

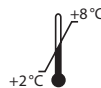
Thymosin α 1 ELISA KIT

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

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

Gültig ab / Valid from 2014-12-15

REF K 9510



RUO



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

Inhalt

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

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) Kit ist für die Bestimmung von Thymosin α 1 in Serum und Thymusextrakt geeignet. Nur zu wissenschaftlichen Zwecken. Nur für wissenschaftliche Forschung. Nicht für diagnostische Zwecke.

2. EINLEITUNG

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

Indikationen

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

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K9510	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K9510	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat, 10x	1 x 100 ml
K9510	AB	Antikörper (Kaninchen anti-Thymosin α 1), gebrauchsfertig	3 x 3,5 ml
K9510	CONJ	Konjugat (Ziege-anti-Kaninchen, Peroxidase-markiert), gebrauchsfertig	22 ml
K9510	STDBUF	Standardverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	50 ml
K9510	STD	Standardkonzentrat, lyophilisiert	3 x 1 vial

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K9510	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	2 x 15 ml
K9510	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

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

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

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

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

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie 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 μ l** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 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. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2–8 $^\circ\text{C}$** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte**

Pufferlösung (Waschpuffer) ist bei **2–8°C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

- Der **AB** (Antikörper) ist gebrauchsfertig. Er kann bis zu 4 Wochen bei 2–8°C gelagert werden. Zur Langzeitlagerung muss der Antikörper bei **–20°C** eingefroren werden.
- **Der lyophilisierte STD** (Standard) ist bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Der Standard wird mit **STDBUF** (Standardverdünnungspuffer) rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen (Volumen und Konzentration sowie Erstellung der Verdünnungsreihe siehe entsprechende Produktspezifikation). **Rekonstituierter Standard ist nicht stabil und können 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. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Serum

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

Thymusextrakte

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

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

In dem vorliegenden Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Thymosin α 1 (T*1) werden polyklonale Kaninchenantikörper gegen synthetisches T*1 eingesetzt. Das Testprinzip beruht auf einer Kompetitionsreaktion zwischen dem freien Antigen der Probe und dem immobilisierten Antigen auf der Mikrotiterplatte. Die Detektion und Quantifizierung erfolgt über einen Peroxidase-markierten Sekundärantikörper und der entsprechenden Substratumsetzung.

Vorinkubation

1.	200 μl AB (1. Antikörper) zu 400 μl STD (Standard) bzw. Probenmaterial in einem Eppendorfprobengefäß pipettieren, kurz mischen.
2.	18 Stunden bei 2–8°C unter Schütteln inkubieren

Die angegebenen Volumina sind für Bestimmungen von Doppelwerten.

Pipettierschema

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

Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können in der Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8°C gelagert werden.

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.	200 μl des Vorinkubationsansatzes in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und 90 min bei 2–8°C im Dunkeln 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.	200 μl CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30°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.	200 μl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren.

9.	20–30 min.* bei Raumtemperatur (15-30°C) im Dunkeln inkubieren.
10.	50 μl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, kurz mischen.
11.	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 Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

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.

8. ERGEBNISSE

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

1. 4-Parameter-Funktion

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

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

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

3. Gewichtete Spline-Funktion

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

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

Thymusextrakt

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

9. EINSCHRÄNKUNGEN

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

10. QUALITÄTSKONTROLLE

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

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

Referenzwerte

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

11. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich 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.

12. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des 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.

13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST









- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

14. LITERATUR

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

Verwendete Symbole:

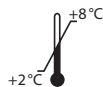
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	Nur für Forschungszwecke		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis

Thymosin α 1 ELISA KIT

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

Valid from 2014-12-15

REF K 9510



RUO



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

Table of Contents

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

1. INTENDED USE

Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) Kit is intended for the quantitative determination of Thymosin α 1 in serum and thymus extract. For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

2. INTRODUCTION

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

Indications

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

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K9510	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K9510	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml
K9510	AB	Antibody (rabbit anti Thymosin α 1), ready to use	3 x 3,5 ml
K9510	CONJ	Conjugate (goat anti rabbit, Peroxidase-labeled), ready to use	22 ml
K9510	STDBUF	Standard dilution buffer, ready to use	50 ml
K9510	STD	Calibrator concentrate, lyophilized	3 x 1 vial
K9510	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	2 x 15 ml
K9510	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

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

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 μ l tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 *g*
- Vortex
- 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 μ m) with an electrical conductivity of 0.055 μ S/cm at 25 °C (\geq 18.2 M Ω cm).

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 μ l** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted **1:10 in ultra pure water** before use (100 ml concentrate + 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 37 °C before dilution of the buffer solutions. The **buffer concentrate** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted buffer solution** (wash buffer) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for one month**.
- The **AB** (antibody) is ready to use. It can be stored at 2–8 °C up to 4 weeks. Long time storage until the expiry date given on the label has to be at **-20 °C**.
- The **lyophilized standard** (STD) is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the standard must be reconstituted with **STDBUF** (standard dilution buffer) (volume, concentration and dilution schema for the calibration curve see product specification). Allow the vial content to solve for 10 minutes and then mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. **Reconstituted standard is not stable and can not 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. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Serum

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

Thymusextract

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

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

In this enzyme immunoassay (EIA) for the determination of Thymosin α 1 ($T\alpha$ 1) polyclonal rabbit antibodies directed against synthetic $T\alpha$ 1 are used. The test principle is based on a competition between antigen in the sample or standards and the antigen coated on the wells of microplate. A peroxidase-conjugated antibody is used for detection and quantification, and tetramethylbenzidine (TMB) as a peroxidase substrate. The enzymatic reaction is terminated by an acidic stop solution. A dose response curve of absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from standard. $T\alpha$ 1 present in the patient samples is determined directly from this curve.

Precubation

1.	Add 200 μl of the AB (1st antibody) to 400 μl of STD (calibrator) or sample solutions into one way test tubes.
2.	Incubate for 18 hours at 2-8°C on a shaker.

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 in the aluminium foil bag with desiccant at 2–8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	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.
2.	Add 200 μl of the preincubated mixture into respective well.
3.	Cover the plate tightly and incubate for 90 min at 2–8°C in the dark on a horizontal shaker.
4.	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.
5.	Add 200 μl CONJ (conjugate) into each well.
6.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (15-30°C) on a horizontal shaker.
7.	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.
8.	Add 200 μl of SUB (substrate) into each well.
9.	Incubate for 20–30 min.* at room temperature (15-30°C) in the dark.
10.	Add 50 μl of STOP (stop solution) into each well, mix shortly.
11.	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 color change is temperature sensitive. We recommend observing the color change and stopping the reaction upon good differentiation.

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.

8. RESULTS

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

1. 4 parameter algorithm

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

2. Point-to-point calculation

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

3. Spline algorithm

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

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

Thymus extract

For the calculation of the sample values the results from the microplate reader has to be multiplied with the selected dilution factor.

9. LIMITATIONS

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

10. QUALITY CONTROL

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

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the 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.

Reference range

We recommend each laboratory to establish its own baseline values.

Baseline values depend on the patient's age and vary between different individuals.

11. PRECAUTIONS

- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic color 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.

12. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be 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.

13. 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.

14. REFERENCES

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

Used symbols:

Temperature limitation



Catalogue Number



For research use only



To be used with



Manufacturer



Contains sufficient for <n> tests



Lot number



Use by