



Immunoassays

p53-Autoantikörper ELISA

2. Generation

Der Elisa-Kit auf einen Blick :

- höhere Spezifität **durch den Einsatz von hochaufgereinigtem, rekombinatem p53-Protein**
- einfachere Durchführung **durch gebrauchsfertige Reagenzien**
- quantitative Bestimmung **des Antikörpertiters (Follow-up) mit Angabe in Units**
- einfache Auswertung **der ELISA-Ergebnisse**
- hohe Übereinstimmung **von Doppelwerten**
- hohe Reproduzierbarkeit **der Ergebnisse**
- sehr gute Übereinstimmung **mit Western Blot-Ergebnissen**



- 1 Inhaltsverzeichnis**
- 2 Einleitung**
- 3 Meßprinzip**
- 4 Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen**
- 5 Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel**
- 6 Packungsinhalt**
 - 6.1 Gefahrenhinweise und Sicherheitsratschläge**
- 7 Haltbarkeitsdaten**
 - 7.1 Hinweise zur Entsorgung**
- 8 Aufarbeitung der Proben**
- 9 Testdurchführung**
 - 9.1 Arbeitsvorbereitung**
 - 9.2 Arbeitsanleitung**
- 10 Bewertung der Einzelmeßwerte**
 - 10.1 Vertrauensbereich der Kontrollen**
 - 10.2 Bestimmung des Cut-off**
- 11 Auswertung**
 - 11.1 Quantifizierung des Antikörpertiters**
 - 11.2 p53-Antikörperindex**
- 12 Trouble shooting**
- 13 Literatur**
- 14 Arbeitsanleitung (Kurzfassung)**



Einleitung

Das p53-Tumorsuppressorgen ist von besonderem Interesse für die onkologische Diagnostik, da in etwa 60% aller Tumoren Mutationen in diesem Gen auftreten (1). Die häufigsten genetischen Aberrationen stellen dabei Punktmutationen dar (2, 3). Dies hat eine p53-Proteinakkumulation innerhalb der Zelle zur Folge. In einem nicht endgültig geklärten Mechanismus kann es zu einer Immunreaktion kommen, die zur Bildung von p53-Autoantikörpern führt. Veränderungen im p53-Gen sind allerdings nicht zwangsläufig mit dem Auftreten von p53-Autoantikörpern assoziiert, ca. 30-40% der Tumorpatienten mit p53-Mutationen entwickeln p53-Autoantikörper. Dennoch wurde bei einigen Tumorentitäten eine enge Korrelation zwischen dem Auftreten von p53-Autoantikörpern und der p53-Protein-Überexpression in Tumorzellen beobachtet (4, 5).

p53-Autoantikörper wurden bei vielen Tumorentitäten, z.B. Ovarial-, Colon-, Kopf- und Hals-, Lunge-, Leber-, Mamma-, Pankreas- und Blasenkarzinom beschrieben. Auch in einigen Autoimmunerkrankungen, wie z.B. Lupus erythematoides, Morbus Wegener, Morbus Basedow, lassen sich p53-Autoantikörper nachweisen, allerdings zeigen Seren dieser Patienten nur geringe Seropositivitäten.

Mit Seren von Patienten mit verschiedenen Krebserkrankungen konnten übereinstimmende Ergebnisse erhalten werden. So ist der Nachweis von p53-Autoantikörper als Malignitätsmarker mit Tumoren hohen Grades und einer schlechteren Überlebenserwartung verbunden. Weiterhin kann der p53 Autoantikörpernachweis als Marker mit diagnostischer Relevanz bei Patienten dienen, in denen andere Tumormarker zu unschlüssigen Ergebnissen führen.

Weiterhin ist der Marker p53-Autoantikörper ein unabhängiger Prognosefaktor. Er kann bei Tumorfällen von diagnostischer Bedeutung sein, bei denen die konventionellen Tumormarker unschlüssige Ergebnisse zeigen (10).

Der p53-Autoantikörper-Status kann wertvolle Informationen beim Monitoren des Krankheitsverlaufs einzelner Patienten liefern. Darüber hinaus weisen bisherige Daten darauf hin, daß p53-Autoantikörper besonders geeignet sind, um Patienten mit hohem Risiko für Tumorerkrankungen zu überwachen. Zur Gruppe solcher Risikopatienten gehören z.B. starke Raucher, Patienten mit langjährigen colorektalen Adenomen oder inflammatorischen Darmerkrankungen und Verdacht auf Colon-CA und letztendlich Patienten, die mit cancerogenen Stoffen arbeiten (5, 6, 11, 12, 13).

Mit dem vorliegenden p53-Autoantikörper-ELISA von dianova GmbH kann auf einfache Art und Weise der p53-Autoantikörper-Status im Serum von Tumorpatienten bestimmt werden, außerdem erleichtert die quantitative Bestimmung des Seruntiters die Beurteilung von seropositiven Patienten im Follow-up. Dies bietet völlig neue Möglichkeiten zur Untersuchung dieses Markers in Forschung und Klinik.



Meßprinzip

Sandwich-ELISA mit Festphase-gekoppeltem, rekombinantem p53-Protein, das die anti-p53 Autoantikörper aus der Serumprobe bindet. Der Nachweis erfolgt über einen Peroxidase konjugierten Ziege anti-Human IgG-Antikörper und anschließender Messung einer Peroxidase-bedingten Farbstoffumsetzung.

Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Alle Reagenzien dieses Kits dürfen nur zu *in vitro*-Untersuchungen verwendet werden.
- Materialien verschiedener Chargen dürfen nicht untereinander gemischt werden.
- Das menschliche Serum, das in einigen Reagenzien enthalten ist, wurde infektionsserologisch auf Hepatitis B-Oberflächenantigene und auf Antikörper gegen Human-Immunschwäche-Virus (HIV1+2) negativ befundet. Trotzdem sollten die gebotenen Vorsichtsmaßnahmen für potentiell infektiöse Materialien eingehalten werden.

Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

- Mikropipette für 10µl- und 100µl-Volumina, (vorzugsweise eine variabel einstellbare
- Mikropipette für Volumina von 0-200 µl)
- Multipipette oder 8-Kanal-Pipette für 50µl-, 100µl- und 200µl-Volumina
- Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten (auch manuelles Waschen möglich)
- Photometer für Mikrotiterplatten

Packungsinhalt

[Kennzeichnung nach den Kriterien der Gefahrenstoffverordnung v. 26.08.1986
Gefahrenhinweise / Sicherheitsratschläge]

Alle Reagenzien sind in ungeöffnetem Zustand bei 2-8 °C bis zum Verfallsdatum haltbar.

Mikrotiterplatte

12 Streifen-Module à 8 'wells, beschichtet mit Festphase-gebundenem, gereinigtem rekombinanten p53-Protein.

Klammer

zum Verschließen der Alufolie

Kalibrator

gebrauchsfertige Lösung (2 ml) eines Humanserum mit geprüfter anti-p53 Antikörper-Konzentration.

Negativ-Kontrolle

gebrauchsfertige Lösung (1 ml) eines Humanserum ohne p53 Autoantikörper.

Proben-Verdünnungspuffer

Lyophilisat (6 Flaschen) einer Proteinmatrix mit 0,05 % Natriumazid zur Verdünnung der Proben. Das Lyophilisat wird mit jeweils 12 ml dest. Wasser rekonstituiert; [R: 28-32; S: 28-45].

dianova GmbH

Mittelweg 176 • 20148 Hamburg

Telefon: 040-450 670 • Fax: 040-450 67 490 • www.dianova.de



Detektor-Antikörper

gebrauchsfertige Lösung (12 ml) eines Peroxidase-konjugierten Anti-human-IgG Antikörpers in einer Proteinmatrix mit 0,01 % Thimerosal. Die Antikörper-Lösung ist zusätzlich mit einem Farbstoff versehen, wodurch der Verwechslung mit anderen Kit-Bestandteilen vorgebeugt und der Pipettierschritt erleichtert wird. Durch den Farbstoff wird die Reaktion nicht beeinflusst.

Substratlösung

gebrauchsfertige TMB-Lösung (12 ml) für den Peroxidase-Nachweis, lichtempfindlich.
[**Xn** gesundheitsschädlich, enthält 3,3,5,5 - Tetramethylbenzidin; R: 10-23/25-36/37/38; S: 7-16/24/45].

Stopplösung

2 N HCl (7,5 ml)
[**C** korrosiv, enthält Hydrochlorid; R: 34, 36, 37; S: 26-45].

Waschpuffer

Puffer (Konzentrat, 3 x 15 ml). Gebrauchslösung: 15 ml Konzentrat + 285 ml dest. Wasser.

Gefahrenhinweise und Sicherheitsratschläge

- R 10:** Entzündlich
- R 23/25:** Giftig beim Einatmen und Schlucken
- R 28:** Sehr giftig beim Verschlucken
- R 32:** Entwickelt bei Berührung mit Säuren sehr giftige Gase
- R 34:** Verursacht Verätzungen
- R 36:** Reizt die Augen
- R 37:** Reizt die Atmungsorgane
- R 38:** Reizt die Haut
- R 40:** Irreversibler Schaden möglich

- S 7:** Behälter dicht verschlossen halten
- S 16:** Von Zündquellen fernhalten, nicht rauchen
- S 24:** Berührung mit der Haut vermeiden.
- S 26:** Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.
- S 28:** Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel Wasser abwaschen.
- S 36:** Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.
- S 45:** Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen
(wenn möglich dieses Etikett vorzeigen)

Haltbarkeitsdaten

Reagenz	Lagerung		Haltbarkeit
Serum	unverdünnt	2 - 8°C - 20°C	24 Stunden > 1 Jahr
Mikrotiterplatte	geöffnet/ mit Klammer geschlossen	2 - 8°C	bis Verfalldatum
Kalibrator	geöffnet	2 - 8°C	bis Verfalldatum
Negativ-Kontrolle	geöffnet	2 - 8°C	bis Verfalldatum
Proben- Verdünnungspuffer	lyophilisiert rekonstituiert	2 - 8°C 2 - 8°C	bis Verfalldatum 14 Tage
Detektor-Antikörper	geöffnet	2 - 8°C	bis Verfalldatum
Substratlösung	geöffnet	2 - 8°C / dunkel	
Stopplösung	geöffnet	2 - 8°C oder RT	
Waschpuffer	geöffnet/konzentriert geöffnet/verdünnt	2 - 8°C oder RT 2 - 8°C	bis Verfalldatum 3 Monate

Hinweise zur Entsorgung

Chemikalien und Zubereitungen, die als Reststoffe anfallen, sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen des Bundes und der Länder. Die zuständige Behörde oder Abfallbeseitigungsunternehmen informieren über die Entsorgung von Sonderabfällen.

Aufarbeitung der Proben

Das Serum wird nach Koagulation der Blutproben durch Zentrifugation gewonnen. Die Serumproben sollten höchstens 24 h bei 2-8°C gelagert werden; zur längeren Aufbewahrung empfiehlt sich die Lagerung geeigneter Aliquots bei -20°C. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

Zur Messung des anti-p53-Antikörper-Gehalts im ELISA ist eine 1 : 100 Verdünnung der Proben in Proben-Verdünnungspuffer notwendig (5 µl Serum + 495 µl Puffer).

Für eine quantitative Bestimmung des Antikörpertiters sollten die Anweisungen im Kapitel 11.2 "Quantifizierung des Antikörpertiters" befolgt werden.

Testdurchführung

- Alle Reagenzien unmittelbar vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.
- Nicht benötigte Streifen aus der Mikrotiterplatte entfernen und im beigelegten Beutel mit der Klammer verschlossen aufbewahren.
- Herstellen der **Waschlösung** aus dem konzentrierten Waschpuffer durch Verdünnen von 15 ml mit 285 ml dest. Wasser.
- Das Lyophilisat des Proben-Verdünnungspuffers wird mit 12 ml dest. Wasser rekonstituiert.
- Die Serumproben werden vor Einsatz in dem Assay 1:100 in Proben-Verdünnungspuffer verdünnt (5 µl Serum + 495 µl Puffer); Kalibrator und Negativ-Kontrolle werden unverdünnt eingesetzt. Benötigt werden 100µl/Einzelwert; wir empfehlen das Ansetzen von Doppelwerten.

Arbeitsanleitung

1. Die im Rahmen fest eingeklemmten Streifen der Mikrotiterplatte werden mit dem verdünnten Waschpuffer (= **Waschlösung**) kurz vor dem Probenauftrag fünfmal mit einem Automaten gewaschen. Bei manuellem Waschen wird mit Hilfe der Multipipette oder 8-Kanal-Pipette 200 µl Waschlösung pro 'well' einpipettiert, dekantiert und danach wird die Platte auf einem Papiervlies trocken gedrückt. Dieses manuelle Waschen wird ebenfalls fünfmal wiederholt. (Alternativ kann **nur bei diesem ersten Waschschrift** die Platte einmal befüllt werden, die Waschlösung 3 Minuten stehengelassen und danach dekantiert werden.)
2. Unmittelbar anschließend werden jeweils 100 µl der Kontrollen (**Kalibrator, Negativ-Kontrolle**) bzw. der **vorverdünnten Probenlösungen** pro well einpipettiert. Wir empfehlen jeweils Doppelbestimmungen. Dieser Vorgang sollte innerhalb von 15 Minuten abgeschlossen sein. Die Inkubation erfolgt für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Der folgende Waschvorgang wird durchgeführt wie unter 'Arbeitsschritt 1' beschrieben.
3. Mit Hilfe der Multipipette wird der gebrauchsfertige **Detektor-Antikörper** mit jeweils 100 µl pro well einpipettiert. Die Inkubation erfolgt für 60 Minuten bei Raumtemperatur.

4. Unmittelbar nach dem Abwaschen der Lösung des 'Arbeitsschrittes 3' werden jeweils 100 µl der **Substratlösung** pro well zupipettiert. Nach der zügigen Befüllung mit der Multipipette (innerhalb von 5 Minuten) wird für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion muß weitestgehend im Dunkeln stattfinden (z.B. in einem Schrank).
5. Die Enzymreaktion wird dann durch Zugabe von 50 µl **Stoplösung** pro well abgebrochen. Dies bewirkt einen Farbumschlag der Lösung auf der Mikrotiterplatte von Blau nach Gelb. Für diesen Pipettierschritt sollten die gleichen Zeitintervalle eingehalten werden wie in 'Arbeitsschritt 4'.
6. Vor der photometrischen Messung sollte überprüft werden, ob sich an der Unterseite der Mikrotiterplatte Verunreinigungen befinden, die dann mit einem weichen Papiertuch entfernt werden sollten.

Die **photometrische Messung** wird bei **450 nm** durchgeführt; zum Abgleich eventueller optischer Unterschiede des Materials der Mikrotiterplatte wird ein Referenzfilter von 620 oder 750 nm empfohlen. Die photometrische Messung kann bis höchstens eine Stunde nach dem Abstoppen ohne Probleme durchgeführt werden. Bis zur Messung sollte die Platte im Dunkeln aufbewahrt werden.

7. Die Gesamtdauer des Tests beläuft sich auf ca. 3 Stunden.

Bewertung der Einzelmeßwerte

Bei einer korrekten Durchführung des Kits sollten die Extinktionen der Kontrollen in den folgenden Vertrauensbereichen liegen:

	Kalibrator	Negativ-Kontrolle
E_{450}	> 0,7	< Cut-off

Bestimmung des Cut-off

Der Cut-off ergibt sich durch Multiplizieren der Extinktion des Kalibrators mit einem chargenspezifischen Faktor.

Beträgt beispielsweise die E_{450} des Kalibrators 1,00 so errechnet sich der Cut-off: $1,00 \times 0,15 = \mathbf{0,15}$

Der chargenspezifische Faktor dieses Lots beträgt: **0,15**

Auswertung

Die Ergebnisse werden anhand des Cut-off ausgewertet

negative Proben: Alle Seren mit einer Extinktion kleiner oder gleich des Cut-off sind negativ. Der p53-Antikörperindex besitzt einen Wert kleiner oder gleich Null (s. Punkt 0).

positive Proben: Alle Seren mit einer Extinktion größer der des Cut-off sind positiv. Dabei können durchaus Werte auftreten, die eine höhere Absorption als der Kalibrator aufweisen. Der p53-Antikörperindex besitzt einen Wert größer Null (positiver Wert).

Kritischer Bereich: Oberhalb des Cut-off wird ein kritischer Bereich definiert ($E_{\text{Cut-off}} + 20\%$). Beträgt der Cut-off beispielsweise $E_{450} = 0,15$ so liegt der kritische Bereich zwischen 0,15 und 0,18.

Proben, die eine Extinktion innerhalb des kritischen Bereichs aufweisen, sollten noch einmal überprüft werden. Sollten diese nach erneuter Testung wieder im kritischen Bereich liegen, so ist eine Überprüfung des Patienten nach 5-8 Wochen zu empfehlen.

Bisherige Daten zeigen, daß alle Patienten, bei denen p53-Autoantikörper detektiert wurden, auch eine maligne Erkrankung aufwiesen.

Quantifizierung des Antikörpertiters

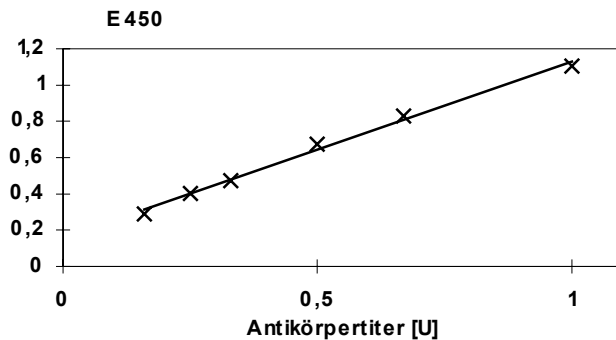
Die Bestimmung des Antikörpertiters erfolgt anhand einer Eichkurve, die mit dem mitgelieferten Standard (Kalibrator) für jeden Test neu erstellt wird. Der Antikörpertiter wird in Units [U] angegeben. 1 Unit ist definiert als p53-Autoantikörper-Bindungsaktivität des mitgelieferten humanen Serumstandards (Kalibrator).

Eichkurve:

Aus dem Kalibrator wird mit Proben-Verdünnungspuffer eine Standardreihe angesetzt; empfohlen werden 6 Meßwerte. Die Extinktion (E_{450}) des unverdünnten Kalibrators entspricht genau einer Unit (1 U).

Verdünnung Kalibrator Standard (S)	unverdünnt (S1)	1:1,5 (S2)	1:2 (S3)	1:3 (S4)	1:4 (S5)	1:6 (S6)
Titer [U]	1	0,67	0,5	0,33	0,25	0,16
Proben-Verdünnungs- puffer µl	---	33	50	67	75	84
Kalibrator µl	100	67	50	33	25	16

Für die Eichkurve wird die Extinktion (E_{450}) gegen den Antikörpertiter (U) aufgetragen. Dabei sind lineare Skalen zu verwenden [lin-lin]. Die Auswertung kann mittels eines Auswerteprogrammes erfolgen, das die einzelnen Punkte miteinander verbindet [point to point].



Hinweis : diese Eichkurve nicht zur Auswertung benutzen

Proben:

Zur quantitativen Bestimmung werden die positiven Seren in Proben-Verdünnungspuffer so verdünnt, daß die Meßwerte innerhalb der Eichkurve liegen. Dies kann Verdünnungsschritte bis 1 : 5000 erfordern. Der Antikörpertiter der Proben wird aus der Eichkurve abgelesen. Proben, die außerhalb der Eichkurve liegen, müssen in höherer Verdünnung erneut getestet werden. Bei der Berechnung des Antikörpertiters wird die Verdünnung berücksichtigt.

$$\text{Antikörpertiter}_{\text{Eichkurve}} [\text{U}] \times \text{Verdünnung}_{\text{Serum}} = \text{Antikörpertiter}_{\text{Serum unverdünnt}} [\text{U}]$$

Beispiel zur Auswertung:

chargenspezifischer Faktor = 0,15

	E ₄₅₀ Probe	Verdünnung	Antikörpertiter _{Eichkurve} [U]	Antikörpertiter _{Serum} [U]
Kalibrator	1,11			
Cut-off	0,17			
Probe 1	0,06	1 : 100	*	*
Probe 1	0,29	1 : 100	0,167	17
Probe 1	0,11	1 : 100	1,0	100
Probe 2	2,48	1 : 100	*	*
Probe 2	1,17	1 : 500	*	*
Probe 2	0,74	1 : 1000	0,55	550

* außerhalb Eichkurve



p53-Antikörperindex

Der p53-Antikörperindex ermöglicht die Vergleichbarkeit verschiedener Testläufe. Er wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{E450 [\text{Probe}] - E450 [\text{Cut-off}]}{E450 [\text{Kalibrator}] - E450 [\text{Cut-off}]} = \text{p53-Antikörperindex}$$

Beispiel zur Auswertung:

chargenspezifischer Faktor = 0,15

	OD	p53-Anti- körper-Index	Bewertung
Negativ- Kontrolle	0,07	-0,09	
Kalibrator	1,03	1	
Cut-off	0,15	0	
Cut-off + 20%	0,18	0,03	Grenze des kritischen Bereichs
Probe 1	0,06	-0,10	negativ
Probe 2	0,17	+0,02	kritisch
Probe 3	0,47	+0,36	positiv



Trouble shooting

starker Hintergrund ($E_{\text{Kalibrator}} > 2,0$)

Ein hoher Hintergrund kann durch zu wenig Waschen entstehen. Wenn ein Waschautomat verwendet wird, sollte der Waschdruck oder die Waschdauer überprüft werden. Bei manuellem Waschen muß zwischen den einzelnen Waschzyklen die Platte auf Vliespapier trocken gedrückt werden, um die Waschlösung möglichst vollständig zu entfernen.

zu schwache Extinktion des Kalibrators ($E_{\text{Kalibrator}} < 0,7$)

Eine zu geringe Extinktion des Kalibrators kann durch zu starkes Waschen hervorgerufen werden. Wird ein Waschautomat verwendet, so kann der Waschdruck zu stark sein. Wenn möglich sollte entweder der Waschdruck verringert werden oder mit weniger Waschzyklen gewaschen werden.

$E_{\text{Negativ-Kontrolle}} \geq E_{\text{Cut-off}}$

Wenn die Negativ-Kontrolle eine gleiche oder höhere Extinktion als der Cut-off aufweist, kann das eventuell an unterschiedlichen Inkubationszeiten liegen. Werden sehr viele Proben aufgetragen, so ist auf ein zügiges Pipettieren zu achten, damit möglichst keine zu großen Zeitverzögerungen auftreten. Sollte die Negativ-Kontrolle in Reihe 1 und der Kalibrator erst in Reihe 12 aufgetragen werden, so könnten unterschiedlichen Inkubationszeiten auftreten. Es empfiehlt sich bei vielen Proben den Kalibrator und Negativ-Kontrolle nicht nur zu Anfang, sondern auch in der Mitte oder am Ende der Platte nochmals zu wiederholen, um diese Verzögerung zu erfassen.

Literatur

1. Hollstein M. et al., Science (1991), **253**: 49-53
p53 mutations in human cancer
2. Burkart C., Deutsches Ärzteblatt (1994), **91**: 679-684
Das Tumorsuppressorprotein p53
3. Soussi T., Immunol Today (1996), **17** (8): 354-356
The humoral immune response to the tumorsuppressor gene-product p53 in human cancer: implications for diagnosis and therapie
4. Green J.A. et al., Eur J Cancer (1994), **30A** (5): 580-584
Serum p53 autoantibodies: Incidence in Familial Breast Cancer
5. Lubin R. et al., Nature Medicine (1995), **1** (7): 701-702
Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer
6. Lavieille J.P. et al., Anticancer Res. (1996), **16** (4C): 2385-2388
Analysis of p53 antibody response in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck



7. Angelopoulou K. et al., *Cancer* (1996), **78** (10): 2146-2152
Circulating Antibodies against p53 Protein in Patients with Ovarian Carcinoma
8. Werner J.A. et al, *Cancer Immunol Immunother* (1997), **44** (2): 112-116
p53 serum antibodies as a prognostic indicator in head and neck cancer
9. Houbiers et al., *Br J Cancer* (1995), **72**: 637-64
Antibodies against p53 with poor prognosis of colorectal cancer
10. Kressner U. et al., *Br J Cancer* (1998);
Increased serum p53 antibody levels indicate poor prognosis in patients with colorectal cancer
11. Trivers G.E. et al., *JNCI* (1995), **87**: 1400-1407
Anti-p53 antibodies in sera of workers occupationally exposed to vinyl chloride.
12. Lavieille J.P. et al., *Oral Oncol* (1998), **34** (2): 84-92
Implications of p53 alterations and anti-p53 antibody response in head and neck squamous cell carcinoma
13. Hammel P. et al., *Gut* (1997); **40** (3): 356-361
Detection and monitoring of serum p53 antibodies in patients with colorectal cancer
14. Lowe S.W. et al., *Mol Gen Cancer* (1994), **LIX** : 419-426
Apoptosis and the prognostic significance of p53 mutations
15. Zalcman G. et al., *Clin Cancer Res* (1998), **4** (6): 1359-136
Monitoring of p53 autoantibodies in lung cancer during therapy: relationship to response to treatment

Arbeitsanleitung (Kurzfassung)

Vorgang	Inkubation
<ul style="list-style-type: none"> Herstellung der Waschlösung 15 ml Konzentrat + 285 ml dest. Wasser Herstellung des Proben-Verdünnungspuffers Zugabe von 12 ml dest. Wasser pro Flasche Verdünnung der Serumproben 1 : 100 mit Proben-Verdünnungspuffer Hydratisieren der benötigten Streifen mit Waschlösung (Einpipettieren von 200 µl/well, 3 min stehen lassen, dekantieren) Inkubation von 100 µl/well des Kalibrators, der Negativ-Kontrolle, bzw. der vorverdünnten Proben (Empfehlung: jeweils Doppelwertansätze) 5 x Waschen mit 200 µl/well Waschlösung (5 x mit Waschautomaten oder 5 x manuell) Inkubation von 100 µl/well Detektor-Antikörper 5 x Waschen mit 200 µl/well Waschlösung Inkubation von 100 µl/well der Substratlösung !im Dunkeln! Zugabe von 50 µl/well der Stopplösung Photometrische Messung bei 450 nm (empfohlene Referenz: 620 oder 750nm) 	<p>60 min, RT</p> <p>60 min, RT</p> <p>30 min, RT</p>

Gesamtdauer des Tests: ca. 3 Stunden
