

Arbeitsanleitung/Manual

Retinol-bindendes Protein (RBP 4) ELISA Kit

*Zur in vitro Bestimmung des Retinol-bindendes Protein in
Plasma, Serum und Urin*

Retinol-binding protein (RBP 4) ELISA Kit

*For the in vitro determination of Retinol-binding protein in
plasma, serum and urine*

Gültig ab/valid from 08.09.2005

Artikelnummer/Catalogue No.: K 6110

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

Tel.: ++49 6251 70190-0

Fax: ++ 49 6251 849430

e.mail: Info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Packungsgröße/Package size: 96 Tests/96 determinations

Lagerung/Storage: 2 - 8 °C



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com

Inhaltsverzeichnis/Table of content	Seite/Page
1. VERWENDUNGSZWECK	3
2. EINLEITUNG	3
3. TESTPRINZIP	4
4. INHALT DER TESTPACKUNG	5
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	5
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	6
7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	7
8. PROBENVORBEREITUNG	7
9. TESTDURCHFÜHRUNG	8
HINWEISE	8
PIPETTIERSCHEMA	8
10. ERGEBNISSE	10
MUSTEREICHKURVE	10
12. QUALITÄTSKONTROLLE	11
ERWARTETE ERGEBNISSE	11
13. TESTCHARAKTERISTIKA	12
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	12
SENSITIVITÄT	13
LINEARITÄT	13
14. LITERATUR	13
15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	14

1. INTENDED USE	16
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	16
3. PRINCIPLE OF THE TEST	17
4. MATERIAL SUPPLIED	18
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	19
7. PRECAUTIONS	20
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	20
9. ASSAY PROCEDURE	21
PROCEDURAL NOTES	21
TEST PROCEDURE	21
10. RESULTS	23
TYPICAL CALIBRATION CURVE	23
11. LIMITATIONS	24
12. QUALITY CONTROL	24
EXPECTED VALUES	24
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	25
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	25
SENSITIVITY	26
SAMPLE DILUTION	26
14. REFERENCES	26
15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	27

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von **Retinol-bindendem Protein (RBP)** in Serum, Plasma und Urin geeignet. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Retinol-bindendes Protein (RBP) ist für den Transport von Vitamin A in der Zirkulation verantwortlich. Mit einem Molekulargewicht von 21 kD ist RBP ein kleines Protein, das in komplexierter Form mit Präalbumin vorliegt. Das freie RBP-Molekül wird - ähnlich wie andere kleine Moleküle (z.B. β -2 Microglobulin) - im Glomerulus schnell aus dem Plasma herausfiltriert und anschließend in den tubulären Zellen resorbiert und abgebaut. Bei Nierenerkrankungen mit vorherrschenden tubulären Störungen kann RBP nicht mehr resorbiert werden und ist im Urin nachweisbar.

Eine aktuelle Publikation von Yang et al. (2005) beschreibt eine neue Funktion des RBP4 (der Plasmaform des RBP), nämlich die Beeinflussung der Glukosehomöostase sowie der Insulinsensitivität bzw. -resistenz. Die Autoren beobachteten, dass eine Erhöhung der Serum-RBP4-Spiegel eine systemische Insulinresistenz auslöst, während eine Absenkung von RBP4 im Serum die Aktivität von Insulin steigert.

Aufgrund der Ergebnisse postulieren die Autoren, dass RBP4 die Insulinsensitivität z.T. durch Insulin-Signalling im Muskel beeinflusst, z.B. durch Veränderung der Tyrosin-Phosphorylierung des Insulinrezeptor-Substrates-1 (IRS-1) bzw. der Aktivität der IRS-1 assoziierten PI(3)K. RBP4 könnte an der Pathogenese des Typ 2 Diabetes beteiligt sein, und die Absenkung der RBP4 Konzentrationen könnte eine neue Strategie in der Behandlung des Typ 2 Diabetes darstellen.

Indikationen

- Früherkennung einer tubulären Proteinurie
- Chronische Leberschädigungen
- Cadmium Vergiftungen
- Untersuchungen zur Insulinresistenz

3. TESTPRINZIP

Dieser Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) dient zur quantitativen Bestimmung des **Retinol-bindenden Proteins (RBP)** in Plasma, Serum und Urin.

In diesem ELISA wird **RBP** aus den Proben an polyklonale, auf Mikrotiterplatten fixierte Antikörper (Kaninchen anti RBP) gebunden. Gebundenes **RBP** wird dann mit Hilfe von Peroxidase-markierten anti RBP Antikörpern detektiert. Die Menge der gebundenen Peroxidase-markierten anti RBP Antikörper ist direkt proportional dem RBP-Gehalt. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem RBP-Gehalt direkt proportional. Parallel dazu wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.		Kit Komponenten	Menge
K 6110MTP		Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6110WP		ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6110K		Konjugat, (Kaninchen anti RBP, Peroxidase-markiert)	200 µl
K 6110PV		Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	100 ml
K 6110ST		Standards, lyophilisiert (0; 1.1; 3.3; 11; 33 µg/l)	2 x 5 vials
K 6110KO		Kontrolle, lyophilisiert	2 x vials
K 6110TMB		TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml
K 6110AC		ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	7 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 5 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 oder 405 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte 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 bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzenrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnen (100 ml Konzentrat + 900 ml aqua bidest.), 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 **Standards** und die **Kontrolle** sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Standards und die Kontrolle mit **500 µl** aqua bidest. rekonstituieren, vorsichtig mischen und zum Lösen mind. 10 Minuten stehen lassen. Rekonstituierte Standards können 14 Tage bei 2-8 °C gelagert werden.
- Das **Konjugat** (POD-markierter Antikörper) **1:100** in **Waschpuffer** verdünnen (z.B. 100 µl Konjugat + 10 ml Waschpuffer). Das Konjugat ist im **unverdünnten** Zustand bei 2 – 8 °C bis zum angegebenen Datum haltbar.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMABNAHMEN

- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid bzw. Thimerosal 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 in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet 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 Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

Serum und Plasma

Serum- oder Plasmaproben sind bei 2 – 8 °C mindestens 2 Wochen stabil, bei längerer Lagerung müssen sie tiefgefroren werden.

Vor Gebrauch **1:5000 in Verdünnungspuffer** verdünnen, z. B.

Verdünnung I:

20 µl Probe + 980 µl Verdünnungspuffer = 1:50

Verdünnung II:

10 µl Verdünnung I + 990 µl Verdünnungspuffer = 1:100

Urin

Urinproben mit 1N NaOH auf pH-Wert zwischen 6 und 8 einstellen. Die Proben sind bei 2-8°C zwei Wochen stabil. Längere Lagerung der Proben bei mindestens -20°C.

Vor Gebrauch **1:10** in Verdünnungspuffer verdünnen, z. B.

100 µl Urin + 900 µl Verdünnungspuffer

Urinproben mit einem **RBP-Gehalt > 330 µg/l** **1:100** verdünnen, z. B.

10 µl + 990 µl Verdünnungspuffer.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumen sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.
- Bestimmung immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchführen.

Pipettierschema

Die vorbeschichtete Mikrotiterplatte vor Gebrauch 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen und nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.

Die Bestimmungen in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchführen.

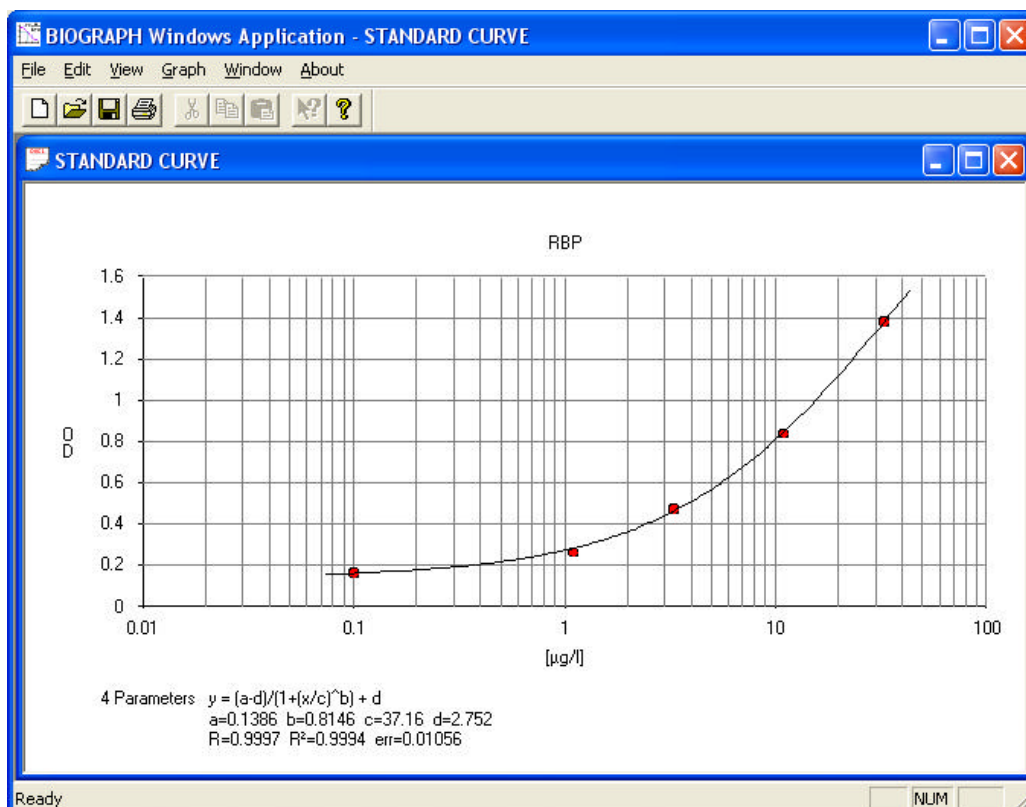
1. **100 µl** Standards und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren.
2. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
3. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
4. **100 µl** vorverdünntes Konjugat (POD-Antikörper) pro Vertiefung pipettieren.
5. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
6. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
7. **100 µl** TMB-Lösung pro Vertiefung pipettieren.
8. **10-20 Minuten** (entsprechend der Farbdifferenzierung) bei Raumtemperatur inkubieren.
9. **50 µl Stopplösung** pro Vertiefung pipettieren.
10. Extinktion **sofort** im Mikrotiterplattenphotometer bei **450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Sollte die Extinktion

des höchsten Standards den Meßbereich des Photometers übersteigen, sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) messen.

10. ERGEBNISSE

Zur Auswertung des Testes empfehlen wir die 4-Parameter-Funktion. Alternativ kann auch eine Punkt-zu-Punkt-Auswertung oder eine gewichtete Spline-Funktion gewählt werden. Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte diese der Operator durchführen.

Mustereichkurve



Konzentration [µg/l]	33	11	3.3	1.1	0
OD Mittelwert	1.864	1.151	0.548	0.287	0.163

Diese Daten sind als Beispiel für eine Standardkurve aufgeführt und dürfen nicht zur Auswertung von Kundenergebnissen verwendet werden.

Serum und Plasma

Die ermittelte Konzentration wird mit **5000** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu erhalten.

Urin

Die ermittelte Konzentration wird mit dem **Verdünnungsfaktor** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu erhalten.

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit hohen RBP Konzentrationen, die außerhalb der Standardkurve liegen, sollen weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden.

12. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von kommerziell erhältlichen Kontrollen (wenn vorhanden) für die interne Qualitätskontrolle.

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

Erwartete Ergebnisse

Normbereiche:

Plasma oder Serum: 30-75 mg/l

Urin: 0.01-0.54 mg/l

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

13. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben innerhalb einer Meßserie wurde geprüft. Zwei Normalproben wurden 16 mal in einem RBP ELISA von einer Person angesetzt.

Intra-Assay VK n= 16

Probe	RBP Mittelwert [µg/l]	Intra-Assay V _k [%]
1	24.1	5
2	11.1	5

Inter-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben an unterschiedlichen Tagen wurde geprüft. Zwei Normalproben wurden an verschiedenen Tagen und von verschiedenen Personen im RBP ELISA gemessen.

Inter-Assay VK n= 25

Probe	RBP Mittelwert [µg/l]	Inter-Assay V _k [%]
1	4.4	9.8
2	6.9	9.7

Sensitivität

Die Nachweisgrenze dieses RBP ELISA´s wurde festgesetzt als $B_0 + 2SD$. Sie beträgt 0.9 µg/l.

Linearität

n= 1

Eine Patientenprobe wurde verdünnt und im RBP ELISA gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt.

Probe	Verdünnung	Erwartet [µg/l]	Gemessen [µg/l]
A	1:7000	4.8	4.8
	1:14000	2.8	2.4
	1:28000	1.2	1.2
	1:56000	0.6	0.8

14. LITERATUR

Yang et al., Nature 2005 Jul 21;436(7049):356-62

15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Test enthaltenen Reagenzien sind ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken oder, wenn vermerkt, zur *in vitro* Diagnostik.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid bzw. Thimerosal 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 in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet 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 Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Die charakteristischen Testbedingungen wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik 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 - zurück zu senden.

Retinol-binding protein ELISA Kit

*For the in vitro determination of Retinol-binding protein in
plasma, serum and urine*

Valid from 08.09.2005

Catalogue No.: K 6110

Package size: 96 Tests/96 determinations

Storage: 2 - 8 °C



1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is intended for the quantitative determination of **Retinol-binding protein (RBP)** in plasma, serum and urine. For *in vitro* diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Retinol-binding protein (RBP) is a small (21kD) transport protein for vitamin A which forms a complex with prealbumin in blood but loses its affinity for prealbumin once the vitamin has been delivered to the target cells. The free RBP molecule is rapidly filtered at the glomerulus and catabolized in the renal tubules after resorption by the proximal tubular cells (like other small molecules e.g. β -2 microglobulin). In kidney disease with prevailing tubular changes these proteins are not reabsorbed and appear in the urine.

As published by Yang et al. (2005) the retinol-binding protein 4 (RBP4) seems to play a key role in the development of insulin resistance. The fat cell derived peptide RBP also modulates the glucose homeostasis and impairs the insulin sensitivity as well as insulin resistance. The elevation of serum RBP4 causes systemic insulin resistance, whereas its reduction improves the insulin action.

As a conclusion from the results, the authors suggest that RBP4 alters insulin sensitivity in part by affecting insulin signalling in muscle through alterations in the amount of tyrosine-phosphorylated IRS-1 and PI(3)K activation. Thus, RBP4 may contribute to the pathogenesis of type 2 diabetes, and lowering RBP4 could be a new strategy for treating type 2 diabetes.

Indications

- Early detection of tubular proteinuria
- Chronic liver diseases
- Cadmium poisoning
- Studies of insulin resistance

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) can be used for quantitative determination of **Retinol-binding protein (RBP)** in plasma, serum and urine. In a first incubation step, **RBP** in the samples is bound to polyclonal rabbit anti RBP antibodies, immobilized on the microtitre plate. A peroxidase-conjugated anti RBP antibody is used for detection and quantification, and tetramethylbenzidine (TMB) as a peroxidase substrate. A dose response curve of absorbance unit (optical density at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from standard. RBP present in the patient samples is determined directly from this curve.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No		Kit Components	Quantity
K 6110MTP		One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 6110WP		ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 6110K		Conjugate, (rabbit anti RBP, peroxidase-labeled)	200 μ l
K 6110KO		Control, lyophilized	2 vials
K 6110PV		Sample dilution buffer, ready-to-use	100 ml
K 6110ST		Calibrators, lyophilized (0; 1.1; 3.3; 11; 33 μ g/l)	2 x 5 vials
K 6110TMB		TMB Substrate (Tetramethylbenzidin), ready-to-use	15 ml
K 6110AC		ELISA Stop solution, ready-to-use	7 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Precision pipettors calibrated and tips to deliver 5-1000 μ l
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 or 405 nm
(reference wave length 620 or 690 nm)

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 4 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.
- The **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml concentrate + 900 ml aqua bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or at 37°C before dilution of the buffer solutions. The **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.**
- **Calibrators** and **Control** must be reconstituted with **500 µl** aqua bidest. Allow the vial to stand for minimum 10 minutes and then mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. Reconstituted Calibrators and Control can be stored for two weeks at 2 - 8 °C.
- **Conjugate** (POD-Antibody) must be diluted **1:100** in wash buffer (100 µl POD antibody + 10 ml wash buffer). The antibody is stable at 2 -8 °C until expiry date stated on the label. **Diluted antibody solution is not stable and can not be stored.**
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date stated on the label of test package when stored at **2-8°C.**

7. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- The calibrators and controls contain human source material which was tested and found to be non-reactive to HBsAg, anti-HIV-1/2, and anti-HCV. Since no method can offer complete assurance that hepatitis B virus, HIV-1/2, HVC or other infectious agents are absent, these reagents should be handled as if potentially infectious.
- Stop Solution consists of diluted Sulfuric Acid. This is a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped out immediately with copious quantities of water. Do not breath vapor and avoid inhalation.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Plasma and serum

Samples can be stored for two weeks at 4°C. For longer storage, freeze at or below -20°C.

Dilute samples 1:5000 in dilution buffer before use.

Dilution I:

20 µl sample + 980 µl dilution buffer = 1:50

Dilution II:

10 µl Dilution I + 990 µl dilution buffer = 1:100

Urine

Adjust the urine to pH between 6 and 8 with 1 N NaOH. Samples are stable at 2-8°C for 2 weeks. For longer storage, freeze at or below -20°C.

Before use dilute urine **1:10**, e.g.

100 µl urine + 900 µl dilution buffer

Urine with a **RBP concentration > 330 µg/l** must be diluted **1:100**, e.g.

10 µl urine + 990 µl dilution buffer).

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the test results. Immundiagnostik can therefore not be held reliable for any damage resulting from this.
- Carry out the assay with the actual manual delivered with the kit.

Test procedure

Wash the precoated microtiter plate 5 x with 250 µl ELISA wash buffer.
Carry out the tests in duplicate.

1. Add **100 µl** of standard and prediluted patient samples into the wells.
2. Incubate for **1 hour at room temperature** shaking on a horizontal mixer.
3. Decant the content of the plate and wash the walls **5 x with 200 µl** of washing buffer.
4. Add **100 µl** diluted Conjugate into each well.
5. Incubate for **1 hour** at room temperature, shaking on a horizontal mixer.
6. Decant the content of the plate and wash the walls **5 x with 200 µl** of washing buffer.
7. Add **100 µl** of TMB substrate solution
8. Incubate for **10-20 minutes** at room temperature, shaking slightly until color differences are sufficient.
9. Add **50 µl** of stop solution and mix shortly.
10. 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

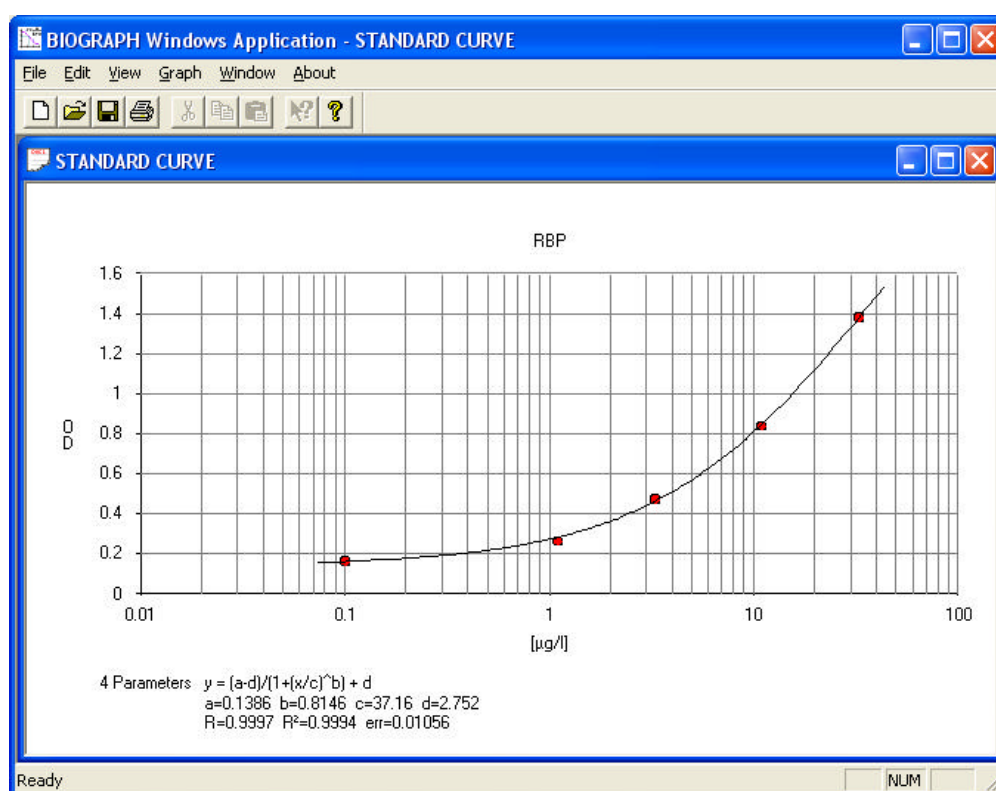
must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.

10. RESULTS

A calibration curve is constructed from the standards. Commercially available software can be used as well as graph paper. Results of the samples are read from this calibration curve.

THE CALIBRATION CURVE IS NOT LINEAR, therefore a spline- or 4PL algorithm is recommended.

Typical calibration curve



Concentration [µg/l]	33	11	3.3	1.1	0
OD mean values	1.864	1.151	0.548	0.287	0.163

The data is for demonstration only and cannot be used for the evaluation of test results.

Serum or Plasma

Multiply the result by **5000** to get the real concentration.

Urine

Multiply the result by the **dilution factor** to get the real concentration.

11. LIMITATIONS

Samples with RBP levels greater than the highest calibrator value, should be diluted and re-assayed.

12. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends commercially control samples as internal quality control.

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 sample are outside the acceptable limits.

*Expected values***Normal range:**

Plasma or Serum: 30 – 75 mg/l

Urine: 0.01 – 0.54 mg/l

It is recommended for each laboratory to establish its own normal range.

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

The precision (intra-assay variation) of the Immundiagnostik RBP ELISA test was calculated from 16 determinations on each of two samples.

Intra-Assay CV n= 16

Sample	RBP Mean value [µg/l]	Intra-Assay CV [%]
1	24.1	5
2	11.1	5

The total precision (inter-assay variation) of the Immundiagnostik RBP ELISA test was calculated from data on 2 samples obtained by different technicians on different days.

Inter-Assay CV n= 25

Sample	RBP Mean value [µg/l]	Inter-Assay CV [%]
1	4.4	9.8
2	6.9	9.7

Sensitivity

The detection limit was defined as $B_0 + 2SD$ and determined to be $0.9 \mu\text{g/l}$.

Sample dilution

Linearity n= 1

One patient sample was diluted. The results are shown below:

Sample	Dilution	Expected [$\mu\text{g/l}$]	Measured [$\mu\text{g/l}$]
A	1:7000	4.8	4.8
	1:14000	2.8	2.4
	1:28000	1.2	1.2
	1:56000	0.6	0.8

14. REFERENCES

Yang et al., Nature 2005 Jul 21;436(7049):356-62

15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.
- 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 thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even 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 out immediately with copious quantities of water.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the 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 wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.