Maus, Peroxidase markiert) zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper – S100A8/S100A9 – Detektions-Antikörper – Peroxidase Konjugat. Als Peroxidase-substrat wird Tetramethylbenzidin eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem S100A8/S100A9-Gehalt direkt 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.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen, nicht verwendete können abgeklebt 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.

1.	Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen 5x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	100 µl STD (Standard) SAMPLE (Probe) CTRL (Kontrollen) in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubieren.*
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.

5.	100 µl verdünnten AB (Detektionsantikörper) in alle Vertiefungen pipettieren
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubieren.*
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl verdünntes CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren.
9.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubieren.*
10.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
11.	100 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren.
12.	10–20 min** bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
13.	100 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, 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.

* Die oben genannten Inkubationsschritte unter Schütteln bei 37 °C sind vom Hersteller empfohlen. Besteht keine Möglichkeit bei 37 °C zu schütteln, empfehlen wir die Inkubation bei 37 °C ohne 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.

Kotproben

Der ermittelte Wert wird mit dem Verdünnungsfaktor **50** multipliziert.

EDTA-Plasma- und Serumproben

Der ermittelte Wert wird mit dem Verdünnungsfaktor **100** multipliziert.

Urin

Der ermittelte Wert wird mit dem Verdünnungsfaktor **3** multipliziert.

Zellkulturüberstände

Der ermittelte Wert wird mit dem Verdünnungsfaktor **2** multipliziert.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

Die Testergebnisse stellen nur Relativwerte dar, da keine Daten über die Kreuzreaktivität vorliegen.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) müssen stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Standardkurve × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

Analytische Sensitivität × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

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.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 3 \text{ SD}$. Gemessen wurde 20-mal der Standard null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 0,076 ng/ml.

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur zu wissenschaftlichen Zwecken 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.

13. 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 Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den 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 im Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina 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.

15. LITERATUR

1. Hildebrand, F. et al., 2013. Inflammation-associated enterotypes, host genotype, cage and inter-individual effects drive gut microbiota variation in common laboratory mice. *Genome biology*, **14**(1), p.R4.
2. Nelson, D. a et al., 2012. An expanded myeloid derived suppressor cell population does not play a role in gammaherpesvirus-exacerbated breast cancer metastases. *Infectious agents and cancer*, **7**(1), p.22.
3. Prinzen, C. et al., 2009. Differential gene expression in ADAM10 and mutant ADAM10 transgenic mice. *BMC genomics*, **10**, p.66.
4. Soro-Paavonen, A. et al., 2008. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) deficiency attenuates the development of atherosclerosis in diabetes. *Diabetes*, **57**(9), pp.2461–2469.
5. Volz, H.C. et al., 2012. S100A8/A9 aggravates post-ischemic heart failure through activation of RAGE-dependent NF- κ B signaling. *Basic research in cardiology*, **107**(2), p.250.
6. Wiechert, L. et al., 2012. Hepatocyte-specific S100a8 and S100a9 transgene expression in mice causes Cxcl1 induction and systemic neutrophil enrichment. *Cell communication and signaling : CCS*, **10**(1), p.40.
7. Yamamoto, Y. et al., 2011. Septic shock is associated with receptor for advanced glycation end products ligation of LPS. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), **186**(5), pp.3248–57.

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



Nur für Forschungszwecke



Zu verwenden mit



Hersteller

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Chargenbezeichnung



Verwendbar bis

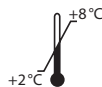
S100A8/S100A9 ELISA Kit

For the determination of S100A8/S100A9 (Calprotectin, MRP 8/14) in stool, serum, plasma, urine, tissue extract, cell culture supernatant

For animal experimental studies (mouse, rat; not suitable for human samples)

Valid from 2015-07-09

REF K 6936



RUO



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	15
2. INTRODUCTION	15
3. MATERIAL SUPPLIED	16
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	17
6. PREPARATION OF SAMPLES	18
7. ASSAY PROCEDURE	18
<i>Principle of the test</i>	18
<i>Test procedure</i>	19
8. RESULTS	20
9. LIMITATIONS	21
10. QUALITY CONTROL	22
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	22
<i>Analytical Sensitivity</i>	22
12. PRECAUTIONS	22
13. TECHNICAL HINTS	22
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	23
15. REFERENCES	23

1. INTENDED USE

The described Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) Kit is intended for the quantitative determination of S100A8/S100A9 (Calprotectin, MRP (8/14) in stool, serum, plasma, urine, tissue extract and cell culture supernatant. For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

2. INTRODUCTION

Alternative names:

Calgranulin A: MRP8, S100A8, CP-10

Calgranulin B: MRP14, S100A9,

Calprotectin, MRP8/14: L1, (p8,14), p34

S100A8/S100A9 (MRP (8/14) is a calcium-binding protein secreted predominantly by neutrophils and monocytes. Fecal S100A8/S100A9 is a marker for neoplastic and inflammatory gastrointestinal diseases.

It is often difficult to distinguish between irritable bowel syndrome and chronic inflammatory bowel disease. This leads in many cases to extensive and unnecessary colonoscopic examinations. The S100A8/S100A9 test allows clear differentiation between the two patient groups. Fecal S100A8/S100A9 levels correlate significantly with histological and endoscopic assessment of disease activity in Morbus Crohn's disease and ulcerative colitis as well as with the fecal excretion of indium-111-labelled neutrophilic granulocytes that has been suggested as the "gold standard" of disease activity in inflammatory bowel disease. However, measuring 111-indium-labeled granulocytes is very costly (patient's hospitalization, analysis and disposal of isotopic material) and is connected with radioactive exposition of the patients. For this reason, a repeated application to children and pregnant women is not recommended.

Elevated levels of S100A8/S100A9 are a much better predictor of relapse than standard inflammatory markers (CRP, ESR HB). Comparing this marker with standard fecal occult blood screening in colorectal cancer demonstrates clearly the diagnostic advantages of the fecal S100A8/S100A9 test. The parameter is of a high diagnostic value: If the S100A8/S100A9 level in stool is low, there is a high probability that an organic disease does not exist.

Indications

- Marker for acute inflammation
- Estimation of gastrointestinal inflammation degree

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6936	PLATE	One holder with strips	12 x 8 wells
K 6936	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 6936	EXBUF	Extraction buffer concentrate 2.5x	90 ml
K 6936	AB	Detection antibody, (monoclonal anti-S100A8/S100A9 (MRP 8/14) antibody), lyophilized	250 µl
K 6936	STD	S100A8/S100A9 standards, lyophilized (0; 0.25; 0.98; 3.9; 15.6 ng/ml)	2 x 5 vials
K 6936	CTRL	Controls, lyophilized (see specification for range)	2 x 1 vial
K 6936	CONJ	Conjugate (anti-mouse, peroxidase labeled), concentrate	200 µl
K 6936	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6936	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig	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

- Ultra pure water*
- Laboratory balance
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker with 37°C incubator
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ 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 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** should be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C before dilution of the buffer solutions. 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 one month.**
- The **extraction buffer concentrate (EXBUF)** must be diluted with **ultra pure water 1:2.5** before use (90 ml EXBUF + 135 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. Before dilution, the crystals must be redissolved at 37 °C in a water bath. The buffer concentrate is **stable at 2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Diluted buffer solution can be stored in a closed flask at **2–8 °C for three months.**
- The **lyophilized standards (STD)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the standards and controls must be reconstituted with **500 µl of ultra pure water.** Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to ensure complete reconstitution. **Reconstituted standards and controls can be stored at 2–8 °C for four weeks.**
- The **lyophilized detection antibody (AB)** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. The AB (**lyophilized detection antibody**) must be reconstituted with **250 µl** wash buffer. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to ensure complete reconstitution. The reconstituted detection antibody must be further diluted **1:101** in wash buffer (100 µl reconstituted detection antibody + 10 ml wash buffer). The **reconstituted detection antibody is stable at -20 °C up to 4 weeks. Diluted detection antibody solution is not stable and can not be stored.**

- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** must be diluted **1:101** in wash buffer (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The CONJ is stable at **2–8 °C** until expiry date stated on the label. **Conjugate (1:101 diluted CONJ) is not stable and cannot be stored.**
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8 °C**.

6. PREPARATION OF SAMPLES

Feaces

Each sample must be extracted **1:50** in extraction buffer (e.g. 100 mg feaces + 5 ml extraction buffer), and then centrifuged for 10 minutes at 3000g.

For analysis, pipette **100 µl** of the supernatant per well.

EDTA-Plasma/Serum

Samples should be diluted **1:100** with wash buffer before assaying.

For analysis, pipette **100 µl** of the dilution per well.

Urine

Samples should be diluted at least **1:3** with wash buffer before assaying.

For analysis, pipette **100 µl** of the dilution per well.

Cell culture supernatants

Samples should be diluted at least **1:2** with wash buffer before assaying.

For analysis, pipette **100 µl** of the dilution per well.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

The assay utilizes the two-site sandwich technique with two selected antibodies that bind to S100A8/S100A9.

Standards, controls and diluted samples which are assayed for S100A8/S100A9 are added to the microtiter wells coated with high affinity anti-S100A8/S100A9 antibodies. During the first incubation step, S100A8/S100A9 in the samples is bound by the immobilized antibodies. In a next incubation step, a monoclonal anti-S100A8/S100A9 antibody is added to each microtiter well. Then a peroxidase labeled anti-mouse conjugate is pipetted into each well and the following complex is formed:

capture antibodies – S100A8/S100A9 – detection antibody – peroxidase conjugate. Tetramethylbenzidine is used as a substrate for peroxidase. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The colour changes from blue to yellow. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the S100A8/S100A9 concentration of the sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. S100A8/S100A9 present in the samples is determined directly from this curve.

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15–30°C) and mix well.

Take as many **microtiter strips** as needed from kit. Store unused strips covered at 2–8°C. Strips are stable until 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.

1.	Wash each well 5 x by dispensing 250 µl of diluted WASHBUF (wash buffer) into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add 100 µl of STD (Standard) SAMPLE (Sample) CTRL (Controls) into respective well.
3.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at 37°C on a horizontal shaker.*
4.	Discard the contents of each well. Wash each well 5 x by dispensing 250 µl of diluted WASHBUF (wash buffer) into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add 100 µl diluted AB (detection antibody) into each well.
6.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at 37°C on a horizontal shaker.*
7.	Discard the contents of each well. Wash each well 5 x by dispensing 250 µl of diluted WASHBUF (wash buffer) into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.

8.	Add 100 µl diluted CONJ (conjugate) into each well.
9.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at 37 °C on a horizontal shaker.*
10.	Discard the contents of each well. Wash each well 5 x by dispensing 250 µl of diluted WASHBUF (washbuffer) into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
11.	Add 100 µl of SUB (substrate) into each well.
12.	Incubate for 10–20 min** at room temperature (15–30 °C) in the dark.
13.	Add 100 µl of STOP (stop solution) into each well, mix.
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.

* The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend to observe the procedure of the colour change and to stop the reaction upon good differentiation.

** 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.

Feaces

To obtain the concentration, the result must be multiplied with the dilution factor **50**.

EDTA-Plasma/Serum

To obtain the concentration, the result must be multiplied with the dilution factor **100**.

Urine

To obtain the concentration, the result must be multiplied with the dilution factor **3**.

Cell culture supernatants

To obtain the concentration, the result must be multiplied with the dilution factor **3**.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result with the dilution factor used.

The test results represent only relative values, as there are no data on the cross reactivity.

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) must be further diluted and re-assayed. Please consider this greater dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range cannot be clearly quantified.

The upper limit of the measurement range can be calculated as:

highest concentration of the standard curve × sample dilution factor to be used

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

Analytical sensitivity × sample dilution factor to be used

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 patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical Sensitivity

The Zero-standard was measured 20 times. The detection limit was set as $B_0 + 3 SD$ and estimated to be 0.076 ng/ml.

12. 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 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 up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. 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 analyzed with each run.

- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on 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 the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- The guidelines for medical 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 send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Hildebrand, F. et al., 2013. Inflammation-associated enterotypes, host genotype, cage and inter-individual effects drive gut microbiota variation in common laboratory mice. *Genome biology*, **14**(1), p.R4.
2. Nelson, D. a et al., 2012. An expanded myeloid derived suppressor cell population does not play a role in gammaherpesvirus-exacerbated breast cancer metastases. *Infectious agents and cancer*, **7**(1), p.22.
3. Prinzen, C. et al., 2009. Differential gene expression in ADAM10 and mutant ADAM10 transgenic mice. *BMC genomics*, **10**, p.66.
4. Soro-Paavonen, A. et al., 2008. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) deficiency attenuates the development of atherosclerosis in diabetes. *Diabetes*, **57**(9), pp.2461–2469.
5. Volz, H.C. et al., 2012. S100A8/A9 aggravates post-ischemic heart failure through activation of RAGE-dependent NF- κ B signaling. *Basic research in cardiology*,

107(2), p.250.

6. Wiechert, L. et al., 2012. Hepatocyte-specific S100a8 and S100a9 transgene expression in mice causes Cxcl1 induction and systemic neutrophil enrichment. *Cell communication and signaling : CCS*, **10**(1), p.40.
7. Yamamoto, Y. et al., 2011. Septic shock is associated with receptor for advanced glycation end products ligation of LPS. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), **186**(5), pp.3248–57.

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



For research use only



To be used with



Manufacturer



Contains sufficient for <n> tests



Lot number



Use by