

Arbeitsanleitung/Manual

# Thymulin EIA Kit

*Zur in vitro Bestimmung von Thymulin in Serum und Thymusextrakt*

# Thymulin EIA Kit

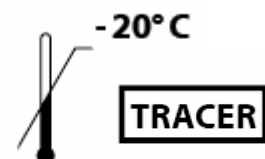
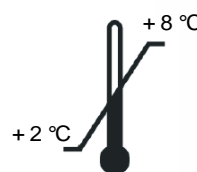
*For the in vitro determination of thymulin in serum and thymus extract*

*Nur zu wissenschaftlichen Zwecken / For research use only*

Gültig ab / Valid from 14.04.2009



K 9810



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim  
Tel.: ++49 6251 70190-0  
Fax: ++ 49 6251 849430  
e.mail: [Info@immundiagnostik.com](mailto:Info@immundiagnostik.com)  
[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

Inhaltsverzeichnis	Seite/Page
Table of content	2
<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>3</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>3. TESTPRINZIP</b>	<b>3</b>
<b>4. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>4</b>
<b>5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>4</b>
<b>6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>5</b>
<b>7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN</b>	<b>5</b>
<b>8. PROBENVORBEREITUNG</b>	<b>6</b>
<b>9. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>6</b>
HINWEISE	6
PIPETTIERSHEMA	7
<b>10. ERGEBNISSE</b>	<b>8</b>
<b>11. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>8</b>
<b>12. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>8</b>
ERWARTETE ERGEBNISSE	8
<b>13. LITERATUR</b>	<b>9</b>
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>9</b>

Table of content	Page
<b>1. INTENDED USE</b>	<b>12</b>
<b>2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST</b>	<b>12</b>
<b>3. PRINCIPLE OF THE TEST</b>	<b>12</b>
<b>4. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>13</b>
<b>5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>13</b>
<b>6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b>	<b>14</b>
<b>7. PRECAUTIONS</b>	<b>14</b>
<b>8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION</b>	<b>15</b>
<b>9. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>15</b>
PROCEDURAL NOTES	15
TEST PROCEDURE	16
<b>10. RESULTS</b>	<b>17</b>
<b>11. LIMITATIONS</b>	<b>17</b>
<b>12. QUALITY CONTROL</b>	<b>17</b>
EXPECTED VALUES	17
<b>13. REFERENCES</b>	<b>18</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>18</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von **Thymulin** in Serum und Thymusextrakt geeignet. Nur zu wissenschaftlichen Zwecken.

## 2. EINLEITUNG

Der Thymus ist als vielseitiges Regulationsorgan zu verstehen. Neben den Funktionen zur Aufrechterhaltung der Immunabwehr (1) sind auch Einflüsse auf das Zentralnervensystem, das Endokrinium bzw. Neuroendokrinium (2) beschrieben. Die Wirkungen werden über sekretierte Einzelpeptide wie Thymulin oder die Thymosine vermittelt. Das **Thymulin** liegt in seiner aktiven Form als Zinkkomplex vor (3-5) und wirkt auf T-Lymphozyten und deren Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (6). Die Regulation der Thymulinsekretion aus dem Thymusepithel ist von Hypophysenhormonen abhängig. Andererseits übt das Thymulin lebenswichtige Funktionen innerhalb des neuroendokrinen Systems aus. Die Indikationen des Thymulins sind folglich sehr vielseitig.

### Indikationen

- Immunstörungen oder Immundefizienzen, z.B. Leukämien oder AIDS
- Autoimmunerkrankungen, z.B. systemischer Lupus erythematodes, rheumatoide Arthritis, multiple Sklerose
- zinkabhängige Erkrankungen, z.B. Morbus Crohn
- Störungen des Endokriniums
- Qualitätskontrolle von Thymuspräparaten

## 3. TESTPRINZIP

Der vorliegende Enzymimmunoassay (EIA) zur Quantifizierung von Thymulin basiert auf immobilisierten, polyklonalen Kaninchenantikörpern. Das Thymulin aus den Serumproben oder Thymusextrakten konkurriert mit einem biotinylierten Thymulin-Tracer um die Bindungsstellen. Der Nachweis erfolgt über Streptavidinmarkierte Peroxidase und die Umsetzung des entsprechenden Substrates.

#### 4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Etikett	Kit Komponenten	Menge
K 9810MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	96
K 9810WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	1x 100 ml
K 9810AP	ASYBUF	Assaypuffer	1 x 100 ml
K 9810T	TRACER	Tracer (Biotinyliertes Thymulin), lyophilisiert	1 x 1 vial
K 9810K	CONJ	Konjugat (POD Streptavidin), gebrauchsfertig	22 ml
K 9810ST	STD	Standards, lyophilisiert (0; 0.03; 0.13; 0.64; 3.2; 16 ng/ml)	3 x 6 vials
K 9810KO	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	3 x 1 vial
K 9810TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	2 x 15 ml
K 9810AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

#### 5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 5 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 oder 405 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

## 6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte 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 3x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Der **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnen (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Der **WASHBUF** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Der lyophilisierte **TRACER** (Tracer, biotinyliertes Thymulin) wird bei 2-8 °C gelagert. Der lyophilisierte **TRACER** wird in **6 ml** aqua bidest. rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. Der rekonstituierte Tracer wird **bei -20 °C gelagert**. Er ist bei -20 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) haltbar.
- Die lyophilisierten **STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrolle) werden mit **150 µl** aqua bidest. rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Standards und Kontrolle sind 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.

## 7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid bzw. Thimerosal 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 verwendet 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 Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

## 8. PROBENVORBEREITUNG

### Serum

Serumproben werden **unverdünnt** eingesetzt. Das Probenmaterial bis zur Verwendung bei  $-20\text{ °C}$  lagern.

### Thymusextrakte

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

## 9. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Hinweise*

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen während den Inkubationen mit Folie abdecken.
- Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien vermeiden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

## Pipettierschema

Die PLATE (vorbeschichtete Mikrotiterplatte) vor Gebrauch **5x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.

Die Bestimmungen sind in der PLATE (Mikrotiterplatte) in Doppelwerten durchzuführen.

1. **50 µl STD** (Standards), **CTRL** (Kontrolle) oder **Proben** und **150 µl ASYBUF** (Assaypuffer) in die Vertiefungen in Doppelbestimmungen pipettieren.
2. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
3. **50 µl TRACER** (Tracer, Biotinyliertes Thymulin) pro Vertiefung pipettieren.
4. **16-20 Stunden** bei 2 – 8 °C unter Schütteln inkubieren.
5. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
6. **200 µl CONJ** (Konjugat, Streptavidin-POD) pro Vertiefung pipettieren.
7. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
8. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
9. **200 µl SUB** (TMB-Substrat) pro Vertiefung pipettieren.
10. **15 ±5 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren bis ausreichend große Farbdifferenzen eingetreten sind.
11. **50 µl STOP** (Stopplösung) zusetzen und kurz mischen.
12. **Extinktion sofort** im Mikrotiterplattenphotometer bei **450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Sollte die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigen, sofort bei 405 nm gegen 620 nm (oder 690 nm) messen.



## **10. ERGEBNISSE**

Zur Auswertung des Testes empfehlen wir die 4-Parameter-Funktion. Alternativ kann auch eine Punkt-zu-Punkt-Auswertung oder eine gewichtete Spline-Funktion gewählt werden. Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte diese der Operator durchführen.

## **11. EINSCHRÄNKUNGEN**

Proben mit hohen Thymulin Konzentrationen, die außerhalb der Standardkurve liegen, sollen mit Puffer verdünnt und nochmals bestimmt.

## **12. QUALITÄTSKONTROLLE**

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von kommerziell erhältlichen Kontrollen (wenn vorhanden) für die interne Qualitätskontrolle.

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

### *Erwartete Ergebnisse*

#### **Referenzbereich**

Die Referenzwerte bei gesunden Menschen sind stark altersabhängig. Die höchsten Werte zeigen sich bei Neugeborenen und ab dem 20. Lebensjahr sinken die Serumwerte ab.

Wir empfehlen jedem Labor eigenen Referenzbereich für verschiedene Altersgruppen zu etablieren.

## 13. 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  $\alpha$ 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  $\alpha$ 1/Interleukin-2 or Thymosin  $\alpha$ 1/Interferon  $\alpha$ ,  $\beta$  Following Cyclophosphamide in Mice Injected with Highly Metastatic Friend Erythroleukemia Cells.  
**Garaci et al.** (1993) *J Immunotherapy* 13:7-17
5. Determination of Thymosin  $\alpha$ 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  $\alpha$ 1 in patients with lung cancer.  
**Schulof et al.** (1985) *Journ.Biol.resp.Med.*4,147-158

## 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in vitro* Diagnostik verwendet 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 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 zurück zu senden.

**Verwendete Symbole:**

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>  
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Manual

# Thymulin EIA Kit

*For the in vitro determination of thymulin in serum and thymus extract*

*For research use only*

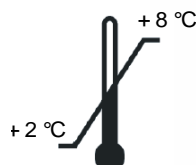
Valid from 14.04.2009



K 9810



96



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim  
Tel.: ++49 6251 70190-0  
Fax: ++ 49 6251 849430  
e.mail: [Info@immundiagnostik.com](mailto:Info@immundiagnostik.com)  
[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

## 1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is intended for the quantitative determination of **Thymulin** in serum and thymus preparations. It is for research use only.

## 2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

The thymus regulates multiple functions. It is mainly responsible for the immune reactions. In addition, it influences the central nervous system and the endocrinium by the secretion of single peptides like Thymulin and Thymosines. **Thymulin** is only active as a zinc complex, and acts on T-lymphocytes and their precursor stem cells. The secretion of Thymulin is regulated by the pituitary gland.

### Indication

- Immune dysfunction and immune deficiencies, e.g. leukaemia, AIDS
- Autoimmune disease, e.g. systemic Lupus erythematoses, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis
- Zinc dependent diseases, e.g. Morbus Crohn
- Dysfunction of the endocrinium
- Quality control of thymus preparations

## 3. PRINCIPLE OF THE TEST

This enzyme immuno assay (EIA) can be used for the determination of **Thymulin** in serum and thymus preparations.

The test principle is based on a competition between the antigen in the sample or standards and biotinylated thymulin as a tracer for the binding sites of anti-**Thymulin** antibodies coated on the wells of the microplate. A peroxidase-conjugated streptavidin 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 the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from the standards. **Thymulin** present in the patient samples is determined directly from this curve.

#### 4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Label	Kit Components	Quantity
K 9810MTP	PLATE	Microtiter plate, precoated	12 x 8 wells
K 9810WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	1 x 100 ml
K 9810AP	ASYBUF	Assay buffer	1 x 100 ml
K 9810T	TRACER	Tracer (Biotinylated Thymulin), lyophilized	1 x 1 vial
K 9810K	CONJ	Conjugate (streptavidin-peroxidase-labeled), ready to use	22 ml
K 9810ST	STD	Calibrators, lyophilized (0; 0.03; 0.13; 0.64; 3.2; 16 ng/ml)	3 x 6 vials
K 9810KO	CTRL	Control, lyophilized	3 x 1 vial
K 9810TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine)	2 x 15 ml
K 9810AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

#### 5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Precision pipettors calibrated and tips to deliver 5-1000 µl
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 or 405 nm (reference wave length 620 or 690 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 3 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.
- The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at 37°C in a water bath before dilution of the buffer solutions. The **WASHBUF** 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 one month**.
- The lyophilized **TRACER** (tracer, biotinylated Thymulin) must be stored at **2-8 °C**. The lyophilized **TRACER** must be reconstituted with **6 ml** aqua bidest. Allow the vial to stand for minimum 10 minutes and then mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. The reconstituted tracer must be **stored at -20°C**. The reconstituted tracer is stable at -20°C until the expiry date stated on the label.
- The lyophilized **STD** (standards) and **CTRL** (control) must be reconstituted with **150 µl** aqua bidest. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. **Reconstituted standards and control are 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**.

## 7. 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 thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.

- Stop solution is composed of sulphuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.

## 8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

### 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.

## 9. ASSAY PROCEDURE

### *Procedural notes*

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- 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.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.



### *Test procedure*

Wash the PLATE (precoated microtiter plate) **5 x with 250 µl** diluted wash buffer. Carry out the tests in duplicate.

1. Pipette **50 µl** of **STD** (standards), **CTRL** (control) or **samples** and **150 µl** of the **ASYBUF** (assay buffer) into each well.
2. Incubate for **1 hour** at room temperature shaking on a horizontal mixer.
3. Add **50 µl** of the **TRACER** (tracer, biotinylated thymulin) into each well, shake gently.
4. Incubate for **16 -20 hours** at 2-8°C shaking on a horizontal mixer.
5. Decant the contents of the plate and wash the wells **5 x with 250 µl** of diluted wash buffer.
6. Add **200 µl** of **CONJ** (conjugate) solution into each well.
7. Incubate for **1 hour** at room temperature shaking on a horizontal mixer.
8. Decant the contents of the plate and wash the wells **5 x with 250 µl** of diluted wash buffer.
9. Add **200 µl** of **SUB** (TMB-substrate) solution
10. Incubate for **15 ± 5 min** at room temperature in the dark until sufficient coloring is achieved.
11. Add **50 µl** of **STOP** (stop solution) and mix shortly.
12. 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 measurement range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm (or 690 nm) as reference.

## 10. RESULTS

A calibration curve is constructed from the calibrators. Commercially available software can be used as well as graph paper. Results of the samples are read from this calibration curve.

THE CALIBRATION CURVE IS NOT LINEAR, therefore a spline- or 4PL algorithm is recommended.

## 11. LIMITATIONS

Samples with levels greater than the highest standard value, should be diluted and re-assayed.

## 12. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends commercially control samples as internal quality control.

**Control samples** should be analyzed 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.

### *Expected values*

#### **Reference range**

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

We recommend each laboratory to establish its own baseline values.

## 13. 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  $\alpha$ 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  $\alpha$ 1/Interleukin-2 or Thymosin  $\alpha$ 1/Interferon  $\alpha$ ,  $\beta$  Following Cyclophosphamide in Mice Injected with Highly Metastatic Friend Erythroleukemia Cells.  
**Garaci et al.** (1993) *J Immunotherapy* 13:7-17
5. Determination of Thymosin  $\alpha$ 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  $\alpha$ 1 in patients with lung cancer.  
**Schulof et al.** (1985) *Journ.Biol.resp.Med.*4,147-158

## 14. 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.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.
- 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 wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

**Used symbols:**

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for &lt;n&gt; tests



Manufacturer



Use by



Lot number