

Retinol-bindendes Protein RBP/RBP4 ELISA

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

Retinol-binding protein RBP/RBP4 ELISA

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

Gültig ab / Valid from 2022-02-09

REF K 6110



IVD



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

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

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-bindendes 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 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 6110	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 6110	CONJ	Konjugatkonzentrat (Kaninchen anti-RBP/RBP4, peroxidase markiert)	1 x 200 µl
K 6110	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
K 6110	STD	Standards, lyophilisiert (0; 1,1; 3,3; 11; 33 µg/l)	2 x 5 vials
K 6110	CTRL 1	Kontrolle 1, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 6110	CTRL 2	Kontrolle 2, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* 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. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4x 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.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASH-BUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Die lyophilisierten Standards (STD) und Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die **Rekonstitutionsvorgaben** sind dem **Spezifikationsdatenblatt** zu entnehmen. **Standards und Kontrollen** (rekonstituierte STD und CTRL) **können 14 Tage bei 2–8 °C gelagert werden**.
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:101** in **Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das CONJ ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:101 verdünntes CONJ) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden**.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Serum und Plasma

Serum- oder Plasmaproben sind bei 2–8 °C mindestens 2 Wochen stabil. Bei längeren Aufbewahrungszeiten sind die Proben bei -20 °C zu lagern.

Vor Gebrauch wird die Probe **1:5 000 in Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF)** verdünnt, z. B.

- **20 µl** Probe + **980 µl** SAMPLEBUF, mischen = **1:50 (Verdünnung I)**
- **50 µl** Verdünnung I + **450 µl** SAMPLEBUF, mischen = **1:10 (Verdünnung II)**
- **50 µl** Verdünnung II + **450 µl** SAMPLEBUF, mischen = **1:10 (Verdünnung III)**.
Diese entspricht nun einer Gesamtverdünnung von **1:5 000**.

100 µl der **Verdünnung III** werden im Test pro Vertiefung eingesetzt.

Urin

Urinproben mit 1 N NaOH auf einen pH-Wert zwischen 6 und 8 einstellen. Die Proben sind bei 2–8 °C zwei Wochen stabil. Bei längeren Aufbewahrungszeiten sind die Proben bei mindestens -20 °C zu lagern.

Vor Gebrauch wird die Probe **1:10 in Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF)** verdünnt, z. B.

100 µl Urin + **900 µl** SAMPLEBUF, mischen = **1:10**

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

10 µl Urin + **990 µl** SAMPLEBUF, mischen = **1:100**

100 µl der verdünnten Probe werden im Test pro Vertiefung eingesetzt.

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. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

Vor Gebrauch **alle Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (15–30 °C) bringen, gut mischen.

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der verschlossenen Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Die Vertiefungen vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen . Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	Je 100 µl Standards/Kontrollen/verdünnte Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln* inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen . Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	100 µl Konjugat (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln* inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen . Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	10–20 min** bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
10.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.

11.	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 gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.
-----	--

* Wir empfehlen die Streifen bei 550 rpm (Umdrehungen pro Minute) mit einem Orbit von 2 mm zu schütteln.

** 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 **5 000** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu erhalten.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

Urin

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

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Standardkurve × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

LoB × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

LoB siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG 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 AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

*Referenzwerte***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 Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 16)

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

Inter-Assay (n = 25)

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

Wiederfindung in der Verdünnung

Eine Patientenprobe wurde verdünnt und im RBP/RBP4-ELISA gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt (n = 1).

Probe	Verdünnung	erwartet [µg/l]	gemessen [µg/l]
A	1:7 000	4,8	4,8
	1:14 000	2,8	2,4
	1:28 000	1,2	1,2
	1:56 000	0,6	0,8

Analytische Sensitivität

Die im Folgenden aufgeführten Werte wurden in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Leerwert (*limit of blank*, LoB)

0,2 µg/l

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP-17-A2 durchgeführt.

Spezifität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zum Trägerprotein Thyreoglobulin gefunden.

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet 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 gesundheitsgefährdend und umweltschädlich. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen können zu Haut- und/oder Atemwegsreizungen führen. Jeder Kontakt mit den Substanzen ist zu vermeiden. Weiterführende Sicherheitsinformationen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen, welches Sie auf Anfrage bei der Immundiagnostik AG erhalten.
- Das 10x Waschpufferkonzentrat (WASHBUF) enthält Tenside, welche bei Augenkontakt zu schweren Augenreizungen führen können.

Achtung: Verursacht schwere Augenreizung. **BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN:** Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

- 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. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

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.

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigefügten 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 Pipettiervolumina 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, zurückzusenden.

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		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Reizend

Retinol-binding protein RBP/RBP4 ELISA

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

Valid from 2022-02-09

REF K 6110



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	15
2. INTRODUCTION	15
3. MATERIAL SUPPLIED	16
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	17
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	17
7. ASSAY PROCEDURE	18
<i>Principle of the test</i>	18
<i>Test procedure</i>	18
8. RESULTS	19
9. LIMITATIONS	20
10. QUALITY CONTROL	20
<i>Reference range</i>	21
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	21
<i>Precision and reproducibility</i>	21
<i>Dilution recovery</i>	22
<i>Analytical Sensitivity</i>	22
<i>Specificity</i>	22
12. PRECAUTIONS	22
13. TECHNICAL HINTS	23
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	23
15. REFERENCES	24

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay 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. INTRODUCTION

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 catabolised 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 6110	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 6110	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	1 x 100 ml
K 6110	CONJ	Conjugate concentrate (rabbit anti RBP/RBP4, peroxidase-labelled)	1 x 200 µl
K 6110	STD	Standards, lyophilised (0; 1.1; 3.3; 11; 33 µg/l)	2 x 5 vials
K 6110	CTRL 1	Control, lyophilised (see specification for range)	2 x 1 vial
K 6110	CTRL 2	Control, lyophilised (see specification for range)	2 x 1 vial
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 g
- Vortex
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure 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. STORAGE AND PREPARATION 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.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for 1 month**.
- The **lyophilised standards (STD)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Reconstitution** details are given in the **specification data sheet**. **Standards and controls** (reconstituted STD and CTRL) **can be stored at 2–8 °C for 2 weeks**.
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:101** in wash buffer (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The CONJ is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Conjugate** (1:101 diluted CONJ) **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) when stored at **2–8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Plasma and serum

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

Dilute samples **1:5 000 in sample dilution buffer (SAMPLEBUF)** before use. For example:

- **20 µl** sample + **980 µl** SAMPLEBUF, mix well = **1:50 (dilution I)**
- **50 µl** dilution I + **450 µl** SAMPLEBUF, mix well = **1:10 (dilution II)**
- **50 µl** dilution II + **450 µl** SAMPLEBUF, mix well = **1:10 (dilution III)**.

This results in a final dilution of **1:5 000**.

For analysis, pipet **100 µl** of **dilution III** per well.

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 sample dilution buffer** (SAMPLEBUF), for example:

100 µl urine + 900 µl SAMPLEBUF, mix well = **1:10**

Urine with an **RBP4 concentration > 330 µg/l must be diluted 1:100**, for example:

10 µl urine + 990 µl SAMPLEBUF, mix well = **1:100**

For analysis, pipet **100 µl** of the **diluted sample** per well.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the 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, immobilised 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

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15–30 °C) and mix well.

Mark the positions of standards/controls/samples on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips as needed from kit. Store unused strips together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging at 2–8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

- | | |
|----|--|
| 1. | Before use , wash the wells 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper. |
|----|--|

2.	Add each 100 µl standards/controls/ diluted samples into the respective wells.
3.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker* .
4.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add 100 µl conjugate (diluted CONJ) into each well.
6.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker* .
7.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
8.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
9.	Incubate for 10–20 min** at room temperature (15–30 °C) in the dark .
10.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix well.
11.	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.

* We recommend shaking the strips at 550 rpm with an orbit of 2 mm.

** The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour 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 standard 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 duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

Serum or plasma

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 5 000** to get the actual concentrations.

Urine

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor used** to get the actual concentrations.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result by the dilution factor used.

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) can be further diluted and re-assayed. Please consider this higher dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range (see definition below) cannot be clearly quantified.

The upper limit of the measurement range can be calculated as:

highest concentration of the standard curve × sample dilution factor to be used

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

LoB × sample dilution factor to be used

LoB see chapter "Performance Characteristics".

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG 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.

Reference 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 reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 16)

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

Sample	RBP/RBP4 mean value [$\mu\text{g/l}$]	CV [%]
1	24.1	5
2	11.1	5

Inter-Assay (n = 14)

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.

Sample	RBP/RBP4 mean value [$\mu\text{g/l}$]	CV [%]
1	4.4	9.8
2	6.9	9.7

Dilution recovery

One patient sample was diluted and analysed. The results are shown below (n = 1):

Sample	Dilution	expected [µg/l]	measured [µg/l]
A	1:7 000	4.8	4.8
	1:14 000	2.8	2.4
	1:28 000	1.2	1.2
	1:56 000	0.6	0.8

Analytical Sensitivity

The following values have been estimated based on the concentrations of the standard curve without considering possibly used sample dilution factors.

Limit of blank, LoB

0.2 µg/l

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP-17-A2.

Specificity

No cross reactivity to the carrier protein thyreoglobulin was observed.

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- 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 or ProClin are hazardous to health and the environment. Substrates for enzymatic colour reactions may also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances must be avoided. Further safety information can be found in the safety data sheet, which is available from Immundiagnostik AG on request.
- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact.

Warning: Causes serious eye irritation. **IF IN EYES:** Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: get medical Advice/attention.

- 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.
- Control samples should be analysed with each run.
- 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.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to 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.
- The guidelines for medical laboratories 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 send 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		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Irritant