

RAT INSULIN RIA
250 TUBES (Cat. N° RI-13K)

I. INTRODUCTION

La trousse Rat Insulin RIA de Millipore est destinée au dosage de l'insuline de rat dans le sérum, le plasma et les milieux de culture. L'antisérum utilisé dans cette trousse a été produit chez des cochons d'Inde immunisés avec de l'insuline de rat hautement purifiée. Ce dosage permet de mesurer des concentrations de l'ordre de 0,1 ng/ml lorsque le volume d'échantillon est de 100 µl et que la première incubation s'étend sur 24 heures à 4 °C. Il est toutefois possible d'obtenir des résultats en 1 jour en incubant 2 heures à température ambiante, ce qui entraîne une légère perte de sensibilité.

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 l'insuline de rat de Millipore utilise de l'insuline marquée à l'iode 125 et un antisérum de cochon d'Inde anti-insuline de rat, afin de mesurer le taux d'insuline 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 traiter 250 tubes :

1. Réactif A – Tampon de dosage

1 flacon de 40 ml contenant du tampon phosphate 0,05M, pH 7,4 avec de l'EDTA à 0,025M, de la BSA à 1% et de l'azoture 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-insuline de rat dans le tampon de dosage. Prêt à l'emploi.

3. Réactif C - ¹²⁵I Insuline

1 flacon contenant 27 ml après reconstitution d'une solution d'insuline marquée à l'iode 125 (activité spécifique 367 µCi/µg). Sous forme lyophilisée. Chaque flacon a une activité < 185 kBq (5µCi).

Préparation : reconstituer en ajoutant 27 ml de 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 de 27 ml contenant du sérum normal de cochon d'Inde comme réactif co-précipitant dans du tampon de dosage. Prêt à l'emploi.

5. Réactifs E - Standards

7 flacons contenant chacun 1 ml d'une solution d'insuline de rat purifiée dans le tampon de dosage aux concentrations suivantes : 0,1 ; 0,2 ; 0,5 ; 1,0 ; 2,0 ; 5,0 et 10,0 ng/ml. Prêts à l'emploi.

6. Réactifs F - Contrôles 1 et 2

2 flacons contenant chacun 1 ml d'insuline de rat purifiée. Prêts 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'azoture de sodium à 0,08%. Prêt à l'emploi, réfrigérer à 4 °C avant utilisation.

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, les standards qui n'ont pas été utilisés doivent être stockés à -20 °C. 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 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 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 : 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, bien que pour la plupart des applications 50 µl par tube suffisent. Pour les milieux de culture, on utilisera des volumes de 50 à 100 µl. Il est préférable de prendre des précautions si on utilise l'héparine comme anticoagulant, car sa présence en excès provoque une augmentation des taux. Il est préférable de ne pas utiliser plus de 10 UI d'héparine par ml de sang prélevé.

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 (> 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.

A- Mise en place du dosage – Jour 1 :

1. Pipeter 200 µl de tampon de dosage dans les tubes 3 et 4 correspondant à la liaison non spécifique (LNS) et 100 µl dans les tubes 5 et 6 correspondant au B₀.
2. Pipeter 100 µl de standards 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 d'insuline 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 tenir compte des facteurs de dilution.
4. Pipeter 100 µl d'insuline marquée à l'iode 125 dans tous les tubes.
5. Ajouter 100 µl d'anticorps anti-insuline dans tous les tubes à l'exception des tubes correspondant à l'activité totale (1 et 2) et à la LNS (3 et 4).
6. Mélanger au vortex, couvrir et laisser incuber pendant 20 à 24 heures à 4°C.

Le jour suivant :

7. 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.
8. Mélanger au vortex et laisser incuber 20 minutes à 4°C.
9. 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

10. 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.

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

Schéma de dosage de l'insuline

Préparation	Jour 1					Jour 2		Étapes 9-11	
	Étape 1	Étapes 2 et 3		Étape 4	Étape 5	Étape 6	Étape 7		Étape 8
Numéroter les tubes	Ajouter Tampon de dosage	Ajouter Standard / Contrôle / Echantillon		Ajouter traceur	Ajouter anticorps		Ajouter réactif précipitant		
1,2	-	-		100 µl	-		-		
3,4	200 µl	-		100 µl	-		1,0 ml		
5,6	100 µl	-		100 µl	100 µl		1,0 ml		
7,8	-	100 µl de 0,1 ng/ml		100 µl	100 µl		1,0 ml		
9,10	-	100 µl de 0,2 ng/ml		100 µl	100 µl		1,0 ml		
11,12	-	100 µl de 0,5 ng/ml		100 µl	100 µl		1,0 ml		
13,14	-	100 µl de 1,0 ng/ml		100 µl	100 µl		1,0 ml		
15,16	-	100 µl de 2,0 ng/ml		100 µl	100 µl		1,0 ml		
17,18	-	100 µl de 5,0 ng/ml		100 µl	100 µl		1,0 ml		
19,20	-	100 µl de 10,0 ng/ml		100 µl	100 µl		1,0 ml		
21,22	-	100 µl de C1		100 µl	100 µl		1,0 ml		
23,24	-	100 µl de C2		100 µl	100 µl		1,0 ml		
25,n	-	100 µl d'échantillon		100 µl	100 µl		1,0 ml		

Vortexer, couvrir, et incuber 20-24 heures à 4°C

Vortexer, couvrir, et incuber 20 min. à 4°C

Centrifuger 20 min. à 4°C, décanter et compter

IX. CALCUL DES RÉSULTATS

A. Explication

Les calculs des taux d'insuline de rat 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 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 l'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 ng/ml d'insuline de rat des échantillons inconnus et des contrôles par interpolation avec la courbe standard.

8. Une correction mathématique sera faite pour tenir compte du facteur de dilution lorsque le volume d'échantillon utilisé est inférieur à 100 µl.

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 de l'insuline de rat est égale à 0,1 ng/ml (pour un échantillon de 100 µl).
4. La limite de linéarité du dosage de l'insuline est de 10 ng/ml (pour un échantillon de 100 µl). Tout résultat supérieur à 10 ng/ml devra être redosé après dilution à l'aide du tampon de dosage.

XI. VALEURS A JEUN

0,5 à 2 ng/ml

XII. CARACTÉRISTIQUES DU DOSAGE

A. Sensibilité

La plus petite quantité d'Insuline de rat qui puisse être détectée dans ce dosage est égale à 0,1 ng/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.

ED₈₀ = 0,2 \pm 0,02 ng/ml

ED₅₀ = 0,8 \pm 0,04 ng/ml

ED₂₀ = 3,0 \pm 0,36 ng/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.

Insuline de rat I	100%
Insuline de rat II	100%
Insuline humaine	100%
Proinsuline humaine	69%
Insuline de porc	100%
Insuline de mouton	100%
Insuline de hamster	100%
Insuline de souris	100%
Peptide C de rat	*
Glucagon	*
Somatostatine	*
Polypeptide pancréatique	*
IGF-1	*
IGF-2 humain	*
* Indétectable	

D. Précision

Echantillon	Moyenne (ng/ml)	Répétabilité %	Reproductibilité %
1	0,5	2,2	8,9
2	0,8	1,4	9,1
3	1,4	4,3	8,5
4	3,2	1,8	9,1
5	3,7	4,6	9,4

5 plasmas de rat contenant des concentrations variables en insuline ont été utilisés pour cette étude. Le % de répétabilité a été calculé à partir de la moyenne de 5 réplicats lors d'un seul dosage. Le % de reproductibilité a été calculé à partir de la moyenne de 25 résultats obtenus dans 5 dosages.

E. Test de surcharge

Echantillon	Insuline ajoutée (ng/ml)	Insuline observée (ng/ml)	Insuline attendue (ng/ml)	Récupération (%)
1	0	0,4	-	-
2	0,5	0,8	0,9	89
3	1	1,3	1,4	93
4	2	2,2	2,4	91
5	5	4,6	5,4	85

Des concentrations croissantes d'insuline de rat ont été ajoutées à un sérum de rat et la concentration finale a été mesurée dans 5 dosages en 5 réplicats.

F. Linéarité

Echantillon	Volume échantillon	Concentration observée (ng/ml)	Concentration attendue (ng/ml)	Pourcentage de concentration attendue (%)
1	100µl	1,0	1,0	100
	75 µl	1,0		100
	50µl	1,0		100
	25µl	0,8		80
2	100µl	2,1	2,1	100
	75 µl	2,1		100
	50µl	2,0		95
	25µl	1,7		81
3	100µl	2,9	2,9	100
	75 µl	2,9		100
	50µl	2,9		100
	25µl	2,7		93
4	100µl	4,8	4,8	100
	75 µl	4,7		98
	50µl	4,7		98
	25µl	4,5		94

Des aliquots de plasma de rat contenant des concentrations en insuline différentes ont été analysés dans les 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.

G. Exemple de résultats d'analyse

N° tube	Nom	CPM	CPM moyens	CPM corrigés	B/B ₀ %	Résultats en ng/ml
1	Activité totale	22694	22873			
2		23052				
3	LNS	748	738			
4		728				
5	B ₀	12080	12058	11320		
6		12036				
7	Standard 0,1 ng/ml	10709	11009	10271	90,7	
8		11309				
9	Standard 0,2 ng/ml	9781	9891	9153	80,9	
10		10001				
11	Standard 0,5 ng/ml	7169	7239	6501	57,4	
12		7309				
13	Standard 1,0 ng/ml	5099	5071	4333	38,3	
14		5043				
15	Standard 2,0 ng/ml	3376	3434	2696	23,8	
16		3492				
17	Standard 5,0 ng/ml	2004	2079	1341	11,9	
18		2154				
19	Standard 10,0 ng/ml	1499	1498	760	6,7	
20		1497				
21	Contrôle1	7633	7631	6893	60,9	0,44
22		7629				
23	Contrôle 2	3903	3880	3142	27,8	1,69
24		3857				
25-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. 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. Thorell J.I. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 31:187, 1973.
2. 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.
3. Westgard, J.O., et al. A multi-rule Shewart chart for quality control in clinical chemistry. *Clin. Chem.* 27 :493-501, 1981.
4. 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.

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

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