

Arbeitsanleitung / Manual

IDK[®] IDO ELISA

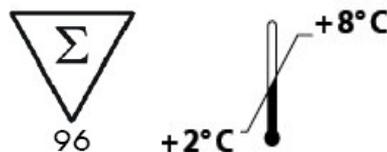
***Zur in-vitro-Bestimmung von Indolamin-2,3-Dioxygenase 1
(IDO1)***

***For the in vitro determination of Indoleamine 2,3-dioxygenase 1
(IDO1)***

Nur zu Forschungszwecken / For research use only

Gültig ab / Valid from 2015-12-09

REF **K 7727**



RUO



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. INHALT DER TESTPACKUNG	2
3. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	2
4. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	3
5. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG	4
6. TESTDURCHFÜHRUNG	4
<i>Testprinzip</i>	4
<i>Pipettierschema</i>	5
7. ERGEBNISSE	7
8. EINSCHRÄNKUNGEN	8
9. QUALITÄTSKONTROLLE	8
10. TESTCHARAKTERISTIKA	9
<i>Analytische Sensitivität</i>	9
11. VORSICHTSMASSNAHMEN	9
12. TECHNISCHE MERKMALE	9
13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	10
14. LITERATUR	10

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die quantitative Bestimmung von Indolamin-2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) geeignet. Nur für wissenschaftliche Forschung. Nicht für diagnostische Zwecke.

2. INHALT DER TESTPACKUNG

Art. Nr.	Bezeichnung	Kit Komponenten	Menge
K 7727	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 7727	STD	Standards, lyophilisiert (0; 0,3; 1,5; 6; 25; 100 ng/ml)	1 x 6 vials
K 7727 K 7727	CTRL 1 CTRL 2	Kontrollen, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 2 vials
K 7727	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 7727	AB	IDO-Antikörper, lyophilisiert	2 x 1 vial
K 7727	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	1 x 30 ml
K 7727	CONJ	Konjugat, Peroxidase-markiert, Konzentrat	1 x 65 µl
K 7727	CONJBUF	Konjugatverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 13 ml
K 7727	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 7727	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

3. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte

- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 6)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25°C (≥18,2 MΩ cm).

4. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so je nach Probenaufkommen mehrmals bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz an zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (**100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser**), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das Pufferkonzentrat kann bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die verdünnte Pufferlösung ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Die lyophilisierten STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrollen) sind bei 2-8 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Standards und Kontrollen werden mit **200 µl Assaypuffer (ASYBUF)** rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. Rekonstituierte Standards und Kontrollen können bei **-20 °C** gelagert werden.
- Der Inhalt eines Fläschchens **IDO-Antikörper (AB)** wird in **5,5 ml Assaypuffer (ASYBUF)** gelöst. Werden mehrere Fläschchen benötigt, deren

Inhalt vereinen und vor Gebrauch mischen. Der gelöste IDO-Antikörper kann bei **-20 °C** gelagert werden.

- Das **Peroxidase-Konjugat (CONJ)** wird **1:201** in Konjugatstabilisierungspuffer (CONJBUF) verdünnt (**z.B. 60 µl CONJ + 12 ml CONJBUF**; nur die benötigte Menge ansetzen). Unverdünntes Konjugat ist bei 2-8 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Verdünntes Konjugat kann **1 Woche bei 2-8 °C** aufbewahrt werden.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

5. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

Als Probe eignet sich Serum und EDTA-Plasma. Die Proben werden **unverdünnt** verwendet.

Dieser ELISA ist auch für andere Probenmatrices geeignet wie z.B. Zellkulturüberstand, Gewebehomogenisat etc. Es kann dafür aber ein anderer Standardmessbereich nötig sein, bitte kontaktieren Sie dazu die Immundiagnostik AG.

Proben mit sichtbaren Mengen an Feststoff sollten zentrifugiert werden. Zur längeren Lagerung sollten die Proben bei -20 °C aufbewahrt werden.

6. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf der Sandwich-ELISA-Technik.

Teststandards, Kontrollen und Proben, die auf IDO1 zu untersuchen sind, werden in eine Mikrotiterplatte pipettiert, deren Vertiefungen mit einem hochaffinen polyklonalen anti-human IDO1-Antikörper beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt wird die IDO aus der Probe von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Beim zweiten Inkubationsschritt wird der Detektionsantikörper, ein Biotin-markierter polyklonaler anti-IDO1-Antikörper, zugegeben, welcher an die vom Fängerantikörper gebundene IDO1 bindet. Dann wird das Konjugat (peroxidase-markiertes Streptavidin) pipettiert und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper – humane IDO1 – Detektionsantikörper – Peroxidase-Konjugat. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB)

eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem IDO-Gehalt direkt proportional. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

Vor Gebrauch **alle Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (15-30 °C) bringen, gut mischen.

Markieren Sie die Positionen für Standards/ Kontrollen/ Proben (STD/ CTRL/ SAMPLE) in Doppelbestimmung in einem Protokollblatt.

Die benötigten Streifen der Mikrotiterplatte (PLATE) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Mikrotiterstreifen 5 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen und nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
2.	2 x 25 µl der Proben (STD, CTRL, SAMPLE) als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren.
3.	100 µl Assaypuffer (ASYBUF) in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettieren.
4.	Platte abdecken und 2 Stunden bei Raumtemperatur (15-30 °C) auf einem Horizontalschüttler (180-240 rpm) inkubieren.
5.	Inhalt der Platte verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.

6.	100 µl gelösten IDO-Antikörper (AB) in jede Vertiefung pipettieren.
7.	Platte abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30 °C) auf einem Horizontalschüttler (180-240 rpm) inkubieren.
8.	Inhalt der Platte verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
9.	100 µl verdünntes Peroxidase-Konjugat (CONJ) in alle Vertiefungen pipettieren.
10.	Platte abdecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur (15-30 °C) auf einem Horizontalschüttler (180-240 rpm) inkubieren.
11.	Inhalt der Platte verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
12.	100 µl TMB-Substrat (SUB) in alle Vertiefungen pipettieren.
13.	12-18 min bei Raumtemperatur (15-30 °C) im Dunkeln inkubieren*.
14.	100 µl Stopplösung (STOP) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen.
15.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

* Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen, den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

7. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion.

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden, z.B. 0,001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

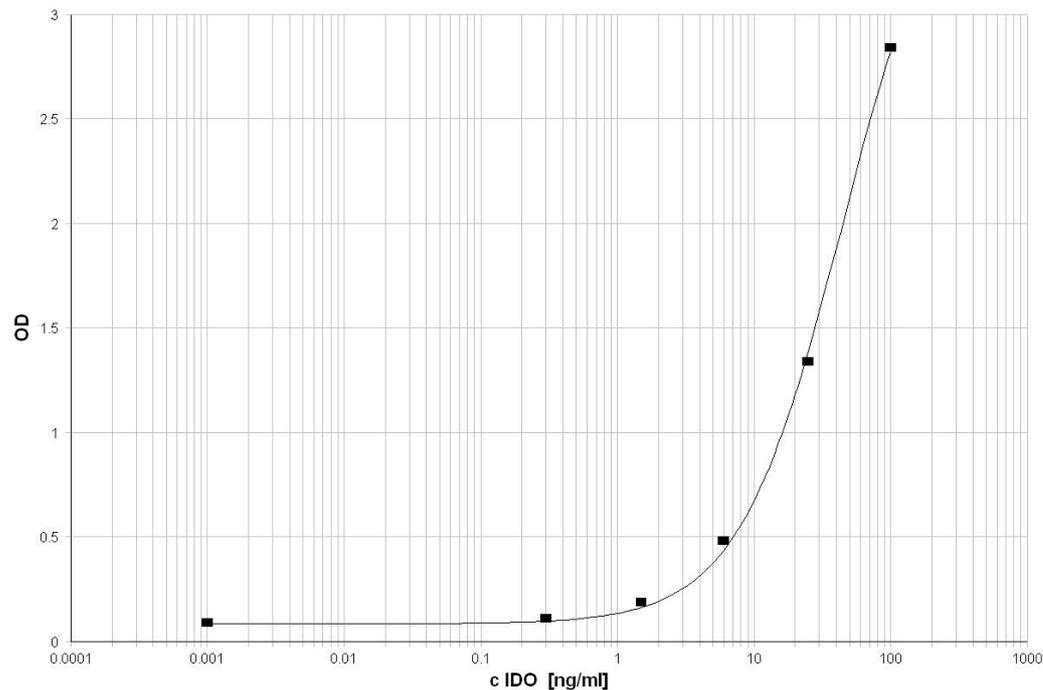
Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Serum und EDTA-Plasma

Die Konzentrationen der Proben können direkt aus der Standardkurve in ng/ml abgelesen werden. Es wird **kein Faktor** benötigt.

Falls eine Probe verdünnt worden ist, so ist die ermittelte Konzentration mit diesem Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve. Sie darf nicht zur Auswertung der Messwerte benutzt werden



8. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben, deren OD größer ist als die des höchsten Standards, sollten mit Assaypuffer (ASYBUF) verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diesen Verdünnungsfaktor bei der Ergebnisberechnung.

9. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

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

10. TESTCHARAKTERISTIKA

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 42 x der Standard Null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 0,09 ng/ml.

Probe	Mittelwert [OD]	2 Standardabweichungen (2 x SD)	Nachweisgrenze [ng/ml]
Standard Null	0,111	0,010	0,09

11. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu Forschungszwecken verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten Natriumazid oder ProClin zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

12. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- *IDK®* ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

14. LITERATUR

Brandacher G, Hoeller E, Fuchs D, Weiss HG. Chronic immune activation underlies morbid obesity: is IDO a key player. *Curr Drug Metab.* 2007; **8** (3): 289-95.

Cavia-Saiz M, Muñoz Rodríguez P, Llorente Ayala B, García-González M, Coma-Del Corral MJ, García Girón C. The role of plasma IDO activity as a diagnostic marker of patients with colorectal cancer. *Mol Biol Rep.* 2014 Apr; **41**(4):2275-9.

Ciorba MA: Indoleamine 2,3 dioxygenase in intestinal disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2013 Mar;**29**(2):146-52

Creelan BC, Antonia S, Bepler G, Garrett TJ, Simon GR, Soliman HH: Indoleamine 2,3-dioxygenase activity and clinical outcome following induction chemotherapy and concurrent chemoradiation in Stage III non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology.* 2013 Mar 1; **2**(3):e23428

Suzuki Y, Suda T, Asada K, Miwa S, Suzuki M, Fujie M, Furuhashi K, Nakamura Y, Inui N, Shirai T, Hayakawa H, Nakamura H, Chida K: Serum Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity Predicts Prognosis of Pulmonary Tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2012 March; **19**(3): 436–442

Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	Nur für Forschungszwecke		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis

Manual

IDK® IDO ELISA

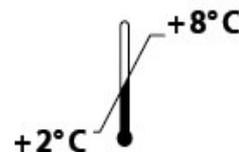
***For the in vitro determination of indoleamine 2,3-dioxygenase 1
(IDO1)***

For research use only

Valid from 2015-12-09

REF

K 7727



RUO



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	14
2. MATERIAL SUPPLIED	14
3. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	14
4. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	15
5. PREPARATION AND STORAGE OF SAMPLES	16
6. ASSAY PROCEDURE	16
<i>Principle of the test</i>	16
<i>Test procedure</i>	16
7. RESULTS	18
8. LIMITATIONS	19
9. QUALITY CONTROL	19
10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	20
<i>Analytical sensitivity</i>	20
11. PRECAUTIONS	20
12. TECHNICAL HINTS	20
13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	21
14. REFERENCES	21

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is intended for the quantitative determination of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1). It is for research use only. Not for use in diagnostic procedures.

2. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit Components	Quantity
K 7727	PLATE	Holder with precoated strips	12 x 8 Wells
K 7727	STD	Standards lyophilized (0, 0.3, 1.5, 6, 25, 100 ng/ml)	1 x 6 vials
K 7727	CTRL 1 CTRL 2	Controls, lyophilized (see specification for range)	1 x 2 vials
K 7727	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 7727	AB	IDO antibody, lyophilized	2 x 1 vial
K 7727	ASYBUF	Assay buffer, ready to use	1 x 30 ml
K 7727	CONJ	Conjugate (peroxidase-labeled), concentrate	1 x 65 µl
K 7727	CONJBUF	Conjugate stabilizing buffer, ready to use	1 x 13 ml
K 7727	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K 7727	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

3. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Calibrated precision pipets and 10-1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Centrifuge, 3000 x g

- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 6)

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥18.2 MΩ cm).

4. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used several times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- Dilute the **wash buffer concentrate (WASHBUF)** with ultra pure water **1:10** before use (**100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water**), mix well. Crystals may occur due to high salt concentration in the stock solution. The crystals must be redissolved at room temperature or at 37 °C using a water bath before dilution. The wash buffer concentrate is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. Diluted buffer solution can be stored in a closed flask at **2-8 °C for one month.**
- The lyophilized **standards (STD)** and **controls (CTRL)** are stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the standards and controls must be reconstituted with **200 µl of assay buffer (ASYBUF)**. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to ensure complete reconstitution. Reconstituted standard and controls can be stored at **-20 °C.**
- Dissolve the the content of one vial of **IDO antibody (AB)** in **5.5 ml of assay buffer (ASYBUF)**. When more than one vial is to be used, combine the contents and mix prior to use. The reconstituted IDO antibody can be stored at **-20°C.**
- Dilute the **peroxidase conjugate (CONJ) 1:201** with conjugate stabilizing buffer (CONJBUF) (**e.g. 60 µl CONJ + 12 ml CONJBUF**, prepare only the required amount). The undiluted POD conjugate is stable at 2-8 °C until the expiry date stated on the label. Diluted POD conjugate can be stored at **2-8 °C for 1 week.**

- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8 °C**.

5. PREPARATION AND STORAGE OF SAMPLES

Serum and EDTA plasma are suited for this test system. The samples are analyzed **undiluted**.

Analysis of other sample matrices is possible, e.g. cell culture supernatant or tissue homogenates, but different standard concentrations may be necessary. Please do not hesitate to contact Immundiagnostik AG.

Samples with visible amounts of precipitates should be centrifuged. Store samples frozen at -20 °C.

6. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

The assay utilizes the two-site sandwich technique with two selected polyclonal antibodies that bind to human indoleamine 2,3-deoxygenase 1 (IDO1).

Assay standards, controls and samples containing IDO1 are added to the wells of a microplate coated with a high affine polyclonal anti-human IDO1 antibody. During the first incubation step IDO1 in the samples is captured by the immobilized antibody. Then, the biotinylated detection antibody, a polyclonal anti-human IDO1 antibody, is added. In the next step peroxidase labeled streptavidin is added to each well and the following complex is formed: capture antibody – human IDO1 – detection antibody – peroxidase conjugate. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as a substrate for the peroxidase. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The color changes from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the IDO1 concentration of sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from standards. The IDO1 concentration of the samples is determined directly from this curve.

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15-30 °C) and mix well.

Mark the positions of standards/ controls/ samples (STD/ CTRL/ SAMPLE) on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips as needed from kit. Store unused strips covered at 2-8 °C. Strips are stable until the expiry date stated on the label.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Wash each well 5 x with 250 µl of diluted wash buffer before use. After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
2.	Add 2 x 25 µl of standards/ controls/ samples (STD/ CTRL/ SAMPLE) into the respective wells of the microtiter plate.
3.	Add 100 µl of assay buffer (ASYBUF) into each well
4.	Cover the plate tightly and incubate for 2 hours at room temperature (15-30 °C) on a horizontal shaker (180-240 rpm).
5.	Discard the contents of each well and wash 5 times with 250 µl of diluted wash buffer . After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
6.	Add 100 µl of IDO antibody (AB) into each well.
7.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (15-30 °C) on a horizontal shaker (180-240 rpm).
8.	Discard the contents of each well and wash 5 times with 250 µl of diluted wash buffer . After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
9.	Add 100 µl of diluted peroxidase conjugate (CONJ) into each well.
10.	Cover the plate tightly and incubate for 30 min at room temperature (15-30 °C) on a horizontal shaker (180-240 rpm).

11.	Discard the contents of each well and wash 5 times with 250 µl of diluted wash buffer . After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
12.	Add 100 µl of TMB substrate (SUB) into each well.
13.	Incubate for 12-18 min at room temperature (15-30 °C) in the dark*.
14.	Add 100 µl of stop solution (STOP) into each well, mix thoroughly.
15.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm (690 nm) as a reference.

* The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend to observe the color change and to stop the reaction upon good differentiation.

7. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the "4 parameter algorithm".

1. 4-parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

2. Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for concentration.

3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for concentration.

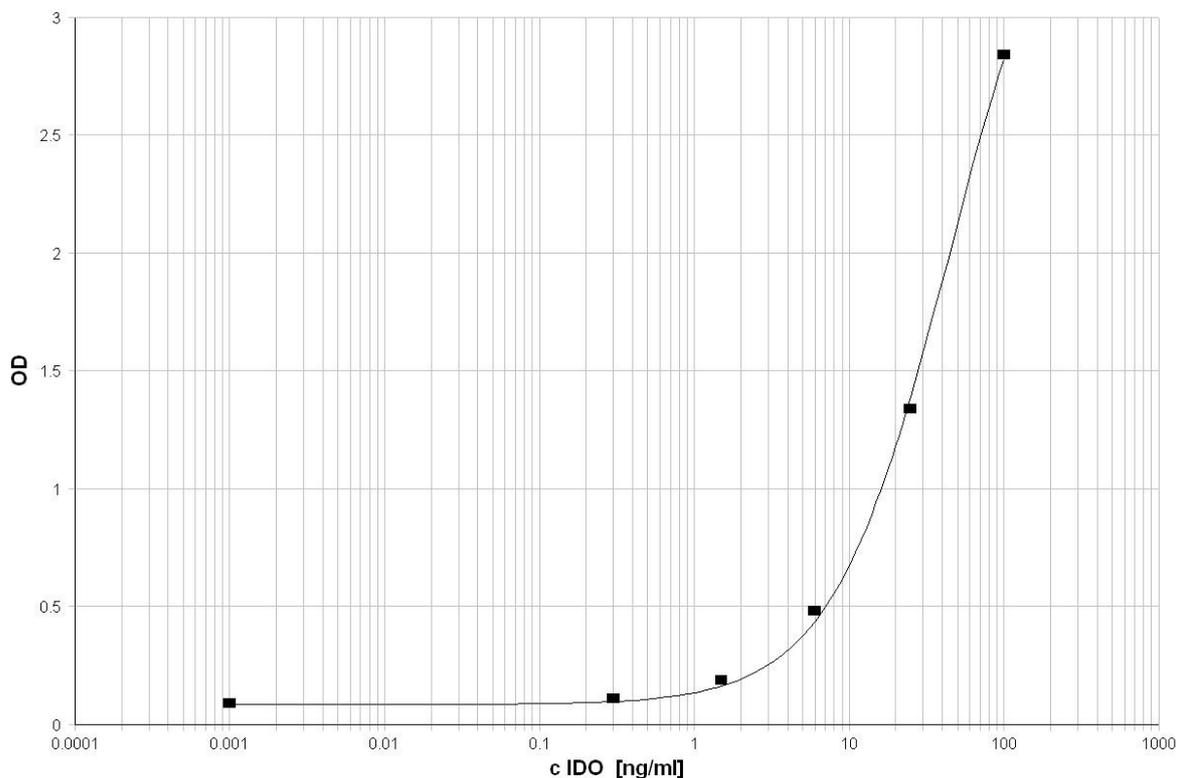
The plausibility of the duplicate values should be examined before automatically evaluating the results. If this option is not available within the used program, the duplicate values should be evaluated manually.

Serum and EDTA plasma

The concentrations can be determined directly from the standard curve in ng/ml. **No factor** is needed.

If a sample has been diluted, multiply the obtained result by the dilution factor used.

In the following, an example of a standard curve is given; do not use it for the calculation of your results.



8. LIMITATIONS

Samples with an OD higher than the OD of the highest standard should be diluted with assay buffer (ASYBUF) and re-assayed. Please consider this dilution factor when calculating the results.

9. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analyzed with each run. Results generated from the analysis of control samples should be evaluated for acceptability using

appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control samples are outside of the acceptable limits.

10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical sensitivity

The zero-standard was measured 42 times. The detection limit was set as $B_0 + 2 \text{ SD}$ and estimated to be 0.09 ng/ml.

sample	mean value [OD]	2 x standard deviation (2 x SD)	detection limit [ng/ml]
zero-standard	0.111	0.010	0.09

11. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for research use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes
- The stop solution consists of sulfuric acid, which is a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapour and avoid inhalation.

12. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore, we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.

- Control Samples should be analyzed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- *IDK®* is a trademark of Immundiagnostik AG.
- Incubation time, incubation temperature, and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

14. REFERENCES

Brandacher G, Hoeller E, Fuchs D, Weiss HG. Chronic immune activation underlies morbid obesity: is IDO a key player. *Curr Drug Metab.* 2007; **8** (3): 289-95.

Cavia-Saiz M, Muñoz Rodríguez P, Llorente Ayala B, García-González M, Coma-Del Corral MJ, García Girón C. The role of plasma IDO activity as a diagnostic marker of patients with colorectal cancer. *Mol Biol Rep.* 2014 Apr; **41**(4):2275-9.

Ciorba MA: Indoleamine 2,3 dioxygenase in intestinal disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2013 Mar; **29**(2):146-52

Creelan BC, Antonia S, Bepler G, Garrett TJ, Simon GR, Soliman HH: Indoleamine 2,3-dioxygenase activity and clinical outcome following induction chemotherapy and concurrent chemoradiation in Stage III non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology*. 2013 Mar 1; **2**(3):e23428

Suzuki Y, Suda T, Asada K, Miwa S, Suzuki M, Fujie M, Furuhashi K, Nakamura Y, Inui N, Shirai T, Hayakawa H, Nakamura H, Chida K: Serum Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity Predicts Prognosis of Pulmonary Tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2012 March; **19**(3): 436–442

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



For research use only



To be used with



Manufacturer



Contains sufficient for <n> tests



Lot number



Use by