

# total sRANKL (human) ELISA Kit

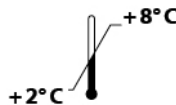
Zur in vitro Bestimmung des total sRANKL (human)  
in Serum und Plasma

# total sRANKL (human) ELISA Kit

For the in vitro determination of total sRANKL (human)  
in serum and plasma

Gültig ab / Valid from 11.11.2008

**REF** K 1016



**IVD**

**CE**



# Inhalt

<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>2</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
<b>3. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>3</b>
<b>4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>4</b>
<b>5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>4</b>
<b>6. PROBENVORBEREITUNG</b>	<b>5</b>
Probenverdünnung	5
<b>7. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>6</b>
Testprinzip	6
Pipettierschema	6
<b>8. ERGEBNISSE</b>	<b>8</b>
<b>9. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>8</b>
<b>10. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>9</b>
Erwartete Ergebnisse	9
<b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>9</b>
Präzision und Reproduzierbarkeit	9
Wiederfindung	10
Sensitivität	10
Linearität	11
<b>12. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>11</b>
<b>13. TECHNISCHE MERKMALE</b>	<b>12</b>
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>12</b>
<b>15. LITERATUR</b>	<b>12</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) ist für die quantitative Bestimmung von total sRANKL (human) aus Serum und Plasma geeignet. Nur zur in vitro Diagnostik.

Der Assay erkennt sowohl das freie als auch das im Komplex mit OPG gebundene sRANKL in Serum und Zellkulturüberstand. Freies sRANKL kann mathematisch ermittelt werden indem der Assay einmal mit einem Überschuss (freies und OPG gebundenes sRANKL werden bestimmt) und einmal ohne OPG Zugabe durchgeführt wird (nur die bereits in der Probe vorliegenden OPG-sRANKL-Komplexe werden bestimmt).

## 2. EINLEITUNG

RANKL (Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand, auch als Osteoprotegerin Ligand, OPGL, bekannt), sein zellulärer Rezeptor RANK und sein Fängerrezeptor, das Osteoprotegerin (OPG) wurden als Schlüsselkomponenten im körpereigenen Regelkreis des Knochenwiederaufbaus identifiziert. RANKL, ein Mitglied der TNF- (Tumor Necrosis Factor) Familie, ist das Hauptstimulanz für die Reifung von Osteoklasten und ist für ihr Überleben ausschlaggebend. Daher führt ein Anstieg der Expression von RANKL zu Knochenresorption und -verlust. RANKL wird von Zellen der Osteoblastlinie und aktivierten T-Lymphozyten produziert und aktiviert seinen spezifischen Rezeptor, RANK, welcher sich auf Osteoklasten und dendritischen Zellen befindet.

Die Wirkung von RANKL wird von OPG gesteuert, das in verschiedenen Geweben sezerniert wird und als löslicher endogener Rezeptorantagonist wirkt.

Die Pathogenese der Paget-Krankheit, gut- und bösartige Knochentumore, postmenopausale Osteoporose, rheumatische Arthritis, Knochenmetastasen und Hyperkalzämie wurden in Verbindung mit einem gestörten RANKL/OPG - Gleichgewicht gebracht. Am Tiermodell konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß von Störungen dieser Art durch ein Einstellen des RANKL/OPG - Gleichgewichts mittels Zugabe von OPG gemindert werden konnte.

Es wurde gezeigt, dass RANKL bei murinen Osteoblasten oder Stromazellen als membrangebundenes Protein exprimiert und von einer Metalloprotease in seine lösliche Form (sRANKL) abgespalten wird. Stimulation der Osteoclastogenese, beispielsweise durch IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-11, IL 17 und TNF- $\alpha$  fördern auch die Expression von RANKL und inhibieren die Expression von OPG in Osteoblasten oder Stromazellen. Zytokine wie IL-13, INF- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ 1, die die Osteoklastogenese inhibieren, unterdrücken die Expression von RANKL und stimulieren die Expression von OPG.

### **Molekulare Struktur:**

sRANKL ist ein Vertreter der TNF-Klasse und weist eine hohe Ähnlichkeit mit anderen Vertretern dieser Proteingruppe auf (SwissProt Nr. O14788). Zwei Isoformen entstehen durch alternative Fusionsvorgänge: ein Membranprotein vom Typ II (ISOFORM 1, 317 AS, 35.5 kD) und ein sezerniertes Molekül (ISOFORM 2, 244 AS, 27.7kD), dem die Domänen für das Zytoplasma und

Transmembranen fehlen. Obwohl beide Isoformen bioaktiv sind, scheint das membrangebundene Protein die homöostatische Form zu sein, während die Expression des löslichen sRANKL einen pathologischen Zustand anzeigt.

### Indikationen

- Postmenopausale und senile Osteoporose
- Krankheiten mit lokal erhöhter Knochenresorption
- Paget-Krankheit
- Erkrankungen der Zahnwurzelhaut
- Entzündliche Krankheiten
- Immunologische Störungen
- Arthritis
- Onkologie

## 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 1016MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 1016WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 1016LG	SOL	OPG-Lösung, gebrauchsfertig	5.5 ml
K 1016ST	STD	Standard, Konzentrat (Bereich siehe Spezifikation oder Etikett)	1 vial
K 1016KO	CTRL	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 vial
K 1016K	CONJ	Konjugat, Streptavidin, peroxidase-markiert	1 vial
K 1016AK2	AB	Detektionsantikörper, biotiniliert	1 vial
K 1016TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml
K 1016AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	15 ml

#### 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

#### 5. 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 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (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.
- Das **Konjugat, Streptavidin-Peroxidase**, wird **1:1000** in Waschpuffer (10 µl Streptavidin-PO in 10 ml Waschpuffer) verdünnt. Die unverdünnte Lösung ist bei 2-8 °C bis zum angegebenen Datum haltbar. **Verdünnte Konjugat-Lösung kann nicht gelagert werden.**
- Der **Detektionsantikörper** wird **1:1000** in Waschpuffer verdünnt (10 µl biotinylierter Antikörper in 10 ml Waschpuffer). Der unverdünnte Antikörper ist bei 2-8 °C bis zum angegebenen Datum haltbar. Verdünnte Antikörperlösungen sollten nicht gelagert werden.
- Das **Standardkonzentrat** (STD) und die **Kontrolle** (CTRL) sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar.

Die Lösungen für die Standardkurve werden aus dem **total sRANKL-Standardkonzentrat** (S6) mit verdünntem Waschlösungspuffer in **1:3 Verdünnungsschritten** wie folgt hergestellt.

**S6 (Standardkonzentrat)**

**100 µl S6 + 200 µl verdünnten Waschlösungspuffer = S5**

**100 µl S5 + 200 µl verdünnten Waschlösungspuffer = S4**

**100 µl S4 + 200 µl verdünnten Waschlösungspuffer = S3**

**100 µl S3 + 200 µl verdünnten Waschlösungspuffer = S2**

**Als Standard S1, 0 pg/ml, wird verdünnter Waschlösungspuffer verwendet.**

- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 6. PROBENVORBEREITUNG

### Probenverdünnung

#### Plasma/Serum Proben

Frisch abgenommenes Serum/Plasma sollte innerhalb einer Stunde abzentrifugiert werden. Es kann entweder am gleichen Tag im Test eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden. Lipämische oder hämolysierte Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Vor dem Einsatz im Test sollten die Proben gut gemischt werden. Wir empfehlen alle Proben in Doppelbestimmungen zu analysieren.

**Plasma/Serum Proben** vor dem Einsatz im Test **1:10** in **Waschlösungspuffer** verdünnen. Zum Beispiel:

**50 µl Probe + 450 µl verdünnten Waschlösungspuffer.**

#### Zellkultur

Bei Messung in Zellkultur muss das jeweilige Zellkulturmedium als Blank mitgemessen werden. Der Blank wird von den Probenwerten abgezogen.

## 7. TESTDURCHFÜHRUNG

### Testprinzip

Der Test basiert auf der "Sandwich"-ELISA Technik. Es werden zwei ausgewählte Antikörper, die humanes sRANKL und OPG erkennen, verwendet.

Teststandards, Kontrollen und verdünnte Patientenproben, die sRANKL enthalten und die OPG-Lösung werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem hochaffinen polyklonalen anti-human OPG Antikörper beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das sRANKL aus der Probe an das OPG gebunden und von dem gekoppelten Fängerantikörper an die Mikrotiterplatte gebunden. Dann wird der Detektionsantikörper (ein Biotin-markierter monoklonaler anti-sRANKL Antikörper) zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper - humanes OPG-sRANKL – Detektionsantikörper. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugats, das spezifisch an Biotin bindet. 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 bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem total sRANKL-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.

### Pipettierschema

1.	Im Test nur Reagenzien und Proben verwenden, die Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen
2.	Positionen für STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Probe/Kontrolle) in Doppelbestimmung im Protokollblatt markieren
3.	Benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden
4.	5x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
5.	50 µl STD/SAMPLE/CTRL in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen pipettieren. Als STD 0 pg/ml Waschpuffer einsetzen

6.	50 µl SOL (OPG-Lösung) in alle Vertiefungen pipettieren
7.	Streifen abdecken und 16 - 24 Stunden bei 2 - 8 °C inkubieren
8.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
9.	100 µl biotinylierten Detektionsantikörper in alle Vertiefungen pipettieren
10.	Streifen abdecken und 2 Stunden bei Raumtemperatur (18-26°C) inkubieren
11.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
12.	100 µl CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren
13.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei 2 - 8 °C inkubieren
14.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
15.	100 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren
16.	20 - 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren*
17.	50 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen
18.	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 gelesen. 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.

## 8. 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. 0.01).

### 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 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. 0.01).

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/Plasma Proben

Um die total sRANKL Konzentration im **Serum/Plasma** zu berechnen, wird die ermittelte Konzentration mit **10** multipliziert.

## 9. EINSCHRÄNKUNGEN

**Serum/Plasma** Proben mit hohen total sRANKL Konzentrationen, die außerhalb der Standardkurve liegen, werden mit Waschpuffer verdünnt und nochmals bestimmt.

## 10. 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 Bereiches, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Werte nicht gewährleisten.

Erwartete Ergebnisse

### Umrechnungsfaktor von pg/ml zu pmol/l

1 pg/ml = 0.016 pmol/l

(Molmasse: sRANKL wird in der Literatur als Trimer beschrieben - 60 kD; Monomer: 20 kD)<sup>1</sup>

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n=20)		
Probe	total sRANKL [pg/ml]	VK [%]
1	618	0.9
2	2346	3.5

Inter-Assay (n=20)		
Probe	total sRANKL [pg/ml]	VK [%]
1	618	9.3
2	2306	7.1

## Wiederfindung

2 Proben wurden mit 3 unterschiedlichen total sRANKL Standardmengen versetzt und gemessen.

Wiederfindung n=2

Probe [pg/ml]	Spike [pg/ml]	total sRANKL erwartet [pg/ml]	total sRANKL gemessen [pg/ml]
104	1800	1904	1961
	1200	1304	1334
	800	904	835
151	1800	1951	1943
	1200	1351	1259
	800	951	922

## Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als  $B_0 + 2 \text{ SD}$ . Gemessen wurde 20 mal der Standard null.

Probe	total sRANKL Mittelwert [OD]	Standardabweichung (SD)	Nachweisgrenze [pg/ml]
1	0.013	0,24	1.56

## Linearität

Zwei Patientenproben wurden mit Probenverdünnungspuffer verdünnt und im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt.

n= 2

Probe	Verdünnung	Erwartet [pg/ml]	Gemessen [pg/ml]
A	1:100	1537	1537
	1:150	1025	1021
	1:200	768	701
B	1:100	1477	1477
	1:150	984	1083
	1:200	731	754

## 12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur in vitro Diagnostik.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- 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 giftig und karzinogen. 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 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.

### 13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt 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.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

### 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur in vitro Diagnostik verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- 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 zurück zu senden.

### 15. LITERATUR

1. Lacey D.L, et al., Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* (1998), 93:165-176.
2. Kong Y.Y. et al., OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* (1999), 397: 315-323.
3. Hsu H. et al., Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci* (1999), 96:3540-3545.

4. Josien R, et al, TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo. *J Exp Med* (2000), 191: 495-502.
5. Fuller K. et al., TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med* (1998), 188: 997-1001.
6. Nakashima T , et. al., Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* (2000), 275(3):768-75.
7. Kong Y.Y. et al., Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* (1999), 402: 304-309.
8. Hofbauer L.C. & A.E. Heufelder, Role of receptor activator of nuclear factor-KB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* (2001), 79: 243-253.
9. Hofbauer L.C. & A.E. Heufelder, The Role of Osteoprotegerin and Receptor Activator of Nuclear Factor KB Ligand in the Pathogenesis and Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* (2001), 44:253-259.
10. Hofbauer LC, et al.,. The role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. *J Clin Endocrinol Metab* (2000), 85: 2355-2363.
11. Teitelbaum S.L., Bone resorption by osteoclasts. *Science* (2000), 289: 1504-1508.

### **Publikationen zum Immundiagnostik total sRANKL ELISA:**

1. Oelzner P et al. (2006) RANKL, Osteroprotegerin und IL-6-System bei Rheumatoider Arthritis - Einfluß von Alter, Erkrankungsdauer, Menopause und entzündlicher Aktivität. Poster vorgestellt bei der Osteologietagung, 8.-11. März 2006, Köln
2. Hein G et al. (2005) Vergleich der Serum- und Synovia-Spiegel von sRANKL und OPG bei rheumatoider Arthritis und nicht erosiven Arthritiden. Poster, vorgestellt beim 33. Kongress der D. Ges. für Rheumatologie, September 2005, Dresden
3. Schedler J et al. (2005) Osteoprotegerin, RANK- Ligand und 5b-b TRAP bei Patienten mit Morbus Crohn. Poster P148 *Z Gastroenterol* 43:812

Dieser Assay ist eine Gemeinschaftsentwicklung der Firmen  
Immundiagnostik, Bensheim und Apotech, Epalinges, Schweiz



**Verwendete Symbole:**

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>  
Prüfungen

Chargenbezeichnung



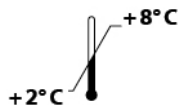
Verwendbar bis

# total sRANKL (human) ELISA Kit

For the in vitro determination of total sRANKL (human)  
in serum and plasma

Valid from 11.11.2008

**REF** K 1016



**IVD**

CE

# Content

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>17</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>18</b>
<b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>19</b>
<b>5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b>	<b>19</b>
<b>6. SAMPLE PREPARATION</b>	<b>20</b>
Dilution of samples	20
<b>7. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>20</b>
Principle of the test	20
Test procedure	21
<b>8. RESULTS</b>	<b>22</b>
<b>9. LIMITATIONS</b>	<b>23</b>
<b>10. QUALITY CONTROL</b>	<b>23</b>
Expected values	23
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>23</b>
Precision and reproducibility	23
Recovery	24
Sensitivity	24
Linearity	25
<b>12. PRECAUTIONS</b>	<b>25</b>
<b>13. TECHNICAL HINTS</b>	<b>26</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>26</b>
<b>15. REFERENCES</b>	<b>26</b>

## 1. INTENDED USE

The described Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) is intended for the quantitative determination of total sRANKL (human) in serum and plasma. It is for in vitro diagnostic use only.

The assay detects free as well as OPG-bound sRANKL in serum and cell culture supernatants. Free sRANKL can be mathematically estimated when the assay is performed once with an excess of OPG (free and OPG-bound sRANKL are determined), and then without any addition of OPG (only OPG-sRANKL-complexes already present in the sample are determined).

## 2. INTRODUCTION

RANKL (receptor activator of nuclear factor (NF)- $\kappa$ B ligand; also: osteoprotegerin ligand, OPGL), its cellular receptor, receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK), and the decoy receptor, osteoprotegerin (OPG) have been identified as the key molecular regulation system for bone remodelling. RANKL, a member of the tumor necrosis factor (TNF) family, is the main stimulatory factor for the formation of mature osteoclasts and is essential for their survival. Therefore, an increase in RANKL expression leads to bone resorption and bone loss. RANKL is produced by osteoblastic lineage cells and activated T lymphocytes. It activates its specific receptor RANK which is located on osteoclasts and dendritic cells.

The effects of RANKL are counteracted by OPG which is secreted by various tissues and acts as an endogenous soluble receptor antagonist.

Imbalances of the RANKL/OPG system have been related to the pathogenesis of Paget's disease, benign and malignant bone tumors, postmenopausal osteoporosis, rheumatoid arthritis, bone metastases and hypercalcemia. It was shown in several studies that in animal models restoring of the RANKL/OPG balance (e.g. by administering OPG) reduces the severity of these disorders.

It has been shown, that RANKL is produced as a membrane-bound protein on murine osteoblasts/stromal cells, and cleaved into a soluble form by a metalloprotease. Stimulators of the osteoclastogenesis such as IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-11, IL-17, and TNF- $\alpha$ , increase the expression of RANKL and decrease OPG expression in osteoblasts/stromal cells. Cytokines inhibiting the osteoclastogenesis such as IL-13, INF- $\gamma$ , and TGF- $\beta$ 1, suppress the expression of RANKL and stimulated OPG expression.

### **Molecular structure:**

sRANKL is a part of the TNF superfamily with high similarity to other members of that protein species. (SwissProt Nr. O14788). Two isoforms are produced by alternate splicing, a type II membrane protein (ISOFORM 1, 317 AA, MW 35.5 kD), and a secreted molecule (ISOFORM 2, 244 AA, MW 27.7kD), lacking the cytoplasmic and transmembrane domain. Although both forms are

bioactive, the membrane bound protein seems to be the homeostatic form, while the production of soluble RANKL signals pathological conditions.

### Indications

- Postmenopausal and senile osteoporosis
- Diseases with locally increased bone resorption activity
- Paget's disease
- Periodontal disease
- Inflammatory diseases
- Immunological disorders
- Arthritis
- Oncology

## 3. MATERIAL SUPPLIED

Catalogue No	Content	Kit Components	Quantity
K 1016MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 1016WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 1016LG	SOL	OPG-Solution, ready-to-use	5.5 ml
K 1016ST	STD	Standard, concentrate (for range see specification or label)	1 vial
K 1016KO	CTRL	Control, ready-to-use (for range see specification)	1 vial
K 1016AK2	AB	Detection antibody, biotinylated	1 vial
K 1016K	CONJ	Conjugate, streptavidin peroxidase-labeled	1 vial
K 1016TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzi- dine), ready-to-use	15 ml
K 1016AC	STOP	ELISA stop solution, ready-to-use	15 ml

#### 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000  $\mu\text{l}$
- Foil to cover the microtiter plate
- 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 nm  
(reference wave length 620 or 690 nm)

#### 5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than one time, make sure that the reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare just the appropriate amount necessary for the 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  $\mu\text{l}$**  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 a. bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals have to be redissolved at room temperature or at 37°C using a water bath 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** could be stored in a closed flask at **2-8°C for one month**.
- Dilute **POD-streptavidin 1:1000** in wash buffer (10  $\mu\text{l}$  POD streptavidin in 10 ml ELISA wash buffer). The streptavidin is stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label. **Diluted streptavidin solution is not stable and can not be stored.**
- Dilute **biotinylated detection antibody 1:1000** in wash buffer (10  $\mu\text{l}$  antibody in 10 ml ELISA wash buffer). The antibody is stable at 2-8°C until expiry date given on the label. **Diluted antibody solution is not stable and can not be stored.**
- The **standard concentrate** (STD) and the **control** (CTRL) are stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label.

Prepare the solutions for the standard curve from the **total sRANKL standard concentrate (S6)** in **1:3** dilution steps by adding diluted **wash buffer** as follows:

**S6** (standard concentrate)

**100 µl S6 + 200 µl diluted wash buffer = S5**

**100 µl S5 + 200 µl diluted wash buffer = S4**

**100 µl S4 + 200 µl diluted wash buffer = S3**

**100 µl S3 + 200 µl diluted wash buffer = S2**

**Diluted wash buffer is used as standard S1, 0 pg/ml.**

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

## 6. SAMPLE PREPARATION

Dilution of samples

### Serum/plasma samples

Fresh collected serum/plasma should be centrifuged within one hour. Store samples at -20 °C if not assayed on the same day. Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results. Samples should be mixed well before assaying. We recommend duplicate analyses for each sample.

Dilute **serum/plasma** samples **1:10** with **wash buffer** prior to analyses. For example:

**50 µl sample + 450 µl diluted wash buffer.**

### Cell culture supernatants

Cell culture medium is used as a blank. Record the absorbance readings for each sample and subtract the absorbance of the blank background from the absorbance obtained for each sample.

## 7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

The assay utilizes the two-site “sandwich” technique with two selected antibodies that bind to human sRANKL and OPG.

Assay standards, controls and prediluted patient samples containing human sRANKL and the OPG-solution are added to wells of microplate coated with a high affine polyclonal anti-human OPG antibody. After the first incubation period, sRANKL is bound to the OPG and the antibody immobilized on the wall of microtiter wells. Then a biotinylated mono-

clonal anti-human sRANKL antibody is added to each microtiter well and a "sandwich" of "capture antibody - human OPG - sRANKL – streptavidin (peroxidase-labeled) is formed. For quantification, a streptavidin horseradish-peroxidase conjugate is added, which specifically binds to biotin. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as a substrate for 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 concentration of total sRANKL. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. total sRANKL present in the patient samples, is determined directly from this curve.

## Test procedure

1.	Prior to use, allow all reagents and samples to come to room temperature (18-26 °C) and mix well
2.	Mark the positions of STD /SAMPLE/CTRL (Standards/Sample/Control) in duplicate on a protocol sheet
3.	Take microtiter strips out of the kit. Store unused strips covered at 2-8° C. Strips are stable until the expiry date stated on the label
4.	Wash 5 times by dispensing 250 µl of diluted WASHBUF (Wash buffer) into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper
5.	Add 50 µl of STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) in duplicate into respective well. Use the wash buffer as STD 0 pg/ml.
6.	Add 50 µl SOL (OPG-solution) into each well
7.	Cover the plate tightly and incubate for 16 - 24 hours at 2 - 8 °C
8.	Discard the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 µl of diluted WASHBUF (Wash buffer) into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper
9.	Add 100 µl detection antibody into each well
10.	Cover the plate tightly and incubate for 2 hours at room temperature (18-26 °C)
11.	Discard the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 µl of diluted WASHBUF (Wash buffer) into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper
12.	Add 100 µl CONJ (conjugate) into each well

13.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at 2 - 8 °C
14.	Discard the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 µl of diluted WASHBUF (Wash buffer) into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper
15.	Add 100 µl of SUB (substrate) into each well
16.	Incubate for 20-30 minutes at room temperature (18-26°C) in the dark*
17.	Add 50 µl of STOP (stop solution) into each well, mix thoroughly
18.	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

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

## 8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend to use the „4-Parameter-algorithm“.

### 1. 4-Parameter-algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator has to be specified with a value less than 1 (e.g. 0.01).

### 2. Point-to-point-calculation

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

### 3. Spline-algorithm

We recommend a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator has to be specified with a value less than 1 (e.g. 0.01).

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

**Serum/plasma samples**

For the calculation of the total sRANKL concentration in **plasma/serum** the result must be multiplied by **10**.

**9. LIMITATIONS**

**Serum/plasma** samples with total sRANKL levels greater than the highest standard value, should be diluted with wash buffer and re-assayed.

**10. QUALITY CONTROL**

Immundiagnostik AG recommends the use of commercial control samples for internal quality control if available.

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

**Conversion factor for pg/ml to pmol/l**

1 pg/ml = 0.016 pmol/l (60 kDa)

Relative molecular mass: sRANKL molecular mass is described in the literature as a trimer molecule of 60 kD; monomer - 20 kDa<sup>1</sup>.

We recommend each laboratory to establish its own norm concentration range.

**11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n=20)		
Sample	total sRANKL [pg/ml]	CV [%]
1	618	0.9
2	2346	3.5

Inter-Assay (n=20)		
Sample	total sRANKL [pg/ml]	CV[%]
1	618	9.3
2	2306	7.1

### Recovery

2 samples were spiked with 3 different total sRANKL standards and measured using this assay.

Sample [pg/ml]	Spike [pg/ml]	total sRANKL expected [pg/ml]	total sRANKL measured [pg/ml]
104	1800	1904	1961
	1200	1304	1334
	800	904	835
151	1800	1951	1943
	1200	1351	1259
	800	951	922

### Sensitivity

The sensitivity was set as  $B_0 + 2SD$ . The zero-standard was measured 20 times.

Sample	total sRANKL mean value [OD]	Standard variation (SD)	Detection limit [pg/ml]
1	0.013	0,24	1.56

## Linearity

Two patient samples were diluted with sample dilution buffer and analyzed. The results are shown below:

n= 2

Sample	Dilution	Expected [pg/ml]	Measured [pg/ml]
A	1:100	1537	1537
	1:150	1025	1021
	1:200	768	701
B	1:100	1477	1477
	1:150	984	1083
	1:200	731	754

## 12. PRECAUTIONS

- For in vitro diagnostic use only.
- The quality control guidelines should be followed.
- Human material used in the kit components was 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.
- Reagents of the kit package contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. The 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 spill should be wiped out immediately with copious quantities of water.

### 13. TECHNICAL HINTS

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the 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.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

### 14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for in vitro diagnostic use only.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- 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 lodged within 14 days after receipt of the product. The product shall be sent to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

### 15. REFERENCES

1. Lacey D.L, et al., Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* (1998), 93:165-176.
2. Kong Y.Y. et al., OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* (1999), 397: 315-323.
3. Hsu H. et al., Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci* (1999), 96:3540-3545.
4. Josien R, et al, TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo. *J Exp Med* (2000), 191: 495-502.

5. Fuller K. et al., TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med* (1998), 188: 997-1001.
6. Nakashima T , et. al., Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* (2000), 275(3):768-75.
7. Kong Y.Y. et al., Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* (1999), 402: 304-309.
8. Hofbauer L.C. & A.E. Heufelder, Role of receptor activator of nuclear factor-KB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* (2001), 79: 243-253.
9. Hofbauer L.C. & A.E. Heufelder, The Role of Osteoprotegerin and Receptor Activator of Nuclear Factor KB Ligand in the Pathogenesis and Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* (2001), 44:253-259.
10. Hofbauer LC, et al.,. The role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. *J Clin Endocrinol Metab* (2000), 85: 2355-2363.
11. Teitelbaum S.L., Bone resorption by osteoclasts. *Science* (2000), 289: 1504-1508.

### **Publications based on Immundiagnostik's total sRANKL ELISA:**

1. Oelzner P et al. (2006) RANKL, Osteroprotegerin und IL-6-System bei Rheumatoider Arthritis - Einfluß von Alter, Erkrankungsdauer, Menopause und entzündlicher Aktivität. Poster vorgestellt bei der Osteologietagung, 8.-11. März 2006, Köln
2. Hein G et al. (2005) Vergleich der Serum- und Synovia-Spiegel von sRANKL und OPG bei rheumatoider Arthritis und nicht erosiven Arthritiden. Poster, vorgestellt beim 33. Kongress der D. Ges. für Rheumatologie, September 2005, Dresden
3. Schedler J et al. (2005) Osteoprotegerin, RANK- Ligand und 5b-b TRAP bei Patienten mit Morbus Crohn. Poster P148 *Z Gastroenterol* 43:812

This assay was developed by  
Immundiagnostik, Bensheim, Germany and Apotech, Epalinges, Switzerland



**Used Symbols:**

Store at



Catalog Number



In Vitro Diagnostic Device



No. of tests



Lot number



Use by





**Immundiagnostik AG**

Stubenwald-Allee 8a  
D-64625 Bensheim

Tel.: +49(0) 62 51/70 19 00

Fax: +49(0) 62 51/84 94 30

[info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)