

RAT LEPTIN RIA
250 TUBES (Cat. N° RL-83K)

I. UTILISATION

La trousse RIA Leptine de rat de Millipore est destinée au dosage de la leptine de rat dans le sérum, le plasma ou les milieux de culture. C'est un dosage entièrement homologue dans la mesure où l'anticorps a été développé contre de la leptine de rat hautement purifiée et que le traceur et les standards sont préparés avec de la leptine de rat. ***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 leptine de rat de Millipore utilise de la leptine de rat marquée à l'iode 125 et un antisérum anti-leptine de rat, afin de mesurer le taux de leptine dans le sérum, le plasma, 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 contenant 40 ml de tampon phosphate 0,05M, pH 7,4 avec de l'EDTA 0,025M, de la BSA à 1%, du triton X-100 à 0,05% 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-leptine de rat dans du tampon de dosage. Prêt à l'emploi.

3. Réactif C - ¹²⁵I Leptine de rat

1 flacon contenant 27 ml après reconstitution d'une solution de leptine de rat marquée à l'iode 125, purifiée par HPLC (activité spécifique 135 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 avec du sérum normal de cochon d'Inde. Prêt à

l'emploi.

5. Réactifs E - Standards

7 flacons contenant chacun 1 ml de leptine de rat recombinante purifiée dans du tampon de dosage aux concentrations suivantes : 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 ; 20 et 50 ng/ml.

6. Réactifs F - Contrôles 1 et 2

2 flacons contenant chacun 1 ml de leptine de rat recombinante purifiée dans du tampon de dosage. 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, à utiliser 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. 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 trouses, 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 NÉCESSAIRE 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. 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 milieux de culture 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. 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.

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), 200 µl dans les tubes 5 et 6 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 en double (**Remarque** : on peut utiliser des volumes plus faibles d'échantillon lorsque l'on s'attend à avoir des taux de leptine 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-leptine de rat 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 température ambiante.

Jour 2 :

6. Pipeter 100 µl de leptine de rat marquée à l'iode 125 dans tous les tubes.

7. Mélanger au vortex, couvrir et laisser incuber pendant 22 à 24 heures à température ambiante.

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. Décantier 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 leptine de rat des échantillons en utilisant une procédure de calcul automatique.

Schéma de dosage de la leptine

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 température ambiante	Ajouter traceur	Vortexer, couvrir, et incuber 22-24 heures à température ambiante		Incuber 20 min. à 4°C et centrifuger 20 min. à 4°C, décanter et compter
1,2	-	-	-		-		-	
3,4	300 µl	-	-		-		1,0 ml	
5,6	200 µl	-	100 µl		100 µl		1,0 ml	
7,8	100 µl	100 µl de 0,5 ng/ml	100 µl		100 µl		1,0 ml	
9,10	100 µl	100 µl de 1 ng/ml	100 µl		100 µl		1,0 ml	
11,12	100 µl	100 µl de 2 ng/ml	100 µl		100 µl		1,0 ml	
13,14	100 µl	100 µl de 5 ng/ml	100 µl		100 µl		1,0 ml	
15,16	100 µl	100 µl de 10 ng/ml	100 µl		100 µl		1,0 ml	
17,18	100 µl	100 µl de 20 ng/ml	100 µl		100 µl		1,0 ml	
19,20	100 µl	100 µl de 50 ng/ml	100 µl		100 µl		1,0 ml	
21,22	100 µl	100 µl de C1	100 µl		100 µl		1,0 ml	
23,24	100 µl	100 µl de C2	100 µl		100 µl		1,0 ml	
25,n	100 µl	100 µl d'échantillon	100 µl	100 µl	1,0 ml			

IX. CALCUL DES RÉSULTATS

A. Explication

Les calculs des taux de leptine 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 les 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 ng/ml de leptine de rat des échantillons inconnus et des contrôles par interpolation avec la courbe standard.

Remarque : Quand le volume utilisé est différent de 100 μ l, une correction mathématique sera faite pour tenir compte du facteur de dilution (ex : si on a utilisé 50 μ l, 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 de la leptine est égale à 0,5 ng/ml (pour un échantillon de 100 μ l).
4. La limite de linéarité du dosage de la leptine est de 50 ng/ml (pour un échantillon de 100 μ l). Tout résultat supérieur à 50 ng/ml devra être redosé après dilution à l'aide du Tampon de dosage.

XI. CARACTÉRISTIQUES DU DOSAGE

A. Sensibilité

La plus petite quantité de leptine qui puisse être détectée dans ce dosage est égale à 0,5 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 = 1,0 \pm 0,1 ng/ml

ED₅₀ = 3,1 \pm 0,2 ng/ml

ED₂₀ = 9,9 \pm 1,0 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.

Leptine de rat	100%
Leptine de souris	100%
Leptine humaine	<2%
Leptine canine	0,5%
Glucagon	*
SRIF	*
Insuline	*

* Indétectable

D. Précision

Echantillon	Moyenne (ng/ml)	Répétabilité %	Reproductibilité %
1	1,6	2,4	4,8
2	3,3	4,1	3,0
3	6,8	2,0	5,7
4	11,6	4,6	5,7

4 plasmas de rat contenant des concentrations variables en leptine 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	Leptine ajoutée (ng/ml)	Leptine observée (ng/ml)	Leptine attendue (ng/ml)	Récupération (%)
1	0	1,6	-	-
2	2	3,3	3,6	92
3	5	6,8	6,6	103
4	10	11,6	11,6	100

Des concentrations croissantes de leptine 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	17,4	17,4	100
	75 µl	16,7		96
	50µl	15,3		88
	25µl	13,5		78
2	100µl	14,7	14,7	100
	75 µl	13,7		93
	50µl	12,7		86
	25µl	11,5		78
3	100µl	12,0	12,0	100
	75 µl	11,4		95
	50µl	10,7		89
	25µl	9,9		83
4	100µl	9,3	9,3	100
	75 µl	8,6		92
	50µl	8,2		88
	25µl	7,9		85

Des aliquots de plasma de rat contenant des concentrations en leptine 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	13495	13409			
2		13323				
3	LNS	411	431			
4		450				
5	B ₀	5997	5932	5501		
6		5866				
7	Standard 0,5 ng/ml	5673	5607	5176	94,1	
8		5540				
9	Standard 1 ng/ml	5032	4962	4531	82,4	
10		4891				
11	Standard 2 ng/ml	4206	4138	3707	67,4	
12		4070				
13	Standard 5 ng/ml	2489	2447	2016	36,7	
14		2405				
15	Standard 10 ng/ml	1610	1601	1170	21,3	
16		1592				
17	Standard 20 ng/ml	1134	1118	687	12,5	
18		1101				
19	Standard 50 ng/ml	844	844	413	7,5	
20		843				
21	Contrôle1	4185	4134	3703	67,3	1,85
22		4082				
23	Contrôle 2	2103	2100	1669	30,3	7,0
24		2096				
25,n	Echantillon					

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

XII. 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 ± 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

XIII. BIBLIOGRAPHIE

1. Ahren, B., et. al. Regulation of plasma leptin in mice: Influence of age, high-fat diet, and fasting. *Am. J. Physiol.* 273:R113-R120, 1997.
2. Ma, Zhongmin, et. al. Radioimmunoassay of leptin in human plasma. *Clinical Chemistry.* 42:942-946, June, 1996.
3. Maffei, M., et. al. Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Med.* Vol. 1, 11:1155-1161, 1995.
4. Pelleymounter, M.A., et. al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science.* 269:540-543, 1995.
5. Westgard, J.O., et. al. A multi-rule Shewhart 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