

# Retinol-bindendes Protein RBP / RBP4 ELISA

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

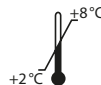
# Retinol-binding protein RBP / RBP4 ELISA

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

Gültig ab / Valid from 2019-03-27



K 6120



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)



# Inhalt

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

## 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.  $\beta$ -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 6120	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 6120	CONJ	Konjugatkonzentrat, (Kaninchen anti RBP/RBP4, Peroxidase-markiert)	1 x 200 µl
K 6120	SAMPLE- BUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
K 6120	CAL	Kalibrator, lyophilisiert (Konzentra- tion der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 6120	CTRL 1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 6120	CTRL 2	Kontrolle, 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 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 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 zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 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.
- Als **Leerwert** (Blank) werden **100 µl Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) pipettiert.
- **Der lyophilisierte Kalibrator (CAL)** und die **lyophilisierten Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. CAL und CTRL werden mit **500 µl Reinstwasser** rekonstituiert und kurz geschwenkt, um eine vollständige Rekonstitution zu gewährleisten. Sie werden zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. **Kalibrator und Kontrollen** (rekonstituierter CAL und rekonstituierte CTRL) **können 14 Tage bei 2–8 °C gelagert werden**.
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird unmittelbar 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. 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 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 = **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 1N NaOH auf einen 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 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 eines mitgeführten Kalibrators und dessen Bezug zu ei-

ner chargenabhängigen Musterkalibrierkurve 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 Kalibrator/Kontrollen/Leerwert/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 <b>5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen</b> . Nach dem letzten Waschschrift Resten von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	Je <b>100 µl Kalibrator/Kontrollen/Leerwert/verdünnte Proben</b> in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und <b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) <b>unter Schütteln*</b> inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen</b> . Nach dem letzten Waschschrift Resten von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	<b>100 µl Konjugat</b> (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen abdecken und <b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) <b>unter Schütteln*</b> inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen</b> . Nach dem letzten Waschschrift Resten von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	<b>100 µl Substrat</b> (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.



9.	<b>10–20 min**</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) <b>im Dunkeln</b> inkubieren.
10.	<b>100 µl Stopplösung</b> (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
11.	<b>Extinktion sofort</b> im Mikrotiterplattenphotometer bei <b>450 nm</b> 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 <b>405 nm</b> 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 Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

## 8. ERGEBNISSE

Für die Auswertung der Messwerte verwenden Sie bitte ein 4-parametrisches Logit-Log-Modell unter Verwendung der Angaben zu dem Verlauf der Kalibrationskurve sowie der optischen Dichte des Kalibrators (CAL), welche auf dem QC-Datenblatt der jeweiligen Kitcharge zu finden sind.

Abhängig von der verwendeten Software kann der Kalibrationskurvenverlauf sowohl durch die Parameter A, B, C und D als auch durch die Wertepaare aus Konzentration und optischer Dichte der Standards beschrieben werden.

**Achtung:** Die Parameterwerte müssen genau eingegeben werden, da selbst geringe Abweichungen der Zahlenwerte zu massiven Störungen der Auswertung führen können.

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 ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 5000** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

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

## Urin

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **verwendeten Verdünnungsfaktor** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu erhalten.

## 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:

$$\text{höchste Konzentration der Kalibrierkurve} \times \text{anzuwendender Probenverdünnungsfaktor}$$

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

$$\text{Analytische Sensitivität} \times \text{anzuwendender Probenverdünnungsfaktor}$$

Analytische Sensitivität 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)**

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

Probe	RBP/RBP4 Mittelwert [µg/l]	Intra-Assay V <sub>k</sub> [%]
1	24,1	5
2	11,1	5

#### **Inter-Assay (n = 25)**

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

Probe	RBP/RBP4 Mittelwert [µg/l]	Inter-Assay V <sub>k</sub> [%]
1	4,4	9,8
2	6,9	9,7

### *Wiederfindung in der Verdünnung*

Eine Patientenprobe wurde verdünnt und im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt (n = 1)

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  $0,9 \mu\text{g/l}$ .

### *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 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 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  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, da schon geöffnete Mikrotiterplatten anderen Bedingungen unterliegen als verschlossene.
- 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 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  $\beta$ 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  $\beta$ 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		

# Retinol-binding protein RBP / RBP4 ELISA

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

Valid from 2019-03-27



**K 6120**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Table of Contents

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



## 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.  $\beta$ -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 6120	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 6120	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	1 x 100 ml

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6120	CONJ	Conjugate concentrate (rabbit anti RBP/RBP4, peroxidase-labelled)	1 x 200 µl
K 6120	CAL	Calibrator, lyophilised (see specification for concentration)	2 x 1 vial
K 6120	CTRL 1	Control, lyophilised (see specification for range)	2 x 1 vial
K 6120	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

\* 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. 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.

- **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**.
- Use **100 µl** of **wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) as **blank**.
- The **lyophilised calibrator (CAL)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. Before use, the **CAL** (calibrator) and **CTRL** (controls) must be reconstituted with **500 µl of ultrapure water**. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to ensure complete reconstitution. **Reconstituted calibrators and controls can be stored at 2–8°C for two weeks**.
- The **lyophilised calibrator (CAL)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. Before use, the CAL and CTRL have to be reconstituted with **500 µl of ultrapure water** and mixed by gentle inversion to ensure complete reconstitution. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and then mix thoroughly. **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. 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 **1:5 000 in sample dilution buffer (SAMPLEBUF)** before use.

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

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. The concentration of Retinol-binding protein RBP/RBP4 can be quantified by referring the optical density of the calibrator to a lot-dependent master calibration curve.

### *Test procedure*

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

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

Take as many microtiter strips as needed from the 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 <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add each <b>100 µl calibrator/controls/blank/diluted samples</b> into the respective wells.
3.	Incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15–30°C) on a <b>horizontal shaker*</b> .
4.	Discard the content of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add <b>100 µl conjugate</b> (diluted CONJ) into each well.
6.	Incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15–30°C) on a <b>horizontal shaker*</b> .
7.	Discard the content of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
8.	Add <b>100 µl substrate</b> (SUB) into each well.
9.	Incubate for <b>10–20 minutes**</b> at room temperature (15–30°C) in the <b>dark</b> .
10.	Add <b>100 µl stop solution</b> (STOP) into each well and mix well.
11.	Determine <b>absorption immediately</b> with an ELISA reader at <b>450 nm</b> 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 <b>405 nm</b> 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

For result evaluation, please use a four parametric logit-log model based on the standard curve of the respective kit lot and the calibrator value (CAL). All essential information on the standard curve is provided on the QC data sheet of the respective product lot.

The calibration curve can be expressed either by the concentration of each standard with its corresponding optical density or by the four parameters A,B,C and D. In both cases the optical density of the calibrator (CAL) is essential. Depending on your evaluation software program, either the one or the other kind of data described above should be entered.

**Caution:** Please make sure that all parameters and values are transferred accurately into your software as minor deviations can cause severe errors during evaluation.

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 and plasma

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

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result with the dilution factor used to get the real concentration.

### Urine

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

## 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 calibration curve × sample dilution factor to be used*

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

*Analytical sensitivity × sample dilution factor to be used*

Analytical sensitivity 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

### *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	1:7000	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 set as  $B_0 + 2 \text{ SD}$  and estimated to be 0.9 µg/l.

### *Specificity*

No cross reactivity to the carrier protein thyreoglobulin was observed.

## Precision and reproducibility

### Intra-Assay (n = 16)

The reproducibility of two results in one measurement series was evaluated. Two samples were analysed 16 times by one person using the RBP/RBP4 ELISA.

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

### Inter-Assay (n = 25)

The reproducibility of two results at different days was evaluated. Two samples were analysed at different days by different persons using the RBP/RBP4 ELISA.

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

## 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 and Proclin are toxic. Substrates for the enzymatic colour 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.
- 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.
- 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 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  $\beta$ 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  $\beta$ 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		