

Retinol-bindendes Protein (RBP) / RBP4 ELISA Kit

*Zur in-vitro-Bestimmung des RBP/RBP4 in Plasma, Serum
und Urin*

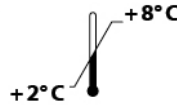
Retinol-binding protein (RBP) / RBP4 ELISA Kit

*For the in vitro determination des RBP/RBP4 in plasma,
serum and urine*

Gültig ab / Valid from 01.11.2013



K 6110



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D-64625 Bensheim

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	2
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	3
6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG	4
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	6
9. EINSCHRÄNKUNGEN	7
10. QUALITÄTSKONTROLLE	7
<i>Normwerte</i>	8
11. TESTCHARAKTERISTIKA	8
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	8
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	9
<i>Analytische Sensitivität</i>	9
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	9
13. TECHNISCHE MERKMALE	10
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	10
15. LITERATUR	10

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von freiem **Retinol-bindendem Protein (RBP)/RBP4** bzw. von **RBP4 im Komplex mit Transthyretin** in Serum, Plasma und Urin geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Retinol-bindendem Protein (RBP)/RBP4 ist für den Transport von Vitamin A in der Zirkulation verantwortlich. Mit einem Molekulargewicht von 21 kD ist RBP/RBP4 ein kleines Protein, das in komplexierter Form mit Präalbumin vorliegt. Das freie RBP/RBP4-Molekül wird – ähnlich wie andere kleine Moleküle (z. B. β -2 Microglobulin) – im Glomerulus schnell aus dem Plasma herausfiltriert und anschließend in den tubulären Zellen resorbiert und abgebaut. Bei Nierenerkrankungen mit vorherrschenden tubulären Störungen kann RBP/RBP4 nicht mehr resorbiert werden und ist im Urin nachweisbar.

Eine aktuelle Publikation von Yang et al. (2005) beschreibt eine neue Funktion des RBP/RBP4, nämlich die Beeinflussung der Glukosehomöostase sowie der Insulinsensitivität bzw. -resistenz. Die Autoren beobachteten, dass eine Erhöhung der Serum-RBP/RBP4-Spiegel eine systemische Insulinresistenz auslöst, während eine Absenkung von RBP/RBP4 im Serum die Aktivität von Insulin steigert.

Aufgrund der Ergebnisse postulieren die Autoren, dass RBP/RBP4 die Insulinsensitivität z.T. durch Insulin-Signalling im Muskel beeinflusst, z.B. durch Veränderung der Tyrosin-Phosphorylierung des Insulinrezeptor-Substrates-1 (IRS-1) bzw. der Aktivität der IRS-1-assoziierten PI(3)K. RBP/RBP4 könnte an der Pathogenese des Typ-2-Diabetes beteiligt sein, und die Absenkung der RBP/RBP4 Konzentrationen könnte eine neue Strategie in der Behandlung des Typ-2-Diabetes darstellen.

Indikationen

- Früherkennung einer tubulären Proteinurie
- Chronische Leberschädigungen
- Cadmium Vergiftungen
- Untersuchungen zur Insulinresistenz

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6110MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6110WP	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6110K	CONJ	Konjugat, (Kaninchen anti RBP/RBP4, Peroxidase-markiert)	200 µl
K 6110PV	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	100 ml
K 6110ST	STD	Standards, lyophilisiert (0; 1,1; 3,3; 11; 33 µg/l)	2 x 5 vials
K 6110KO1	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	2 vials
K 6110KO2	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	2 vials
K 6110TMB	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml
K 6110AC	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig	15 ml

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 5–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.

- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz an-zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10 in Reinst-wasser** verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml Reinstwasser), gut mi-schen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** (Waschpuffer) ist bei **2-8°C einen Monat** in einem geschlos-senen Gefäß haltbar.
- Als **BLANK** (Leerwert) werden **100 µl** des vorbereiteten und 1:10 verdünnten Waschpuffers pipettiert.
- **Der lyophilisierten STD** (Standards) und die **CTRL** (Kontrollen) sind bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Standards und die Kontrollen werden mit **500 µl Reinstwasser** rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Stan-dards können 14 Tage bei 2-8°C gelagert werden.**
- Das **Konjugat** (CONJ) wird unmittelbar vor Gebrauch **1:101 in Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Unverdünntes Konjugat ist bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konju-gat ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8°C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

Serum und Plasma

Serum- oder Plasmaproben sind bei 2-8°C mindestens 2 Wochen stabil, bei längerer Lagerung müssen sie tiefgefroren werden.

Vor Gebrauch die Probe **1:5000 in SAMPLEBUF** (Probenverdünnungspuffer) ver-dünnen, z. B.

Verdünnung I:

20 µl Probe + 980 µl SAMPLEBUF = 1:50

Verdünnung II:

10 µl Verdünnung I + 990 µl SAMPLEBUF = 1:100

Um Ungenauigkeiten beim Pipettieren der kleinen Volumina zu vermeiden, empfehlen wir folgende Verdünnungsschritte:

Verdünnung I:

20 µl Probe + 980 µl SAMPLEBUF = 1:50

Verdünnung II:

50 µl Verdünnung I + 450 µl SAMPLEBUF = 1:10

Verdünnung III:

50 µl Verdünnung II + 450 µl SAMPLEBUF = 1:10

Urin

Urinproben mit 1N NaOH auf pH-Wert zwischen 6 und 8 einstellen. Die Proben sind bei 2–8 °C zwei Wochen stabil. Längere Lagerung der Proben bei mindestens -20 °C.

Vor Gebrauch **1:10 in SAMPLEBUF** (Probenverdünnungspuffer) verdünnen, z. B.

100 µl Urin + 900 µl SAMPLEBUF

Urinproben mit einem **RBP/RBP4-Gehalt > 330 µg/l 1:100 verdünnen**, z. B.

10 µl + 990 µl SAMPLEBUF.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung des Retinol-bindenden Proteins (RBP)/RBP4 in Plasma, Serum und Urin.

In diesem ELISA wird RBP/RBP4 aus den Proben an polyklonale, auf Mikrotiterplatten fixierte Antikörper (Kaninchen-anti-RBP/RBP4) gebunden. Gebundenes RBP/RBP4 wird dann mit Hilfe von Peroxidase-markierten anti-RBP/RBP4-Antikörpern detektiert. Die Menge der gebundenen Peroxidase-markierten anti-RBP/RBP4-Antikörper ist direkt proportional dem RBP/RBP4-Gehalt. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem RBP/RBP4-Gehalt direkt proportional. Parallel dazu wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

Pipettierschema

Die vorbeschichtete **PLATE** (Mikrotiterplatte) **vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen** und nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen. Die Bestimmungen in der Mikrotiterplatte sind in Doppelwerten durchzuführen.

1.	100 µl STD (Standards), CTRL (Kontrollen) und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren..
2.	1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln inkubieren.
3.	Den Inhalt der Platte verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
4.	100 µl verdünntes CONJ (Konjugat, POD-Antikörper) pro Vertiefung pipettieren.
5.	1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
6.	Den Inhalt der Platte verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
7.	100 µl SUB (TMB-Substrat) pro Vertiefung pipettieren.
8.	10–20 Minuten (entsprechend der Farbdifferenzierung*) bei Raumtemperatur inkubieren.
9.	100 µl STOP (Stopplösung) pro Vertiefung pipettieren.
10.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gelesen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

* Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen den Farbschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion:

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0,001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Serum und Plasma

Die ermittelte Konzentration wird mit dem Verdünnungsfaktor **5000** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu erhalten.

Urin

Die ermittelte Konzentration wird mit dem **verwendeten Verdünnungsfaktor** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu erhalten.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben, deren OD höher ist als die des höchsten Standards, sollten stärker verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Normwerte

Plasma oder Serum

Erwachsene 20–75 mg/l

Neugeborene 11–34 mg/l

Im Alter von 6 Monaten 18–50 mg/l

Urin: 0,01–0,54 mg/l

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben innerhalb einer Messserie wurde geprüft. Zwei Normalproben wurden 16-mal in einem RBP/RBP4-ELISA von einer Person angesetzt.

Intra-Assay VK n= 16

Probe	RBP/RBP4 Mittelwert [µg/l]	Intra-Assay Vk [%]
1	24,1	5
2	11,1	5

Inter-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben an unterschiedlichen Tagen wurde geprüft. Zwei Normalproben wurden an verschiedenen Tagen und von verschiedenen Personen im RBP/RBP4-ELISA gemessen.

Inter-Assay VK n= 25

Probe	RBP/RBP4 Mittelwert [µg/l]	Inter-Assay Vk [%]
1	4,4	9,8
2	6,9	9,7

Wiederfindung in der Verdünnung

n= 1

Eine Patientenprobe wurde verdünnt und im RBP/RBP4-ELISA gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt.

Probe	Verdünnung	erwartet [µg/l]	gemessen [µg/l]
A	1:7000	4,8	4,8
	1:14000	2,8	2,4
	1:28000	1,2	1,2
	1:56000	0,6	0,8

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von $0,9 \mu\text{g/l}$.

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden, da schon geöffnete Mikrotiterplatten anderen Bedingungen unterliegen als verschlossene.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigegefügtten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurück zu senden.

15. LITERATUR

1. Graham, T. E., Wason, C. J., Blüher, M. & Kahn, B. B. Shortcomings in methodology complicate measurements of serum retinol binding protein (RBP4) in insulin-resistant human subjects. *Diabetologia* **50**, 814–23 (2007).

2. Graham, T. E. et al. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N. Engl. J. Med.* **354**, 2552–63 (2006).
3. Yang, Q. et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* **436**, 356–62 (2005).
4. Blumsohn, A., Morris, B. W., Griffiths, H. & Ramsey, C. F. Stability of β 2-microglobulin and retinol binding protein at different values of pH and temperature in normal and pathological urine. *Clin. Chim. Acta* **195**, 133–137 (1991).
5. Bernard, A. M., Moreau, D. & Lauwerys, R. Comparison of retinol-binding protein and β 2-microglobulin determination in urine for the early detection of tubular proteinuria. *Clin. Chim. Acta* **126**, 1–7 (1982).

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Manual

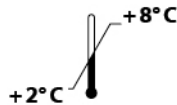
Retinol-binding protein (RBP) / RBP4 ELISA Kit

*For the in vitro determination des RBP/RBP4 in plasma, serum
and urine*

Valid from 01.11.2013



K 6110



Immundiagnostik AG

Table of Contents

1. INTENDED USE	14
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	14
3. MATERIAL SUPPLIED	14
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	15
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	15
6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	16
7. ASSAY PROCEDURE	17
<i>Principle of the test</i>	17
<i>Test procedure</i>	17
8. RESULTS	18
9. LIMITATIONS	19
10. QUALITY CONTROL	19
<i>Normal range</i>	19
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	19
<i>Precision and reproducibility</i>	19
<i>Dilution recovery</i>	20
<i>Analytical Sensitivity</i>	20
12. PRECAUTIONS	21
13. TECHNICAL HINTS	21
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	21
15. REFERENCES	22

1. INTENDED USE

The Immundiagnostik Assay is intended for the quantitative determination of **free Retinol-binding protein (RBP)/RBP4** as well as **RBP4 complexed with transthyretin** in plasma, serum and urine. For *in vitro* diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Retinol-binding protein (RBP)/RBP4 is a small (21 kD) transport protein for vitamin A which forms a complex with prealbumin in blood but loses its affinity for prealbumin once the vitamin has been delivered to the target cells. The free RBP/RBP4 molecule is rapidly filtered at the glomerulus and catabolized in the renal tubules after resorption by the proximal tubular cells (like other small molecules, e.g. β -2 microglobulin). In kidney disease with prevailing tubular changes, these proteins are not reabsorbed and appear in the urine.

As published by Yang et al. (2005), the retinol-binding protein (**RBP)/RBP4** seems to play a key role in the development of insulin resistance. The fat cell derived peptide RBP/RBP4 also modulates the glucose homeostasis and impairs the insulin sensitivity as well as insulin resistance. The elevation of serum RBP/RBP4 causes systemic insulin resistance, whereas its reduction improves the insulin action.

As a conclusion from the results, the authors suggest that **RBP/RBP4** alters insulin sensitivity in part by affecting insulin signalling in muscle through alterations in the amount of tyrosine-phosphorylated IRS-1 and PI(3)K activation. Thus, RBP/RBP4 may contribute to the pathogenesis of type 2 diabetes, and lowering RBP/RBP4 could be a new strategy for treating type 2 diabetes.

Indications

- Early detection of tubular proteinuria
- Chronic liver diseases
- Cadmium poisoning
- Studies of insulin resistance

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6110MTP	PLATE	Holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 6110WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 6110PV	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready to use	100 ml

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6110K	CONJ	Conjugate (rabbit anti RBP/RBP4, peroxidase-labeled)	200 µl
K 6110ST	STD	Standards, lyophilized (0; 1.1; 3.3; 11; 33 µg/l)	2 x 5 vials
K 6110KO1	CTRL	Control, lyophilized	2 vials
K 6110KO2	CTRL	Control, lyophilized	2 vials
K 6110TMB	SUB	TMB substrate (tetramethylbenzidine), ready to use	15 ml
K 6110AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	15 ml

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Calibrated precision pipettors and 5–1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 g
- Vortex
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted **1:10 in ultra pure water** before use (100 ml concentrate + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock so-

lutions. The crystals must be redissolved at room temperature or 37°C before dilution of the buffer solutions. The **buffer concentrate** is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Diluted buffer solution** (wash buffer) can be stored in a closed flask at **2–8°C for one month**.

- The **lyophilized standards** (STD) and **controls** (CTRL) are stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. Before use, the **STD** (standards) and **CTRL** (controls) must be reconstituted with **500 µl of ultra pure water**. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to ensure complete reconstitution. **Reconstituted standards and controls can be stored at 2–8°C for two weeks**.
- The **conjugate** (CONJ) must be diluted **1:101 in wash buffer** (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The undiluted conjugate is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Diluted conjugate is not stable and cannot be stored**.
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8°C**.

6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Plasma and serum

Samples can be stored for two weeks at 4°C. For longer storage, freeze at or below -20°C.

Dilute samples **1:5000 in SAMPLEBUF** (sample dilution buffer) before use.

Dilution I:

20 µl sample + 980 µl SAMPLEBUF = 1:50

Dilution II:

10 µl dilution I + 990 µl SAMPLEBUF = 1:100

To avoid some potential for error in RBP/RBP4 estimation due to small volumes, we recommend the following dilution steps:

Dilution I:

20 µl sample + 980 µl SAMPLEBUF = 1:50

Dilution II:

50 µl dilution I + 450 µl SAMPLEBUF = 1:10

Dilution III:

50 µl dilution II + 450 µl SAMPLEBUF = 1:10

Urine

Adjust the urine to pH between 6 and 8 with 1 N NaOH. Samples are stable at 2–8 °C for 2 weeks. For longer storage, freeze at or below -20 °C.

Before use, dilute urine **1:10 in SAMPLEBUF** (sample dilution buffer), e.g.

100 µl urine + 900 µl SAMPLEBUF

Urine with a **RBP4 concentration > 330 µg/l must be diluted 1:100**, e.g.

10 µl urine + 990 µl SAMPLEBUF

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA can be used for quantitative determination of retinol-binding protein (RBP)/RBP4 in plasma, serum and urine. In a first incubation step, RBP/RBP4 in the samples is bound to polyclonal rabbit anti RBP/RBP4 antibodies, immobilized on the microtitre plate. A peroxidase-conjugated anti RBP/RBP4 antibody is used for detection and quantification, and tetramethylbenzidine (TMB) as a peroxidase substrate. A dose response curve of absorbance unit (optical density at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from standard. RBP/RBP4 present in the patient samples is determined directly from this curve.

Test procedure

Wash the pre-coated PLATE (microtiter plate) **5 x with 250 µl ELISA wash buffer before use**. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be tapped on absorbent paper.

Carry out the tests in duplicate.

1.	Add 100 µl of STD (standard), CTRL (controls) and prediluted patient samples into the wells.
2.	Incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) shaking on a horizontal mixer.
3.	Decant the content of the plate and wash the wells 5 x with 250 µl of washing buffer.
4.	Add 100 µl of diluted CONJ (conjugate) into each well.
5.	Incubate for 1 hour at room temperature, shaking on a horizontal mixer.

6.	Decant the content of the plate and wash the wells 5 x with 250 µl of washing buffer.
7.	Add 100 µl of SUB (TMB substrate solution).
8.	Incubate for 10–20 minutes at room temperature, shaking slightly until color differences are sufficient*.
9.	Add 100 µl of STOP (stop solution) and mix shortly.
10.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.

* The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend observing the color change and stopping the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the “4 parameter algorithm”.

1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

2. Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the paired values should be evaluated manually.

Serum or Plasma

Multiply the result **by the dilution factor 5000** to get the real concentration.

Urine

To obtain the real concentration, **multiply** the result **by the dilution factor used**.

9. LIMITATIONS

Samples with an OD higher than the OD of the highest standard should be further diluted and re-assayed.

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

Normal range

Plasma or Serum:

Adults 20–75 mg/l

Newborn 11–34 mg/l

Age 6 months 18–50 mg/l

Urine: 0.01–0.54 mg/l

We recommend each laboratory to establish its own norm concentration range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay

The precision (intra-assay variation) of the Immundiagnostik RBP/RBP4 ELISA test was calculated from 16 determinations on each of two samples.

Intra-Assay CV n= 16

Sample	RBP/RBP4 mean value [µg/l]	Intra-Assay CV [%]
1	24.1	5
2	11.1	5

Inter-Assay

The total precision (inter-assay variation) of the Immundiagnostik RBP/RBP4 ELISA test was calculated from data on 2 samples obtained by different technicians on different days.

Inter-Assay CV n= 25

Sample	RBP/RBP4 mean value [µg/l]	Inter-Assay CV [%]
1	4.4	9.8
2	6.9	9.7

Dilution recovery

Two patient samples were diluted and analyzed. The results are shown below (n = 2):

Sample	Dilution	expected [µg/l]	measured [µg/l]
A	1:7000	4.8	4.8
	1:14000	2.8	2.4
	1:28000	1.2	1.2
	1:56000	0.6	0.8

Analytical Sensitivity

The detection limit was defined as $B_0 + 2 \text{ SD}$ and determined to be 0.9 µg/l.

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Control samples should be analyzed with each run.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or Proclin as bactericides. Sodium azide and Proclin are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch as wells from already opened microtiter plates are exposed to different conditions than sealed ones.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- Quality control guidelines should be followed.

- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Graham, T. E., Wason, C. J., Blüher, M. & Kahn, B. B. Shortcomings in methodology complicate measurements of serum retinol binding protein (RBP4) in insulin-resistant human subjects. *Diabetologia* **50**, 814–23 (2007).
2. Graham, T. E. et al. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N. Engl. J. Med.* **354**, 2552–63 (2006).
3. Yang, Q. et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* **436**, 356–62 (2005).
4. Blumsohn, A., Morris, B. W., Griffiths, H. & Ramsey, C. F. Stability of β 2-microglobulin and retinol binding protein at different values of pH and temperature in normal and pathological urine. *Clin. Chim. Acta* **195**, 133–137 (1991).
5. Bernard, A. M., Moreau, D. & Lauwerys, R. Comparison of retinol-binding protein and β 2-microglobulin determination in urine for the early detection of tubular proteinuria. *Clin. Chim. Acta* **126**, 1–7 (1982).

Used symbols:

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number