



Produktinformation

hAmyloid β 42 ELISA

Mikrotiterplatten Enzym-Immunoassay
für die quantitative Detektion von Amyloid β 42
in humaner Cerebrospinalflüssigkeit (hCSF)

Nur für *in vitro* Gebrauch!

Product Information

hAmyloid β 42 ELISA

Microtiter plate Enzyme-Immunoassay
for the quantitative detection of Amyloid β 42
in human cerebrospinal fluid (hCSF)

For *in vitro* use only!

Testvorschrift in Verbindung mit Test-Kit **LOT** 2_014

DIAGN_P_7012.01, 12.07.04



the **GENETICS** company

Wagistrasse 27
CH-8952 Schlieren, Switzerland

Tel.: +41-44-200 22 00
Fax: +41-44 200 22 11

eMail: diagnostics@the-genetics.com
www.the-genetics.com

KENNZEICHEN DES A β 40 ELISA

- Quantitative Detektion von humanem Amyloid β 42 in cerebrospinaler Flüssigkeit (CSF)
- Selektive Bestimmung von A β 42 mit monoklonalen Antikörpern
- Messbereich von 100 bis 2000 pg/ml
- Hohe Reproduzierbarkeit und Linearität der Standardgerade
- Vorbeschichtete Streifen (12x8) für die flexible Anpassung an ein individuelles Probenaufkommen
- Kleines Probenvolumen (50 μ l)

ANWENDUNG

Der Test eignet sich für die selektive Bestimmung des Peptides Amyloid β 42 (A β 42) in humanen Liquorproben, welches in Kombination mit dem Peptid A β 40 als ein Biomarker im Verlauf der Alzheimer Krankheit gilt. Die „A β -Ratio“ eines Patienten, die als ein wichtiger Parameter bei der Risikobestimmung einer Alzheimerschen Demenz im Rahmen des gesamten Patientenbildes diskutiert wird (s. Literatur S.26), kann aus der Bestimmung des A β 42-Wertes in Kombination mit dem A β 40-Wert (hAmyloid β 40 ELISA, The Genetics Company) berechnet werden.

Der Amyloid β 42 ELISA deckt mit einer „Eichgerade“ basierend auf 7 abgestuften Standardkonzentrationen einen Messbereich von 100 bis 2000 pg/ml ab. Der Test ist somit optimal auf die zu erwartenden A β 42-Konzentrationen in humanem Liquor adaptiert (s. Tab. u.). Aufgrund der hohen Sensitivität des Testsystems werden die Proben direkt im Test eingesetzt.

Für die Anwendung des Testes ist gemäß der „Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (01.01.2002)“ vorzugehen; z.B. sind für jede Probe Mehrfachbestimmungen durchzuführen.

A β 42-Konzentration in humanem Liquor (s. Lit. S.26)	Testbereich
200-1300 pg/ml	100-2000 pg/ml

PRINZIP

Bei diesem Amyloid β Test-Kit wird das Prinzip eines Festphasen-Enzym-Immunoassays, eines sogenannten Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assays (ELISA), zur quantitativen Bestimmung von hA β 42 angewendet. Das zu testende Antigen hA β 42 wird durch monoklonale Anti-A β -Antikörper erfasst, die selektiv an zwei unterschiedlichen Bindungsstellen (Epitopen) binden und so einen „Sandwich-Komplex“ bilden. Die Polystyroloberfläche der Mikrotiterplatte ist bereits mit einem Antikörper (Fangantikörper) beschichtet, der selektiv das N-terminale Ende des Antigens erkennt. Während der Testdurchführung wird ein Anti-A β 42-Antikörper-Biotinkonjugat (Detektionsantikörper) zusammen mit dem Standard bzw. den Proben inkubiert und bildet einen Antikörper-Amyloid-Antikörper-Komplex. Dieser Komplex wird im nächsten Schritt indirekt über eine Biotin-Streptavidin-Bindung mit einem Enzym gekoppelt. Das Enzym katalysiert in einer Folgereaktion die Umwandlung eines Substrates (Chromogen) zu einem farbigen Produkt, dessen Farbintensität photometrisch bestimmt wird. Die gemessene Extinktion korreliert direkt mit der Konzentration an hA β 42 in der Probe. Durch Vergleich mit einer Standardgerade aus synthetischem Peptid Amyloid β 1-42 wird eine quantitative Auswertung der Proben ermöglicht.

TEST-KIT INHALT

- **1 x Produktinformation (Testanleitung)**
- **1 x Test-plate (12 strips à 8 well) = Testplatte (12 Streifen à 8 Kavitäten)**
antikörperbeschichtete Mikrotiterplatte, verpackt à 2x6 Streifen in einem Aluminiumbeutel, gebrauchsfertig
- **2 x synthetic AB1-42 Standard = synthetischer AB1-42 Standard**
100 µl (1000 ng/ml), zur Herstellung der „Eichgerade“ mit Standard & Sample Diluent

Dieser Standard wird getrennt bei -20°C verschickt!!

- **1 x Standard & Sample Diluent = Standard- & Proben-Verdünnungslösung**
25 ml, gebrauchsfertig, zur Verdünnung der Standards bzw. der Proben
- **1 x Antibody Conjugate (100x) = Antikörper-Konjugat**
100 µl, 100-fach konzentriert, vor Gebrauch 1:100 mit Antibody Conjugate Diluent verdünnen
- **1 x Antibody Conjugate Diluent = Antikörper-Konjugat-Verdünnungslösung**
8 ml, gebrauchsfertig, zur Verdünnung von Antibody Conjugate
- **1 x Enzyme Conjugate (100x) = Enzym-Konjugat (Streptavidin-Peroxidase-Konjugat)**
150 µl, 100-fach konzentriert, vor Gebrauch 1:100 mit Enzyme Conjugate Diluent verdünnen
- **1 x Enzyme Conjugate Diluent = Enzym-Konjugat-Verdünnungslösung**
13 ml, gebrauchsfertig, zur Verdünnung von Enzyme Conjugate
- **2 x Washing Solution (20x) = Waschlösung**
2 x 25 ml, 20-fach konzentriert, vor Gebrauch 1:20 mit deionisiertem Wasser verdünnen
- **1 x Substrate Solution = Substratlösung (TMB-Wasserstoffperoxid-Gemisch)**
13 ml, gebrauchsfertig
- **1 x Stop Solution = Stopplösung (1 M Schwefelsäure)**
8 ml, gebrauchsfertig
- **4 x Cover Seal = Abdeckfolie**

BENÖTIGTE MATERIALIEN (NICHT IM TEST-KIT ENTHALTEN)

Zusätzlich zu den im Test-Kit enthaltenen Reagenzien werden folgende Materialien zur Durchführung des ELISA-Tests benötigt:

- Deionisiertes Wasser zur Verdünnung der Washing Solution
- Variable Präzisionspipetten (geeignet für Volumina von 10 µl bis 1000 µl) *
- Vortex-Mischer
- Stoppuhr
- Mikrotiterplatten-Schüttler
- Mikrotiterplatten-Waschgerät *
- Mikrotiterplatten-Photometer ("ELISA-Reader")
- Eis und Eisbehälter für die Probenvorbereitung

* Um durch parallele Arbeitsschritte und gleiche Inkubationszeiten eine hohe Reproduzierbarkeit zu erzielen, empfehlen wir den Gebrauch von Multikanalpipetten und automatischen Plattenwaschgeräten.

SICHERHEITSHINWEISE

- Der Test-Kit ist gemäß den geltenden Sicherheitsbestimmungen und Qualitätsansprüchen hergestellt worden. Er entspricht den grundlegenden Anforderungen der europäischen Richtlinie 98/79/EG für *in vitro* Diagnostika.
- Während des Umgangs mit Probenmaterial sowie im Verlauf der gesamten Testdurchführung sollten Laborkleidung und Laborhandschuhe getragen werden, um einer Infektion durch Probenmaterial vorzubeugen. (Der Test-Kit selbst enthält kein infektiöses Material!). Kontaminierte Bereiche müssen desinfiziert werden.
- Die **Stopplösung (Stop Solution)** besteht aus verdünnter Schwefelsäure (1 M) und ist reizend. Beachten Sie die folgenden Sicherheitsvorschriften:
R36/38 Reizt die Augen und die Haut
S26 Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und Arzt konsultieren
S45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen.
- Proben und Test-Kit-Komponenten müssen entsprechend den geltenden Sicherheitsvorschriften für Laboratorien entsorgt werden.

HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG UND LAGERUNG

- Der hAmyloid B42 ELISA ist nur für den *in vitro* Gebrauch bestimmt.
- Die Vorschriften in dieser Testanleitung sollten sorgfältig gelesen und genau beachtet werden. Die Testdurchführung und Datenauswertung sollte stets durch entsprechend qualifiziertes Personal erfolgen.
- Alle Test-Kit-Komponenten sind bis zum Testeinsatz bei 2 bis 8 °C, die Standards bei ≤ -20 °C zu lagern und dürfen nur bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendet werden. Nicht verwendete Testreagenzien sollten bei 2 bis 8 °C, angebrochene Teststreifen einer geöffneten Aluminiumpackung max. 14 Tage (im Aluminiumbeutel mit dem beigefügten Trockenmittel) gelagert werden.
- Reagenzien aus verschiedenen Test-Kits dürfen nicht untereinander ausgetauscht werden.
- Einige Testbestandteile sind Konzentrate. Nach Herstellung der entsprechenden Gebrauchsverdünnung beträgt deren Verfallsdatum 14 Tage (bei 2-8 °C). Die Standardverdünnungen müssen jeweils direkt vor Testbeginn hergestellt werden.
- Zur Kalibrierung des Testsystems (Standard) sollten die Standardverdünnungen entsprechend der beigefügten Anleitung hergestellt werden. Die daraus resultierende interne Standardgerade ist fester Bestandteil jeder Messung. Eine Übertragung der Absorptionsdaten von einer Testplatte auf die andere ist nicht zulässig.
- Die Ergebnisse sind nicht auswertbar, sofern der Standard 1 (2000 pg/ml) im Test eine Absorption unterhalb 0.6 anzeigt.
- Das Pipettieren aller Testkomponenten, speziell der Standardverdünnungen und der Proben, sollte ohne zeitliche Verzögerungen durchgeführt werden. Um Kreuzkontaminationen und Reagenzienverschleppungen zu vermeiden, sind für jede Probe saubere Pipettenspitzen zu verwenden.
- Das Auftragen der Reagenzien und Proben startet bzw. stoppt kinetische Reaktionen. Um eine möglichst hohe Präzision im Test zu erzielen, sollte jede Position auf der Mikrotiterplatte gleich behandelt werden.
- Nach dem jeweils letzten Waschschrift sollten die Platten gründlich ausgeklopft werden, um Flüssigkeitsreste aus den Plattenvertiefungen (Kavitäten) vollständig zu entfernen.

WICHTIGES ZUR PROBEN- UND TESTVORBEREITUNG



Wir empfehlen, sich jeweils nur die für die Testdurchführung benötigten Gebrauchslösungen herzustellen, da deren Haltbarkeit nach der Verdünnung auf 14 Tage begrenzt ist. Die Testplatte ist für die flexible Anpassung an die Probenmenge in Streifen à 8 Kavitäten unterteilt.

Die Stabilität von Amyloid β in Liquor ist kritisch. Aufgrund des geringen Proteingehaltes in Liquor neigen die Peptide zur Aggregation. Aus diesem Grund kommt der präanalytischen Probenbehandlung innerhalb der Analytik von amyloiden Peptiden eine entscheidende Bedeutung zu. Liquorproben sollten nach einer standardisierten Prozedur gesammelt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Bei der Bearbeitung der aufgetauten Proben ist es wichtig, diese kühl zu halten (z.B. Arbeiten auf Eis). Eine Standardarbeitsprozedur für die Probenentnahme kann bei The Genetics Company erfragt werden.



Für die Vorbereitung der Proben werden Gefäße aus Polypropylen (PP) empfohlen, um Wechselwirkungen mit Lagermaterialien zu vermeiden.



Wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Proben und Standards ist zu vermeiden



Die Test-Kit-Komponenten sind für die Messung von Liquorproben adaptiert. Der Test-Kit kann für Forschungszwecke auch auf andere Probenmaterialien (Zellkultur, Hirnlysat etc.) angewandt werden, die z.T. eine Veränderung der Testprozedur erfordern; spezielle Testanpassungen für diese Probenanwendungen können bei The Genetics Company erfragt werden.

In den meisten Fällen liegt die A β 42-Konzentration von humanen Liquorproben im Messbereich des Test-Kits von 100 bis 2000 pg/ml. Deshalb wird empfohlen, die Probe direkt ohne weitere Verdünnung auf die Testplatte aufzutragen.

HUMAN AMYLOID β 42 ELISA - KURZFASSUNG

Der Test-Kit enthält alle zur Durchführung notwendigen Testbestandteile.

Die antikörperbeschichtete Mikrotiterplatte ist vakuumverpackt und gebrauchsfertig.

Nach der Testvorbereitung (Standard- und gegebenenfalls Probenverdünnung) besteht der Testablauf aus folgenden Schritten (s. Graphik S.12):

1. (Tag 1) Zugabe von Antikörperkonjugat und Standards bzw. Proben auf die Testplatte; Inkubation.
2. (Tag 2) Testplatte waschen und Zugabe von Enzymkonjugat-Verdünnung; Inkubation.
3. (Tag 2) Testplatte waschen und Zugabe von Enzymsubstrat; Inkubation.
4. (Tag 2) Zugabe von Stopplösung, Absorptionsmessung und Auswertung der Ergebnisse.

TESTPROTOKOLL TAG 1

Benötigte Test-Kit-Komponenten:

- Teststreifen à 8 Kavitäten
- Standard & Sample Diluent
- Synthetic AB 1-42 Standard
- Antibody Conjugate (100x)
- Antibody Conjugate Diluent



Wir empfehlen die Gebrauchsverdünnungen der Reagenzien erst unmittelbar vor ihrer Verwendung herzustellen.



Die Standardverdünnungen und Proben sollten während der gesamten Testdurchführung gekühlt werden (<4 °C, Arbeiten auf Eis!), um deren Stabilität und optimale Messergebnisse zu gewährleisten!



Unmittelbar vor ihrer Auftragung auf die Testplatte sind die Proben und Standards gründlich zu mischen (vortexen). Ein exaktes Mischen und Pipettieren der Standardlösung ist entscheidend für die Präzision der Messergebnisse.

Testvorbereitung Tag 1

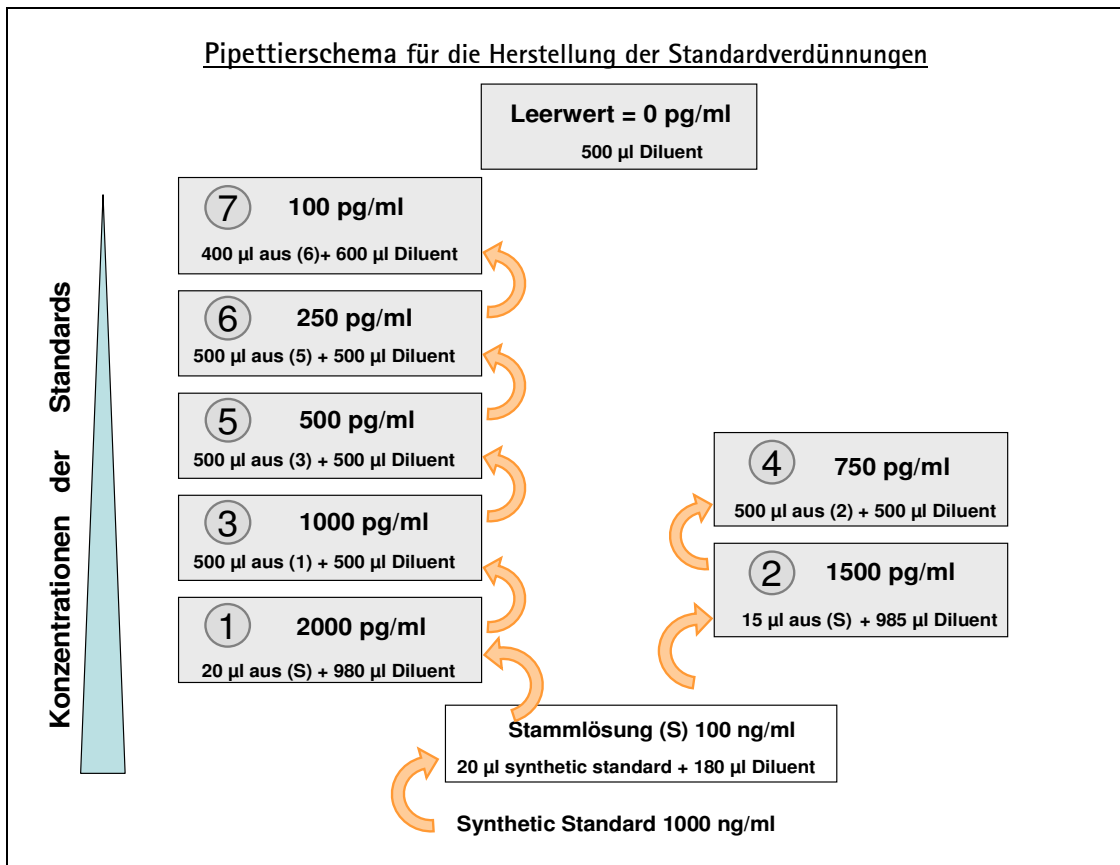
Mit Hilfe der beigegeführten Vorlage (S. 25) einer Mikrotiterplatte können die Proben entsprechend der gedachten Position zur einfacheren Probenkennzeichnung auf der Platte eingetragen werden.

- Herstellung der Standardverdünnungen:

Der Test-Kit enthält eine Stammkonzentration des synthetischen Amyloid β 1-42 von 1000 ng/ml. Zur Herstellung der Standardverdünnungen hat sich folgendes Schema bewährt:

- Arbeiten auf Eis! -

Standard	Konzentration von AB1-42	Volumen des Standard & Sample Diluent	Volumen der Standard-Lösung
Original	1000 ng/ml	synthetic standard	100 μ l aliquot
Stammlösung (S)	100 ng/ml	180 μ l	20 μ l Original
Standard 1	2000 pg/ml	980 μ l	20 μ l Stammlösung (S)
Standard 2	1500 pg/ml	985 μ l	15 μ l Stammlösung (S)
Standard 3	1000 pg/ml	500 μ l	500 μ l Standard 1
Standard 4	750 pg/ml	500 μ l	500 μ l Standard 2
Standard 5	500 pg/ml	500 μ l	500 μ l Standard 3
Standard 6	250 pg/ml	500 μ l	500 μ l Standard 5
Standard 7	100 pg/ml	600 μ l	400 μ l Standard 6
Leerwert	0 pg/ml	500 μ l	0



DEUTSCH

- Herstellung der Antikörper-Konjugatverdünnung:

Antibody Conjugate (100x) 1:100 mit Antibody Conjugate Diluent verdünnen.

Beispiel: 60 µl Antibody Conjugate (100x) + 5940 µl Antibody Conjugate Diluent = 6000 µl

Testschritte Tag 1:

1. 50 µl Antikörper-Konjugatverdünnung pro Kavität pipettieren.
2. 50 µl Standard beziehungsweise 50 µl Probe pro Kavität pipettieren.
Hinweis: Die Proben sind ohne zeitliche Verzögerung unmittelbar nach Auftragung der Standards zu pipettieren.
3. Testplatte anschließend mit Abdeckfolie versehen, ca. 5 min auf Schüttler mischen und über Nacht bei 2 bis 8 °C inkubieren.



Testreagenzien für die Testschritte des Folgetages können an dieser Stelle bereits aus der Kühlagerung entnommen werden, um über Nacht auf Raumtemperatur zu temperieren!

TESTPROTOKOLL TAG 2

Benötigte Test-Kit-Komponenten:

- Washing Solution (20x)
- Enzyme Conjugate (100x)
- Enzyme Conjugate Diluent
- Substrate Solution
- Stop Solution



Achtung! Alle Reagenzien außer dem Enzyme Conjugate müssen auf Raumtemperatur temperiert sein!

Testvorbereitung Tag 2

- Herstellung der Waschlösung:

Washing Solution (20x) 1:20 mit deionisiertem Wasser verdünnen.

Beispiel: 50 ml Washing Solution (20x) + 950 ml deionisiertes Wasser = 1000 ml

- Herstellung der Enzym-Konjugatverdünnung:

Enzyme Conjugate (100x) 1:100 mit Enzyme Conjugate Diluent verdünnen .

Beispiel: 110 µl Enzyme Conjugate (100x) + 10890 µl Enzyme Conjugate Diluent = 11000 µl

Testschritte Tag 2

1. Testplatte 5 x mit 300 µl Waschlösung pro Kavität waschen, Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen der Platte auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
2. 100 µl Enzym-Konjugatverdünnung pro Kavität pipettieren, Testplatte mit Abdeckfolie versehen und 30 min bei Raumtemperatur (20 bis 28 °C) auf einem Schüttler inkubieren (800 U/min).
3. Testplatte 5 x mit 300 µl Waschlösung pro Kavität waschen, Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen der Platte auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
4. 100 µl Substrate Solution pro Kavität pipettieren und **25 bis 30 min** bei Raumtemperatur (20 bis 28 °C) inkubieren. Bitte verkürzen Sie diese Zeit, falls Ihr ELISA-Reader einen begrenzten Messbereich z.B. Absorptionslimit 2.5 aufweist. (Siehe typische Absorptionsdaten S. 8)
ACHTUNG! VOR LICHT GESCHÜTZT INKUBIEREN!
5. 50 µl Stop Solution pro Kavität in der gleichen Reihenfolge wie im vorangegangenen Testschritt pipettieren.
ACHTUNG! STOPPLÖSUNG BEINHALTET SÄURE, DESHALB VORSICHTIG HANDHABEN!
6. Absorption bei 450 nm (Referenzwellenlänge 620–650 nm) innerhalb von 15 min am Mikrotiterplatten-Photometer messen.

ERGEBNISSE

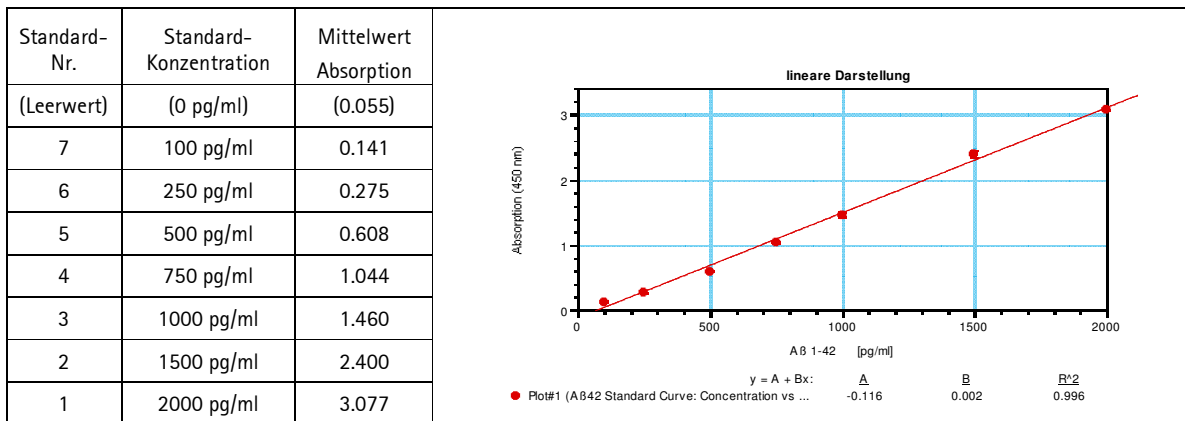
Die weitere Bearbeitung (Mittelwert, Standardabweichung) der Absorptionsdaten der Standards und der Proben erfolgt mit einer handelsüblichen Software für Mikrotiterplatten-Photometer.

Der Leerwert (Nullstandard) ist nicht Teil der Standardgeraden und wird deshalb nicht mit in die Berechnung der Standardgeraden einbezogen. Er dient lediglich zur Kontrolle unspezifischer Bindungen; sein Absorptionsmittelwert sollte < 0.2 liegen.

Die Standardgerade wird durch Übertragung der Absorptionsmittelwerte der Standards 1-7 auf die vertikale Achse eines Koordinatensystems gegen die entsprechenden Aβ1-42-Konzentrationen der horizontalen Achse erhalten. Bei linearer Darstellung der Messdaten ergibt sich eine Standardgerade, deren Position, Steigung und Korrelation mit Hilfe der linearen Regression errechnet wird. Liegt der Korrelationskoeffizient unterhalb 0.98, kann die Korrelation durch Verkürzung des Auswertebereichs verbessert werden (z.B. 100-1500 pg/ml oder 250-2000 pg/ml). Die Ergebnisse sind nicht auswertbar, sofern der Standard 1 (2000 pg/ml) im Test eine Absorption unterhalb 0.6 anzeigt. Bitte kontrollieren Sie in diesem Falle Ihre Testdurchführung (Liste möglicher Fehler S. 10).

DEUTSCH

Typische Absorptionswerte einer Standardgeraden*



Mit Hilfe dieser Standardgerade wird die Aβ42-Konzentration der jeweiligen Probe in [pg/ml] errechnet (In einer Studie von Jensen *et al.*¹ konnten nahezu alle Proben ohne weitere Verdünnungen bestimmt werden.). Dabei können nur solche Probenmesswerte zur Auswertung herangezogen werden, die im Auswertebereich der Standardgerade liegen.

Liegen die Messwerte der Proben oberhalb von 2000 pg/ml, sollte die Probe nochmals in einer höheren Verdünnung (mit Standard & Sample Diluent) gemessen werden.

Der dimensionslose Parameter Aβ-Ratio, der sich bei der Unterstützung der frühzeitigen Erkennung von Risikopatienten einer Alzheimer Krankheit als hilfreich erwiesen hat, wird in Kombination mit den Daten aus dem Amyloidβ40 ELISA (Messung aus der gleichen Probe) erhalten.

$$\text{A}\beta\text{-Ratio} = \frac{\text{A}\beta42}{\text{A}\beta40} \times 10$$

Basierend auf internen klinischen Studien kann eine erste Einteilung erfolgen nach:

Aβ-Ratio	<1.0	Verstärktes Risiko einer Alzheimer Krankheit
Aβ-Ratio	1.0-1.5	Grenzbereich; Nachuntersuchung empfohlen
Aβ-Ratio	>1.5	kein erkennbares Risiko einer Alzheimer Krankheit

Infolge der weiteren Integration des Parameters Aβ-Ratio in die klinische Diagnostik sind geringe Änderungen dieser Aβ-Ratio Werte bei der Risikobeurteilung in der Zukunft nicht ausgeschlossen.

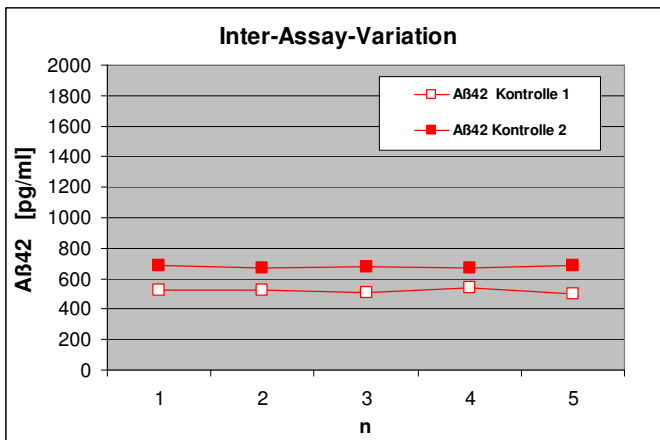
SENSITIVITÄT

Die Nachweisgrenze des Amyloid B42-ELISA liegt bei 100 pg/ml.

PRÄZISION

Anhand von Standardgeraden wurde eine Intra-Assay-Variation (auf derselben Testplatte) von <6 % beziehungsweise eine Inter-Assay-Variation (zwischen unterschiedlichen Testplatten) von <8 % bestimmt.

Die folgenden Inter-Assay-Ergebnisse wurden bei unterschiedlichen Testmessungen (n=5) anhand von Liquor-Kontrollproben erhalten:*



hAβ42	Mittelwert [pg/ml]	Std. Dev [pg/ml].	CV [%]
Kontrolle 1	520	11	2.0
Kontrolle 2	678	9	1.3

SPEZIFITÄT

Der Amyloid B ELISA verwendet monoklonale Anti-Aβ Antikörper mit hoher Selektivität für humanes Aβ. Der im Test verwendete Detektionsantikörper erkennt das C-terminale Ende von Amyloid B1-42, was eine hohe Selektivität gegenüber Aβ42 bewirkt.

Das Aβ42 ELISA-Testsystem wird nicht durch die im humanen Liquor zu erwartenden Aβ40-Konzentrationen beeinflusst. Die Kreuzreaktivität der im Test verwendeten Antikörper zu anderen amyloiden Peptiden wurde mittels ELISA und BIACORE untersucht, wobei sich keine signifikante Kreuzreaktivität zu Aβ1-38, Aβ1-39, Aβ1-40, Aβ1-43 und Aβ1-44 zeigte.*

* Alle Messungen in diesem Produktdatenblatt wurden mit Mehrkanalpipetten und automatischen Mikrotiterplatten-Waschgeräten als Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Literatur

Siehe Seite 26

Mögliche auftretende Fehler und ihre Beseitigung

Problem	Möglicher Fehler	Empfehlung zur Fehlerbeseitigung
<i>Kein Messsignal</i>	Reagenzien vertauscht	Vergewissern Sie sich, dass nur die für die Test-Charge mitgelieferten Reagenzien verwendet wurden.
	Testreagenzien unbrauchbar	Vergewissern Sie sich, dass die Lagerungskette nicht unterbrochen wurde (Test bei 2 bis 8 °C, Standard getrennt bei -20 °C lagern); Test-Kits sollten nur bis zu dem angegeben Verfallsdatum verwendet werden.
<i>Schwaches Messsignal</i>	Reagenzien in der falschen Verdünnung verwendet	Stellen Sie sicher, dass die im Test empfohlenen Testverdünnungen (meist 1:100) benutzt wurden.
	Unpassende Filter	Überprüfen Sie die Wellenlänge der benutzten Filter in Ihrem Mikrotiterplatten-Photometer.
	Zu kurze Inkubationszeiten / zu niedrige Temperatur	Überprüfen Sie die Angaben zu den jeweiligen Inkubationszeiten im Produktdatenblatt Ihrer Test-Charge (die Referenzangabe für die Substratinkubation gilt für Temperaturen von 20 bis 28°C!). Verlängern Sie die Substratinkubationszeit, wenn die Absorption unter 1.0 beträgt (Sollwerte S. 8).
	Reagenzien nicht temperiert	Stellen Sie sicher, dass die für Tag 2 verwendeten Reagenzien vor dem Testeinsatz auf Raumtemperatur (20 bis 28 °C) temperiert wurden.
	Natriumazid, Mercaptoethanol und DTT können bei hohen Konzentrationen mit der Peroxidaseaktivität interferieren	Benutzen Sie nur Proben, die kein oder wenig Natriumazid, Mercaptoethanol oder DTT (<0.1 %) enthalten.
<i>Hohes Messsignal</i>	Reagenzien in der falschen Verdünnung verwendet	Stellen Sie sicher, dass die im Test empfohlenen Testverdünnungen (meist 1:100) benutzt wurden.
	Zu lange Inkubationszeit / zu hohe Inkubationstemperatur	Überprüfen Sie die Angaben zu den jeweiligen Inkubationszeiten im Produktdatenblatt Ihrer Test-Charge (die Referenzangabe für die Substratinkubation gilt für Temperaturen von 20 bis 28°C!). Verkürzen Sie die Inkubationszeit, wenn die Absorption über 3.0 beträgt (Sollwerte S. 8).
<i>Hoher Hintergrund (Leerwert)</i>	Unzureichende Waschschrte	Testplatten gründlich waschen und dabei Waschlösungsreste zwischen den Waschschrten sorgfältig entfernen
	Verunreinigung der Waschlösung	Stellen Sie sicher, dass das Wasser nicht verunreinigt ist. Benutzen Sie immer doppelt destilliertes Wasser für die Rekonstitution und Herstellung der Waschlösung.
	Verunreinigung der Reagenzien oder Gefäße aus vorherigen Tests	Pipettieren Sie nicht direkt aus den Reagenzienflaschen, sofern Testbestandteile in weiteren Messungen noch einmal verwendet werden sollen. (Oxidativ aktive Substanzen können zu einer Eigenfärbung des Enzymsubstrates führen!)
	Reagenzien in der falschen Verdünnung verwendet	Stellen Sie sicher, dass die im Test empfohlenen Testverdünnungen für Antikörper- bzw. Enzym-Konjugat (1:100) eingesetzt wurden.

DEUTSCH

Problem	Möglicher Fehler	Empfehlung zur Fehlerbeseitigung
<i>Schlechte Präzision (=zufällige Fehler)</i>	Nicht-homogene Proben z.B. trübe Lösung, Partikel in der Probe	Stellen Sie sicher, dass die Proben nach einer anerkannten Probeentnahmeprozedur entnommen, bearbeitet und gelagert wurden (in Polypropylengefäßen bei -20 °C gelagerte klare Proben).
	Unvollständiges Mischen der Proben und Standards	Proben und Standards vor dem Pipettieren gründlich mischen.
	Variation beim Pipettieren	Überprüfen Sie die verwendeten Pipetten und kalibrieren Sie diese wenn nötig.
	Verschleppungsfehler zwischen Proben und Standards	Wechseln Sie die Pipettenspitzen nach <u>jedem</u> Pipettierschritt.
	Unvollständiges Mischen der Reagenzien während der Inkubation	Mischen Sie die Reagenzien auf der Testplatte nach jedem Pipettiervorgang durch vorsichtiges Bewegen der Testplatte. Benutzen Sie an den empfohlenen Testschritten einen Schüttler, um das vollständige Mischen der Reagenzien sicherzustellen.
	Unvollständiges Waschen	Stellen Sie sicher, dass das automatische Waschgerät richtig arbeitet. Flüssigkeitsreste müssen nach dem Waschen immer vollständig entfernt werden.
	Verdunstung von Flüssigkeiten	Überprüfen Sie die Fixierung der Adhäsionsfolie während der Inkubationszeiten.
<i>Kalkulierte Messwerte zu hoch bzw. zu niedrig (=systematische Fehler, Abweichen der Messdaten von „Normwerten“)</i>	Bezug zur internen Standardgeraden nicht korrekt	Überprüfen Sie die Referenzangaben im Produktdatenblatt. Die erzeugten Standardwerte sollten eine Linearität im Bereich 100–2000 pg/ml aufweisen; bei Abweichungen ($R < 0.98$) empfehlen wir die Auswertung mit einer Punkt-zu-Punkt-Gleichung (Cubic Spline).
	Fehler bei der Berechnung der Verdünnung	Kalkulieren Sie jeweils den bei der Probenverdünnung verwendeten Verdünnungsfaktor in die Berechnung mit ein.
	Modifikation der Testdurchführung	Beachten Sie sorgfältig die Angaben in der Testvorschrift (Inkubationszeiten, Verdünnung etc.).
	unsachgemäße Probenbehandlung	Stellen Sie sicher, dass die Proben nach einer anerkannten Probeentnahmeprozedur entnommen, bearbeitet und gelagert wurden. (in Polypropylengefäßen bei -20 °C gelagerte klare Proben).
	Messdaten der Standardreihe weichen stark von Referenzdaten ab	Die Vergleichswerte entnehmen Sie den Testdaten S. 8 dieser Produktinformation. Der zu erwartende Bereich berücksichtigt Geräte-, Reagenz- und Labor-Variationen. => schwaches/hohes Messsignal
	Berechnung der AB-Ratio falsch	Für die Berechnung gilt: $AB_{42} * 10 / AB_{40}$

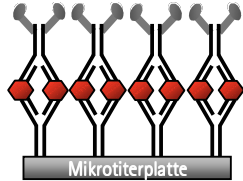
hAmyloid β 42 ELISA



Antikörperbeschichtete Mikrotiterplatte

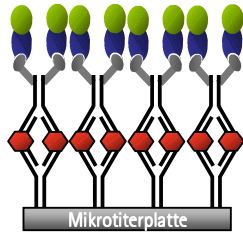
!! Startpunkt für Test-Kit Benutzer !!

1. Inkubation des Antikörper Konjugates und der Standards/Proben (über Nacht, 2-8°C)



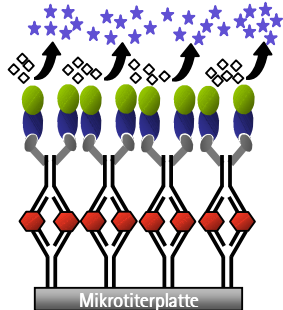
5 x Waschen

2. Inkubation des Enzymkonjugates (30min, RT)

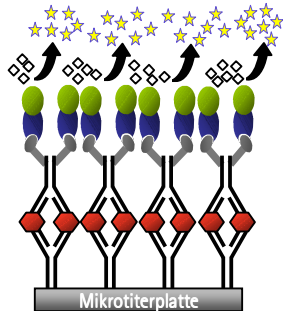


5 x Waschen

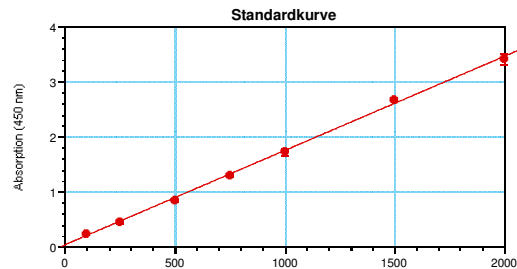
3. Inkubation des Enzymsubstrates (RT)



4. Zugabe der Stopplösung



5. Photometrische Detektion and quantitative Auswertung



$y = A + Bx$: A 0.03 B 0.002 R^2 0.999

anti- $A\beta$ Fangantikörper	anti- $A\beta$ Antikörperkonjugat	hAmyloid β 42
Enzymkonjugat	Chromogen (Substrat)	Produkt
		abgestopptes Produkt

DEUTSCH

CHARACTERISTICS OF THE AB42 ELISA

- Quantitative detection of human Amyloid β 42 in cerebrospinal fluid (CSF)
- Selective analysis of Amyloid β 42 by using monoclonal antibodies
- Test range from 100 to 2000 pg/ml
- High reproducibility and accurate linearity of the standard curve
- Precoated strips (12x8) for flexible usage of samples according to individual customer requirements
- Low sample volumes (50 μ l)

INTENDED USE/APPLICATIONS

The hAmyloid β 42 ELISA is suitable for the selective determination of the peptide Amyloid β 42 (A β 42) in human liquors, which in combination with the peptide A β 40 is a biomarker for Alzheimer's disease. The „A β -Ratio“ of the patient, which is discussed as a leading parameter for risk factors of Alzheimer's disease in the sum of patients data (see literature on page 26), can be calculated by the A β 42-value in combination with the A β 40-value (hAmyloid β 40 ELISA, The Genetics Company).

The Amyloid β 42 ELISA has a standard curve based on 7 internal standards; which covers a test range from 100 to 2000 pg/ml. Therefore the test is well adapted to the A β 42-concentrations in human liquor (see table below). Due to the high sensitivity of the test system, the samples can be measured directly in the test-kit.

The test performance complies with the regulation of the "Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (01.01.2002)", e.g. multiple determinations of one sample material must be made.

Concentration of A β 42 in human liquor (see literature on page 26)	Test range
200-1300 pg/ml	100-2000 pg/ml

PRINCIPLE

With this Amyloid β test-kit, the principle of a solid phase enzyme immunoassay, an Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA), for the quantitative analysis of hA β 42 is applied. The antigen hA β 42 to be tested is detected by selective monoclonal anti-A β -antibodies at two different binding sites (Epitopes), forming a "Sandwich-Complex". The polystyrol surface of the microtiter plate is layered with an antibody (capture antibody) which selectively recognizes the N-terminal end of the antigen. During the test procedure, a selective anti-A β 42-antibody conjugate (detection antibody) is incubated together with the standard/sample and forms an antibody-Amyloid-antibody-complex. This complex is indirectly linked with a Biotin-Streptavidin bridge to an enzyme in the next step. In a follow-up reaction the enzyme catalyzes the conversion of a substrate (Chromogen) into a colored product, which color intensity is measured by means of photometry. The measured extinction correlates directly with the concentration of hA β 42 within the sample. A quantification of the samples is attained by comparing the color intensity to a standard curve made of synthetic peptide Amyloid β 1-42.

CONTENT OF THE TEST-KIT

- 1 x Product information (user guide)
- 1 x Test-plate (12 strips x 8 wells)
Antibody-coated microtiter plate, packaged in 2x6 strips in an aluminium bag, ready-to-use
- 2 x Synthetic AB1-42 Standard
100 µl/vial, 1000 ng/ml, this stock solution must be diluted with Standard & Sample Diluent!

This standard will be shipped separately at -20°C !!

- 1 x Standard & Sample Diluent
25 ml vial, ready-to-use, to dilute the standards or samples
- 1 x Antibody Conjugate (100x)
100 µl/vial, 100 fold concentrate, dilute with Antibody Conjugate Diluent 1:100 before use.
- 1 x Antibody Conjugate Diluent
8 ml/vial, ready-to-use, to dilute the Antibody Conjugate
- 1 x Enzyme Conjugate (100x) (Streptavidin-Peroxidase-Conjugate)
150 µl/vial, 100 fold concentrate, dilute with Enzyme Conjugate Diluent 1:100 before use.
- 1 x Enzyme Conjugate Diluent
13 ml/vial, ready-to-use, to dilute the Enzyme Conjugate
- 2 x Washing Solution (20x)
2 x 25 ml/vial, 20 fold concentrate, dilute 1:20 with deionized water before use.
- 1 x Substrate Solution (TMB/peroxide mixture)
13 ml/vial, ready-to-use
- 1 x Stop Solution (1M sulfuric acid)
8 ml/vial, ready-to-use
- 4 x Cover Seal

ITEMS REQUIRED, BUT NOT PROVIDED IN THE TEST-KIT

In addition to the reagents provided in the test-kit, the following materials are essential for the performance of the ELISA-Test:

- Deionized water for dilution of Washing Solution
- Variable precision pipets (suitable for volumes from 10 to 1000 µl) *
- Vortex-mixer
- Stop-watch
- Microtiter plate shaker
- Microtiter plate washer *
- Microtiter plate photometer ("ELISA-Reader")
- Ice and ice container for sample preparation

* We recommend the use of multichannel pipets and automated plate-washers to achieve parallel working steps and simultaneous incubation times for best reproducibility.

SECURITY PRECAUTIONS

- The test-kit is manufactured with the relevant safety and quality regulations. The test complies with the general requirements of the European guideline 98/79/EG for *in vitro* diagnostics.
- Wear laboratory clothes and protective gloves during the sample preparation and during the whole test procedure to avoid an infection from the samples. (The test-kit itself contains no infectious material!) Contaminated areas must be cleaned with disinfection solution.
- The **Stop Solution** contains sulfuric acid (1 M), which is caustic. Pay attention to the following regulatory safety informations:
R36/38 Irritating to eyes and skin.
S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
S45 In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately.
- Samples and test-kit-components must be disposed in accordance with the common laboratory safety regulations.

STORAGE AND HANDLING PRECAUTIONS

- The hAmyloid B42-ELISA is only for *in vitro* use.
- Carefully read and follow the test-instructions in this user guide included in every test-kit. Test performance and data calculation should always be done by qualified staff.
- Store all test-kit reagents at 2 to 8 °C and the standards at ≤ -20 °C. Reagents may only be used until the given expiration date. In addition, unused test-kit components should be stored at 2 to 8 °C, unused antibody coated test strips from an opened aluminium bag should be stored for a maximum of 14 days (in an aluminium bag along with the included dry-pack).
- Do not mix reagents from different test-kits.
- Some of the test components are concentrated solutions. After dilution the working solution should be used within 14 days (2 to 8 °C). Standard dilutions have to be diluted always just before the test starts.
- To calibrate the test-system (standard), the dilutions should be made according to the description in the test procedure. The resulting internal standard curve is a fixed component of each measurement. A transfer of the absorbance data from one test plate to another is not suitable.
- The test results are not valid if the standard 1 (2000 pg/ml) shows an absorbance below 0.6 in magnitude.
- Pipetting of reagents, especially of the standard dilutions or of the samples, should be done without longer breaks. To avoid a cross contamination and carryover of reagents, the use of clean pipet tips for each sample pipetting is necessary.
- The pipetting of reagents and samples starts / stops kinetic reactions. To obtain a high precision for the test, be sure to treat each well of the microtiter plate in an identical manner.
- The washing solution has to be tapped out of the wells after the last washing step to assure the removal of buffer residues from the wells completely.

IMPORTANT INSTRUCTIONS FOR SAMPLE AND TEST PREPARATION



We recommend diluting the working solutions only for the intended use, since the working solutions are stable for 14 days only. The test plate is subdivided in strips of 8 wells for flexible sample handling.

The stability of Amyloid β in liquor is critical. The tendency of the peptides to aggregate is caused by the low protein content in liquors. For this reason, the preanalytic sample preparation is a major influencing parameter within the analysis of Amyloid peptides. Liquor samples should be collected according to clinical approved standard procedures and immediately stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. During the handling of thawed samples, it is important to keep these chilled (for example working on ice). A standard procedure for liquor preparation can be requested at The Genetics Company.



For the preparation of the samples polypropylene vials are recommended to avoid interaction with sample materials during storage.



Avoid repeated thawing and freezing of samples and standards.



The test-kit components are adapted for the measuring of liquor samples. For research use only the test can be applied to different sample materials (cell supernatant, brain homogenates etc.), which sometimes require a change of the test procedure; specific test applications for those samples can be requested at The Genetics Company.

In most cases, the A β 42-concentration of the human liquor samples is within the test-range of 100 to 2000 pg/ml. Therefore the samples can be used directly in the test, without any dilution procedures

HUMAN AMYLOID β 40 ELISA - SHORT ASSAY PROCEDURE

All test reagents for the test performance are integrated within the test-kit.

The antibody-coated microtiter plate is sealed in a vacuum bag and is ready-to-use.

After test pretreatment (standard- and if necessary sample-dilution), the test procedure consists of the following steps (see graph on page 24).

1. (Day 1) Pipette Antibody Conjugate Solution and standards or samples to the test plate, incubation.
2. (Day 2) Wash test plate and pipette Enzyme Conjugate Solution, incubation.
3. (Day 2) Wash test plate and pipette Enzyme Substrate Solution, incubation.
4. (Day 2) Pipette Stop Solution, measure absorption and calculate the results.

TESTPROTOCOL DAY 1

Following kit components are required:

- 8 well test strips
- Standard & Sample Diluent
- Synthetic AB1-42 Standard
- Antibody Conjugate (100x)
- Antibody Conjugate Diluent



We recommend diluting the test reagents just before each application.



The standard dilutions and samples shall be chilled (at <math><4\text{ }^{\circ}\text{C}</math>, working on ice) during the complete test procedure to achieve high stability and optimal data results!



All standards or samples should be mixed gently just before pipetting. Accurate mixing and pipetting of the standard solutions is essential to the precision of the assay.

Preparation of Reagents, Day 1

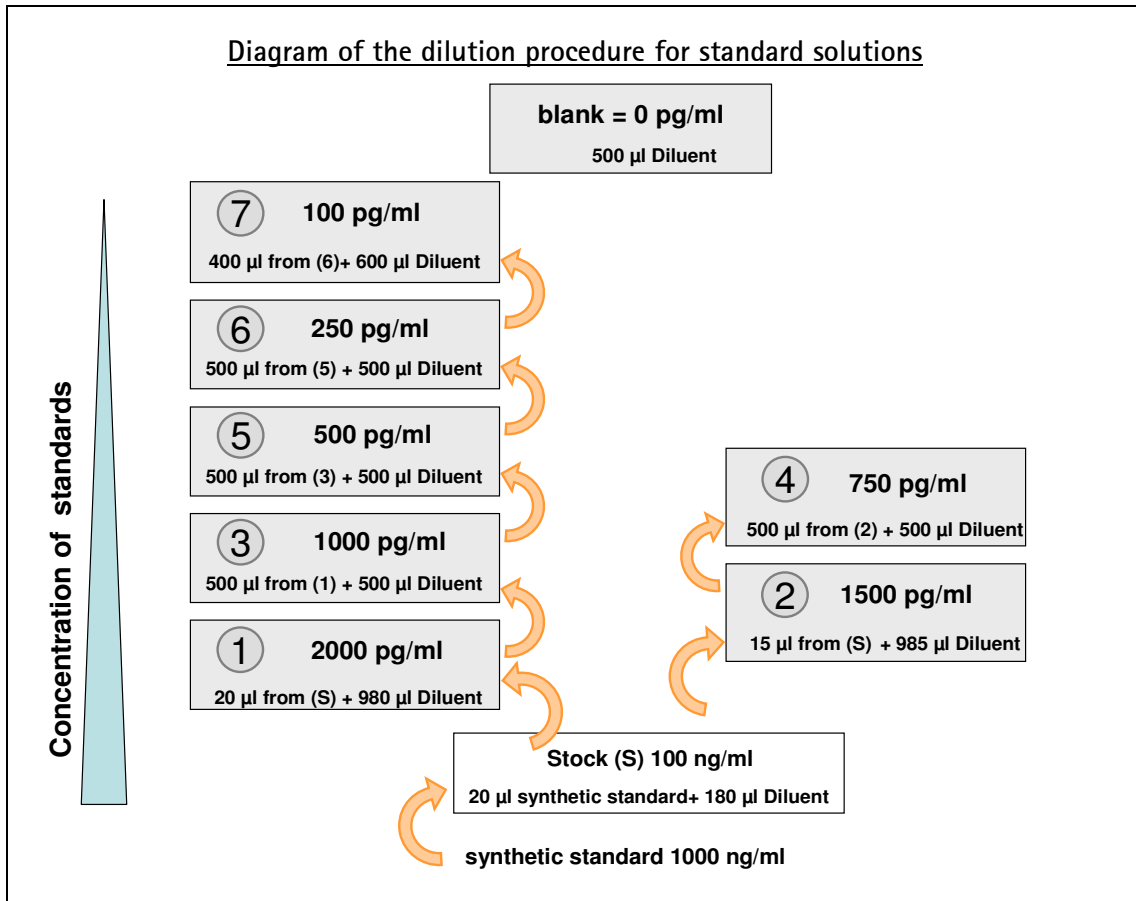
With the help of the attached template of a microtiter plate (p. 25) the samples can be located to the meant position for easier sample registration on the test plate.

- Preparation of Standards:

The test-kit contains a 1000 ng/ml stock solution of synthetic Amyloid β 1-42 standard. The standard dilutions should be made regarding the following dilution scheme:

-Working on ice!

Standard	Concentration of AB1-42	Volume of Standard & Sample Diluent	Volume of Standard
origin	1000 ng/ml	synthetic standard	100 μ l aliquot
stock (S)	100 ng/ml	180 μ l	20 μ l origin
standard 1	2000 pg/ml	980 μ l	20 μ l stock (S)
standard 2	1500 pg/ml	985 μ l	15 μ l stock (S)
standard 3	1000 pg/ml	500 μ l	500 μ l standard 1
standard 4	750 pg/ml	500 μ l	500 μ l standard 2
standard 5	500 pg/ml	500 μ l	500 μ l standard 3
standard 6	250 pg/ml	500 μ l	500 μ l standard 5
standard 7	100 pg/ml	600 μ l	400 μ l standard 6
blank	0 pg/ml	500 μ l	0



- Preparation of Antibody Conjugate Solution:

Dilute Antibody Conjugate (100x) 1:100 with Antibody Conjugate Diluent.

Example: 60 µl Antibody Conjugate (100x) + 5940 µl Antibody Conjugate Diluent = 6000 µl

Assay Procedure, Day 1

1. Pipette 50 µl Antibody Conjugate Solution per well.
2. Pipette 50 µl standard or sample per well.
Note: Pipette the samples without time delay directly after the standards!
3. Cover the wells with a cover seal, thoroughly mix the contents of the wells for a period of 5 minutes and incubate overnight at 2 to 8 °C.



The test reagents needed on the following day can be taken out of the refrigerator to allow them to reach room temperature overnight!

TESTPROTOCOL DAY 2

Following kit components are required:

- Washing Solution (20x)
- Enzyme Conjugate (100x)
- Enzyme Conjugate Diluent
- Substrate Solution
- Stop Solution



Caution! All reagents except for the Enzyme Conjugate must be at room temperature before use!

Preparation of Reagents, Day 2

- **Preparation of Washing Solution:**
Dilute **Washing Solution (20x)** 1:20 with deionized water
Example: 50 ml Washing Solution (20x) + 950 ml deionized water = 1000 ml
- **Preparation of Enzyme Conjugate Solution:**
Dilute **Enzyme Conjugate (100x)** 1:100 with **Enzyme Conjugate Diluent**
Example: 110 µl Enzyme Conjugate (100x) + 10890 µl Enzyme Conjugate Diluent = 11000 µl

Assay Procedure, Day 2

1. Wash test plate 5 x with 300 µl Washing Solution per well, remove the remaining fluid by tapping the plate on an absorbing paper.
2. Pipette 100 µl Enzyme Conjugate Solution per well, cover the wells with seal and incubate for a period of 30 min at room temperature (20 to 28 °C) on an orbital shaker (800 rpm/min).
3. Wash test plate 5 x with 300 µl Washing Solution per well, remove the remaining fluid by tapping the plate on an absorbing paper.
4. Pipette 100 µl Substrate Solution per well and incubate 25 to 30 min at room temperature (20 to 28 °C). Please shorten this time, if your ELISA Reader has a limited working range e.g. absorption limit 2.5. (see typical absorbance data page 20).
CAUTION! AVOID EXPOSURE TO LIGHT!
5. Pipette 50 µl Stop Solution per well in the analogous order as in previous step.
CAUTION! STOP SOLUTION CONTAINS ACID, HANDLE WITH CARE!
6. Read absorption data at 450 nm (reference filter 620–650 nm) within 15 min in the microtiter plate reader.

RESULTS

Analysis of the measured absorbance data (mean, standard deviation) for the standards and for the samples is performed with the help of a microtiter plate reader software.

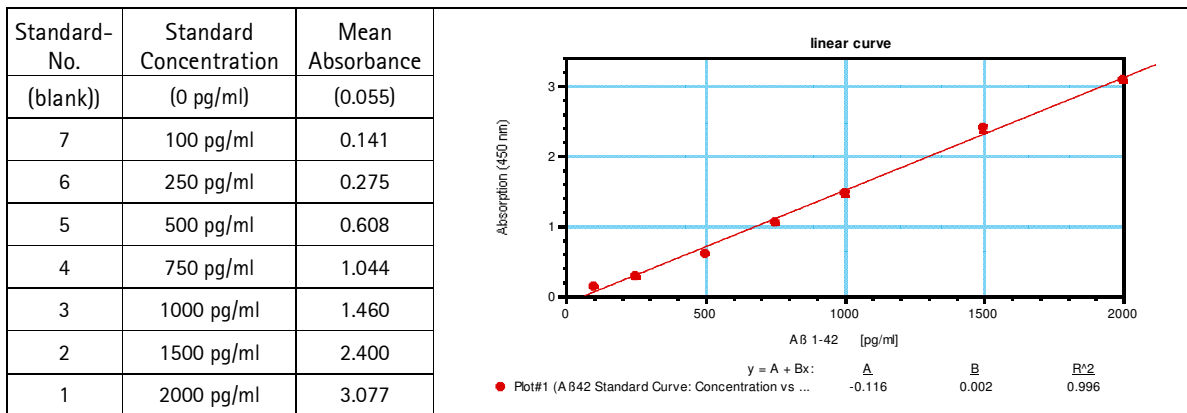
The **blank** (zero standards) is **not** integrated into the calculation of the standard curve! The blank is taken only as a control for a non-specific binding of the antibody; the mean absorbance of the blank shall be below 0.2.

Construct a standard curve by plotting the mean absorbance of standard 1-7 on the vertical axis versus the corresponding AB1-42 concentration on the horizontal axis. The standards generate a linear curve; position, gradient and correlation are calculated by linear regression.

If the correlation coefficient is below 0.98, a better correlation can be achieved by interpolating the linear test range (for example: 100-1500 pg/ml or 100-1000 pg/ml).

The test results are not valid if the standard 1 (2000 pg/ml) shows an absorbance below 0.6 in magnitude. Please control your test handling (troubleshooting list p. 22).

Typical absorbance data and fitting for the standard curve *



The resulting AB42-concentrations of the samples can be calculated with this standard curve (In a study of Jensen *et al.* (reference 1) nearly all samples could be quantified without further dilutions). Only samples that are in the measured range of the standard curve can be calculated.

If the AB-concentration value of a sample exceeds 2000 pg/ml, the test sample must be measured again by using a higher sample dilution (with appropriate amount of Standard & Sample Diluent).

The parameter AB-Ratio, which has proved to be an important support for analysing risk factors of Alzheimer's Disease, is calculated in combination with the data of the Amyloid B40 ELISA (data from the identical sample).

$$\text{AB-Ratio} = \frac{A\beta42}{A\beta40} \times 10$$

Based on internal clinical studies, a first classification can be made by the following cutoff:

AB-Ratio	<1.0	enhanced risk for Alzheimer's disease
AB-Ratio	1.0-1.5	at the limit; Reexamination suggested
AB-Ratio	>1.5	no recognizable risk for Alzheimer's disease

Due to the growing integration of the parameter AB-Ratio in the clinical diagnostics changing of the exact AB-Ratio-value for risk assessment may be possible in future.

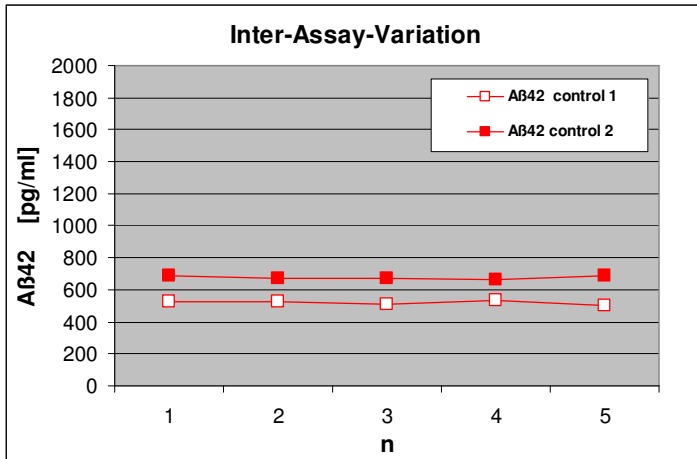
SENSITIVITY

The Amyloid B42 ELISA has a detection limit of 100 pg/ml.

PRECISION

According to the standard curves an Intra-Assay-Variation (on the same test plate) of <6 % and an Inter-Assay-Variation (on different plates) of <8 % CV, was obtained.

The following Inter-Assay-results were obtained by different test measurements (n= 5) for liquor-control samples:*



hAB42	Mean [pg/ml]	Std. Dev. [pg/ml]	CV [%]
control 1	520	11	2.0
control 2	678	9	1.3

SPECIFICITY

The Amyloid β ELISA use monoclonal anti- $\text{A}\beta$ antibodies with high selectivity for human $\text{A}\beta$. The detection antibody recognizes the C-terminal end of Amyloid $\text{B}1-42$, which causes a high selectivity for $\text{A}\beta 42$.

The $\text{A}\beta 42$ ELISA-test system is not influenced by the relevant $\text{A}\beta 40$ -concentrations in human liquor. The cross-reactivity of the used antibodies to other Amyloid peptides was tested by ELISA and BIACORE and shows no significant cross-reactivity to $\text{A}\beta 1-38$, $\text{A}\beta 1-39$, $\text{A}\beta 1-40$, $\text{A}\beta 1-43$ and $\text{A}\beta 1-44$.*

* All data presented in this product data sheet refer to handling with multichannel pipets and automated microtiter plate washers. Determinations were made in triplicate.

References

See page 26

Troubleshooting

Problem	Cause	Recommend
<i>no signal</i>	wrong test reagents used	ensure that only the reagents for the specific test-lot are used.
	test reagents damaged	check the storage of test-kit (standard) is carried out at 2 to 8 °C (-20 °C); don't use the test-kit after expiration date.
<i>weak signal</i>	test reagents used in a wrong dilution	control used test dilutions carefully (usually a dilution factor of 100 is used).
	wrong filter (wavelength)	check your wavelength in your microtiter plate photometer.
	incubation time too short temperature too low	check the information of incubation times of the lot in the product data sheet. (The incubation time of the enzyme substrate is applied for temperatures from 20 to 28 °C!); extend the substrate incubation time, if absorption is below 1.0 (reference data p. 21).
	reagents not used at right temperature	make sure that the reagents used for day 2 have reached room temperature (20 to 28 °C) before using within the test-kit.
	sodium azide, mercaptoethanol or DTT can interfere with peroxidase activity at high concentrations	only use samples which contain no or a low contents (< 0.1 %) of sodium azide, mercaptoethanol or DTT.
<i>high signal</i>	test reagents used in a wrong dilution	check used test dilutions carefully (usually a dilution factor of 100 is used).
	incubation time too long temperature too high	check the information of incubation times of the lot in the product data sheet. (The incubation time of the enzyme substrate is applied for temperatures from 20 to 28 °C!); shorten the substrate incubation time, if absorption is above 3.0 (reference data p. 21).
<i>high background (blank)</i>	insufficient washing steps	wash plate carefully and remove the liquid after each washing carefully.
	contamination of the washing solution	make sure that the water is not contaminated. Use always double distilled water for the reconstitution and dilution of the washing solution.
	contamination of reagents or vials/tubes from previous experiments	avoid pipetting directly out of the reagent vials, if test reagents should be used in further measurements. (Oxidative active contaminants can influence the enzyme substrate by non-specific color development).
	test reagents (antibody- and enzyme conjugate) used in wrong dilutions	check used test dilutions for antibody- and enzyme conjugate carefully (usually a dilution factor of 100 is used).

ENGLISH

Problem	Cause	Recommend
<i>low precision (= random error)</i>	non-homogeneous samples e.g. cloudy solution, particles in the sample	check that the samples are taken, prepared and stored according to a recommended sample procedure (polypropylene tubes, storage of clear samples at -20 °C).
	insufficient mixing of samples and standards	mix samples and standards before pipetting carefully.
	variation in pipetting	check your pipettes and calibrate if necessary.
	carry over between samples and/or standards	change pipet tips after each pipetting.
	insufficient mixing of reagents during incubation	mix reagents on the test plate after pipetting by moving the test plate carefully; use an orbital microtiter plate shaker on the recommended test steps for optimal mixing of reagents.
	insufficient washing	check that the automatic microtiter plate washer is working correctly; residues of liquids must be removed completely after each washing step.
	evaporation of liquids	check the contact of the cover seal with the plate during the incubation steps.
<i>calculated data are too high or too low (=systematic error, deviation of data from „typical data“)</i>	correlation to internal standard curve is not correct	check the reference data in the product data sheet; the generated standard curve should be linear in the range of 100-2000 pg/ml, if the correlation $R < 0.98$ we recommend a data calculation by a point to point curve (cubic spline).
	calculation of the dilution factor is not correct	check the dilution factor used for the sample dilution within the data calculation
	modification of the test procedure	follow the instructions in the product data sheet carefully (incubation time, dilution etc.).
	incorrect sample treatment	check that the samples are taken, prepared and stored according to a recommended sample procedure (polypropylene tubes, storage of clear samples at -20 °C).
	data for standard curve do not match reference data	measured data should be in the range of the reference data (p. 20). => see weak, high signal
	wrong calculation of the AB-ratio	the AB-ratio is calculated by: $AB_{42} * 10 / AB_{40}$

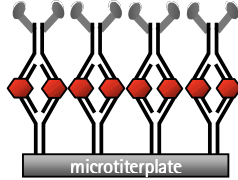
hAmyloid β 42 ELISA



antibody coated microtiter plate

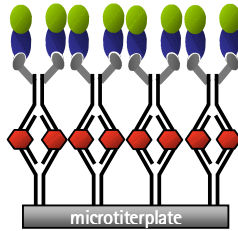
!! Starting point for test-kit user !!

1. Incubation of antibody conjugate and standard/sample (over night, 2-8°C)



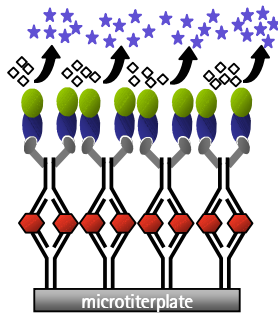
5 x Wash

2. Incubation of enzyme conjugate (30min, RT)

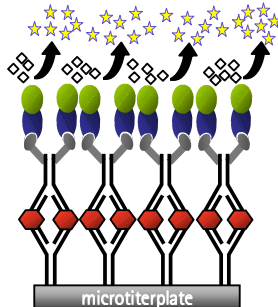


5 x Wash

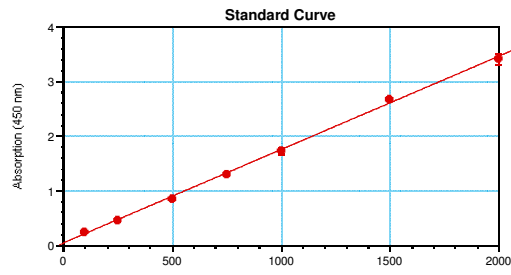
3. Incubation of enzyme substrate (RT)



4. Stop Reaction



5. Photometric detection and calculation of results



$y = A + Bx$:
 A: 0.03 B: 0.002 R²: 0.999

	coated anti- $A\beta$ antibody		anti- $A\beta$ antibody conjugate		hAmyloid β 42
	enzyme conjugate		chromogenic substrate		product
					stopped product

ENGLISH

Muster einer Mikrotiterplatte für die Planung der Probenanordnung bzw. Probenverdünnung
 Template of a microtitre plate for the location of samples or sample dilutions

Name: _____ Date: _____

Experiment: _____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

SELECTED LITERATURE

1. Ida N., Hartmann T., Pantel J., Schröder J., Zerfass R., Förstl H., Sandbrink R., Masters C.L., Beyreuther K., Analysis of Heterogeneous β A4 Peptides in Human Cerebrospinal Fluid and Blood by a Newly Developed Sensitive Western Blot Assay, *J. Biol. Chem.* 271 (37): 22908–22914, (1996).
2. Jensen M., Schröder J., Blomberg M., Engvall B., Pantel J., Ida N., Basun H., Wahlund L., Werle E., Jaus M., Beyreuther K., Lannfelt L., Hartmann T., Cerebrospinal Fluid AB42 is Increased Early in Sporadic Alzheimer's Disease and Declines with Disease Progression, *Ann. Neurol.* 45: 504–511 (1999).
3. Jensen M., Hartmann T., Engvall B., Wang R., Uljon S.N., Sennvik K., Näslund J., Muehlhauser F., Nordstedt C., Beyreuther K., Lannfelt L., Quantification of Alzheimer Amyloid Peptides Ending at Residues 40 and 42 by Novel ELISA Systems, *Mol Medicine* 6: 291–302 (2000)
4. Shoji M, Cerebrospinal Fluid AB40 and AB42: Natural Course and Clinical Usefulness, *Frontiers in Bioscience* 7: 997–1006 (2002).
5. Lewczuk P, Esselmann H, Otto M, Maler JM, Henkel AW, Henkel MK, Eikenberg O, Antz C, Krause WR, Reulbach U, Kornhuber J, Wiltfang J., Neurochemical diagnosis of Alzheimer's dementia by CSF Abeta42, Abeta42/Abeta40 ratio and total tau, *Neurobiol Aging* 25(3):273–81 (2004)