

GHRELIN (TOTAL) RIA
125 TUBES (Cat. N° GHRT-89HK)

I. UTILISATION

La trousse RIA Ghréline Totale de Millipore est destinée au dosage de la Ghréline dans le sérum, le plasma et les milieux de culture ou les extraits tissulaires. Elle utilise un anticorps qui reconnaît la ghréline totale indépendamment de la présence ou de l'absence d'un groupe octanoyle sur la sérine 3. Lorsque le volume de sérum ou de plasma est de 100 µl, on peut aisément mesurer des concentrations de l'ordre de 93 pg/ml.

Cette trousse est uniquement destinée à la recherche.

II. PRINCIPE DU DOSAGE

Dans un dosage radioimmunologique, une quantité fixe d'antigène marqué est incubée avec une dilution constante de l'antisérum calculée de telle sorte que le nombre de sites de liaison de l'antigène est limité, par exemple, seuls 50% de traceur seront liés à l'anticorps. Si de l'antigène non marqué est ajouté dans le milieu, il y a compétition entre le traceur marqué et l'antigène non marqué pour un nombre limité et constant de sites de liaison sur l'anticorps. De plus, la quantité de traceur lié à l'anticorps diminue quand la concentration de l'antigène non marqué augmente. On peut effectuer la mesure après avoir effectué la séparation de l'anticorps lié du traceur libre et après avoir compté la fraction libre, la fraction liée ou les deux.

On prépare une courbe standard à l'aide de quantités croissantes d'antigène non marqué et on calcule à partir de cette courbe la concentration des échantillons inconnus. On a ainsi les quatre conditions de base d'un dosage radioimmunologique : un antisérum spécifique de l'antigène à doser, l'antigène marqué par une substance radioactive, une méthode de séparation de l'antigène sous forme liée à l'antisérum, de l'antigène sous forme libre, et finalement l'instrument qui permet de compter la radioactivité.

Le dosage de la Ghréline Totale de Millipore utilise de la Ghréline marquée à l'iode 125 et un antisérum de lapin anti-Ghréline, afin de mesurer le taux de Ghréline dans le sérum, le plasma et les milieux de culture au moyen d'une technique de dosage par double anticorps/PEG.

III. RÉACTIFS FOURNIS

Chaque trousse contient le matériel suffisant pour effectuer 125 dosages :

1. Réactif A – Tampon de dosage Ghréline Totale

1 flacon de 20 ml contenant du tampon phosphate 0,01M, pH 8,5 avec de l'EDTA 0,01 M, de la gélatine à 0,1% et de l'azoture de sodium à 0,08%. Prêt à l'emploi.

2. Réactif B - Solution d'antisérum

1 flacon contenant 13 ml d'antisérum de lapin anti-Ghréline dans le Tampon de dosage. Prêt à l'emploi.

3. Réactif C - ¹²⁵I Ghréline

1 flacon contenant 13,5 ml après reconstitution d'une solution de Ghréline marquée à l'iode 125 et purifiée par HPLC (activité spécifique 302 µCi/µg). Sous forme lyophilisée. Chaque flacon a une activité < 56 kBq (1,5 µCi).

Préparation : reconstituer en ajoutant le contenu du diluant pour traceur. Laisser reposer à température ambiante pendant 30 minutes en agitant doucement le flacon à intervalles réguliers.

4. Réactif D – Diluant pour traceur Ghréline Totale

1 flacon contenant 13,5 ml de tampon de dosage avec 0,025% de Triton-X100 et du sérum normal de lapin. Prêt à l'emploi.

5. Réactifs E - Standard

1 flacon contenant 2 ml après reconstitution d'une solution de Ghréline dans du tampon phosphate avec un agent conservateur non mercuriel.

Préparation : reconstituer avec 2 ml d'eau distillée ou désionisée.

La concentration du standard varie de lot en lot. Consulter la feuille d'analyse incluse dans la trousse pour obtenir la concentration exacte en Ghréline.

6. Réactifs F - Contrôles 1 et 2

2 flacons contenant chacun après reconstitution 1 ml de Ghréline. Sous forme lyophilisée.

Préparation : reconstituer avec 1 ml d'eau distillée ou désionisée.

7. Réactif G - Réactif précipitant

1 flacon contenant 130 ml d'anticorps de chèvre anti-lapin en solution dans du tampon phosphate 0,05M, qui contient du PEG à 3%, du Triton X-100 à 0,05%, de l'EDTA à 0,025 M et de l'azoture de sodium à 0,08%. Prêt à l'emploi, réfrigéré à 4 °C.

IV. CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS

Conserver tous les réactifs à 2-8 °C pour une conservation à court terme. Pour une conservation prolongée (> à 2 semaines), conserver à -20 °C. **Après reconstitution, la portion de standard le plus concentré qui n'a pas été utilisé doit être stocké à -20°C. Il en va de même pour le traceur et les contrôles après reconstitution.** Eviter les congélations/décongélations répétées (>5 fois). Se référer à la date d'expiration figurant sur l'étiquette pour connaître la date d'expiration pour une conservation à -20°C. Ne pas mélanger les réactifs qui proviennent de différentes trusses, sauf s'ils proviennent du même lot.

V. PRECAUTIONS D'UTILISATION

A. Règles de base de radioprotection

1. Le matériel radioactif de cette trousse doit être manipulé en respectant les règles de sécurité concernant l'emploi des radionucléides en source non scellées.

2. Toute manipulation de substances radioactives doit s'effectuer dans une zone contrôlée, conformément à la réglementation en vigueur.

3. Ne pas pipeter les solutions radioactives à la bouche.

4. Ne pas manger, boire ou fumer en zone contrôlée.

5. Eviter tout contact direct avec les produits radioactif. Utiliser des blouses et des gants de protection.

6. Tout déchet radioactif solide ou liquide sera éliminé selon la réglementation en vigueur.

7. Dans le cas de contamination ou de perte de substance radioactive, observer les procédures établies.

B. Autres précautions

1. Les réactifs de cette trousse sont destinés exclusivement à l'analyse in vitro et ne doivent en aucun cas être administrés à l'homme ou à l'animal.

2. ATTENTION : Tous les réactifs de cette trousse contiennent de l'azoture de sodium en tant qu'agent conservateur à une concentration de 0,08%. Bien qu'il s'agisse d'une concentration très

faible, il faut noter que l'azoture de sodium peut réagir avec le plomb et le cuivre des tuyauteries pour former des composés explosifs. Lors de l'élimination des réactifs dans l'évier, faire couler un grand volume d'eau pour éviter la formation d'azotures métalliques. Eviter toute contamination de la peau et des muqueuses.

VI. MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

1. Tubes en verre borosilicaté, à usage unique, 12 x 75 mm (il est possible d'utiliser des tubes de polypropylène ou de polystyrène si l'utilisateur estime que le précipité est suffisamment stable)
2. Pipettes de précision et pointes de 100 µl
3. Distributeur automatique : 10 µl, 100 µl et 1,0 ml
4. Papier absorbant
5. Vortex
6. Réfrigérateur
7. Centrifugeuse réfrigérée capable de développer 2000 à 3000 xg
8. Compteur à scintillations gamma

VII. PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

On utilisera un maximum de 100 µl de sérum ou de plasma par dosage. **Toutefois il est de loin préférable d'utiliser du plasma plutôt que du sérum.** Dans la plupart des cas, un volume de 50 µl par tube est suffisant. Pour les milieux de culture, on utilisera des volumes de 50 à 100 µl.

On conservera les échantillons à 4°C, si on doit les doser dans les 24 heures. Pour un stockage prolongé, il est préférable de les stocker à -20°C. **Eviter les congélations/décongélations répétées qui entraîneront une baisse des résultats à chaque cycle.** Eviter d'utiliser des échantillons hémolysés ou lipidiques.

Il est préférable de prendre des précautions si on utilise l'héparine comme anticoagulant, car sa présence en excès provoque une augmentation des taux². Il est préférable de *ne pas* utiliser plus de 10 UI d'héparine par ml de sang prélevé.

VIII. DOSAGE

A- Préparation des standards de Ghréline Totale

1- Ouvrir avec précaution le flacon de standard lyophilisé. A l'aide d'une pipette Eppendorf, reconstituer le standard de Ghréline Totale avec 2 ml d'eau distillée ou désionisée pour obtenir la concentration indiquée sur la fiche d'analyse. Bien mélanger par inversion, laisser reposer 5 minutes ou jusqu'à dissolution complète, puis mélanger à nouveau.

2- Numéroté 6 tubes 1, 2, 3, 4, 5, et 6. Ajouter 0,5 ml de tampon de dosage à chacun des 6 tubes. Préparer des dilutions en série de la façon suivante :

- ajouter 0,5 ml du standard reconstitué au tube 1. Mélanger soigneusement et transférer 0,5 ml du tube 1 au tube 2.
- mélanger soigneusement et transférer 0,5 ml du tube 2 au tube 3.
- mélanger soigneusement et transférer 0,5 ml du tube 3 au tube 4.
- mélanger soigneusement et transférer 0,5 ml du tube 4 au tube 5.
- mélanger soigneusement et transférer 0,5 ml du tube 5 au tube 6.
- mélanger soigneusement

Remarque : ne pas utiliser un distributeur. Changer de pointe pour chaque dilution. Mouiller la pointe avec le standard avant de pipeter. **La solution de standard reconstitué non utilisée doit être stockée à -20 °C. Eviter les congélations / décongélations répétées.**

	Volume d'eau désionisée à ajouter 2 ml	Volume de standard à ajouter 0	Concentration du standard (pg/ml) X (voir feuille d'analyse pour la concentration exacte)
Tube	Volume de tampon de dosage à ajouter 0,5 ml	Volume de standard à ajouter 0,5 ml de standard reconstitué	Concentration du standard (pg/ml) X/2
1			
2	0,5 ml	0,5 ml du tube 1	X/4
3	0,5 ml	0,5 ml du tube 2	X/8
4	0,5 ml	0,5 ml du tube 3	X/16
5	0,5 ml	0,5 ml du tube 4	X/32
6	0,5 ml	0,5 ml du tube 5	X/64

B- Préparation des contrôles 1 et 2

Ouvrir avec précaution les flacons de contrôle. A l'aide d'une pipette Eppendorf, reconstituer les contrôles 1 et 2 avec 1 ml d'eau distillée ou désionisée. Bien mélanger par inversion, laisser reposer 5 minutes ou jusqu'à dissolution complète, puis mélanger à nouveau.

Remarque : la concentration exacte en Ghréline des contrôles 1 et 2 figure sur la feuille d'analyse incluse dans la trousse. **Après reconstitution, les portions de contrôles non utilisées doivent être congelées à -20 °C. Eviter les congélations / décongélations répétées.**

C- Mise en place du dosage – Jour 1:

Il est important de suivre ce protocole et d'être précis dans les étapes de pipetage.

1. Pipeter 300 µl de tampon de dosage dans les tubes 3 et 4 correspondant à la liaison non spécifique (LNS) et 200 µl dans les tubes 5 et 6 correspondant au B₀ et 100 µl dans tous les autres tubes.

2. Pipeter 100 µl de standards et de contrôles en double (Voir le schéma du dosage).

3. Pipeter 100 µl d'échantillon dilué en double.

Remarque : des volumes d'échantillons moindres peuvent être utilisés lorsque les concentrations de Ghréline sont supposées très élevées ou lorsque le volume d'échantillon disponible est réduit. On ajoutera la quantité de tampon de dosage nécessaire pour compenser la différence de volume

(par exemple si on utilise 50 µl d'échantillon, on ajoutera 50 µl de tampon de dosage). Se reporter à la section calcul des résultats pour modifier celui-ci.

4. Ajouter 100 µl d'anticorps anti-Ghréline dans tous les tubes à l'exception des tubes correspondant à l'activité totale (1 et 2) et à la LNS (3 et 4).

5. Mélanger au vortex, couvrir et laisser incuber pendant 20 à 24 heures à 4 °C.

Jour 2 :

6. reconstituer le traceur avec 13,5 ml de Diluant pour traceur. Mélanger et pipeter 100 µl de Ghréline marquée à l'iode 125 dans tous les tubes.

Remarque : reconstituer le traceur juste avant de le pipeter et congeler immédiatement les portions inutilisées.

7. Mélanger au vortex, couvrir et laisser incuber pendant 20 à 24 heures à 4 °C.

Jour 3 :

8. Ajouter 1,0 ml de réactif précipitant froid (4 °C) à tous les tubes à l'exception de ceux qui correspondent à l'activité totale.

9. Mélanger au vortex et laisser incuber 20 minutes à 4 °C.

10. Centrifuger à 4 °C tous les tubes, à l'exception de ceux qui correspondent à l'activité totale pendant 20 minutes à 2000 - 3000 x g. Remarque : Si on utilise une vitesse inférieure à 2000 x g, ou si on a observé des précipités de mauvaise qualité au cours des dosages précédents, on augmentera le temps de centrifugation afin d'obtenir des précipités de bonne qualité (par exemple 40 minutes).

Conversion des tr/min.en xg

$$xg = (1,12 \times 10^{-5}) (r) (tr/min.)^2$$

r = distance radiale en cm (depuis l'axe de rotation jusqu'au fond des tubes)

tr/min. = vitesse du rotor

11. Décanter immédiatement le surnageant de tous les tubes à l'exception des tubes correspondant à l'activité totale (tubes 1 et 2), laisser égoutter pendant au moins 15 à 60 secondes, et retirer l'excès de liquide au bord des tubes. Remarque : Ne retourner les tubes qu'une seule fois. Les culots sont fragiles et pourraient glisser.

12. Compter tous les tubes dans un compteur à scintillations gamma pendant 1 minute. Calculer la concentration en Ghréline humaine des échantillons en utilisant une procédure de calcul automatique.

Schéma de dosage de la Ghréline

Jour 1					Jour 2		Jour 3	
Préparation	Étape 1	Étapes 2 et 3	Étape 4	Étape 5	Étape 6	Étape 7	Étape 8	Étapes 9-12
Numéroter les tubes	Ajouter Tampon de dosage	Ajouter Standard/ Contrôle/ Echantillon	Ajouter anticorps	Vortexer, couvrir, et incuber 20-24 heures à 4°C	Ajouter traceur	Vortexer, couvrir, et incuber 20-24 heures à 4°C	Ajouter réactif précipitant	Centrifuger 20 min. à 4°C, décanter et compter
1,2	-	-	-		100 µl		-	
3,4	300 µl	-	-		100 µl		1,0 ml	
5,6	200 µl	-	100 µl		100 µl		1,0 ml	
7,8	100 µl	100 µl du tube 6	100 µl		100 µl		1,0 ml	
9,10	100 µl	100 µl du tube 5	100 µl		100 µl		1,0 ml	
11,12	100 µl	100 µl du tube 4	100 µl		100 µl		1,0 ml	
13,14	100 µl	100 µl du tube 3	100 µl		100 µl		1,0 ml	
15,16	100 µl	100 µl du tube 2	100 µl		100 µl		1,0 ml	
17,18	100 µl	100 µl du tube 1	100 µl		100 µl		1,0 ml	
19,20	100 µl	100 µl de standard reconstitué	100 µl		100 µl		1,0 ml	
21,22	100 µl	100 µl de contrôle 1	100 µl		100 µl		1,0 ml	
23,24	100 µl	100 µl de contrôle 2	100 µl		100 µl		1,0 ml	
25,26	100 µl	100 µl d'échantillon	100 µl	100 µl	1,0 ml			

IX. CALCUL DES RÉSULTATS

A. Explication

Les calculs des taux de Ghréline totale peuvent être faits automatiquement par la plupart des compteurs gamma qui possèdent des capacités de traitement des données ou par un traitement indépendant des données par un logiciel disponible dans le commerce². Choisir un système à 4 paramètres ou un log/logit pour le traitement mathématique des données (**Remarque** : S'assurer que la LNS est bien soustraite de la moyenne des cpm obtenus pour chaque duplicata à l'exception de l'activité totale, avant de finaliser les calculs).

B. Calcul manuel

1. Calculer la moyenne des coups par minute (CPM) obtenus pour les tubes correspondant à l'AT (tubes 1 et 2), à la LNS (tubes 3 et 4), Maximum de liaison (tubes 5 et 6), standards, contrôles et échantillons de malade.
2. Soustraire la moyenne des coups correspondant aux tubes LNS de la moyenne des coups obtenus pour les autres tubes, (à l'exception de AT), pour obtenir la moyenne des coups corrigée.
3. Calculer le pourcentage maximum de liaison en divisant les CPM corrigés correspondant au standard zéro (B_0) par les CPM moyens correspondant à l'activité totale (AT). Ce pourcentage devrait être compris entre 35 et 50%.
4. Calculer le pourcentage de liaison ($B/B_0 \times 100$) correspondant à chaque standard et à chaque échantillon, en divisant la moyenne des coups corrigés de chacun des standards et de chacun des échantillons par la moyenne corrigée des coups correspondant au maximum de liaison (standard zéro).
5. Tracer la courbe standard en reportant le pourcentage de B/B_0 correspondant à chaque standard en ordonnée, et le logarithme de la concentration de chacun des standards en abscisse (l'utilisation d'un papier log-log permet d'obtenir une courbe presque droite).

6. Construire la courbe standard en joignant les points obtenus.
7. Calculer la concentration en pg/ml de Ghréline humaine des échantillons inconnus et des contrôles par interpolation avec la courbe standard.
8. Lorsque l'on dose des milieux de culture le taux de Ghréline dans le milieu de culture pur doit être soustrait de la concentration obtenue pour chaque échantillon afin d'obtenir le taux réel en Ghréline.
9. Une correction mathématique sera faite pour tenir compte du facteur de dilution dans le cas d'échantillons de sérum ou de plasma.

X. INTERPRÉTATION – CRITÈRES D'ACCEPTATION

1. Il faudra éliminer le dosage si l'un des 2 contrôles est en dehors des 2 déviations standards.
2. Si les CV observés entre les duplicatas d'un même échantillon sont supérieurs à 10%, il faudra redoser l'échantillon.
3. La limite de sensibilité du dosage de la Ghréline totale est égale à 93 pg/ml (pour un échantillon de 100 µl).
4. La limite de linéarité du dosage de la Ghréline est de 6000 pg/ml (pour un échantillon de 100 µl). Tout résultat supérieur à 6000 pg/ml devra être redosé après dilution à l'aide du Tampon de dosage.

XI. CARACTÉRISTIQUES DU DOSAGE

A. Sensibilité

La plus petite quantité de Ghréline totale qui puisse être détectée dans ce dosage est égale à 93 pg/ml quand on utilise un prélèvement de 100 µl.

B. Caractéristiques de la courbe standard

Les paramètres suivants sont indiqués sous forme de moyenne \pm 1 écart type.

$$ED_{80} = 346 \pm 37 \text{ pg/ml}$$

$$ED_{50} = 774 \pm 40 \text{ pg/ml}$$

$$ED_{20} = 1727 \pm 34 \text{ pg/ml}$$

C. Spécificité

La spécificité permet de connaître la capacité du test à mesurer l'analyte de façon sélective en présence d'autres composants présents dans la matrice de l'échantillon.

Ghréline humaine	100%
Ghréline de Rat	100%
Ghréline canine	100%
Ghréline 14-28	100%
DES-Octanoylghréline	100%
Ghréline 1-10	*
Peptide apparenté à la motiline	*
Leptine humaine	*
Insuline humaine	*
Glucagon	*
GLP-1 (7-36)	*

* Indétectable

D. Précision

Variation Inter et Intra - essai :

Echantillon	Moyenne (pg/ml)	Répétabilité %	Reproductibilité %
1	1000	10,0	14,7
2	1500	3,3	17,8
3	2000	7,9	16,0
4	3000	4,4	16,7

4 plasmas humains contenant des concentrations variables en ghréline ont été utilisés pour cette étude. Chaque échantillon a été dosé de manière à générer 5 résultats exploitables (10 réplicats) dans 6 dosages différents. Le % de répétabilité a été calculé à partir de la moyenne d'un seul dosage. Le % de reproductibilité a été calculé à partir de la moyenne des 30 résultats obtenus dans les 6 dosages.

E. Test de surcharge

Echantillon n°	Ghréline humaine ajoutée (pg/ml)	Récupération %
1	500	96
2	1000	90
3	2000	91

On a ajouté à 3 échantillons de plasma humain des quantités variables de Ghréline. Chaque échantillon a été dosé de manière à obtenir 3 résultats exploitables (6 réplicats) dans 3 dosages différents.

F. Test de parallélisme

Effet de la dilution du plasma

Echantillon	Volume d'échantillon	Concentration observée (pg/ml)	Concentration attendue (pg/ml)	Pourcentage de concentration attendue (%)
1	100 µl	2676	2676	100
	75 µl	1988	2644	99
	50 µl	1542	3083	115
	25 µl	748	2991	112
2	100 µl	1457	1457	100
	75 µl	1096	1457	100
	50 µl	814	1629	112
	25 µl	500	1999	137
3	100 µl	1660	1660	100
	75 µl	1330	1769	107
	50 µl	934	1868	113
	25 µl	607	2430	146

Des aliquots de plasma humain contenant des concentrations en Ghréline différentes ont été analysés dans des volumes indiqués ci-dessus. Les facteurs de dilution 1 – 1,33 – 2 et 4, représentant respectivement les volumes 100, 75, 50 et 25 µl ont été utilisés dans le calcul des concentrations observées. La moyenne et le pourcentage de Ghréline attendue provenant de 3 dosages différents sont montrés dans ce tableau.

XIII. CONTROLE DE QUALITE

Les bonnes pratiques de laboratoire recommandent que des contrôles soient inclus dans chaque série de dosages afin d'en vérifier les performances. Deux sérums de contrôles sont inclus dans la trousse dans ce but. Il est nécessaire de doser ces contrôles ainsi que d'autres propres au laboratoire de façon régulière, afin d'établir des valeurs moyennes et des fourchettes de valeurs acceptables. Les valeurs attendues pour les contrôles de la trousse figurent sur une carte incluse dans chaque coffret. La reproductibilité des paramètres de la courbe standard et des valeurs des contrôles doit se situer dans un intervalle de valeurs défini par le laboratoire.

1. Quand les 2 contrôles sont dans la fourchette des ± 2 DS : Dosage OK
2. L'un des contrôles est en dehors de la fourchette :
Vérifier les points suivants :
 - a) Erreur de calcul.
 - b) Duplicates des standards et des contrôles
 - c) Vérification des solutions de réactifs
 - d) Vérification du compteur gamma

XIV. BIBLIOGRAPHIE

1. Morgan, C.R. and Lazarow, A. Immunoassay of Insulin: Two antibody system. Plasma insulin levels in normal, subdiabetic, and diabetic rats. *Diabetes* 12:115-126, 1963.
2. Thorell J.I. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 31:187, 1973.
3. Feldman H. and Rodbard D. « Mathematical Theory of Radioimmunoassay », in W.D. Odell and Doughaday, W.H. (Ed), *Principles of Competitive Protein-Binding Assays*. Philadelphia : J.B : Leppincott Company ; pp 158-203, 1971.
4. Westgard, J.O., et al. A multi-rule Shewart chart for quality control in clinical chemistry. *Clin. Chem.* 27 :493-501, 1981.

Fabriqué par :
Millipore
6 Research Park Drive
St Charles, Missouri
63304 USA

Distribué en France par :
Labodia France
266 avenue Daumesnil
75012 Paris