

Serazym[®] Bovine Serum Albumin (BSA) sensitive

Enzymimmunoassay zum Nachweis von Bovine Serum Albumin in biologischen Flüssigkeiten

 E-108  96  *In-vitro*-Diagnostikum 



Seramun Diagnostica GmbH · Sprenghagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
Telefon +49 (0) 33767 79110 · Fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

Anwendungsbereich

Der **Serazym[®] Bovine Serum Albumin sensitive** ist ein *in-vitro*-Diagnostikum zum Nachweis von Bovine Serum Albumin (BSA) in biologischen Flüssigkeiten.

Testprinzip

Der **Serazym[®] Bovine Serum Albumin sensitive** ist ein schneller immunenzymometrischer Ein-Schritt Assay basierend auf polyklonalen Antikörpern (Kaninchen), die gegen reines Rinderserumalbumin (BSA) gerichtet sind. Probenmaterial und Peroxidase-(POD)-markierte anti-BSA-Antikörper werden zusammen in die Kavitäten der Mikrotiterplatte gegeben, welche mit anti-BSA-Antikörpern beschichtet sind. Nach 60 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur (20...25°C) werden die ungebundenen Komponenten durch 5 mal waschen mit Waschpuffer entfernt. Anschließend wird Substrat (Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid) dazugegeben und für 15 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubiert. Die spezifisch gebundenen enzymmarkierten Antikörper in den Kavitäten werden durch eine Blaufärbung angezeigt. Diese Farbreaktion wird durch die Zugabe von Schwefelsäure gestoppt und resultiert in einem Farbumschlag nach gelb. Die Extinktionen werden bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Für optimale Ergebnisse sollte ein Referenzfilter (620 - 690 nm) verwendet werden. Eine Standardkurve wird aus den Extinktionen und den dazugehörigen BSA-Konzentrationen erstellt. Anhand der Extinktionen werden an der Standardkurve die entsprechenden Konzentrationen der unbekannten Proben abgelesen.

Referenzen:

1. Khomehchian, S. : Development of a sandwich enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) for determining of bovine serum albumin (BSA) in trivalent measles-mump-rubella (MMR) vaccines, Human Vaccines 4:5, 375-378; September/October 2008
2. Granström, M.: A sandwich ELISA for bovine serum in viral vaccines, Journal of Biological Standardization (1987) 15, 193-197
3. Zhang, K.: The establishment of a highly sensitive ELISA for detecting bovine serum albumin (BSA) based on a specific pair of monoclonal antibodies (mAB) and its application in vaccine quality control, Human Vaccines 6:8, 652-658; August 2010

Testkomponenten

			Für 96 Kavitäten
1	WELLS	Mikrotiterplatte beschichtet mit polyklonalen anti –BSA- Antikörpern (Kaninchen)	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
2	WASHBUF CONC 10x	Waschpuffer 10-fach	50 ml Konzentrat für 500 ml Lösung weiße Kappe
3	DIL	Verdünnungsmedium	70 ml · gebrauchsfertig rot gefärbt schwarze Kappe
4	STD 1 - 7	Standard 1-7 S1 = 50,0 ng/ml; S2 = 40,0 ng/ml; S3 = 30,0 ng/ml; S4 = 20,0 ng/ml; S5 = 10,0 ng/ml; S6 = 5,0 ng/ml S7 = 2,5 ng/ml	1.0 ml pro Standard gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Kappe
5	CONTROL	Kontrolle 25 ng/ml	1.0 ml · gebrauchsfertig rot gefärbt grüne Kappe
6	CONJ HRP	POD-Konjugat POD markierte polyklonale anti-BSA- Antikörper (Kaninchen)	15 ml · gebrauchsfertig grün gefärbt rote Kappe
7	SUBSTR TMB	Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	15 ml · gebrauchsfertig blaue Kappe
8	STOP	Stopplösung 0,25 M Schwefelsäure	15 ml · gebrauchsfertig gelbe Kappe

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Gewinnung und Lagerung

Der *Serazym*[®] Bovine Serum Albumin sensitive wird verwendet, um den BSA-Gehalt in verdünnten biologischen Flüssigkeiten zu bestimmen. Proben sollten nicht länger als 48 Stunden bei 2...8°C gelagert werden. Für längere Lagerung wird eine Temperatur von -20°C empfohlen. Gefrorene Proben sollten vor dem Verwenden zügig auf Raumtemperatur erwärmt und gut gemischt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Vorbereitung und Verwendung

Proben müssen, üblicherweise zwischen 1:6 und 1:21, mit Verdünnungsmedium verdünnt werden. Der Verdünnungsfaktor ist abhängig vom Probenmaterial und der erwarteten BSA-Konzentration.

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

Verstellbare Einkanal-Mikropipette 0,100 – 1,000 ml und 0,010 – 0,100 ml · 8-Kanalpipette bzw. Multipipetten 0,050 - 0,200 ml · Pipettenspitzen · Reagenzbehälter zur Dispensierung mit 8-Kanalpipette · 8-Kanal-Handwaschkamm mit Vakuumpumpe und Abfallbehältern oder Mikrotiterplatten-Waschgerät · Mikrotiterplatten-Photometer mit 450 nm Mess- und ≥ 620 nm Referenzfilter · destilliertes oder deionisiertes Wasser · Messzylinder und Bechergläser · Teströhrchen (2 ml) für die Probenverdünnung · Stoppuhr

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Ein Testbesteck (1x96 Vertiefungen) erlaubt die quantitative BSA-Bestimmung in maximal 40 Proben, wenn diese sowie die Standards und Kontrolle, als Doppelbestimmung eingesetzt werden. Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und Mikrotitrationsstreifen ist bei Lagerung bei 2...8°C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8 °C mindestens zwei Monate haltbar. Die gebrauchsfertig verdünnte Waschlösung ist bei Lagerung bei 2...8°C mindestens 1 Monat verwendbar.

Vorbereitung und Verwendung

Alle Reagenzien müssen Raumtemperatur erreicht haben, bevor sie im Assay verwendet werden dürfen. Die Mikrotiterplatte mit teilbaren Streifen ist in einem aluminium-beschichteten Beutel zusammen mit Trockenmittel vakuumversiegelt. Öffnen der Verpackung erst nach Erreichen der Raumtemperatur. Nicht gebrauchte Kavitäten vor Feuchtigkeit schützen und zusammen mit dem Trockenmittel in den Beutel zurücklegen und fest verschließen.

Verdünnungsmedium

Das Verdünnungsmedium ist gebrauchsfertig. Bei einer Lagerung bei 2...8 °C können Präzipitate auftreten, die nach Erreichen der Raumtemperatur wieder in Lösung gehen. Das Verdünnungsmedium erst verwenden, wenn es Raumtemperatur erreicht hat.

Waschpuffer

Waschpufferkonzentrat (10-fach) 1 + 9 mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen. Beispiel: 10 ml Waschpufferkonzentrat (2) + 90 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser

Testdurchführung

Proben mit Verdünnungsmedium (3) verdünnen (üblicherweise zwischen 1:6 und 1:21). Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten

Achtung: Der *Serazym*[®] Bovine Serum Albumin sensitive ist ein sehr empfindlicher Test, der weniger als 1,0 ng/ml BSA im Probenmaterial nachweist. Es wird empfohlen, Einweg-Reagenzbehälter zum Pipettieren der Reagenzien zu verwenden. Jede Kontamination der Arbeitsmaterialien mit BSA muss strikt vermieden werden. Die Glasware, die zum Ansetzen des Waschpuffers verwendet wird und die Geräte zur Testbearbeitung müssen absolut BSA-frei sein.

Für den Fall, dass ein Waschgerät verwendet wird, ist sicherzustellen, dass die Kavitäten komplett gefüllt (mindestens 300µl/well) und in jedem Waschzyklus komplett entleert werden. Für den Fall, dass per Hand gewaschen wird, sind Schaumbildung und Luftblasen in den Kavitäten zu vermeiden. Die Einwirkzeit des Waschpuffers in den Kavitäten muss mindestens 5 Sekunden pro Waschzyklus betragen. Die Flüssigkeit muss nach jedem Waschzyklus komplett entfernt werden. Es wird empfohlen Waschlösungsreste durch gründliches Absaugen oder Ausschlagen der Kavitäten zu entfernen.

Substrat (7) vor Licht geschützt aufbewahren!

Working steps

1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. 100 µl **CONJ HRP** POD-Konjugat (6) pro Kavität pipettieren
3. je 100 µl **verdünnte Probe**
100 µl **STD 1 – 7** Standard S1-S7 (4)
100 µl **CONTROL** Kontrolle (5)
in die dafür vorgesehenen Kavitäten pipettieren, vorsichtig mischen.
Es wird empfohlen Proben, Standards und Kontrolle in Doppelbestimmung zu untersuchen.
4. Platte abdecken und für 60 ± 1 min bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.
5. Dekantieren und 5 mal mit 300 µl Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen.
Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
6. 100 µl **SUBSTR TMB** Substrat (7) pro Kavität pipettieren.
7. 15 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.
8. 100 µl **STOP** Stopplösung (8) pro Kavität pipettieren, vorsichtig mischen.
9. Messen der OD bei 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm) mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 min nach Reaktionsstopp.

Berechnung der Ergebnisse

Konstruieren Sie eine Standardkurve durch Auftragen der gemessenen Mittelwerte der Extinktionen der Kalibratoren S 1-7 (y-Achse) gegen die deklarierte BSA-Konzentration (x-Achse). Alternativ kann das Verdünnungsmedium als Standard S8 in die Standardkurve integriert werden. In diesem Fall ist für Standard S8 eine fiktive Konzentration von 0,1 ng/ml einzusetzen, um die mathematische Erstellung der erweiterten Standardkurve zu ermöglichen. Bestimmen Sie die BSA-Konzentration der unbekannten Probe durch Ablesen der Extinktion an der Referenzkurve. Proben mit höheren BSA-Konzentrationen als Standard S 1 (50ng/ml), sollten in einer höheren Verdünnung nochmals getestet werden. Im Falle einer Vorverdünnung der Proben ist die erhaltene Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

Referenzwerte

Testvalidierung

Der Test kann ausgewertet werden wenn:

- Der Extinktionsmittelwert von Standard 1 (50,0 ng/ml) $\geq 1,50$
- Der Extinktionsmittelwert von Standard 7 (2,5 ng/ml) $\leq 0,50$
- Der Mittelwert der Kontrolle zwischen 20 ng/ml und 30 ng/ml bestimmt wird

Sind die o.g. Gültigkeitskriterien nicht erfüllt, muss der Testansatz wiederholt werden. Stellen Sie sicher, dass die Abarbeitung strikt gemäß Testanleitung erfolgt (korrekte Reagenzienvorbereitung, korrekte Inkubationszeiten- und Temperaturen, sorgfältiges Waschen). Sollten die Gültigkeitskriterien auch nach wiederholtem Testansatz nicht erfüllt sein, kontaktieren Sie bitte den Hersteller.

Grenzen der Methode

Falsche Ergebnisse können durch Kontaminationen der Reagenzien oder der Arbeitsgeräte mit BSA hervorgerufen werden. Kreuzreaktionen der Reagenzien oder Proben, bakterielle oder Pilzkontaminationen der Reagenzien oder der Proben, inkorrektes Waschen und inkorrekte Inkubationszeiten können ebenfalls zu falschen Ergebnissen führen.

Aufgrund des High-Dosis-Hook-Effektes können Proben mit BSA-Konzentrationen $> 8 \mu\text{g/ml}$ zu gering bestimmt werden. In diesen Fällen wird empfohlen mehrere unterschiedliche Verdünnungen der gleichen Probe zu testen.

Leistungsmerkmale

Präzision

Intra-Assay Variationskoeffizienten (VK) im *Serazym*[®] Bovine Serum Albumin sensitive aus 8-fach Bestimmungen der Proben.

Probe	Extinktionsmittelwert	Standardabweichung	VK [%]
1	2,437	0,033	1,43
2	2,060	0,035	1,79
3	1,670	0,050	3,18
4	1,243	0,051	4,41
5	0,737	0,029	4,24
6	0,473	0,013	2,86
7	0,322	0,002	0,51
8	1,494	0,037	2,61

Probe	Konzentrationsmittelwert [ng/ml]	Standardabweichung	VK [%]
1	50,1	0,924	1,97
2	39,8	0,905	2,43
3	30,0	1,197	4,26
4	20,2	1,122	5,93
5	9,9	0,561	6,08
6	5,0	0,221	4,69
7	2,5	0,025	1,06
8	25,9	0,843	3,48

Inter-Assay Variationskoeffizienten (VK) im *Serazym*[®] Bovine Serum Albumin sensitive in 8 unterschiedlichen Ansätzen aus 2-fach Bestimmungen der Proben.

Probe	Extinktionsmittelwert	Standardabweichung	VK [%]
1	2,087	0,099	5,07
2	1,205	0,067	5,93
3	0,715	0,037	5,50
4	0,466	0,027	6,74

Probe	Konzentrationsmittelwert [ng/ml]	Standardabweichung	VK [%]
1	50,9	1,701	3,57
2	24,2	0,750	3,31
3	12,0	0,297	2,64
4	6,3	0,299	5,06

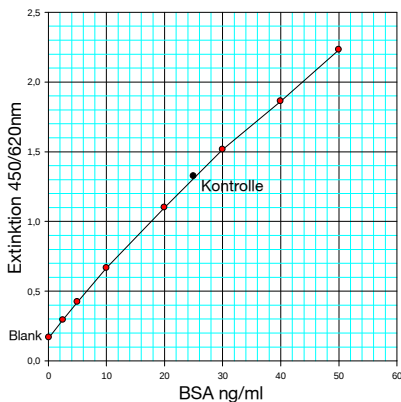
Kreuzreaktivität

Human Serum Albumin und Ovalbumin (200 ng/ml – 3 ng/ml) wurde im *Serazym*[®] Bovine Serum Albumin sensitive getestet. Es wurde keine Kreuzreaktivität festgestellt.

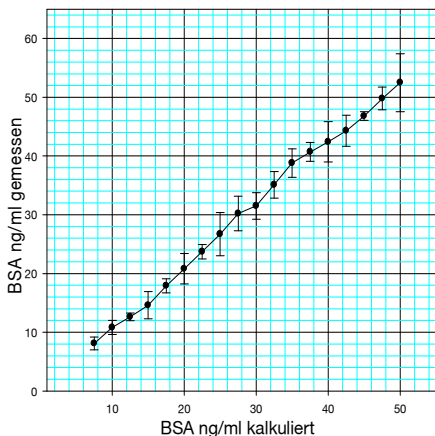
Untere Nachweisgrenze

Die untere Nachweisgrenze wurde mit 0,5 ng/ml bestimmt.

Typische Kalibrationskurve im
Serazym[®] Bovine Serum Albumin sensitive

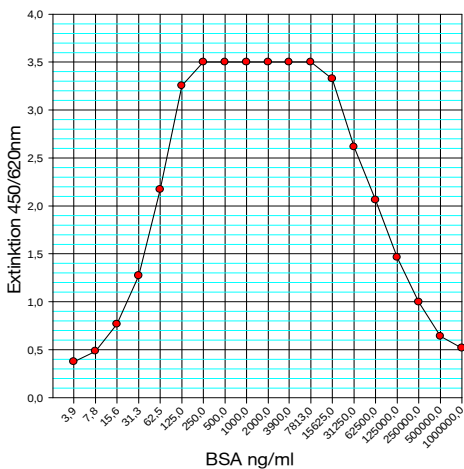


Verdünnungslinearität und analytische Sensitivität



Die analytische Sensitivität wurde mit 5 ng BSA/ml bestimmt.

High-Dosis-Hook-Effect



Untersuchungen der Signalintensität in Abhängigkeit von der BSA-Konzentration zeigte einen High-Dosis-Hook-Effekt ab einer BSA-Konzentration von $\geq 8 \mu\text{g BSA/ml}$ (siehe "Grenzen der Methode").

Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Dieses Testbesteck ist nur zum *in-vitro*-Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden. Die Arbeitsanleitung ist strikt einzuhalten. Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. **Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt mit Ausnahme von Waschpuffer, TMB/Substratlösung und Stopplösung.** Die Komplettierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt.

Einige Reagenzien (2, 3, 4, 5, 6, 7) enthalten geringe Mengen Kathon (1,0 % v/v) und Thimerosal (< 0,1 % w/v) als Konservierungsmittel. Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden. Die Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8 °C. Vor dem Beginn der Testung ist ein Datenblatt vorzubereiten auf dem die Positionierung der Proben, Standards und Kontrolle vermerkt ist. Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Patientenproben und Kontrollen sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.

Insbesondere sind folgende Regeln einzuhalten:

Nicht essen, trinken oder rauchen!

Nie mit dem Mund pipettieren!

Handschuhe zur Vermeidung von Kontakt mit den Reagenzien und Proben tragen!

Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!



Inkubationsschema *Serazym*[®] Bovine Serum Albumin sensitive (E-108)

1.  100 µl **CONJ HRP** (6)

+

100 µl **verdünnte Probe**

100 µl **STD S1 – S7** (4), alternativ S1 – S8

100 µl **CONTROL** (5), kurz schütteln

 60 min Inkubation bei RT (20...25°C)

5 x Waschen mit Waschlösung
2.  100 µl **SUBSTR TMB** (7)

15 min Inkubation bei RT (20...25°C) lichtgeschützt
3.  100 µl **STOP** (8)

Messung der Extinktion bei 450 / ≥ 620 nm



Hersteller

REF

Bestell-Nummer

LOT

Chargen-Nummer



Anzahl der Bestimmungen



Biologische Gefahr



Hinweise beachten



Verfallsdatum



Lagertemperatur



Arbeitsanleitung beachten

Serazym[®] Bovine Serum Albumin (BSA) sensitive

Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine serum albumin in biological fluids

REF E-108 ▽ 96 IVD *In-vitro*-diagnostic test CE



Seramun Diagnostica GmbH · Spreehagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
phone +49 (0) 33767 79110 · fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

Intended Use

The **Serazym[®] Bovine Serum Albumin sensitive** is an *in-vitro*-diagnostic test for the detection of bovine serum albumin (BSA) in biological fluids.

Principle Of The Test

The **Serazym[®] Bovine Serum Albumin sensitive** is a fast immune enzymometric one-step assay based on affinity purified polyclonal antibodies (rabbit) against bovine serum albumin (BSA). Specimens and horseradish peroxidase (HRP) labelled anti-BSA-antibodies are dispensed into the microtitration plate wells, which are coated with anti-BSA-antibodies and incubated at 20...25°C / 68...77°F for 60 minutes. After the incubation unbound components are removed by washing the wells five times with wash buffer. Then substrate solution (tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide) is added to each well and incubated for 15 minutes at 20...25°C / 68...77°F protected from light. The presence of specifically bound enzyme labelled antibodies in the wells is indicated by the development of a blue colour. Reaction stop by addition of sulphuric acid to the wells results in a colour change to yellow. Absorbances are read at 450 nm wavelength. For optimum results a reference filter (620 - 690 nm wavelength) should be used. A standard curve is created by plotting the absorbances of the different BSA standards versus their concentrations. The absorbances of the unknown samples can be transformed into their corresponding BSA concentrations by reading from the standard curve.

References:

4. Khomehchian, S. : Development of a sandwich enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) for determining of bovine serum albumin (BSA) in trivalent measles-mump-rubella (MMR) vaccines, Human Vaccines 4:5, 375-378; September/October 2008
5. Granström, M.: A sandwich ELISA for bovine serum in viral vaccines, Journal of Biological Standardization (1987) 15, 193-197
6. Zhang, K.: The establishment of a highly sensitive ELISA for detecting bovine serum albumin (BSA) based on a specific pair of monoclonal antibodies (mAB) and its application in vaccine quality control, Human Vaccines 6:8, 652-658; August 2010

Test Components

			For 96 Wells
1	WELLS	Microtitration plate coated with polyclonal anti-bovine serum albumin- antibodies (rabbit)	12 single breakable 8-well strips vacuum-sealed with desiccant
2	WASHBUF CONC 10x	Wash buffer 10-fold	50 ml concentrate for 500 ml solution white cap
3	DIL	Sample diluent	70 ml · ready to use coloured red black cap
4	STD 1 - 7	Standard 1-7 S1 = 50.0 ng/ml; S2 = 40.0 ng/ml; S3 = 30.0 ng/ml; S4 = 20.0 ng/ml; S5 = 10.0 ng/ml; S6 = 5.0 ng/ml S7 = 2.5 ng/ml	1.0 ml per standard ready to use coloured red transparent cap
5	CONTROL	Control 25 ng/ml	1.0 ml · ready to use coloured red green cap
6	CONJ HRP	HRP-conjugate HRP-labelled, polyclonal anti- bovine serum albumin - antibodies (rabbit)	15 ml · ready to use coloured green red cap
7	SUBSTR TMB	Substrate 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide	15 ml · ready to use blue cap
8	STOP	Stop solution 0.25 M sulphuric acid	15 ml · ready to use yellow cap

Preparation And Storage Of Samples

Collection and storage

The *Serazym*[®] Bovine Serum Albumin sensitive is intended for the determination of the BSA content in diluted biological fluids. Samples should not be stored longer than 48 hours at 2...8°C / 35.6 ... 46.4°F prior to use. Otherwise a storage temperature of -20°C / -4°F is recommended. Frozen samples should be rapidly warmed to room temperature and mixed thoroughly before testing. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided.

Preparation

Dilute samples with sample diluent (3) (usually 1 : 6 to 1 : 21). The dilution varies in dependence from the material and expected BSA concentration.

Materials Required But Not Provided

Adjustable one-channel micropipette 0.100 - 1.000 ml and 0.010 - 0.100 ml · Adjustable 8-channel micropipette 0.050 - 0.200 ml · Pipette tips · Reagent containers for dispensing with 8-channel pipette · Graduated measuring flasks 10 ml and 100 ml · Eppendorf tubes 2.0 ml · Microplate washer (automatic or hand wash head) · Microplate reader with optical filters of 450 nm for measurement and ≥ 620 nm for reference · Distilled or deionized water · Stop-watch

Preparation And Storage Of Reagents

Kit size and expiry

One kit (1x 96 wells) enables BSA quantification in a maximum of 40 samples when samples, standards and control are run in duplicate. The complete kit with unopened reagent bottles and microtitration strips is stable until the expiry date printed on the kit box in case of storage at 2...8°C / 35.6...46.4°F. Once opened all kit components are stable for up to 2 months under appropriate storage conditions 2...8°C / 35.6...46.4°F. When stored at 2...8°C / 35.6...46.4°F the ready to use wash solution can be used for at least 30 days.

Reagent preparation

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay. The microtitration plate is vacuum-sealed in a foil with desiccant. The plate consists of a frame and strips with breakable wells. Allow the sealed plate to reach room temperature before opening. Unused wells should be stored refrigerated and protected from moisture in the original cover carefully resealed.

Sample diluent

The sample diluent is ready-to-use. During storage at 2...8°C precipitates may occur, that will dissolve when the solution is warmed to room temperature. Make sure the sample diluent has reached room temperature before starting the assay.

Wash solution

Prepare a sufficient amount of wash solution by diluting the 10fold concentrated wash buffer 1 + 9 with distilled or deionized water.

For Example: 10 ml wash buffer concentrate (2) + 90 ml distilled or deionized water.

Assay Procedure

Dilute samples with sample diluent (3) (usually 1 : 6 to 1 : 21). Avoid any time shift during dispensing of reagents and samples.

Attention: The *Serazym*[®] Bovine Serum Albumin sensitive is a very sensitive assay detecting less than 1.0 ng BSA per ml sample material. It is recommended to use new disposable reagent containers for pipetting the reagents. Make sure that the glassware used for buffer preparation and the equipment used for running the assay are absolutely free of BSA. Any possibility of contamination of working equipment with BSA should be strictly avoided! Therefore special dispensers, pipettes and washers have to be used only for this test and not for other ELISAs.

In case of using a washer make sure that the wells are completely filled (at least 300 μ l / well) and drained in every single washing cycle. In case of manual washing avoid foam and air bubbles in the wells. It is recommended to tap the plate onto absorbent paper after each washing cycle.

Make sure that the soak time of the wash solution in the wells is at least 5 seconds per wash cycle and that the remaining fluid is completely drained in every single wash cycle!

Avoid light exposure of the TMB substrate solution!

Working steps

1. Warm all reagents to room temperature before use. Mix gently without causing foam.
2. Dispense 100 µl **CONJ HRP** HRP-conjugate (6) per well and
3. Pipette: 100 µl **diluted samples**
100 µl **STD 1 – 7** standard S1-S7 (4)
100 µl **CONTROL** control (5)
into the intended wells, mix gently.
It is recommended to run samples, standards and control in duplicate.
4. Cover plate and incubate for 60 ± 1 min at $20...25^{\circ}\text{C}$ / $68...77^{\circ}\text{F}$.
5. Decant, then wash each well 5x with 300 µl wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper.
6. Dispense 100 µl **SUBSTR TMB** substrate (7) per well.
7. Incubate for 15 min at $20...25^{\circ}\text{C}$ / $68...77^{\circ}\text{F}$, protected from light.
8. Dispense 100 µl **STOP** stop solution (8) per well, mix gently.
9. Read absorbance at 450 nm / ≥ 620 nm with a microplate reader within 30 min after reaction stop.

Result Interpretation

Calculate the mean absorbance of standards, control and samples. Create a reference curve from the mean absorbances of the standards S1 – S7 (y-axis) and the corresponding BSA concentrations of these standards (x-axis). Alternatively the diluent can be included as standard S8 to construct the standard curve (S1–S8). In this case, a concentration of 0.1 ng/ml is to be selected for S8 to enable a mathematical model of the standard curve. Plot the mean absorbances of the calibrator S1 – S8 (y-axis) against the corresponding BSA concentrations of these standards (x-axis). Determine the BSA concentration of the unknown samples by referring their mean absorbances to the reference curve. Samples with BSA concentrations exceeding those of standard S 1 (50 ng/ml) should be retested in higher predilution. In case of sample predilution values have to be multiplied with the dilution factor.

Reference Values

Test validity

A test run is valid if:

- the mean absorbance of standard 1 (50.0 ng/ml) is ≥ 1.50
- the mean absorbance of standard 7 (2.5 ng/ml) is ≤ 0.50
- the mean of the control is determined between 20 ng/ml and 30 ng/ml

If the above mentioned quality criteria are not met, repeat the test and make sure that the test procedure is correct (incubation times and temperatures, sample and wash buffer dilution, washing steps etc.). In case of repeated failure of the quality criteria contact your supplier.

Limitations of the procedure

Incorrect results may be caused by contamination of reagents or working equipment with BSA.

Cross contaminations of the kit reagents and samples, bacterial or fungal contaminations of reagents and/or samples, incorrect washing and incorrect incubation times may also cause erroneous results. Due to the high-dosis-hook-effect samples with BSA concentrations higher than 8 µg/ml may be determined too low. In these cases it is recommended to test several higher dilutions of the respective samples.

Performance Characteristics

Precision

Intra-assay coefficients of variation (CV) in the *Serazym*[®] Bovine Serum Albumin sensitive from 8-fold determinations of samples.

sample	mean absorbance	standard deviation	CV [%]
1	2.437	0.033	1.43
2	2.060	0.035	1.79
3	1.670	0.050	3.18
4	1.243	0.051	4.41
5	0.737	0.029	4.24
6	0.473	0.013	2.86
7	0.322	0.002	0.51
8	1.494	0.037	2.61

sample	mean concentration [ng/ml]	standard deviation	CV [%]
1	50.1	0.924	1.97
2	39.8	0.905	2.43
3	30.0	1.197	4.26
4	20.2	1.122	5.93
5	9.9	0.561	6.08
6	5.0	0.221	4.69
7	2.5	0.025	1.06
8	25.9	0.843	3.48

Inter-assay coefficients of variation (CV) in the *Serazym*[®] Bovine Serum Albumin sensitive in 8 different test runs from twofold determinations of samples.

sample	mean absorbance	standard deviation	CV [%]
1	2.087	0.099	5.07
2	1.205	0.067	5.93
3	0.715	0.037	5.50
4	0.466	0.027	6.74

sample	mean concentration [ng/ml]	standard deviation	CV [%]
1	50.9	1.701	3.57
2	24.2	0.750	3.31
3	12.0	0.297	2.64
4	6.3	0.299	5.06

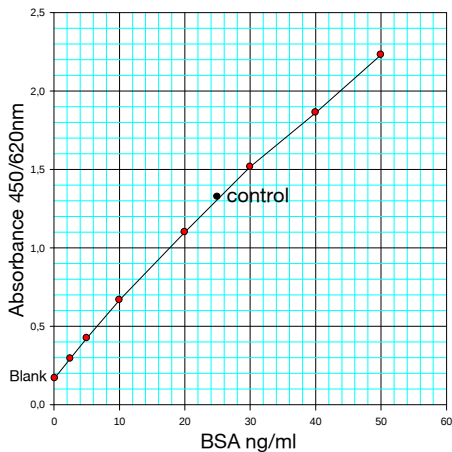
Cross reactivity

Samples with different concentrations (200 ng/ml – 3 ng/ml) of Human serum albumin and Ovalbumin were tested in the *Serazym*[®] Bovine Serum Albumin sensitive. No cross reactivity was observed.

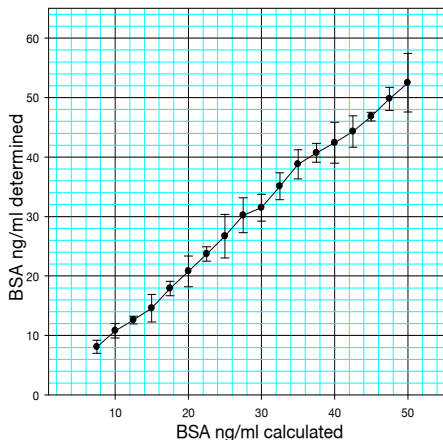
Lower detection limit

The lower detection limit was determined to be 0.5 ng/ml.

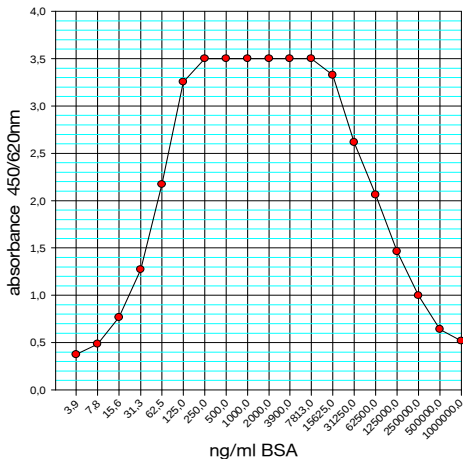
Typical calibration curve in the
Serazym[®] Bovine Serum Albumin sensitive



Dilution linearity and analytical sensitivity



High-Dosis-Hook-Effect



An analytical sensitivity of 5 ng BSA/ml for the reliable detection of a difference in concentration of BSA between samples was determined.

Development of signal intensity in dependence of the BSA concentration reveals a high-dose hook effect which starts by exceeding a concentration of about 8 µg/ml (see “limitations of the procedure”).

Common Advices and Precautions

This kit is for *in-vitro* use only. Follow the working instructions carefully. The kit should be performed by trained technical staff only. The expiry date on the respective labels is appropriate to note. The same applies for the specified shelf life of the reconstituted reagents. **Do not use or mix reagents from different lots except for sample diluent, wash buffer, TMB/substrate solution and stop solution.** Do not use reagents from other manufacturers. Precisely adhere to the prescribed incubation times and temperatures. Avoid time shift during dispensing of reagents. All reagents should be kept at 2...8°C / 36...46°F before use. Prepare a data sheet that defines the positions of samples, standards and control before starting the assay. Some of the reagents (2, 3, 4, 5, 6, 7) contain small amounts of Thimerosal (< 0.1% w/v) and Kathon (1.0% v/v) as preservative. They may neither be swallowed nor come into contact with skin or mucous membranes. In case of contact rinse with plenty of water. The stop solution contains 0.25 mol/l sulphuric acid. Avoid contact with skin and mucous membranes. In case of contact rinse with plenty of water. Handle all samples as potentially infectious. Use a new pipette tip for each sample to avoid contaminations and absolutely BSA-free equipment to get correct results. Since the kit contains potentially hazardous materials, the following precautions must always be observed:

Do not smoke, eat or drink while handling kit material!

Always use protective gloves!

Never pipette material by mouth!

Note safety precautions of the single test components!



Incubation Scheme *Serazym*[®] Bovine Serum Albumin sensitive (E-108)

1.  100 µl **CONJ HRP** ⁽⁶⁾

+
100 µl **diluted sample**

100 µl **STD S1 – S7** ⁽⁴⁾ alternatively S1 – S8

100 µl **CONTROL** ⁽⁵⁾

 60 min incubation (20...25°C / 68...77°F)

5 x wash with wash solution
2.  100 µl **SUBSTR TMB** ⁽⁷⁾

15 min incubation (20...25°C / 68...77°F) protected from light
3.  100 µl **STOP** ⁽⁸⁾

Read absorbances at 450 / ≥ 620 nm



Manufacturer



Catalogue-No.



Lot-No.



Number of determinations



Biohazard



Notice advices



Use by



Storage temperature



Consult instructions for use