

M30 CytoDeath™ ELISA

REF 10900

Instructions for Use
pages 3 – 13

Gebrauchsanweisung
Seite 15 – 26

**For research and laboratory use only.
Not for human or diagnostic use.**

Instructions for Use of the M30 CytoDeath™ ELISA

En

Contents

Explanation of Symbols Used on Labels	4
Trademarks	4
Patents	4
Shipping and Storage	4
Assay Description	5
Intended Purpose	5
Summary and Explanation of the Test	5
Principle of the Method	5
Materials Provided for 96 Determinations	6
Materials Required but not Provided	6
Assay Protocol	7
Warnings and Precautions	7
Suitable Cell Lines	7
Collection and Preparation of Samples	7
Component Preparation	9
Storage and Shelf Life After First Opening	9
Flow Chart	10
Assay Procedure	12
Calculation of Analytical Results	12
Assay Performance	13
Performance Characteristics	13
Traceability of Standard	13
Literature	13
Warranty	13

Explanation of Symbols Used on Labels



Catalogue number



Contains sufficient for <n> tests



Batch code



Manufacturer



Temperature limitation



Use by



Consult Instructions for Use

Trademarks

M30®, M30 Apoptosense®, M65®, EpiDeath® and PEVIVA® are registered trademarks of VLVbio (VLVbio AB).

Patents

U.S. patents number 6,296,850 and 6,716,968 and 6,706,488.

European patent number EP 1 019 438.

Japanese patent number 4372340

Canadian patent number 2305681.

Shipping and Storage

The M30 CytoDeath™ ELISA is shipped in cooled conditions and should be stored at 2–8 °C. *Note!* Do not freeze!

Assay Description

Intended Purpose

En

The M30 CytoDeath™ ELISA is a one step *in vitro* immunoassay for the quantitative determination of the apoptosis-associated K18Asp396 (M30) neo-epitope in cultured human, monkey or bovine cells.

Summary and Explanation of the Test

Caspases cleave various cellular proteins during apoptosis. In epithelial cells, one of those substrates is the intermediate filament protein keratin 18 (K18). The M30 antibody recognises a neo-epitope exposed after caspase cleavage of K18 after the aspartic acid residue 396 (ref. 1). Cleavage at this position occurs early during apoptosis by caspase-9 and during the execution phase by caspase-3 and caspase-7 (ref. 2).

The M30 CytoDeath™ ELISA measures the levels of soluble caspase-cleaved K18 (cck18) fragments containing the K18Asp396 neo-epitope. After induction of apoptosis of epithelial cells, cck18 increases are first observed in cell extracts. Release of antigen into the extracellular compartment occurs later and is due to secondary necrosis of apoptotic bodies. The cck18 increase during apoptosis is inhibited by the caspase-inhibitor zVAD-fmk.

The M30 CytoDeath™ ELISA can be used in combination with the M65 Epi-Death® ELISA (PEVIVA Prod. No. 10040) which measures total K18. Combining the two assays is useful for assessment of cell death mode (ref. 3).

The M30 is a mouse monoclonal IgG2b antibody. The M30 CytoDeath™ ELISA is suitable for human, monkey and bovine cells (murine cells can not be used).

Principle of the Method

The M30 CytoDeath™ ELISA is a solid-phase sandwich enzyme immunoassay. Standards and samples react with a solid phase capture antibody M6 directed against K18 and the HRP- (horseradish peroxidase) conjugated M30 antibody directed against the K18Asp396 neo-epitope. Unbound conjugate is removed by a washing step. TMB Substrate is added. The colour development is stopped and the absorbance is read. The resulting colour is directly proportional to the concentration of the analyte.

By plotting a standard curve from known concentrations versus measured absorbance, the amount of antigen in the sample can be calculated. The concentration of the antigen is expressed as units per litre (U/L).

Materials Provided for 96 Determinations

M6 Coated Microstrips: One microplate, 12 strips with 8 wells each, 96 dry wells in total. The wells are coated with mouse monoclonal K18 antibody M6. The microplate is sealed in an aluminium bag, which contains a desiccating device. If not all the strips are used, reseal the bag and keep the desiccating device inside. *Ready for use!*

M30 CytoDeath HRP Conjugate: Concentrate (24 × conc.). One vial containing 0.4 mL of mouse monoclonal M30 antibody (anti-K18Asp396 neo-epitope) conjugated with horseradish peroxidase (HRP) in a phosphate buffer with protein stabilizers. Preservative added. Should be diluted with M30 CytoDeath Conjugate Dilution Buffer (see section “Component Preparation” on page 9). *Note!* Do not expose to light!

M30 CytoDeath Conjugate Dilution Buffer: One vial containing 12 mL of phosphate buffer with protein stabilizers for dilution of the M30 CytoDeath HRP Conjugate. Preservative added. Green coloured.

M30 CytoDeath Standards: Standard Zero containing 0.6 mL of phosphate buffer with foetal calf serum (FCS). Standards Low, Medium and High, 0.6 mL each, containing standard material in a phosphate buffer with FCS. The values of the Standards are 0 U/L (Zero), 250 U/L (Low), 1 000 U/L (Medium) and 3 000 U/L (High). Preservative added. Yellow coloured. *Ready for use!* Standard Zero can be used for dilutions of samples > 3 000 U/L.

Wash Tablet: One tablet for 500 mL of prepared wash solution. Dissolve the Wash Tablet in 500 mL of fresh deionised water.

TMB Substrate: One bottle containing 22 mL of TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) Substrate. *Note!* Do not expose to light! *Ready for use!*

Stop Solution: One vial containing 8 mL of 1.0 M sulphuric acid. *Ready for use!*

Sealing Tape: One (1) sheet.

Instructions for Use.

Certificate of Analysis.

Materials Required but not Provided

- Microplate reader (wavelength 450 nm; linear 0 – 3 OD)
- Microplate shaker (oscillation: 600 rpm; orbit: 1.5 – 4 mm)
- 96-well microtiter plate washer or multichannel pipette (volume 250 µL)
- Vortex mixer
- Precision pipettes: 25, 50, 75 and 200 µL
- Cylinder (500 mL)
- Deionised water

Assay Protocol

En

Warnings and Precautions

1. M30 CytoDeath™ ELISA kit is intended for *in vitro* use only.
2. Do not mix reagents from different kit lots.
3. All samples should be regarded as contagious and handled and disposed of according to appropriate regulations.
4. Do not use samples that are contaminated.
5. The Stop Solution contains 1.0 M sulphuric acid, which will cause irritation of the skin and is harmful to the eyes. In case of contact, flush with plenty of water and seek medical advice.
6. Safety Data Sheets (SDS) are available on www.vlvbio.com or by request.

Suitable Cell Lines

The M30 CytoDeath™ ELISA detects apoptosis in *in vitro* cell cultures. The assay is specific for human, monkey and bovine cells. Since the quantification of apoptosis is due to a measurement of keratin 18, make sure that the used cell line expresses this protein.

Many different cell lines have been used successfully with the M30 CytoDeath™ ELISA. Visit the Peviva webpage on www.vlvbio.com for further information.

Collection and Preparation of Samples

The sample volume should be sufficient for measuring each sample in duplicate (test volume $2 \times 25 \mu\text{L}$).

Note! The M30 CytoDeath™ ELISA cannot be used for blood samples. Consider the M30 Apoptosense® ELISA (Peviva prod. no. 10011) for measuring caspase-cleaved K18 in serum or plasma.

Note! The same type of material (lysate or supernatant) collected by one method should be used for a specific project. For further information on the performance of the M30 CytoDeath™ ELISA using different types of samples, please consult www.vlvbio.com.

Store samples at $2 - 8 \text{ }^\circ\text{C}$ up to 4 hours. For longer periods store samples frozen at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ or lower. Samples can be freeze-thawed without loss of activity but it is recommended that repeated freeze-thawing should be avoided.

For dilution of samples see section "Performance Characteristics".

Sample Preparation from Lysed Cell Cultures

For many applications it is advantageous to measure total M30-reactivity (K18Asp396) at a single, late time point. Such measurements reflect an integrated assessment of apoptosis. To assay total K18Asp396 fragments in cell culture media and cell extracts, add non-ionic detergent directly to the cells in the tissue culture medium.

Day 1: Seed the cells. The seeding density needs to be determined for the specific cell type and the type of cytotoxic agent; 2 000–10 000 cells per well in a 96-well plate is usually adequate. Recommended cell medium volume in the well is 100–200 μL .

Day 2: Remove the old medium, wash the cells once with PBS and add fresh medium (100–200 μL /well). Expose the cells to the desired agent(s). Negative and positive controls (e. g. treated with staurosporine) are recommended.

Day 2–4: Stop treatment by freezing the plate to $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ or lower.

Measurement: Thaw the plate to room temperature. For 96-well plates containing 200 μL medium per well: add 10 μL 10 % NP-40 per well. Allow lysis to occur on a plate shaker for 5 minutes at room temperature. Mix gently by pipetting up and down, careful not to create air bubbles and transfer $2 \times 25\text{ }\mu\text{L}$ of the medium/lysate to the wells of the M6 Coated Microstrips.

Sample Preparation from Cell Culture Supernatants

The M30 CytoDeath™ ELISA and M65 EpiDeath® ELISA can be used to assess cell death mode by calculation of an M30:M65 ratio (ref. 3). Such measurements should be performed using medium supernatants! The ratio should be calibrated for each carcinoma cell line using appropriate controls, i. e. agents known to induce apoptosis (e. g. genotoxic agents or staurosporine) and/or mainly necrosis (e. g. oligomycin treatment of glucose starved cells or treatment with hydrogen peroxide).

Day 1/Day 2: Seed the cells, wash and add agents as described above.

Day 2–4: Collect the sample medium from each well. To avoid drying effects, collecting multiple samples from the same well is not recommended. Centrifuge the medium and collect the cell-free supernatant. *Note!* Avoid collecting cells. $2 \times 25\text{ }\mu\text{L}$ cell-free supernatant samples are used for each assay.

Component Preparation

Dilution of M30 CytoDeath HRP Conjugate

Dilute the M30 CytoDeath HRP Conjugate with M30 CytoDeath Conjugate Dilution Buffer. The M30 CytoDeath HRP Conjugate vial contains exactly 0.4 mL. Add 9.2 mL of M30 CytoDeath Conjugate Dilution Buffer directly to the HRP Conjugate vial and mix.

Dissolving of Wash Tablet

Dissolve one Wash Tablet in 500 mL of fresh deionised water. Let the tablet dissolve in the water and mix before use.

Dilution of Samples

Samples higher than Standard High should be diluted with cell culture medium or Standard Zero (0 U/L). Since dilution in the assay is linear, the original concentration is calculated by multiplying the measured concentration by the dilution factor.

Storage and Shelf Life After First Opening

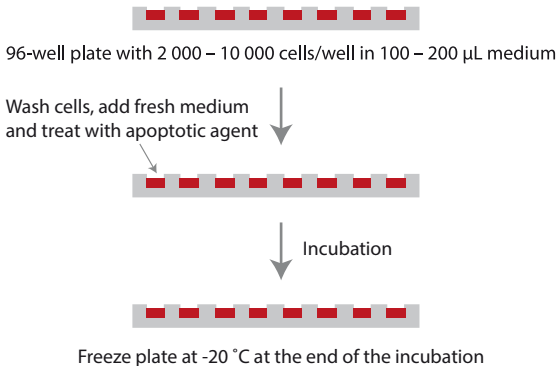
If the entire kit is not used, store reagents in their original containers at 2–8 °C. If not all strips are used, reseal the microstrips bag. Remember to include the desiccating device.

The TMB Substrate and the M30 CytoDeath HRP Conjugate are sensitive to light and to metal ions and should be stored in the original amber bottles at 2–8 °C at all times between uses. If a new container is used it has to be protected from light! TMB Substrate cannot be used after exposure to light.

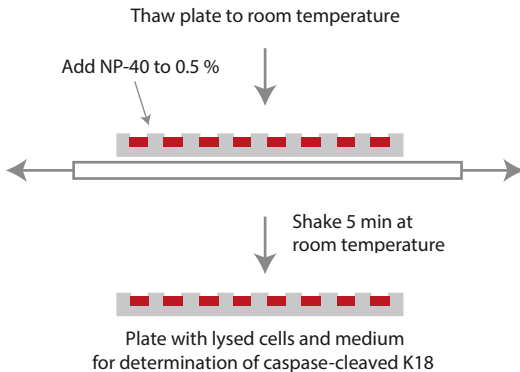
If the kit is used on several occasions, store the diluted M30 CytoDeath HRP Conjugate in the vial at 2–8 °C. Do not expose to light. The diluted M30 CytoDeath HRP Conjugate solution is stable for 3 weeks.

The prepared wash solution is stable for 5 weeks when stored at 2–8 °C.

Step 1: Prepare Cells

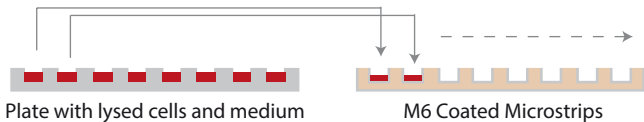


Step 2: Prepare Cell Lysates



Step 3: Determine Caspase-Cleaved K18

Aspirate 3 × and then transfer 25 μL to the M6 Coated Microstrips



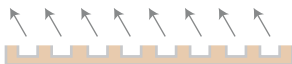
Add 75 μL of diluted
M30 CytoDeath HRP conjugate



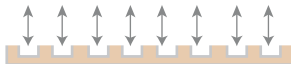
Shake 4 hours at room temperature



Remove lysate/antibody solution



Wash 5 × with prepared wash solution



Add 200 μL of TMB Substrate



Incubate 20 min at room
temperature in darkness



Add 50 μL of Stop Solution
Shake 5 – 10 sec



Read absorbance at 450 nm after 5 – 30 min

Assay Procedure

The M30 CytoDeath™ ELISA should be performed at room temperature (24 ± 3 °C).

1. Allow all reagents to reach room temperature before performing the assay. Vortex all reagents prior to use.
2. Dissolve the Wash Tablet in fresh deionised water (see section “Component Preparation” on page 9).
3. Dilute M30 CytoDeath HRP Conjugate with 9.2 mL of M30 CytoDeath Conjugate Dilution Buffer and mix (see section “Component Preparation” on page 9).
4. Pipette 25 µL of standard or sample per well (duplicates are recommended).
5. Add 75 µL of the diluted M30 CytoDeath HRP Conjugate solution per well.
Note! Steps 4 and 5 should be performed sequentially without interruption within 15 minutes.
6. Cover the wells with sealing tape or a microtiter plate lid.
7. Incubate on shaker for 4 hours. Speed setting: 600 rpm on a plate shaker (other shakers: make sure the liquid is moving while staying in the well).
8. Wash the plate in a plate washer 5 times with 400–500 µL prepared wash solution per well (overflow wash)
or
Wash the plate manually, discarding the incubation solution and washing the wells 5 times with 250 µL of prepared wash solution. Avoid contamination between wells.
9. Add 200 µL of TMB Substrate to each well. Incubate in darkness at room temperature for 20 ± 1 minutes.
10. Add 50 µL of Stop Solution to each well. To ensure complete mixing of the TMB Substrate and the Stop Solution, shake the microplate for 5–10 seconds. Leave the microplate for 5 minutes before reading the absorbance.
11. Determine the absorbance at 450 nm in a microplate reader within 30 minutes and record the results.
12. Calculate the results as described in section “Calculation of Analytical Results”.

Calculation of Analytical Results

The M30 CytoDeath™ ELISA results are calculated using computer-assisted methods. Evaluate the values of samples using a suitable program for handling ELISA type data. Fitting algorithm: Cubic Spline. x-axis: concentration (U/L); y-axis: absorbance at 450 nm (A450).

Note! If samples have been diluted, the observed concentration must be multiplied by the dilution factor.

Assay Performance

Performance Characteristics

Measuring range: The measuring range is 0–3 000 U/L.

High Dose Effect: No High Dose effect occurs up to 26 000 U/L.

Sensitivity: Detection Limit is 60 U/L (calculated as Standard Zero + 3 standard deviations); Lower Limit of Quantification (LLOQ) is 250 U/L.

Reproducibility: Within assay (WA % CV) variation is < 7 %, between assay (BA % CV) variation is < 10 % and total variation < 10 % for samples over LLOQ.

Spiking Recovery: 80–120 %.

Linearity/Dilution: Recovery within 80–120 % for dilutions in cell culture medium or Standard Zero.

Traceability of Standard

The units measured by the M30 CytoDeath™ ELISA are defined against a synthetic peptide containing the M30 and M6 epitopes.

Literature

1. Leers *et al.*, *J Pathol.* 187, 1999, 567.
2. Schutte *et al.*, *Exp Cell Research* 297, 2004, 11.
3. Hägg *et al.*, *Invest New Drugs* 20, 2002, 253.
4. Kramer *et al.*, *Cancer Res* 64, 2004, 1751.
5. Erdal *et al.*, *PNAS* 102, 2005, 192.
6. Zhang *et al.*, *Clin Cancer Res.* 16, 2010, 4478.
7. Gruenbacher *et al.*, *Cancer Res.* 2010 [*in press*]
8. Herrmann *et al.*, *J Biomol Screen.* 13, 2008, 1.
9. Brnjic *et al.*, *Mol Biosyst.* 6, 2010, 767

For further references and information, please consult www..

Warranty

The performance data presented here were obtained using the procedure indicated. Any change or modification in this procedure as recommended by the manufacturer may affect the results. In such event, the manufacturer disclaims all warranties expressed, implied or statutory, including the implied warranty of merchantability and the fitness for use. The manufacturer and its authorized distributors, in such event, shall not be liable for damages indirect or consequential.

Gebrauchsanweisung für M30 CytoDeath™ ELISA

Inhaltsangabe

Erklärung der auf den Etiketten benutzten Symbolen	16
Handelsmarken	16
Patente	16
Lagerung und Versand	16
Testdurchführung	17
Verwendungszweck	17
Zusammenfassung und Erklärung des Tests	17
Testprinzip	17
Reagenzien für 96 Bestimmungen	18
Zusätzlich benötigtes Material	19
Testprotokoll	19
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	19
Handhabung der Proben	19
Vorbereitung der Komponenten	21
Lagerung und Haltbarkeit nach dem ersten Öffnen	21
Flussdiagramm	22
Testprotokoll	24
Berechnung der Analysenergebnisse	24
Leistungsmerkmale des Tests	25
Testcharakterisierung	25
Kalibrierung des Standards	25
Literaturhinweise	25
Haftung	26

De

Erklärung der auf den Etiketten benutzten Symbolen



Bestellnummer



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Chargenbezeichnung



Hersteller



Temperaturbegrenzung



Verwendbar bis



Gebrauchsanweisung beachten

Handelsmarken

M30®, M30 Apoptosense®, M65®, EpiDeath® und PEVIVA® sind eingetragene Handelsmarken von VLVbio (VLVbio AB).

Patente

U.S.-Patente Nummer 6,296,850 und 6,716,968 und 6,706,488.

Europäisches Patent Nummer EP 1 019 438.

Japanisches Patent Nummer 4372340

Kanadisches Patent Nummer 2305681.

Lagerung und Versand

M30 CytoDeath™ ELISA wird gekühlt versendet und muss bei 2 – 8 °C gelagert werden. **Achtung!** Nicht einfrieren!

Testdurchführung

Verwendungszweck

M30 CytoDeath™ ELISA ist ein einstufiger *in vitro*-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung des apoptose-spezifischen Caspase-gespaltenen Keratins 18 (ccK18, K18Asp396 oder M30-Neoepitop) in Zellkulturen (Herkunft: Mensch, Affe oder Rind).

Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Caspasen spalten verschiedene zelluläre Proteine im Verlauf der Apoptose. In epithelialen Zellen ist eines dieser Substrate das intermediäre Filamentprotein Keratin 18 (K18). Der Antikörper M30 erkennt ein Neoepitop, das sich hinter der Asparaginsäure 396 (Ref. 1) des K18 befindet und nach der Caspasenspaltung freigelegt wird. Die Spaltung an dieser Position erfolgt im Frühstadium der Apoptose durch Caspase 9 und in der Exekutionsphase durch Caspase 3 und Caspase 7 (Ref. 2).

M30 CytoDeath™ ELISA misst den Gehalt an löslichen Caspase-gespaltenen K18-(ccK18-) Fragmenten, die das K18Asp396-Neoepitop enthalten. Nach Auslösung der Apoptose in epithelialen Zellen steigt die ccK18-Konzentration zuerst in den Zellextrakten an. Das Antigen wird später durch sekundäre Nekrose apoptotischer Körper in den extrazellulären Bereich freigesetzt. Der Caspase-Inhibitor zVAD-fmk hemmt während der Apoptose den Anstieg des ccK18-Werts.

M30 CytoDeath™ ELISA kann zusammen mit dem M65 EpiDeath® ELISA (PE-VIVA Prod.-Nr. 10040) verwendet werden, welcher den Gesamtgehalt an K18 misst. Die Kombination beider Tests ist zur Evaluierung des Zelltods nützlich (Ref. 3).

Der M30 ist ein monoklonaler Mausantikörper vom Typ IgG2b. Der M30 Cyto-Death ELISA reagiert mit Caspase-gespaltenem K18 von Menschen, Affen und Rindern.

Testprinzip

M30 CytoDeath™ ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay. Standards und Proben reagieren mit einem festen Fängerantikörper M6, der auf K18 gerichtet ist und mit dem mit HRP (Meerrettichperoxidase) konjugierten Antikörper M30, der auf das K18Asp396-Neoepitop gerichtet ist. Ungebundenes Konjugat wird durch einen Waschprozess entfernt. TMB-Substrat wird zugegeben. Die Farbentwicklung wird beendet und die Absorption gemessen. Die

resultierende Färbung ist direkt proportional zur Konzentration des M30-Antigengehalts.

Durch Aufzeichnung einer Standardkurve mit bekannten Konzentrationen gegen die gemessene Absorption kann der Antigengehalt in der Probe berechnet werden. Die Konzentration des Antigens wird in Einheiten per Liter (U/l) angegeben.

Reagenzien für 96 Bestimmungen

M6 Coated Microstrips: Eine Mikrotiterplatte, 96 trockene Testmulden (12 Streifen à 8 Mulden). Die Mulden sind mit dem monoklonalem K18-Mausantikörper M6 beschichtet. Die Mikrotiterplatte befindet sich in einem versiegelten Aluminiumbeutel, der ein Trockenmittelbeutel enthält. Eventuell nicht benötigte Streifen müssen im verschlossenen Beutel zusammen mit dem Trockenmittel aufbewahrt werden. *Gebrauchsfertig!*

M30 CytoDeath HRP Conjugate: Konzentrat (24 × konz.). Ein Fläschchen mit 0,4 ml Meerrettichperoxidase-(HRP)-konjugiertem monoklonalem Mausantikörper M30 (anti-K18Asp396-Neoepitop) in Phosphatpuffer mit Proteinstabilisator. Mit M30 CytoDeath Conjugate Dilution Buffer verdünnen. Enthält Konservierungsmittel. *Achtung!* Vor Licht schützen!

M30 CytoDeath Conjugate Dilution Buffer: Ein Fläschchen, das 12 ml Phosphatpuffer mit Proteinstabilisator zur Verdünnung des M30 CytoDeath HRP Conjugates enthält. Enthält Konservierungsmittel. Blaue Lösung.

M30 CytoDeath Standards: Ein Fläschchen Standard Zero mit 0,6 ml Phosphatpuffer mit FKS (fötalem Kälberserum). Standards Low, Medium und High, jeweils 0,6 ml, die das Standardmaterial in Phosphatpuffer mit FKS enthalten. Die Werte der Standards sind 0 U/l (Zero), 250 U/l (Low), 1 000 (Medium) und 3 000 U/l (High). Enthält Konservierungsmittel. Gelbe Lösung. *Gebrauchsfertig!* Proben > 3 000 U/l können mit Standard Zero verdünnt werden.

Wash Tablet: Eine Tablette für 500 ml Waschpuffer. Tablette in 500 ml frischem deionisiertem Wasser auflösen.

TMB Substrate: Eine Flasche mit 22 ml TMB-Substrat (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin). *Achtung!* Vor Licht schützen! *Gebrauchsfertig!*

Stop Solution: Ein Fläschchen mit 8 ml 1,0 M Schwefelsäure. *Gebrauchsfertig!*

Sealing Tape: Eine (1) Lage.

Gebrauchsanweisung.

Analysenzertifikat.

Zusätzlich benötigtes Material

- Absorptionsmessgerät für Mikrotiterplatten (Wellenlänge 450 nm, linear 0 – 3 AD)
- Mikrotiterplattenschüttler (Drehzahl: 600 U/min, Orbit: 1,5 – 4 mm)
- Mikrotiterplattenwascher (für 96 Testmulden) oder Mehrkanalpipette (Volumen: 250 µl)
- Wirbelmischer
- Präzisionspipetten: 25, 50, 75 und 200 µl
- Messzylinder (500 ml)
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser

Testprotokoll

De

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

1. M30 CytoDeath™ ELISA Kit nur zum *in vitro*-Gebrauch.
2. Reagenzien aus unterschiedlichen Kitchargen dürfen nicht vermischt werden.
3. Alle Proben sind als infektiös anzusehen und vorschriftsgemäß zu behandeln und zu entsorgen.
4. Kontaminierte Proben dürfen nicht verwendet werden.
5. Die Stop Solution enthält 1,0 M Schwefelsäure, die Hautreizungen und Schäden an den Augen verursacht. Bei Kontakt mit reichlich Wasser auswaschen und einen Arzt aufsuchen.
6. Sicherheitsdatenblätter (SDS) sind unter www.vlvbio.com oder auf Nachfrage erhältlich.

Handhabung der Proben

Das Probevolumen sollte so bemessen sein, dass mit jeder Probe jeweils zwei Messungen durchgeführt werden können (Testvolumen: 2 × 25 µl).

Achtung! Mit dem M30 CytoDeath™ ELISA können keine Blutproben gemessen werden. Für Serum- oder Plasmapmessungen wird auf den M30 Apoptose ELISA (Peviva Produkt-Nr. 10011) verwiesen.

Achtung! Im Rahmen eines Projekts sollte stets das gleiche Probenmaterial (Lysat oder Zellüberstand) verwendet werden. Für weitere Informationen über die Leistung des M30 CytoDeath™ ELISA bei Verwendung unterschiedlicher Proben wenden Sie sich bitte an www.vlvbio.com.

Bewahren Sie die Proben bis zu 4 Stunden bei 2 – 8 °C auf. Bei längerer Lagerung müssen die Proben bei mindestens -20 °C eingefroren werden. Das

Einfrieren und Auftauen der Proben beeinträchtigt zwar deren Reaktivität nicht, doch sollte es nicht unnötig erfolgen.

Bezüglich der Verdünnung der Proben siehe Abschnitt „Testcharakterisierung“.

Handhabung der Proben aus Zellkulturen (Lysate)

In vielen Anwendungen ist es von Vorteil, die Gesamtreaktivität von M30 (ccK18) einmalig zu einem späten Zeitpunkt zu messen. Solche Messungen repräsentieren eine integrierte Bewertung der Apoptose. Zur Bestimmung des Gesamtgehalts von ccK18-Fragmenten in Zellkulturmedien und Zellextrakten füge man nichtionische Tenside direkt zu den Zellen im Gewebekulturmedium hinzu.

Tag 1: Aussäen der Zellen. Die Saatedichte richtet sich nach der spezifischen Zellart und dem jeweiligen zytotoxischen Mittel; 5 000 – 10 000 Zellen pro Mulde in einer 96-Testmuldenplatte sind im Allgemeinen ausreichend. Empfohlenes Volumen des Gewebekulturmediums ist 100 – 200 µl.

Tag 2: Altes Medium entfernen, Zellen einmal mit PBS waschen und frisches Medium (200 µl/Mulde) zugeben. Die Zellen mit der/den gewünschten Testsubstanz(en) versetzen.

Tag 2 – 4: Für 96-Testmuldenplatten, die 200 µl Medium pro Mulde enthalten, 10 µl 10 % NP-40 pro Mulde hinzufügen. Zur Ausführung der Lyse die Platte auf einem Rotationsschüttler bei Raumtemperatur 5 Minuten lang inkubieren. Zur Verbesserung des Mischergebnisses wird empfohlen, das Medium/Lysat zuvor vorsichtig auf und ab zu pipettieren; dabei darauf achten, dass die Probe nicht schäumt. Überführung von 2 × 25 µl des Mediums/Lysates in die Mulden der M6 Coated Microstrips.

Handhabung der Proben aus Zellkulturüberständen

M30 CytoDeath™ ELISA und M65® ELISA können zur Bewertung der Art des Zelltodes durch Berechnung eines M30:M65-Verhältnisses (Ref. 3) verwendet werden. Die Erstellung eines derartigen Verhältnisses sollte allerdings auf die Bestimmung von Zellkulturüberständen beschränkt sein. Dieses Verhältnis sollte für jede Karzinomzelllinie mit geeigneten Kontrollen kalibriert werden, d. h. mit Mitteln, die bekanntlich Apoptose einleiten (z. B. genotoxische Mittel, Staurosporin) und/oder hauptsächlich zur Nekrose führen (z. B. Oligomycinbehandlung nach Glukoseentzug oder Behandlung mit Wasserstoffperoxid) (Ref. 3).

Tag 1/Tag 2: Aussäen der Zellen, waschen und Zugabe der Testsubstanzen wie vorstehend beschrieben.

Tag 2 – 4: Aufnehmen des Probenmediums von jeder Mulde. Um eine Austrocknung zu vermeiden, sollten nicht mehrere Proben aus der gleichen Mulde aufgenommen werden. Zentrifugieren des Mediums und Aufnahme des zellfreien Überstandes. *Achtung!* Aufnahme von Zellen vermeiden. Verwendung von 2 × 25 µl zellfreiem Überstand je Test.

Vorbereitung der Komponenten

Verdünnung des M30 CytoDeath HRP Conjugates

Das M30 CytoDeath HRP Conjugate muss vor der Verwendung mit M30 CytoDeath Conjugate Dilution Buffer verdünnt werden. Das Fläschchen mit Konjugat enthält genau 0,4 ml. 9,2 ml des M30 CytoDeath Conjugate Dilution Buffer direkt in das Fläschchen mit dem Konjugat zugeben und mischen.

Zubereitung des Waschpuffers

Für die Zubereitung des Waschpuffers die Wash Tablet in 500 ml frischem deionisiertem Wasser auflösen und mischen.

Probenverdünnung

Proben über dem Standard High (3 000 U/l) können mit Zellkulturmedium oder mit Standard Zero (0 U/l) verdünnt werden. Da die Verdünnung linear ist, kann die Originalkonzentration durch Multiplizieren des Messergebnisses mit dem Verdünnungsfaktor errechnet werden.

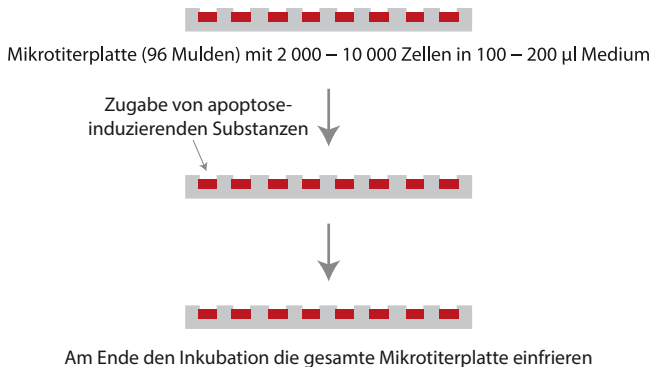
Lagerung und Haltbarkeit nach dem ersten Öffnen

Falls nicht der gesamte Kit verwendet wird, müssen die Reagenzien in ihren Originalbehältern bei 2 – 8 °C gelagert werden. Falls nicht alle Streifen benötigt werden, Beutel mit Mikrotiterstreifen wieder versiegeln (Trockenmittelbeutel beilegen).

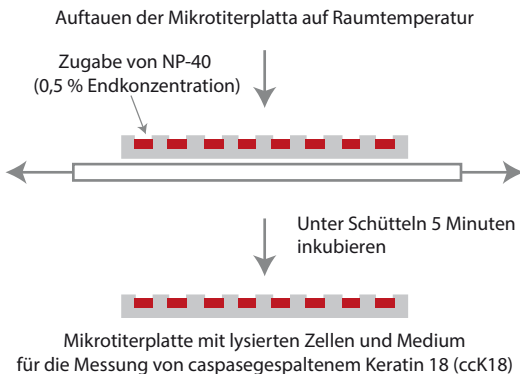
TMB Substrate und M30 CytoDeath HRP Conjugate sind lichtempfindlich und empfindlich gegenüber Metallionen. Sie sollten bei Nichtgebrauch immer in den originalen Braunglasflaschen bei 2 – 8 °C gelagert werden. Bei Verwendung eines neuen Behälters ist für Lichtschutz zu sorgen. TMB Substrate kann nach Lichteinwirkung nicht mehr benutzt werden.

Falls der Kit für verschiedene Anlässe verwendet wird, das verdünnte M30 CytoDeath HRP Conjugate im Fläschchen bei 2 – 8 °C lagern und vor Licht schützen. Die verdünnte Konjugatlösung ist 3 Wochen haltbar. Der Waschpuffer (aufgelöste Wash Tablet) ist bei Lagerung zwischen 2 – 8 °C 5 Wochen haltbar.

Schritt 1: Versuchsdurchführung

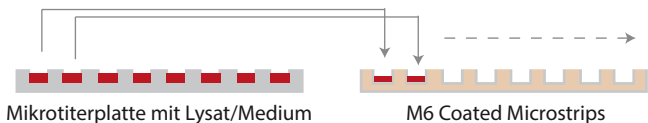


Schritt 2: Vorbereitung des Probenlysats



Step 3: Messung der cck18-Konzentration

3 × auf- und abpipettieren und anschließend
25 µl Probe in die M6 Coated Microstrips überführen



75 µl verdünntes Konjugat
hinzugeben



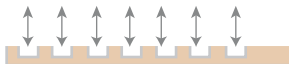
Unter Schütteln 4 Stunden bei
Raumtemperatur inkubieren



Probe-Konjugat-Lösung entfernen



5 × mit Waschpuffer waschen



200 µl TMB Substrate hinzufügen



20 Minuten im Dunkeln bei
Raumtemperatur inkubieren



50 µl Stop Solution hinzugeben
5 – 10 Sek. schütteln



Nach 5 – 30 Minuten Absorption bei 450 nm messen

Testprotokoll

M30 CytoDeath™ ELISA muss bei Raumtemperatur (24 ± 3 °C) durchgeführt werden.

1. Vor dem Durchführen des Tests alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen. Alle Reagenzien vor Gebrauch mit Hilfe des Wirbelmischers mischen.
2. Wash Tablet in frischem deionisiertem Wasser verdünnen (siehe „Vorbereitung der Komponenten“, S. 21).
3. M30 CytoDeath HRP Conjugate mit M30 CytoDeath Conjugate Dilution Buffer verdünnen (siehe „Vorbereitung der Komponenten“, S. 21) und mischen.
4. 25 µl der M30 CytoDeath Standards (Zero, Low, Medium und High) oder Proben pro Mulde pipettieren (Duplikate werden empfohlen).
5. Zugabe von 75 µl der verdünnten M30 CytoDeath HRP Conjugate-Lösung zu jeder Mulde. *Achtung! Die Schritte 4 und 5 müssen aufeinander folgend, ohne Unterbrechung, innerhalb von 20 Minuten ausgeführt werden.*
6. Mulden mit Sealing Tape oder einem Deckel für Mikrotiterplatten abdecken.
7. Auf dem Schüttler 4 Stunden inkubieren (Geschwindigkeitseinstellung: 600 U/min).
8. Mikrotiterplatte in einem Mikrotiterplattenwascher fünf Mal mit 400 – 500 µl Waschpuffer pro Mulde waschen (Überlaufwaschen)
oder
Die Mikrotiterplatte von Hand waschen: Inkubationslösung verwerfen und die Mulden 5 Mal mit 250 µl Waschpuffer waschen. Kreuzkontamination zwischen den Mulden vermeiden.
9. Zugabe von 200 µl TMB Substrate zu jeder Mulde. Im Dunkeln bei Raumtemperatur 20 ± 1 Minute inkubieren.
10. Zugabe von 50 µl Stop Solution zu jeder Mulde. Mikrotiterplatte 5 – 10 Sekunden schütteln, um TMB Substrate und Stop Solution vollständig zu vermischen. Mikrotiterplatte vor dem Ablesen der Absorption 5 Minuten stehen lassen.
11. Bestimmung der Absorption bei 450 nm in einem Absorptionslesegerät für Mikrotiterplatten innerhalb von 30 Minuten. Aufzeichnen der Ergebnisse.
12. Berechnen der Ergebnisse wie im Abschnitt „Berechnung der Analyseergebnisse“ beschrieben.

Berechnung der Analyseergebnisse

Die Ergebnisse der Absorptionsmessung werden mit computerunterstützten Methoden berechnet. Die Auswerten der Messergebnisse der Proben erfolgt mit Hilfe eines geeigneten Programms für den Umgang mit Daten vom Typ ELISA. Algorithmus: Kubischer Spline. x-Achse: Konzentration (U/l); y-Achse: Absorption bei 450 nm (A450).

Achtung! Falls Proben verdünnt wurden, muss die abgelesene Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

Leistungsmerkmale des Tests

Testcharakterisierung

Messbereich: Der Messbereich liegt zwischen 0 und 3 000 U/l.

Hochdosiseffekt: Unterhalb von 26 000 U/l tritt kein Hochdosiseffekt auf.

Empfindlichkeit: Nachweisgrenze: 60 U/l (Standard Zero (0 U/l) + 3 Standardabweichungen); Bestimmungsgrenze: 250 U/l.

Reproduzierbarkeit: Die Intra-Assay-Abweichung (Intra-Assay % VK) < 7 %, die Inter-Assay-Abweichung (Inter-Assay % VK) beträgt < 10 % und die Totalabweichung beträgt < 10 % bei Proben überhalb der Bestimmungsgrenze.

Wiederfindung: 80 – 120 %

Linearität/Verdünnung: Wiederfindungswerte von 80 – 120 % bei Verdünnungen mit Zellkulturmedium oder Standard Zero (0 U/l).

Kalibrierung des Standards

Die mit dem M30 CytoDeath™ ELISA gemessenen Einheiten sind in Bezug auf ein synthetisches Peptid definiert, das die Epitope M30 und M6 enthält.

Literaturhinweise

1. Leers *et al.*, *J Pathol.* 187, 1999, 567.
2. Schutte *et al.*, *Exp Cell Research* 297, 2004, 11.
3. Hägg *et al.*, *Invest New Drugs* 20, 2002, 253.
4. Kramer *et al.*, *Cancer Res* 64, 2004, 1751.
5. Erdal *et al.*, *PNAS* 102, 2005, 192.
6. Zhang *et al.*, *Clin Cancer Res.* 16, 2010, 4478.
7. Gruenbacher *et al.*, *Cancer Res.* 2010 [*in press*]
8. Herrmann *et al.*, *J Biomol Screen.* 13, 2008, 1.
9. Brnjic *et al.*, *Mol Biosyst.* 6, 2010, 767

Weitere Literaturhinweise und Informationen finden Sie auf unserer Webseite unter www.vlvbio.com/literature.aspx.

Haftung

Die hier beschriebenen Leistungsangaben wurden mit dem oben genannten Verfahren erhalten. Jede Abweichung oder Modifikation von diesem durch den Hersteller empfohlenen Verfahren kann die Ergebnisse beeinflussen. In diesem Fall lehnt der Hersteller die Haftung aller ausdrücklichen, implizierten oder gesetzlichen Gewährleistungen ab, einschließlich der gesetzlichen Gewährleistung der Marktfähigkeit und der Gebrauchstauglichkeit. In diesem Fall können der Hersteller und seine autorisierten Vertriebshändler nicht für indirekte oder Folgeschäden haftbar gemacht werden.

De



VLVbio

VLVbio AB, Hästholmsvägen 32, 131 30 Nacka, Sweden
Phone: +46 8 122 053 00 • www.vlvbio.com • info@vlvbio.com