

Proinsuline humaine RIA
250 TUBES (Cat. N° HPI-15K)

I. UTILISATION

La trousse RIA Proinsuline de Linco est destinée au dosage de la proinsuline dans le sérum, le plasma et les milieux de culture. Ce dosage ne présente aucune réaction croisée ni avec l'insuline humaine (<0,1%), ni avec le C-peptide humain (<0,1%). Il est complètement homologue puisque l'anticorps est dirigé contre la proinsuline humaine purifiée et que les standards et le traceur sont préparés avec de la proinsuline humaine. ***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 soit 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 proinsuline de LINCO Research utilise de la proinsuline marquée à l'iode 125 et un antisérum anti-proinsuline humaine, afin de mesurer le taux de proinsuline humaine 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 effectuer 250 dosages :

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% 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 mouton anti-proinsuline humaine dans du tampon de dosage. Prêt à l'emploi.

3. Réactif C - ¹²⁵I Proinsuline humaine

1 flacon contenant 27 ml après reconstitution d'une solution de proinsuline marquée à l'iode 125, purifiée par HPLC (activité spécifique 229 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 mouton. Prêt à l'emploi.

5. Réactifs E - Standards

6 flacons contenant chacun 2 ml de proinsuline humaine recombinante purifiée dans du tampon de dosage aux concentrations suivantes : 2, 5, 10, 20, 50, 100 pmol/ml.

6. Réactif F – Matrice sérique

1 flacon de 6 ml de solution permettant de corriger les effets de matrice pour le dosage des échantillons de sérum ou de plasma.

7. Réactifs G - Contrôles 1 et 2

2 flacons contenant chacun 1 ml de proinsuline humaine recombinante purifiée dans du tampon de dosage. Prêt à l'emploi.

8. Réactif H - Réactif précipitant

1 flacon contenant 260 ml d'anticorps d'âne anti-mouton en tampon phosphate 0,05M contenant 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 STABILITÉ DES RÉACTIFS

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 / 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. PRÉCAUTIONS 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 scellée.
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 100 µl et 200 µl et pointes
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 200 µl de sérum ou de plasma par dosage. Il est possible d'utiliser des volumes inférieurs lorsque les taux de proinsuline attendus sont très élevés ou lorsque le volume d'échantillon disponible est limité. Dans ce cas, il faudra ajouter du tampon de dosage pour compenser la différence et faire en sorte que le volume final par tube soit de 200 µl (exemple : si le volume de sérum est de 100 µl, ajouter 100 µl de tampon) – voir également la note à la section IX Calcul des résultats. 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 400 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 à partir du **tube 23 (pas de tampon dans les tubes 7 à 22)**.
2. Pipeter 200 µl de standards et de contrôles en double (Voir le schéma du dosage).
3. Pipeter 200 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 proinsuline 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 100 µl d'échantillon, on ajoutera 100 µl de tampon de dosage). Se reporter à la section calcul des résultats pour modifier celui-ci.
4. Ajouter 100 µl de matrice sérique dans les tubes 5 à 22.
5. Ajouter 100 µl d'anticorps anti-proinsuline humaine 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 48 heures à température ambiante.

Jour 3 :

7. Pipeter 100 µl de proinsuline humaine marquée à l'iode 125 dans tous les tubes.
8. Mélanger au vortex, couvrir et laisser incuber pendant 22 heures à température ambiante.

Jour 4 :

9. 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.
10. Mélanger au vortex et laisser incuber 20 minutes à 4 °C.
11. Centrifuger à 4 °C tous les tubes, à l'exception de ceux qui correspondent à l'activité totale pendant 25 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

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

Schéma de dosage de la proinsuline

Préparation	Jour 1					Jour 3		Jour 4	
	Étape 1	Étapes 2 et 3	Étape 4	Étape 5	Étape 6	Étape 7	Étape 8	Étape 9	Étapes 10-13
Numéroter les tubes	Ajouter Tampon de dosage	Ajouter Standard/ Contrôle/ Echantillon	Ajouter matrice sérique	Ajouter anticorps	Vortexer, couvrir, et incuber 48 heures à température ambiante.	Ajouter traceur	Vortexer, couvrir, et incuber 22 heures à température ambiante.	Ajouter réactif précipitant	Vortexer et incuber 25 minutes à 4°C. Centrifuger 20 min. à 4°C, décanter et compter
1,2	-	-	-	-		100 µl		-	
3,4	400 µl	-	-	-		100 µl		1,0 ml	
5,6	200 µl	-	100 µl	100 µl		100 µl		1,0 ml	
7,8	-	200 µl de 2 pM	100 µl	100 µl		100 µl		1,0 ml	
9,10	-	200 µl de 5 pM	100 µl	100 µl		100 µl		1,0 ml	
11,12	-	200 µl de 10 pM/	100 µl	100 µl		100 µl		1,0 ml	
13,14	-	200 µl de 20 pM	100 µl	100 µl		100 µl		1,0 ml	
15,16	-	200 µl de 50 pM	100 µl	100 µl		100 µl		1,0 ml	
17,18	-	200 µl de 100 pM	100 µl	100 µl		100 µl		1,0 ml	
19,20	-	200 µl de C1	100 µl	100 µl		100 µl		1,0 ml	
21,22	-	200 µl de C2	100 µl	100 µl		100 µl		1,0 ml	
23, n	100 µl	200 µl d'échantillon	-	100 µl	100 µl	1,0 ml			

IX. CALCUL DES RÉSULTATS

A. Explication

Les calculs des taux de proinsuline 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 algorithme 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

- 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.
- 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.
- 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%.
- 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).
- 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 pM de proinsuline des échantillons inconnus et des contrôles par interpolation avec la courbe standard.

Remarque: Quand le volume utilisé est différent de 200 µl, une correction mathématique sera faite pour tenir compte du facteur de dilution (ex: si on a utilisé 100 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 écarts-type.
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 proinsuline est égale à 2 pM (pour un échantillon de 200µl).
4. La limite de linéarité du dosage de la proinsuline est de 100 pM (pour un échantillon de 200 µl). Tout résultat supérieur à 100 pM devra être redosé après dilution à l'aide du Tampon de dosage.

XI. VALEURS ATTENDUES

Valeurs observées chez les individus à jeun :

7,9 +/- 1,5 pM

Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs normales.

XII. CARACTÉRISTIQUES DU DOSAGE

A. Sensibilité

La plus petite quantité de proinsuline qui puisse être détectée dans ce dosage est égale à 2 pM quand on utilise un prélèvement de 200 µl.

B. Caractéristiques de la courbe standard

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

ED₈₀ = 10 \pm 1 pM

ED₅₀ = 23 \pm 2 pM

ED₂₀ = 52 \pm 3 pM

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.

Proinsuline humaine	100%
Des 31, 32 HPI	95%
Des 64, 65 HPI	<0,1%*
Insuline humaine	<0,1%*
Peptide C humain	<0,1%*

Proinsuline bovine	*
Proinsuline porcine	*
Glucagon	*
IGF-I humain	*
IGF-II humain	*
Somatostatine	*
Polypeptide pancréatique	*

* Indéetectable

D. Précision

Variation Inter et Intra - essai :

Echantillon	Moyenne (pM)	Répétabilité %	Reproductibilité %
1	4,7	6,9	7,7
2	7,5	5,0	10,1
3	17,8	2,0	5,0
4	40,8	1,5	1,5

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

E. Test de surcharge

Des quantités variables de Proinsuline ont été ajoutées à 4 échantillons de sérum humain. Les moyennes des duplicats de chaque sérum dosé 4 fois dans 4 dosages distincts ont été reportées dans le tableau ci-dessous.

Echantillon	Proinsuline ajoutée (pM)	Proinsuline mesurée (pM)	Proinsuline attendue (pM)	Récupération %
1	0	4,0	-	-
2	5	8,3	9,0	92
3	12,8	73	14,0	91
4	20	22,3	24,0	93

F. Linéarité

Effet de la dilution du sérum

Différents volumes de sérums humains contenant des concentrations variables en proinsuline ont été analysés. Les facteurs de dilution 1 ; 1,33 et 2 choisis représentent respectivement les volumes 200µl, 150µl et 100µl. Les moyennes et les pourcentages attendus de chaque sérum dosés dans 4 dosages distincts sont reportés dans le tableau ci-dessous.

Echantillon	Volume	Proinsuline mesurée (pM)	Proinsuline attendue (pM)	%
1	200 µl	40,8	40,8	100
	150 µl	43,2		106
	100 µl	44,9		110
2	200 µl	17,8	17,8	100
	150 µl	19,3		108
	100 µl	21,3		120
3	200 µl	14,3	14,3	100
	150 µl	15,5		108
	100 µl	16,2		113
4	200 µl	12,6	12,6	100
	150 µl	13,0		103
	100 µl	14,4		114

F. Exemple de résultats d'analyse

N° tube	Nom	CPM	CPM moyens	CPM corrigés	B/B ₀ %	Résultats en pM
1	Activité totale	16329	16232			
2		16134				
3	LNS	585	570			
4		555				
5	B ₀	6963	7030	6460		
6		7096				
7	Standard 2 pM	6797	6711	6141	95,1	
8		6625				
9	Standard 5 pM	6114	6255	5685	88,0	
10		6395				
11	Standard 10 pM	5624	5599	5029	77,9	
12		5574				
13	Standard 20 pM	4050	4101	3531	54,7	
14		4152				
15	Standard 50 pM	1895	1889	1319	20,4	
16		1883				
17	Standard 100 pM	1219	1182	612	9,5	
18		1144				
19	Contrôle 1	5795	5851	5281	81,7	8,16
20		5906				
21	Contrôle2	2905	2918	2348	36,3	31,6
22		2931				

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 ± 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. 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. Lippincott Company; pp 158-203, 1971

2. Thorell J.I. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 31:187, 1973.

3. 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