



Instructions for Use

BDNF ELISA

IVD



REF EIA-5968

Σ 96


DRG Instruments GmbH,

Distributed by:


DRG International, Inc.,

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

Table of Contents

1	INTENDED USE.....	2
2	SUMMARY AND EXPLANATION	2
3	PRINCIPLE OF THE TEST	2
4	MATERIALS PROVIDED	2
5	REAGENT STORAGE & STABILITY	2
6	MATERIALS NOT PROVIDED.....	2
7	WARNINGS AND PRECAUTIONS	3
8	SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING.....	3
9	REAGENT PREPARATION	4
10	PROCEDURE	4
11	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	5
12	ADDITIONAL INSTRUCTIONS.....	6
13	REFERENCES / LITERATURE.....	6
1	VERWENDUNGSZWECK.....	7
2	ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG.....	7
3	TESTPRINZIP	7
4	BESTANDTEILE DES KITS	7
5	LAGERUNG UND HALTBARKEIT	7
6	ERFORDERLICHE ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN.....	8
7	WARNUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN.....	8
8	PROBENSAMMUNG UND VORBEREITUNG	8
9	REAGENZIVORBEREITUNG	9
10	TESTDURCHFÜHRUNG	9
11	ASSAY-CHARAKTERISTIKA.....	10
12	ZUSÄTZLICHE ANWEISUNGEN.....	10
13	REFERENZEN / LITERATUR.....	11
	SYMBOLS USED.....	12

1 INTENDED USE

The purpose of this kit is the quantitative determination of mature human BDNF in human serum, or citrate treated plasma samples only when used as directed.

2 SUMMARY AND EXPLANATION

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) belongs to the neurotrophin family of growth factors that play an important role in a variety of physiological functions, for instance mediating neuronal survival and apoptosis, maintaining synaptic plasticity and regulating synaptic transmission. Altered BDNF levels in the central nervous system and blood are implicated in a variety of neurodegenerative diseases such as amyotrophic lateral sclerosis, neuropathic pain and Alzheimer's disease.

3 PRINCIPLE OF THE TEST

The BDNF enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Kit is a sandwich ELISA that allows the preferential quantification of mature BDNF in less than 3 hours. This kit consists of a pre-coated mouse monoclonal anti-BDNF capture antibody, a biotinylated anti-BDNF detection antibody and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin. The addition of a substrate (3,3',5,5'- tetramethylbenzidine, TMB) yields a colored reaction product which is directly proportional to the concentration of BDNF present in samples and protein standards. This BDNF ELISA kit employs a recombinant human BDNF standard approved by the World Health Organization (WHO, www.nibsc.org). This kit is suitable to measure mature BDNF in human serum and suitably treated plasma samples only. The antibodies used in this ELISA kit bind epitopes within the mature domain of the protein and therefore recognize the mature as well as the pro-form of BDNF. However, cross-reactivity to the full-length proBDNF protein is low.

4 MATERIALS PROVIDED

1. BDNF antibody coated 96 well microplate strips	1 x 96 wells, set: 12 x 8
2. Assay Diluent A* (ready to use)	2 x 25 mL
3. Recombinant BDNF Standard, (freeze-dried)	2 x 1000 pg
4. BDNF Detection antibody (ready to use)	1 x 12 mL
5. Streptavidin-HRP (ready to use)	1 x 12 mL
6. Wash Buffer (20x), 1 bottle	1 x 25 mL
7. TMB Substrate (1x)	1 x 12 mL
8. Stop Solution (1x)	1 x 12 mL
9. Plate Sealer	4

*The assay diluent provided in this kit is suitable for measuring BDNF in serum or plasma. See SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING section for the minimum required sample dilutions.

5 REAGENT STORAGE & STABILITY

Reagent	Storage & Stability
ELISA kit as supplied	24 months at 2 °C - 8 °C
Reconstituted Standard	Use on same day; aliquot unused standard to prevent multiple freeze-thaw cycles and store at -20 °C for 2 weeks.
Detection Ab & HRP Conjugate (1X)	30 months at 2 °C - 8 °C
Diluted Wash Buffer	36 months at 20 °C - 25 °C

6 MATERIALS NOT PROVIDED

1. Precision pipettes
2. Disposable pipette tips
3. ELISA reader capable of reading absorbance at 450 nm
4. Flat-head Vortex mixer
5. Plate shaker
6. Graph paper

7 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. Potential biohazardous materials:
The standards contain human source components which have been tested and found non-reactive for hepatitis B surface antigen as well as HIV antibody with FDA licensed reagents. However, as there is no test method that can offer complete assurance that HIV, Hepatitis B virus or other infectious agents are absent, these reagents should be handled at the Biosafety Level 2, as recommended in the Centers for Disease Control/National Institutes of Health manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories." 1984.
2. This kit is intended for the quantitation of BDNF in human serum, or suitably treated human plasma samples only.
3. Do not pipette by mouth. Do not smoke, eat, or drink in the areas in which specimens or kit reagents are handled.
4. The components in this kit are intended for use as an integral unit. The components of different lots should not be mixed.
5. It is recommended that standards, control and serum samples be run in duplicate
6. Some test reagents contain chemicals and chemical mixtures which are considered hazardous. Please observe good laboratory practices and handling methods when using components of this assay.
7. Optimal results will be obtained by strict adherence to this protocol. Accurate and precise pipetting, as well as following the exact time and temperature requirements prescribed are essential. Any deviation from this may yield invalid data.

8 SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Serum

- Allow the serum to clot in a serum separator tube (about 30 minutes to 4 hours) at room temperature.
- Centrifuge at approximately 1,000 x g for 15 minutes.
- Analyze the serum immediately or aliquot and store frozen at -20 °C to -80 °C.

- Dilute serum samples with Assay Diluent A to measure BDNF concentrations.
- For human serum samples, a minimum dilution of **1/50 – 1/100** is required.

Plasma

- Collect plasma using citrate as anticoagulant, other coagulants have not been qualified for use.
- Centrifuge for 15 min at 2 °C - 8 °C at 1,500 x g within 30 minutes of collection.
- For eliminating the platelet effect we suggest further centrifugation for 10 min at 2 °C - 8 °C at 10,000 x g.
- Analyze immediately or aliquot and store samples at -20 °C to -80 °C.

- Dilute plasma samples at least **1/20** with Assay Diluent A to measure BDNF concentrations.

Note: Because of the release of BDNF from platelets, serum and plasma BDNF levels in humans will vary depending on temperature, storage time and anti-coagulant used. Serum BDNF levels are less variable than plasma BDNF concentrations and reach stable peak levels after 1 hour of incubation (Tsuchimine et al., 2014). Thus, to prevent sample variation, strict adherence to consistent sample preparation procedures among samples and study groups are highly recommended.

Moreover, for unknown concentrations of BDNF in samples, it is important to perform several dilutions of the sample to allow the BDNF concentration to fall within the range of the BDNF standard curve (7.8 - 500 pg/mL).

Typical normal human serum values are 10 - 30 ng/mL; Plasma values are more variable but range from 2 - 20 ng/mL in most cases if collected quickly.

9 REAGENT PREPARATION

20X Wash Buffer

Prepare 1X Wash buffer by adding the contents of the bottle (25 mL, 20X) to 475 mL of distilled or deionized water. Store at room temperature (20 °C - 25 °C).

Preparation of BDNF Standard

- Reconstitute the lyophilized antigen standard with 1 mL of the same diluent used for preparing sample dilutions.
- Label the vial with the reconstituted BDNF standard as “1000 pg/mL”; vortex and let stand for 15 minutes.
- Dilute the 1000 pg/mL BDNF standard 1:2 (e.g. 500 µL of 1000 pg/mL standard + 500 µL diluent); label this tube “500 pg/mL”.
- Note: 500 pg/mL is the highest concentration of the BDNF standard curve.

In order to generate a BDNF standard curve, perform a 1:2 serial dilutions down to 7.8 pg/mL. The volumes used for the dilution series depends on the number of repeats per BDNF concentration. For triplicate measurement (100 µL per well) of each BDNF standard concentration, we recommend this procedure:

1. Label 6 tubes with “250 pg/mL”, “125 pg/mL”, “62.5 pg/mL”, “31.3 pg/mL”, “15.6 pg/mL” and “7.8 pg/mL”, respectively
2. Aliquot 400 µL of the sample diluent into each tube
3. Take 400 µL from the “500 pg/mL” tube and transfer to the “250 pg/mL” tube
4. Pipet up and down and vortex to mix to avoid foaming, use only a very brief vortex
5. Repeat steps 3 and 4 for each consecutive concentration until the last tube “7.8 pg/mL” is prepared and mixed well.
6. Standard solution should be prepared no more than 2 hours prior to the experiment. The working standard solution may be stored at 4 °C for up to 12 hours, or at -20 °C for up to 24 hours. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

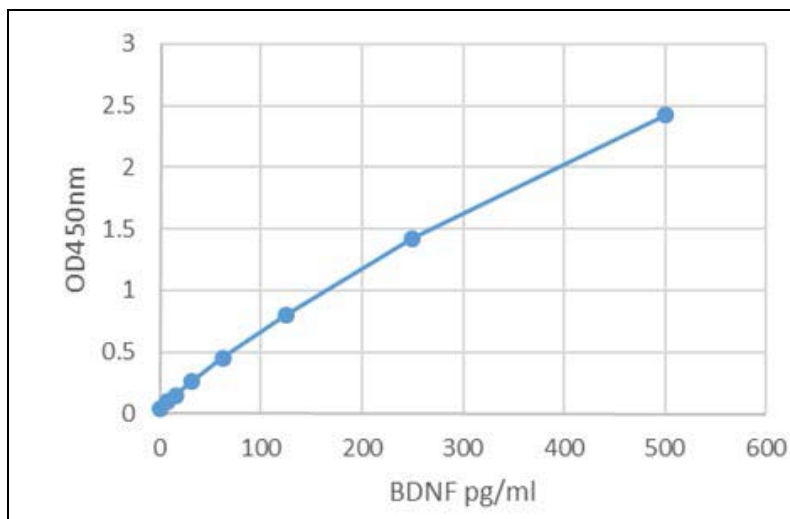
10 PROCEDURE

All steps are performed at room temperature (20 °C - 25 °C, 70 °F - 75 °F).

1. Add 100 µL of diluted BDNF standards, samples and blank (sample diluent only) to the pre-coated microplate wells
2. If available, include a negative and positive control sample in the assay procedure.
3. Seal the plate (e.g. with plate sealer or parafilm) and incubate the plate with moderate shaking for 60 minutes.
4. Discard the solution inside the wells and perform 3 washes with 1x wash buffer (350 µL per well). See the ADDITIONAL INSTRUCTIONS section for a detailed description of the washing procedure (MANUAL WASHING INSTRUCTIONS).
5. Add 100 µL of the detection antibody into each well.
6. Seal the plate (e.g. with plate sealer or parafilm) and incubate the plate with moderate shaking for 30 minutes.
7. Discard the solution inside the wells and wash as described in step 4
8. Add 100 µL of the streptavidin-HRP conjugate into each well
9. Seal the plate (e.g. with plate sealer or parafilm) and incubate the plate with moderate shaking for 30 minutes.
10. Discard the solution inside the wells and wash as described in step 4
11. Add 100 µL of TMB into each well and incubate plate at room temperature for 15 minutes without shaking in the dark.
12. Stop the reaction by adding 50µL of the stop solution into each well. Visible blue color will change to yellow. Read the absorbance at 450 nm on a plate reader. Note: Color will fade over time; hence, we recommend plate to be read within 5 minutes after adding the stop solution or no longer than 30 minutes after addition.

10.1 Example of a Standard Curve

	Conc. pg/mL	OD 450 nm
Std 1	0	0.05
Std 2	7.8	0.10
Std 3	15.6	0.15
Std 4	31.3	0.26
Std 5	62.5	0.45
Std 6	125	0.80
Std 7	250	1.42
Std 8	500	2.42



10.2 Calculation of Results

1. Average the readings for each BDNF standard concentration, blank and sample.
2. Plot a standard curve with the BDNF standard concentration on the x-axis and the OD at 450 nm on the y-axis.
3. If values for the BDNF standards are adjusted for background absorbance, then subtract the blank value from the OD450 of the samples as well.
4. Use appropriate software to reduce the data and generate a four-parameter logistic curve-fit. Do not use linear regression.
5. Perform a regression analysis to calculate the concentration of BDNF in the samples. Multiply the result by the sample dilution factor.

11 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1 Sensitivity

The sensitivity was determined by calculating the mean + 2SD of the standard zero point tested 20 times in the same run.

Serum	No. of Replicates	Mean pg/mL	Standard Deviation	Mean + 2SD (Sensitivity)
Zero Standard	20	1.11	0.745	2.6

11.2 Correlation with a Reference ELISA kit:

Serum samples were tested by this ELISA kit and a reference ELISA kit. Results were as follows:

Correlation	Slope	Intercept
0.99	0.93	11.2

11.3 Precision

Intra-Assay

Serum	No. of Replicates	Mean pg/mL	Standard Deviation	Coefficient of Variation (%)
1	16	8.6	0.71	8.26
2	16	60.2	3.00	4.98
3	16	215.9	8.44	3.91

Inter-Assay

Serum	No. of Replicates	Mean pg/mL	Standard Deviation	Coefficient of Variation (%)
1	16	8.7	0.73	8.4
2	16	59.7	2.98	5.0
3	16	217.1	10.52	4.8

11.4 Linearity

Two different patient samples were diluted with the sample diluent to 1:200, 1:400 and 1:800. BDNF values were calculated and results were corrected with the dilution factor.

	Original Value	Percentage of Recovery		
Serum	pg/mL	1/200	1/400	1/800
1	19230.8	96.7	97.5	90.0
2	34855.7	99.3	101.1	103.9

12 ADDITIONAL INSTRUCTIONS

1. Do not perform standard or sample dilutions within the experimental well to avoid damaging the plate.
2. It is recommended that at least duplicate measurements, if not triplicate for each standard and sample dilution be performed for best evaluation of the results.
3. Dilute samples to a BDNF concentration that falls within the range of the standard curve. Do not extrapolate absorbance readings for best results.
4. Avoid touching the inside surface of the plate wells with the pipette tip or sharp objects.
5. Complete removal of liquid from the wells at each step is essential for reliable results. However, avoid letting the wells dry out at any time. Complete the assay in one session if possible.
6. Add TMB and the stop solution to the wells in the same order to all wells.
7. Ensure that all bubbles are removed and that the bottom of the plate is optically clean prior to taking the absorbance reading for best results.
8. All incubations are at room temperature (20 °C - 25 °C, 70 °F - 75 °F) in our laboratories.

12.1 Manual washing instructions

Proper emptying and washing of the plate is crucial for low backgrounds, consistent readings, and the reduction of non-specific binding. For manual plate washing, we recommend the following procedure:

- a. To remove liquid from the wells, place the plate on the palm of the hand and quickly invert the plate over the sink. Forcefully move the arm downwards and stop abruptly to force the liquid out of the wells. When done correctly, this technique should prevent liquid from getting onto the fingers or onto the outside of the microplate wells
- b. Blot and forcefully tap the microplate against clean paper towels for 3-5 times.
- c. Wash the wells by pipetting 350 μ L of wash buffer into each well and empty the wells as described in step a-b).
- d. Repeat this procedure for a total of 3 times for each wash cycle.

13 REFERENCES / LITERATURE

1. Tsuchimine et al., Preanalysis Storage Conditions Influence the Measurement of Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels in Peripheral Blood. *Neuropsychobiology*. 2014 April; 69(2): 83-87.
2. Polacchini et al., A method for reproducible measurements of serum BDNF: comparison of the performance of six commercial assays. *Scientific Reports*. 2015 December; 5:17989 | DOI: 10.1038/srep17989.

1 VERWENDUNGSZWECK

Der Zweck dieses Kits ist die quantitative Bestimmung von reifem humanem BDNF in humanem Serum oder Zitratplasma nur bei bestimmungsgemäßer Verwendung.

2 ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Der aus dem Gehirn stammende neurotrophische Faktor (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF) gehört zur Familie der Neurotrophin-Wachstumsfaktoren, die eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von physiologischen Funktionen spielen, wie z.B. der Vermittlung von neuronalem Überleben und Apoptose, der Aufrechterhaltung der synaptischen Plastizität und der Regulierung der synaptischen Übertragung. Veränderte BDNF-Werte im zentralen Nervensystem und im Blut sind an einer Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen wie amyotrophe Lateralsklerose, neuropathische Schmerzen und Alzheimer beteiligt.

3 TESTPRINZIP

Der BDNF Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit ist ein Sandwich-ELISA, der die Quantifizierung von reifem BDNF in weniger als 3 Stunden ermöglicht. Dieser Kit besteht aus einem vorbeschichteten monoklonalen Maus-Anti-BDNF-Fangantikörper, einem biotinylierten Anti-BDNF-Detektionsantikörper und Streptavidin, das mit Meerrettich-peroxidase (HRP) konjugiert ist. Die Zugabe eines Substrats (3,3',5,5' - Tetramethylbenzidin, TMB) ergibt ein farbiges Reaktionsprodukt, das direkt proportional zur Konzentration von BDNF in Proben und Proteinstandards ist.

Dieser BDNF-ELISA-Kit verwendet einen rekombinanten humane BDNF-Standard, der von der Weltgesundheitsorganisation (WHO, www.nibsc.org) anerkannt wurde. Dieser Kit ist geeignet, um reifes BDNF in humanem Serum und entsprechend behandelten Plasmaproben zu messen. Die in diesem ELISA-Kit verwendeten Antikörper binden Epitope innerhalb der reifen Domäne des Proteins und erkennen damit sowohl die reife als auch die Proform von BDNF. Die Kreuzreaktivität mit dem full-length proBDNF-Protein ist jedoch gering.

4 BESTANDTEILE DES KITS

1. Mikrotiterplatte, beschichtet mit BDNF-Antikörper	1 x 96 Wells / 12 x 8
2. Assay Diluent A* (gebrauchsfertig)	2 x 25 mL
3. Rekombinanter BDNF-Standard, (lyophilisiert)	2 x 1000 pg
4. BDNF-Detektionsantikörper (gebrauchsfertig)	1 x 12 mL
5. Streptavidin-HRP (gebrauchsfertig)	1 x 12 mL
6. Wash Buffer (20x), 1 Flasche	1 x 25 mL
7. TMB-Substrat (1x)	1 x 12 mL
8. Stop Solution (1x)	1 x 12 mL
9. Plattenabdeckung	4

*Das in diesem Kit enthaltene „Assay Diluent A“ ist für die Messung von BDNF in Serum oder Plasma geeignet. Siehe Abschnitt PROBENSAMMUNG UND VORBEREITUNG für die minimal erforderlichen Probenverdünnungen.

5 LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Reagenz	Lagerung & Haltbarkeit
ELISA Kit	24 Monate bei 2 °C - 8 °C
Rekonstituierter Standard	Innerhalb des gleichen Tages verwenden; Nicht verwendeter Standard sollte aliquotiert werden zur Vermeidung mehrerer Einfrier-Auftau-Zyklen und kann bei -20 °C für 2 Wochen gelagert werden.
Detektions-Antikörper & Streptavidin-HRP (1X)	30 Monate bei 2 °C - 8 °C
Verdünnter Waschpuffer	36 Monate bei 20 °C - 25 °C

6 ERFORDERLICHE ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

1. Präzisionspipetten
2. Einweg-Pipettenspitzen
3. ELISA-Fotometer, der die Absorption bei 450 nm messen kann.
4. Flachkopf-Wirbelmischer (Flat-head Vortex)
5. Plattenschüttler
6. Millimeterpapier

7 WARNUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Die Informationen entnehmen Sie bitte der englischen Arbeitsanleitung.

8 PROBENSAMMUNG UND VORBEREITUNG

Serum

- Lassen Sie das Serum in einem Serumseparatorröhrchen (ca. 30 Minuten bis 4 Stunden) bei Raumtemperatur gerinnen.
- Zentrifugieren Sie bei ca. 1000 g für 15 Minuten.
- Analysieren Sie das Serum sofort oder aliquotieren und lagern Sie es gefroren bei -20 °C bis -80 °C.

- Verdünnen Sie Serumproben mit Assay Diluent A zur Messung der BDNF-Konzentrationen.
- Für humane Serumproben ist eine Mindestverdünnung von **1/50 - 1/100** erforderlich.

Plasma

- Sammeln Sie Plasma mit Zitrat als Antikoagulans, andere Koagulanzen sind nicht für die Verwendung geeignet.
- Zentrifugieren Sie 15 Minuten bei 2 °C - 8 °C bei 1500 g innerhalb von 30 Minuten nach der Entnahme.
- Um den Plättcheneffekt zu eliminieren, empfehlen wir eine weitere Zentrifugation für 10 Minuten bei 2 °C - 8 °C bei 10 000 g.
- Analysieren Sie die Proben sofort oder aliquotieren und lagern Sie es gefroren bei -20 °C bis -80 °C.

- Verdünnen Sie Plasmaproben mindestens **1/20** mit Assay Diluent A zur Messung der BDNF-Konzentrationen.

Hinweis: Aufgrund der Freisetzung von BDNF aus Blutplättchen variieren die BDNF-Spiegel im menschlichen Serum und Plasma je nach Temperatur, Lagerzeit und verwendetem Antikoagulans. Die Serum-BDNF-Spiegel schwanken weniger als die Plasma-BDNF-Konzentrationen und erreichen nach einer Stunde Inkubationszeit stabile Spitzenwerte (Tsuchimine et al., 2014). Um Schwankungen der Proben zu vermeiden, wird daher die strikte Einhaltung einheitlicher Probenvorbereitungsverfahren zwischen Proben und Arbeitsgruppen dringend empfohlen.

Darüber hinaus ist es bei unbekanntem Konzentrationen von BDNF in Proben wichtig, mehrere Verdünnungen der Probe durchzuführen, damit die BDNF-Konzentration innerhalb des Bereichs der BDNF-Standardkurve (7,8 - 500 pg/mL) liegt.

Typische normale humane Serumwerte sind 10 - 30 ng/mL; Plasmawerte sind variabler, reichen aber in den meisten Fällen von 2 - 20 ng/mL, wenn sie schnell gesammelt werden.

9 REAGENZENVORBEREITUNG

20X Wash Buffer

Bereiten Sie 1X-Waschpuffer vor, indem Sie den Inhalt der Flasche (25 mL, 20X) mit 475 mL destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen.

Lagern Sie den Waschpuffer bei Raumtemperatur (20 °C - 25 °C).

Herstellung des BDNF-Standards

- Rekonstituieren Sie den lyophilisierten Standard mit 1 mL der gleichen Verdünnungslösung, die für die Herstellung der Probenverdünnungen verwendet wird.
- Markieren Sie das Fläschchen mit dem rekonstituierten BDNF-Standard als "1000 pg/mL"; vortexen Sie es und lassen Sie es 15 Minuten stehen.
- Verdünnen Sie den 1000 pg/mL BDNF-Standard 1:2 (z.B. 500 µL 1000 pg/mL-Standard + 500 µL Verdünnungslösung); kennzeichnen Sie dieses Röhrchen mit "500 pg/mL".
- Hinweis: 500 pg/mL ist die höchste Konzentration der BDNF-Standardkurve.

Um eine BDNF-Standardkurve herzustellen, führen Sie eine 1:2 serielle Verdünnung bis hinunter zu 7,8 pg/mL durch. Die für die Verdünnungsreihe verwendeten Volumina sind abhängig von der Anzahl der Wiederholungen pro BDNF-Konzentration. Für die Dreifachmessung (100 µL pro Well) jeder BDNF-Standardkonzentration empfehlen wir dieses Verfahren:

1. 6 Röhrchen mit "250 pg/mL", "125 pg/mL", "62,5 pg/mL", "31,3 pg/mL", "15,6 pg/mL" bzw. "7,8 pg/mL" kennzeichnen.
2. Geben Sie 400 µL des Probenverdünners in jedes Röhrchen.
3. 400 µL aus dem "500 pg/mL"-Röhrchen nehmen und in das "250 pg/mL"-Röhrchen übertragen.
4. Pipettieren Sie auf und ab und mischen Sie (mit Vortex) vorsichtig, um Schaumbildung zu vermeiden.
5. Wiederholen Sie die Schritte 3 und 4 für jede aufeinanderfolgende Konzentration, bis das letzte Röhrchen "7,8 pg/mL" vorbereitet und gut vermischt ist.
6. Die Standardlösung sollte nicht länger als 2 Stunden vor dem Versuch hergestellt werden. Die Standardlösung kann bis zu 12 Stunden bei 4 °C und bis zu 24 Stunden bei -20 °C gelagert werden. Vermeiden Sie wiederholte Einfrier-Auftau-Zyklen.

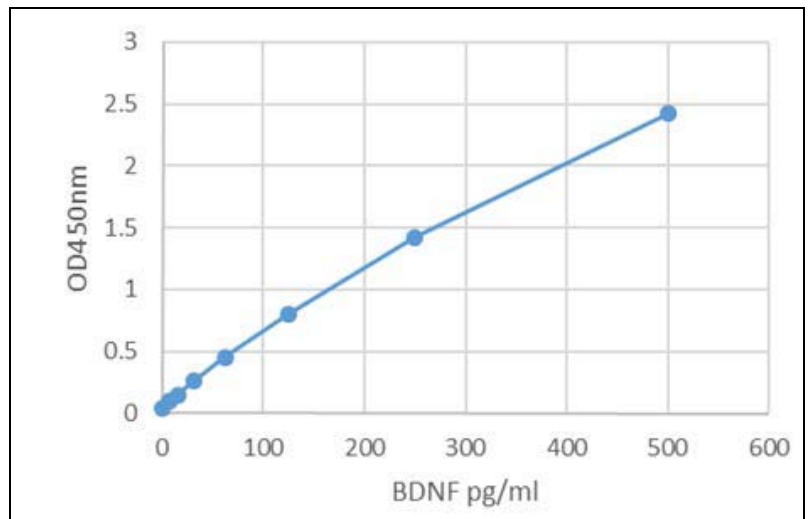
10 TESTDURCHFÜHRUNG

Alle Schritte werden bei Raumtemperatur (20 °C - 25 °C) durchgeführt.

1. **100 µL** verdünnte BDNF-Standards, Proben und Blank (nur Probenverdünner Assay Diluent A) in die vorbeschichteten Wells der Mikrotiterplatte pipettieren.
2. Falls verfügbar, eine Negativ- und Positivkontrollprobe in dem Testansatz mit ansetzen.
3. Platte abdecken (z.B. mit der Plattenabdeckung oder Parafilm) und unter leichtem Schütteln für **60 Minuten** inkubieren.
4. Die Lösung aus den Wells entfernen und 3 Waschgänge mit 1X-Waschpuffer durchführen (350 µL pro Well). Im Abschnitt 13.1 "Anweisung für manuelles Waschen" finden Sie eine detaillierte Beschreibung des Waschvorgangs.
5. **100 µL** des Detektions-Antikörpers in jedes Well pipettieren.
6. Platte abdecken (z.B. mit der Plattenabdeckung oder Parafilm) und unter leichtem Schütteln für **30 Minuten** inkubieren.
7. Die Lösung aus den Wells entfernen und waschen, wie in Schritt 4 beschrieben.
8. **100 µL** des Streptavidin-HRP-Konjugates in jedes Well pipettieren.
9. Platte abdecken (z.B. mit der Plattenabdeckung oder Parafilm) und unter leichtem Schütteln für **30 Minuten** inkubieren.
10. Die Lösung aus den Wells entfernen und waschen, wie in Schritt 4 beschrieben.
11. **100 µL** TMB-Substrat in jedes Well geben und die Platte bei Raumtemperatur für **15 Minuten**, ohne Schütteln, im Dunkeln inkubieren.
12. **50 µL** Stopplösung in jedes Well geben, um die Reaktion zu stoppen. Die sichtbare blaue Farbe wechselt zu gelb. Die Absorption bei 450 nm mit einem Platten-Photometer messen.
Hinweis: Die Farbe verblasst mit der Zeit; daher empfehlen wir, die Platte innerhalb von 5 Minuten nach Zugabe der Stopplösung oder nicht später als 30 Minuten nach Zugabe zu messen.

10.1 Beispiel einer Standardkurve

	Konz. pg/mL	OD 450 nm
Std 1	0	0,05
Std 2	7,8	0,10
Std 3	15,6	0,15
Std 4	31,3	0,26
Std 5	62,5	0,45
Std 6	125	0,80
Std 7	250	1,42
Std 8	500	2,42



10.2 Berechnung der Ergebnisse

1. Mittelwert der Messwerte für jede BDNF-Standardkonzentration, jeden Blank-Wert und jede Probe berechnen.
2. Zeichnen Sie eine Standardkurve mit der BDNF-Standardkonzentration auf der x-Achse und der OD bei 450 nm auf der y-Achse.
3. Sollen die Werte für die BDNF-Standards an die Hintergrundabsorption angepasst werden, dann subtrahieren Sie auch den Blank-Wert vom OD₄₅₀-Wert der Proben.
4. Verwenden Sie geeignete Software, um die Daten mit einer 4-Parameter logistische Kurvenanpassung zu berechnen. Verwenden Sie keine lineare Regression.
5. Führen Sie eine Regressionsanalyse durch, um die Konzentration von BDNF in den Proben zu berechnen. Multiplizieren Sie das Ergebnis mit dem Probenverdünnungsfaktor.

11 ASSAY-CHARAKTERISTIKA

Die Daten entnehmen Sie bitte der englischen Gebrauchsanweisung.

12 ZUSÄTZLICHE ANWEISUNGEN

1. Führen Sie keine Standard- oder Probenverdünnungen in den Wells durch, um eine Beschädigung der Platte zu vermeiden.
2. Es wird empfohlen, mindestens Doppelbestimmungen durchzuführen, um die Ergebnisse bestmöglich auszuwerten.
3. Um beste Ergebnisse zu erzielen, verdünnen Sie die Proben auf eine BDNF-Konzentration, die innerhalb des Bereichs der Standardkurve liegt. Extrapolieren Sie keine Absorptionmesswerte.
4. Vermeiden Sie es, die Innenfläche der Wells mit der Pipettenspitze oder scharfen Gegenständen zu berühren.
5. Die vollständige Entfernung der Flüssigkeit aus den Wells bei jedem Schritt ist für zuverlässige Ergebnisse unerlässlich. Vermeiden Sie jedoch, die Wells austrocknen zu lassen. Den Assay nach Möglichkeit ohne Unterbrechung durchführen.
6. Geben Sie TMB-Substrat und die Stopplösung in der gleichen Reihenfolge zu den Wells.
7. Um beste Ergebnisse zu erzielen, stellen Sie sicher, dass alle Luftblasen entfernt werden und dass der Boden der Platte optisch sauber ist, bevor Sie die Absorptionmessung durchführen.
8. Alle Inkubationen sollen bei Raumtemperatur (20 °C - 25 °C) erfolgen.

12.1 Anweisung für manuelles Waschen

Das richtige Leeren und Waschen der Platte ist entscheidend für niedrige Hintergrund-ODs, gleichbleibende Messwerte und die Reduzierung der unspezifischen Bindung. Für das manuelle Waschen der Platte empfehlen wir das folgende Verfahren:

- a. Um Flüssigkeit aus den Wells zu entfernen, legen Sie die Platte auf die Handfläche und drehen Sie die Platte schnell über das Waschbecken. Bewegen Sie den Arm kräftig nach unten und stoppen Sie abrupt, um die Flüssigkeit aus den Wells zu entfernen. Bei richtiger Anwendung sollte diese Technik verhindern, dass Flüssigkeit auf die Finger oder auf die Außenseite der Mikrotiterplatte kommt.
- b. Tupfen und klopfen Sie die Mikrotiterplatte 3- bis 5-mal kräftig gegen saubere saugfähige Papiertücher.
- c. Waschen Sie die Wells durch Pipettieren von 350 µL Waschpuffer in jedes Well und entleeren Sie die Wells wie in Schritt a-b) beschrieben.
- d. Wiederholen Sie diesen Vorgang insgesamt 3-mal für jeden Waschgang.

13 REFERENZEN / LITERATUR

1. Tsuchimine et al., Preanalysis Storage Conditions Influence the Measurement of Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels in Peripheral Blood. *Neuropsychobiology*. 2014 April; 69(2): 83-87.
2. Polacchini et al., A method for reproducible measurements of serum BDNF: comparison of the performance of six commercial assays. *Scientific Reports*. 2015 December; 5:17989 | DOI: 10.1038/srep17989.

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
	Batch code *	Chargencode *	Codice del lotto	Codigo de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité