

**GLUCAGON RIA**  
**250 TUBES (Cat. N° GL-32K)**

## **I. UTILISATION**

La trousse RIA Glucagon de Linco est destinée au dosage du Glucagon dans le sérum, le plasma et les milieux de culture ou les extraits tissulaires. Elle utilise un anticorps hautement spécifique pour le glucagon pancréatique. La réaction croisée avec l'oxyntomoduline, la forme intestinale du glucagon est inférieure à 0,1%. Lorsque le volume de sérum ou de plasma est de 100 µl, on peut aisément mesurer des concentrations de l'ordre de 20 pg/ml.

## **II. PRINCIPE DU DOSAGE**

Dans un dosage radioimmunologique<sup>1</sup>, 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 du Glucagon de LINCO Research utilise du Glucagon marqué à l'iode 125 et un antisérum anti-Glucagon, afin de mesurer le taux de Glucagon dans le sérum, le plasma, les milieux de culture et les extraits tissulaires au moyen d'une technique de dosage par double anticorps/PEG.

## **III. RÉACTIFS FOURNIS**

Chaque trousse contient le matériel suffisant pour effectuer 250 dosages :

### **1. Réactif A – Tampon de dosage Glucagon**

1 flacon contenant 40 ml de tampon glycine 0,2M, pH 8,8 avec de l'EDTA 0,03M, de la BSA à 1% et de l'azide de sodium à 0,08%. Prêt à l'emploi.

### **2. Réactif B - Solution d'antisérum**

1 flacon contenant 26 ml d'antisérum de cochon d'Inde anti-Glucagon dans du tampon de dosage. Prêt à l'emploi.

### **3. Réactif C - <sup>125</sup>I Glucagon**

1 flacon contenant 27 ml après reconstitution d'une solution de Glucagon marquée à l'iode 125, purifiée par HPLC (activité spécifique 603 µCi/µg). Sous forme lyophilisée. Chaque flacon a une activité < 111 kBq (3 µCi).

Préparation : reconstituer en ajoutant tout 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**

1 flacon contenant 27 ml de tampon de dosage contenant de la glycine. Prêt à l'emploi.

### **5. Réactifs E - Standards**

5 flacons contenant chacun 2 ml de Glucagon recombinant purifié dans du tampon de dosage aux concentrations suivantes : 20, 50, 100, 200, 400 pg/ml.

### **6. Réactifs F - Contrôles 1 et 2**

2 flacons contenant chacun 1 ml de Glucagon recombinant purifié dans du tampon de dosage. Prêt à l'emploi.

### **7. Réactif G - Réactif précipitant**

1 flacon contenant 260 ml d'anticorps de chèvre anti-cochon d'Inde en solution dans du tampon phosphate 0,05 M, qui contient du PEG à 3%, du Triton X-100 à 0,05%, de l'EDTA à 0,025 M et de l'azide de sodium à 0,08%. Prêt à l'emploi. A utiliser à 4 °C.

## **IV. CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS**

Stocker tous les réactifs à 2-8°C pour une conservation à court terme. Pour une conservation prolongée (> à 2 semaines), stocker à -20°C. Eviter les congélations/décongelations 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 trousse, 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 d'une 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'azide 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'azide 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'azides métalliques. Eviter toute contamination de la peau et des muqueuses.

## **VI. MATERIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI**

1. Tubes en verre borosilicaté, à usage unique, 12 x 75 mm (il est possible d'utiliser des tubes en polypropylène ou en polystyrène si l'utilisateur estime que le précipité est suffisamment stable)
2. Pipettes de précision et pointes de 100 µl
3. Distributeur automatique : 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. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS**

On utilisera un maximum de 100 µl de sérum ou de plasma par dosage. La plupart du temps, 50µl par tube suffisent. On peut également utiliser des cultures de tissu ou encore d'autres milieux. Il est préférable de prendre des précautions si on utilise l'héparine comme anticoagulant, car sa présence en excès provoque une augmentation des taux<sup>2</sup>. Il est préférable de *ne pas* utiliser plus de 10 UI d'héparine par ml de sang prélevé.

Le Glucagon humain doit être protégé contre la protéolyse pendant le stockage des échantillons et pendant le dosage. Récolter le sang dans des tubes contenant 250 KUI de trasylol (aprotinine) par ml de sang, ce qui correspondra à une concentration finale de 500 KUI par ml de sérum ou de plasma.

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 de -20°C à -70°C. Eviter les congélations/décongélations répétées (> 5 cycles). Eviter d'utiliser des échantillons hémolysés ou lipidiques.

## VIII. DOSAGE

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

### Mise en place du dosage – Jour 1 :

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 B<sub>0</sub> et 100 µl dans tous les autres tubes.
2. Pipeter 100 µl de standard et de contrôles en double (Voir le schéma du dosage).
3. Pipeter 100 µl d'échantillon en double (**Remarque** : on peut utiliser des volumes plus faibles d'échantillon lorsque l'on s'attend à avoir des taux de Glucagon élevés ou lorsque le volume de l'échantillon est limité). 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-Glucagon 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. Pipeter 100 µl de Glucagon marqué à l'iode 125 dans tous les tubes.
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 éponger 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 Glucagon des échantillons en utilisant une procédure de calcul automatique.

## Schéma de dosage du Glucagon

Préparation	Jour 1				Jour 2		Jour 3	
	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	Vortexer et incuber 20 minutes à 4°C. 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 de 20 pg/ml	100 µl		100 µl		1,0 ml	
9,10	100 µl	100 µl de 50 pg/ml	100 µl		100 µl		1,0 ml	
11,12	100 µl	100 µl de 100 pg/ml	100 µl		100 µl		1,0 ml	
13,14	100 µl	100 µl de 200 pg/ml	100 µl		100 µl		1,0 ml	
15,16	100 µl	100 µl de 400 pg/ml	100 µl		100 µl		1,0 ml	
17,18	100 µl	100 µl de C1	100 µl		100 µl		1,0 ml	
19,20	100 µl	100 µl de C2	100 µl		100 µl		1,0 ml	
21,22	100 µl	100 µl d'échantillon	100 µl		100 µl		1,0 ml	

## IX. CALCUL DES RÉSULTATS

### A. Explication

Les calculs des taux de Glucagon 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 commerce. 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 duplicate 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.
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. Reporter le pourcentage de  $B/B_0$  correspondant à chaque standard en ordonnée et le logarithme de la concentration de chacun des standards en abscisse.
6. Construire la courbe standard en joignant les points obtenus.

7. Calculer la concentration en pg/ml de Glucagon des échantillons inconnus et des contrôles par interpolation avec la courbe standard.

**Remarque:** Quand le volume utilisé est différent de 100 µl, une correction mathématique sera faite pour tenir compte du facteur de dilution (ex: si on a utilisé 50 µl, on multipliera les résultats par un facteur 2).

## 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 duplicates d'un même échantillon sont supérieurs à 10%, il faudra redoser l'échantillon.
3. La limite de sensibilité du dosage du Glucagon est égale à 20 pg/ml (pour un échantillon de 100 µl).
4. La limite de linéarité du dosage du Glucagon est de 400 pg/ml (pour un échantillon de 100 µl). Tout résultat supérieur à 400 pg/ml devra être redosé après dilution à l'aide du Tampon de dosage.

## XI. VALEURS ATTENDUES

Valeurs observées chez les individus à jeun :

50 - 150 pg/ml

## XII. CARACTÉRISTIQUES DU DOSAGE

### A. Sensibilité

La plus petite quantité de Glucagon qui puisse être détectée dans ce dosage est égale à 20 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<sub>80</sub> = 42  $\pm$  5 pg/ml

ED<sub>50</sub> = 117  $\pm$  10 pg/ml

ED<sub>20</sub> = 318  $\pm$  37 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.

Glucagon	100%
Oxyntomoduline	<0,1%
Proinsuline humaine	*
Insuline humaine	*
Peptide C humain	*
Somatostatine	*
Polypeptide pancréatique	*

\* Indétectable

## D. Précision

### Variation Inter et Intra - essai :

Echantillon	Moyenne (pg/ml)	Répétabilité %	Reproductibilité %
1	60	6,8	13,5
2	65	4,0	12,7
3	90	4,6	13,4
4	220	4,0	7,3

Les calculs des variations intra et inter essais ont été réalisés sur 4 sérums humains contenant différentes concentrations de Glucagon. Ces sérums ont été dosés de manière à obtenir 4 résultats exploitables dans 6 dosages.

## E. Test de surcharge

Des quantités variables de Glucagon ont été ajoutées à 5 plasmas canins. Les moyennes des duplicats de chaque sérum dosé 5 fois dans 5 dosages distincts ont été reportées dans le tableau ci-dessous.

Echantillon	Glucagon ajouté (pg/ml)	Glucagon mesuré (pg/ml)	Glucagon attendu (pg/ml)	Récupération %
1	0	25	-	-
2	20	44	45	98
3	50	73	75	97
4	100	121	125	97
5	200	215	225	96

## F. Exemple de résultats d'analyse

N° tube	Nom	CPM	CPM moyens	CPM corrigés	B/B <sub>0</sub> %	Résultats en pg/ml
1	Activité totale	17164	17866			
2		17968				
3	LNS	431	404			
4		377				
5	B <sub>0</sub>	7576	7586	7182		
6		7596				
7	Standard 20 pg/ml	6975	6932	6528	90,9	
8		6888				
9	Standard 50 pg/ml	6052	6080	5676	79,0	
10		6107				
11	Standard 100 pg/ml	4657	4581	4177	58,2	
12		4505				
13	Standard 200 pg/ml	2585	2413	2009	28,0	
14		2241				
15	Standard 400 pg/ml	1176	1165	761	10,6	
16		1153				
17	Contrôle1	5434	5344	4940	68,8	72,79
18		5254				
19	Contrôle 2	2180	2085	1681	23,4	233,07
20		1990				
21-n	Echantillon					

Les résultats présentés ici ne sont que des exemples, et ne peuvent en aucun cas être utilisés comme courbe standard.

### **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. 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  $\pm 2$  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 :  
Linco Research Inc.  
6 Research Park Drive  
St Charles, Missouri  
63304 USA

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