

ampli-sRANKL

(EN) ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF FREE HUMAN sRANKL IN EDTA PLASMA, HEPARIN PLASMA, SERUM OR CELL CULTURE SUPERNATANTS
CAT. NO. BI-20452 12 X 8 TESTS

(DE) ENZYM IMMUNOASSAY ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON FREIEM HUMAN sRANKL IN EDTA PLASMA, HEPARIN PLASMA, SERUM ODER ZELLKULTURÜBERSTAND
KAT. NR. BI-20452 12 X 8 TESTE

(FR) DOSAGE IMMUNOENZYMATIQUE POUR LA DETERMINATION QUANTITATIVE DE sRANKL LIBRE HUMAIN DANS LE PLASMA EDTA, LE PLASMA HEPARINE, LE SERUM OU LES SURNAGEANTS DE CULTURE CELLULAIRE
REF. BI-20452 12 X 8 TESTS

(IT) IMMUNODOSAGGIO ENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DI LIBERO sRANKL UMANO SU CAMPIONI DI PLASMA-EDTA, PLASMA-EPARINA, SIERO O SURNATANTI DI COLTURE CELLULARI
CAT. NO. BI-20452 12 X 8 DETERMINAZIONI

(ES) ENZYMOINMUNOENSAYO PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE sRANKL LIBRE HUMANO EN PLASMA EDTA, PLASMA HEPARINA, SUERO O SOBRENADANTE DE CULTIVOS CELULARES
CAT. NO. BI-20452 12 X 8 TESTS

rev.no. 110831 (replacing 100615)

Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, A-1210 Wien, Divischgasse 4
Tel. +43/1/291 07 45, Fax +43/1/291 07 85, E-mail export@bmgrp.at



BIOMEDICA
BIOMEDICA
GRUPPE 

www.bmgrp.com

CONTENT / INHALT / SOMMAIRE / CONTENUTO / CONTENIDO

ENGLISH	Page 3
DEUTSCH	Seite 9
FRANCAIS	Page 13
ITALIANO	Pagina 17
ESPANOL	Pagina 21

Additional information on our products is available on our website.

Zusätzliche Information zu unseren Produkten ist auf unserer Homepage erhältlich.

Pour toute information complémentaire sur nos produits, visiter notre site Internet.

Ulteriori informazioni sui nostri prodotti possono essere cercate sulla nostra home page.

Encontrará información adicional sobre nuestros productos en nuestra página web.

www.bmgrp.com

1) INTRODUCTION

SRANKL, soluble receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B ligand (also: Osteoprotegerin ligand, OPGL) a member of the tumor necrosis factor (TNF) family, is the main stimulatory factor for the formation of mature osteoclasts and is essential for their survival. RANKL is produced by osteoblastic lineage cells and activated T lymphocytes. It activates its specific receptor RANK that is located on osteoclasts and dendritic cells. The effects are counteracted by OPG (compare BI-20402 OPG ELISA), which is secreted by various tissues and acts as an endogenous soluble receptor antagonist. As the serum concentration of sRANKL is usually quite low in normal samples an additional enhancement system is used in this ELISA.

Indications:

- Postmenopausal and senile Osteoporosis
- Glucocorticoid-induced Osteoporosis
- Diseases with locally increased resorption activity
- Arthritis
- Oncology

2) CONTENTS OF THE KIT

CONT	KIT COMPONENTS	QUANTITY
PLATE	Human recombinant OPG pre-coated microtiter strips in strip holder	12 x 8 tests
WASHBUF	Wash buffer concentrate 20x, natural cap	1 x 50 ml
AB	Goat polyclonal biotinylated anti sRANKL antibody, green cap, ready to use	1 x 11 ml
STD	Standards, (0; 0.125; 0.25; 0.5; 1; 2 pmol/l), white caps, lyophilised	6 vials lyophilised
CTRL	Control, yellow cap, lyophilised, exact concentration after reconstitution see label	1 vial lyophilised
CONJ	Conjugate, (streptavidin-alkaline phosphatase), amber cap, ready to use	1 x 22 ml
AMPLIFIER A	Inorganic salts and buffered enzyme solution with tetrazolium violet, blue cap, in dropper bottle, ready to use	1 x 13 ml
AMPLIFIER B	Stabilised NADPH solution, red cap, in dropper bottle, ready to use	1 x 13 ml
STOP	Stop solution, white cap, ready to use	1 x 7 ml

3) ADDITIONAL MATERIAL ADDED TO THE KIT

- 2 self-adhesive plastic films
- QC protocol
- Protocol sheet
- Instruction manual for use

4) MATERIAL AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Precision pipettes calibrated to deliver 50 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 300 μ l and disposable tips
- Distilled or deionised water
- Plate washer is recommended for washing, alternative multichannel pipette or manifold dispenser
- Refrigerator with 4°C (2-8°C)
- ELISA reader for absorbance at 490 nm
- Graph paper or software for calculation of results
- Incubator with horizontal plate shaker at 300-500 rpm

5) REAGENTS AND SAMPLE PREPARATION

All reagents of the kit are stable at 4°C (2-8°C) until the expiry date stated on the label of each reagent.

Sample preparation:

Collect venous blood samples by using standardized blood collection tubes for serum or plasma. We recommend performing plasma or serum separation by centrifugation as soon as possible (e.g. 20 min at 2000 x g, preferably at 4°C (2-8°C)). If this is not possible store the samples at 4°C (2-8°C) prior to centrifugation (up to one day). The acquired plasma or serum samples should be measured as soon as possible. For longer storage aliquot samples and store at -25°C or lower. All samples should undergo only 4 freeze-thaw cycles. Lipemic or haemolysed samples may give erroneous results. Samples should be mixed well before assaying. For cell culture supernatants the normal standard curve can be used.

Samples with results above the highest standard (2 pmol/l) should be diluted 1:10 with diluted WASHBUF and retested.

For further information on sample stability please visit our website www.bmgrp.com/products/assay_characteristics/sample_stability or contact our customer service by e-mail export@bmgrp.at or by phone +43/ 1/ 29107-45.

Reconstitute / Handling:

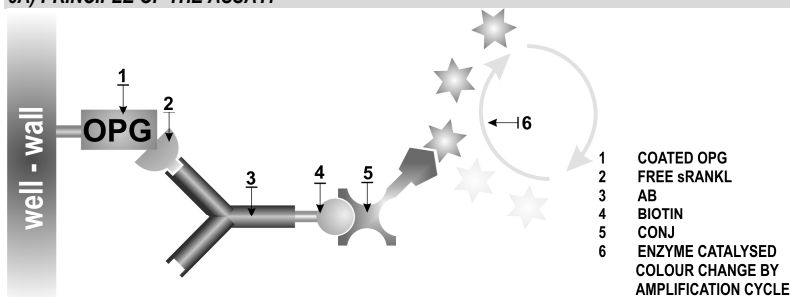
STD (Standards) and CTRL (Control): Each in 700 µl deionised or distilled water at room temperature (18-26°C) for 15 min. Reconstituted STD and CTRL are stable at -25°C or lower until expiry date on label, avoid freeze-thaw cycles.

WASHBUF (Wash buffer): Dilute the concentrate 1:20 (e.g. 50 ml WASHBUF + 950 ml distilled water). Crystals in the buffer concentrate will dissolve at room temperature. The diluted buffer is stable at 4°C (2-8°C) until expiry date stated on label. Use only diluted WASHBUF (Wash buffer) for the assay performance.

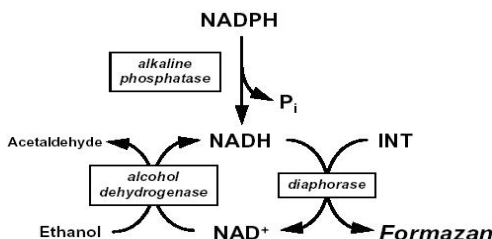
AMPLIFIER A/B: The amplifiers are supplied in dropper bottles ready to use. Contamination of the Amplifier with ubiquitous Alkaline Phosphatase (tears, sweat, etc.) may diminish the quality of results. Therefore we do not recommend to remove the dropper stoppings!

Recommendation: Squeeze out only the needed amount of amplifier A or B from dropper bottles, each into clean vials with a calibration (1 drop is approximately 50 µl) and pipette 100 µl per well. Do not put liquid back into dropper bottles.

6A) PRINCIPLE OF THE ASSAY:



6B) PRINCIPLE OF THE AMPLIFICATION



7) ASSAY PROTOCOL

All reagents and samples must be at room temperature (18-26°C) before use in the assay.

Mark position for BLANK/STD/SAMPLE/CTRL (Blank/Standard/Sample/Control) on the protocol sheet.

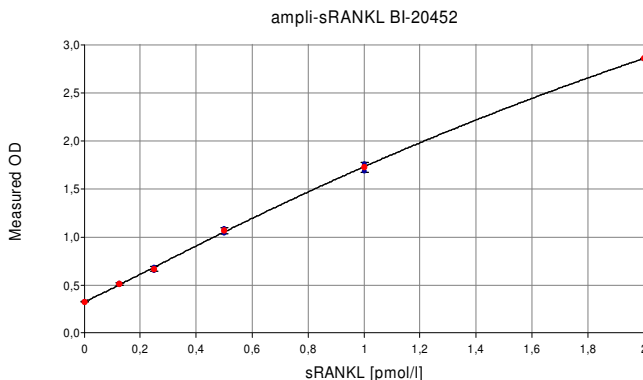
Take microtiter strips out of the aluminium bag, take a minimum of one well as Blank. Store unused strips with desiccant at 4°C (2-8°C) in the aluminium bag. Strips are stable until expiry date stated on the label.

- Pipette 100 µl STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) in duplicate into respective wells, except blank.
- Add 100 µl AB (biotinylated anti sRANKL antibody, green cap) into each well, except blank, swirl gently.
- Cover tightly and incubate over night (18-24h) at room temperature (18-26°C) while on an automatic plate shaker (300-500 rpm).**
- Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer), remove remaining WASHBUF by hitting plate against paper towel after the last wash.
- Add 200 µl CONJ (Conjugate, amber cap) into each well, except blank.
- Cover tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C).**
- Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer), remove remaining WASHBUF by hitting plate against paper towel after the last wash.
- Add 100 µl of Amplifier A (blue cap) into each well.
- Add 100 µl of Amplifier B (red cap) into each well.
- 10. Incubate for 45 +/-10 min at room temperature (18-26°C).**
The optimal OD for the highest standard in the assay should recover between 2.0 - 2.8 with a blank of <0.2. The suggested incubation time above was established during the development of the assay. Each laboratory should establish its own optimal incubation time based on their conditions (i.e. temperature, time, etc). After 30 minutes, the assay should be read periodically (at 5 minutes intervals) prior to adding stop solution to ensure that adequate colour development (>2.0 OD) is achieved.
- Add 50 µl STOP (Stop solution, white cap) into each well.
- Measure absorbance immediately at 490 nm with reference 630 nm, if available.

8) CALCULATION OF RESULTS

Read the optical density (OD) of all wells on a plate reader. Subtract the blank OD from the values of STD, CTRL and sample. Construct the standard curve from the OD values of the STD. Use commercially available software or graph paper. Obtain sample concentration from this standard curve. The assay was evaluated with 4PL algorithm. Different curve fitting methods need to be evaluated by the user.

Example STD-curve:



The quality control protocol supplied with the kit shows the results of the final release QC for each kit. Data for optical density obtained by customers may differ due to various influences and/or due to the normal decrease of signal intensity during shelf life. However, this does not affect validity of results as long as an OD of 1.00 or more is obtained for the standard with the highest concentration and the value of the CTRL is in range (target range see label).

9) ASSAY CHARACTERISTICS

Normal range:	Median: females = 0.37 pmol/l (n = 635); male = 0.46 pmol/l (n = 394) Normal values and precision data (chapter 10) were obtained with human serum samples. It is recommended to establish the normal range for each laboratory.
Standard range:	0; 0.125; 0.25; 0.5; 1; 2 pmol/l
Conversion factor pg/ml to pmol/l:	1 pg/ml = 0.05 pmol/l (MW: 20 kD)
Sample volume:	100 µl human EDTA plasma, Heparin plasma, serum or cell culture supernatant
Detection Limit:	(0 pmol/l + 3 SD): 0.02 pmol/l
Incubation time:	Overnight / 1 h / 30 min

For further information on assay characteristics please visit our website www.bmgrp.com/products/assay_characteristics or contact our customer service by e-mail export@bmgrp.at or by phone +43/ 1/ 29107-45.

10) PRECISION

Intra-Assay: 2 samples of known concentrations were tested 16 times in 1 assay

Inter-Assay: 2 samples of known concentrations were tested in 10 assays

Intra-Assay (n=16)		
Mean (pmol/l)	0.45	0.68
SD	0.04	0.06
CV%	8	9

Inter-Assay (n=10)		
Mean (pmol/l)	1.60	1.42
SD	0.09	0.05
CV%	6	3

11) TECHNICAL HINTS

- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- Do not mix stoppers and caps from different reagents or use reagents between lots.
- Do not use reagents beyond expiration date.
- Protect reagents from direct sunlight.
- Amplifier solutions must be colourless.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.

12) PRECAUTIONS

All test components of human source were tested with 3rd generation tests against HIV-Ab and HBsAg; and were found negative. Nevertheless, they should be handled and disposed as if they were infectious.

All liquid reagents contain 0.01% Proclin 300 as preservative. Avoid contact with skin and mucous membrane.

Proclin 300 is not toxic in concentrations used in this kit. It may cause allergic skin reactions – avoid contact with skin or eyes.

- Do not pipette by mouth.
- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics where reagents are used.
- Wear gloves, glasses and lab jacket while performing this assay.
- Sulfuric acid is irritating to eyes and skin. Avoid contact with skin and mucous. Irritations are possible - Flush with water if contact occurs!!

13) LITERATURE

- Bone loss in relation to serum levels of osteoprotegerin and nuclear factor-kappaB ligand: the Tromsø Study. L Jorgensen, A Vik, N Emaus, J Brox, J-B Hansen, E Mathiesen, and P Vestergaard. Osteoporos Int, 2010; 21(6): 931-938.
- Alendronate reduces osteoclast precursors in osteoporosis. P D'Amelio, A Grimaldi, MA Cristofaro, M Ravazzoli, PA Molinatti, GP Pescarmona, and GC Isaia. Osteoporos Int, 2009; doi: 10.1007/s00198-009-1129-1.
- The Effect of Zoledronic Acid on Serum Dickkopf-1, Osteoprotegerin, and RANKL in Patients with Paget's Disease of Bone. SA Polyzos, AD Anastasilakis, Z Efsthathiadou, M Kita, I Litsas, A Avramidis, G Arsos, E Moraidis, S Gerou, V Pavlidou, A Papatheodorou, and E Terpos. Horm Metab Res, 2009; 41(11): 846-850.
- ADA-deficient SCID is associated with a specific microenvironment and bone phenotype characterized by RANKL/OPG imbalance and osteoblast. AV Sauer, E Mrak, R J Hernandez, E Zacchi, F Cavani, M Casiraghi, E Grunebaum, CM Roifman, MC. Cervi, A Ambrosi, F Carlucci, M G Roncarolo, A Villa, A Rubinacci, and A Aiuti. Blood, 2009; 114, 3216-3226.
- Bone markers predict cardiovascular events in chronic kidney disease. A Fahrleitner-Pammer, J Herberth, SR Browning, B Obermayer-Pietsch, G Wimsberger, H Holzer, H Dobnig, and HH Malluche. J Bone Miner Res, 2008; 23(11): 1850-8.
- Serum osteoprotegerin concentrations are decreased in women with the polycystic ovary syndrome. H F Escobar-Morreale, JI Botella-Carretero, MÁ Martínez-García, M Luque-Ramírez, F Álvarez-Blasco, and JL San Millán. Eur J Endocrinol, 2008; 159: 225 - 232.

- Constitutional Thinness: Unusual Human Phenotype of Low Bone Quality. B Galusca, M Zouch, N Germain, C Bossu, D Frere, F Lang, MH Lafage-Proust, T Thomas, L Vico, and B Estour. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(1):110-117.
- Serum levels of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) in healthy women and men. K Kersch-Schindl, J Wendlova, S Kudlacek, A Gleiss, W Woloszczuk, and P Pietschmann. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2008; 116(8): 491-5.

1) EINLEITUNG

SRANKL, der Rezeptor Aktivator des Nuklear Faktor (NF)-kB Ligand (RANKL, auch: Osteoprotegerin Ligand, OPLG) gehört zur Familie der Tumor Nekrose Faktoren (TNF). RANKL ist der wichtigste Faktor für die Reifung und Proliferation von Osteoklasten. RANKL wird von Osteoblastenstammzellen und aktivierten T Lymphozyten gebildet. RANKL bindet an seinen spezifischen Rezeptor RANK, der von Osteoklasten und dendritischen Zellen exprimiert wird. Als Gegenspieler zu RANKL fungiert Osteoprotegerin (OPG), ein löslicher Rezeptor Antagonist, der von verschiedenen Geweben abgesondert wird und eine übermäßige Aktivierung der Osteoklasten verhindert (siehe BI-20402 OPG ELISA). Da die Konzentration von RANKL in Normalproben ziemlich gering ist, wird in diesem ELISA ein zusätzliches Verstärkersystem verwendet.

Indikationen:

- Postmenopausale und senile Osteoporose
- Glukokortikoid induzierte Osteoporose
- Arthritis
- Krankheiten mit lokal induzierter Knochen-resorptionsaktivität
- Onkologie

2) INHALT DES KITS

CONT	KIT KOMPONENTEN	MENGE
PLATE	Humanes rekombinantes OPG, beschichtet auf Mikrotiterplattenstreifen im Streifenhalter	12 x 8 Tests
WASHBUF	Waschpuffer, 20fach Konzentrat, durchsichtiger Schraubverschluss	1 x 50 ml
AB	Ziege polyklonaler biotinylierter anti sRANKL Antikörper, grüner Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 11 ml
STD	Standards, (0; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 pmol/l), weißer Schraubverschluss, lyophilisiert	6 x lyophilisiert
CTRL	Kontrolle, gelber Schraubverschluss, lyophilisiert, exakte Konzentration siehe Etikett	1 x lyophilisiert
CONJ	Konjugat, (Streptavidin-Alkalische Phosphatase), brauner Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
Amplifier A	Enzymlösung in Puffer mit anorganischen Salzen und Tetrazoliumviolett, blauer Schraubverschluss, in Tropffläschchen, gebrauchsfertig	1 x 13 ml
Amplifier B	Stabilisierte NADPH-Lösung, roter Schraubverschluss, in Tropffläschchen, gebrauchsfertig	1 x 13 ml
STOP	Stopplösung, weißer Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 7 ml

3) ZUSÄTZLICHES MATERIAL IM KIT

- 2 selbstklebende Abdeckfolien
- QC Protokoll
- Protokollblatt
- Arbeitsanleitung (Beipacktext)

4) ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL UND GERÄTE

- Kalibrierte Präzisionspipetten für 50 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl inklusive Pipettenspitzen
- Mikrotiterplattenphotometer mit 490 nm Filter
- Millimeterpapier oder Software
- Mikrotiterplattenwascher wird empfohlen
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Inkubator mit horizontalem Plattenschüttler bei 300-500 rpm

5) REAGENZIEN UND PROBENVORBEREITUNG

Alle Reagenzien des Kits sind bei 4°C (2-8°C) bis zum Ablaufdatum (siehe Etikett des Reagenz) stabil.

Probenvorbereitung:

Abnahme von venösem Blut mittels standardisierter Blutabnahmeröhrchen zur Gewinnung von Serum oder Plasma. Wir empfehlen die Zentrifugation des Blutes für 20 Minuten bei 2000g, bevorzugt bei 4°C (2-8°C), so schnell wie möglich. Das Blut kann vor der Zentrifugation bei 4°C (2-8°C) bis zu 24 Stunden gelagert werden. Das gewonnene Serum oder Plasma soll so schnell wie möglich gemessen werden. Für eine Lagerung sollen die Proben aliquotiert und bei -25°C oder niedriger gelagert werden. Bis zu vier Frier/Tau-Zyklen verändern die Messwerte nicht. Lipämische und hämolytische Proben können falsche Ergebnisse liefern. Proben vor Verwendung gut mischen. Zur Messung von Zellkulturüberständen kann die normale Standardkurve verwendet werden.

Proben mit Ergebnissen über dem höchsten Standard (2 pmol/l) sollten mit verdünntem WASHBUF 1:10 verdünnt und neu getestet werden.

Nähere Informationen zur Probenstabilität finden Sie auf unserer Website unter www.bmgrp.com/products/assay_characteristics/sample_stability oder Sie kontaktieren unser Kundenservice, Email unter export@bmgrp.at, Tel. unter +43/ 1/ 29107- 45.

Rekonstitution / Handhabung:

STD (Standards) und CTRL (Kontrolle): Lösen Sie das Lyophilisat in jeweils 700 µl destilliertem Wasser bei Raumtemperatur (18-26°C) für 15 min. Die rekonstituierten STD und CTRL sind bei -20°C bis zum Ablaufdatum haltbar. Vermeiden Sie Frier/Tau-Zyklen.

WASHBUF (Waschpuffer): Das mitgelieferte Konzentrat wird 1:20 verdünnt (zB. 50 ml WASHBUF + 950 ml destilliertes Wasser). Kristalle im Pufferkonzentrat lösen sich bei Raumtemperatur auf. Der verdünnte Puffer ist bei 4°C (2-8°C) bis zum Ablaufdatum haltbar. Im Testsystem darf nur verdünnter WASHBUF (Waschpuffer) verwendet werden.

AMPLIFIER A/B: Die gebrauchsfertigen Amplifierlösungen befinden sich in Tropffläschchen. Eine Kontamination der Amplifier mit allgegenwärtiger Alkalischer Phosphatase (in Tränenflüssigkeit, Schweiß, etc.) kann zu einer Beeinträchtigung der Messergebnisse führen. Daher ist es nicht empfehlenswert, die Tropfverschlüsse zu entfernen.

Empfehlung zur Handhabung:

Füllen Sie nur die benötigte Menge an Amplifier A oder B jeweils in saubere, kalibrierte Röhrchen (1 Tropfen entspricht etwa 50 µl) und pipettieren Sie 100µl / well mit einer Präzisionspipette. Keine Flüssigkeit in die Tropffläschchen zurückgießen!

6A) TESTPRINZIP

Siehe Kapitel 6A) PRINCIPLE OF THE ASSAY im englischen Teil des Beipacktextes

6B) PRINZIP DES VERSTÄRKERSYSTEMS

Siehe Kapitel 6B) PRINCIPLE OF THE ASSAY im englischen Teil des Beipacktextes

7) TESTPROTOKOLL

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen.

Markieren Sie die Positionen für BLANK/STD/PROBE/CTRL (Leerwert/Standard/Probe/Kontrolle) am Protokollblatt.

Nehmen Sie die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Alusäckchen. Mindestens 1 Well für den Leerwert reservieren. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können mit Trockenmittel im Alusäckchen bei 4°C (2-8°C) bis zum angegebenen Ablaufdatum gelagert werden.

1. Pipettieren Sie 100 µl STD/PROBE/CTRL (Standard/Probe/Kontrolle) in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen, mit Ausnahme des Leerwertes.

2. Pipettieren Sie 100 µl AB (biotinylierter sRANKL Antikörper, grüner Schraubverschluss) in alle Wells, mit Ausnahme des Leerwertes, gut mischen.

3. Streifen abdecken und über Nacht (18-24 Stunden) bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln auf einem Plattenschüttler inkubieren (300-500 rpm)

4. Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.

5. Pipettieren Sie 200 µl CONJ (Konjugat, brauner Schraubverschluss) in alle Wells, mit Ausnahme des Leerwertes.

6. Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) inkubieren.

7. Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.

8. Pipettieren Sie 100 µl Amplifier A (blauer Schraubverschluss) in alle Wells.

9. Pipettieren Sie 100 µl Amplifier B (roter Schraubverschluss) in alle Wells.

10. 45 +/- 10 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) inkubieren.

Die optimale OD für den höchsten Standard des Tests liegt zwischen 2,0 – 2,8 bei einem Leerwert von <0,2. Die vorgeschlagene Inkubationszeit von 45 Minuten wurde bei der Entwicklung des Kits evaluiert. Jeder Verwender sollte seine Inkubationszeit, basierend auf seinen Konditionen (zB. Temperatur, Zeit etc.), evaluieren. Um sicher zu stellen, dass genügend Farbentwicklung erreicht ist (>2,0 OD) sollte ab 30 Minuten Inkubationszeit der Test periodisch (in Intervallen von 5 Minuten) vor Zugabe der Stopplösung gemessen werden.

11. Pipettieren Sie 50 µl STOP (Stopplösung, weißer Schraubverschluss) in alle Wells.

12. Extinktion unmittelbar bei 490 nm messen, mit 630 nm als Referenz, falls möglich.

8) BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Messen Sie die optische Dichte (OD) von allen Wells mit einem Mikrotiterplattenphotometer mit einem 490nm Filter (Referenz 630nm). Die OD des Leerwertes ist von den Werten der STD, CTRL und Proben abzuziehen.

Konstruieren Sie eine Standardkurve aus den OD Werten der STD unter Verwendung von kommerziell erhältlichem Millimeterpapier oder einer geeigneten Software.

Das Testsystem wurde evaluiert mit einem 4 Parameter Algorithmus. Andere Auswerte Algorithmen müssen vom Verwender evaluiert werden. Die Konzentration der Proben wird aus der Standardkurve abgelesen.

Typische STD-Kurve:

Siehe Kapitel 8) CALCULATION OF RESULTS im englischen Teil des Beipacktextes

Auf dem beige packten QC Protokoll sind die Resultate bei der QC Freigabe des Kits vermerkt. Vom Verwender erhaltene Daten der OD können abweichend sein, bedingt durch verschiedene Einflüsse und/oder dem normalen Signalverlust des Kits während der Laufzeit. Dieser mögliche Signalverlust hat keinen Einfluss auf die Gültigkeit der Resultate, so lange die OD des höchsten Standards den Wert 1,00 oder höher erreicht und der Wert der CTRL im gültigen Bereich ist (Bereich siehe Etikett).

9) TESTMERKMALE

Normalwerte:	Median: Frauen = 0,37 pmol/l (n = 635); Männer = 0,46 pmol/l (n = 394) Normalwerte und Präzisionsdaten (Kapitel 10) wurden mit humanen Serumproben erhoben. Jeder Verwender sollte den Normalbereich für seine Proben evaluieren.
Standardbereich:	0; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 pmol/l
Umrechnungsfaktor pg/ml zu pmol/l:	1 pg/ml = 0,05 pmol/l (MW: 20 kD)
Probenvolumen:	100 µl EDTA Plasma, Heparin Plasma, Serum oder Zellkulturüberstand
Detektionsgrenze:	(0 pmol/l + 3 SD): 0,02 pmol/l
Inkubationszeiten:	über Nacht / 1 Std / 30 Min

Nähere Informationen zu den Testmerkmalen finden Sie auf unserer Website unter www.bmgrp.com/products/assay_characteristics oder Sie kontaktieren unser Kundenservice, Email unter export@bmgrp.at, Tel. unter +43/ 1/ 29107-45.

10) PRÄZISION

Intra-Assay: 2 Proben wurden 16 mal in Doppelbestimmung in einem Test getestet.

Inter-Assay: 2 Proben wurden in Doppelbestimmung in 10 Tests getestet.

Intra-Assay (n=16)		
Durchschnitt (pmol/l)	0,45	0,68
SD	0,04	0,06
VK%	8	9

Inter-Assay (n=10)		
Durchschnitt (pmol/l)	1,60	1,42
SD	0,09	0,05
VK%	6	3

11) TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien von verschiedenen Lots oder Tests dürfen nicht gemischt werden.
- Stöpsel oder Verschlüsse von verschiedenen Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Abgelaufene Reagenzien dürfen nicht verwendet werden.
- Reagenzien sind vor direktem Sonnenlicht zu schützen.
- Amplifierlösungen müssen vor Verwendung farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen bei den Inkubationen mit Abdeckfolie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.

12) VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Bestandteile humanen Ursprunges wurden mit Tests der 3. Generation auf HIV-Ak und HBsAg getestet und negativ gefunden. Trotzdem sollten die Reagenzien als potentiell infektiös behandelt werden. Alle flüssigen Reagenzien enthalten 0,01% Proclin 300 als Konservierungsmittel. Vermeiden Sie Kontakt mit Augen, Haut oder Schleimhaut. Proclin 300 ist in der verwendeten Konzentration nicht toxisch. Allergische Reaktionen sind möglich.

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Nicht Rauchen, Essen, Trinken oder Kosmetika benutzen während der Verwendung der Testreagenzien.
- Verwenden Sie Handschuhe zur Vermeidung jeden Kontaktes mit Reagenzien.
- Die Stopplösung enthält Schwefelsäure. Schwefelsäure reizt Augen und Haut. Bei Berührung gründlich mit Wasser spülen.

13) LITERATUR

Siehe Kapitel 13) LITERATURE im englischen Teil des Beipacktextes.

1) INTRODUCTION

Le sRANKL, Récepteur Activateur soluble du Ligand NF- κ B (aussi: ligand ostéoprotégérin, OPGL) est un membre de la famille TNF (Facteur Onconécrosant). Il est le principal facteur stimulateur pour la formation d'ostéoclastes mûrs et est indispensable à leur survie. RANKL est produit par les cellules de lignage ostéoblastiques et les T-lymphocytes activés. RANKL active son récepteur spécifique, RANK, qui se trouve sur les ostéoclastes et les cellules dendritiques. Ces effets sont contrés par l'OPG (voir ELISA réf : BI-20402) qui est sécrété par divers tissus et agit comme antagoniste récepteur soluble endogène. En raison de la basse concentration de sRANKL dans les échantillons normaux, un système d'amplification est utilisé dans cette trousse ELISA.

Indications:

- Ostéoporose post-ménopausique ou sénile
- Ostéoporose induite par glucocorticoïdes
- Maladies entraînant une activité de résorption locale accrue
- Arthrite
- Oncologie

2) CONTENUE DE LA TROUSSE

CONT	COMPOSANT DE LA TROUSSE	QUANTITE
PLATE	Plaque de barrettes de microtitrage revêtues d'OPG recombinant humain, avec portoir pour barrettes	12 x 8 tests
WASHBUF	Tampon de lavage, concentré 20x, bouchon neutre	1 x 50 ml
AB	Anticorps chèvre polyclonal biotinylé anti-sRANKL, bouchon vert, prêt à l'emploi	1 x 11 ml
STD	Standards, (0; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 pmol/l), bouchon blanc, lyophilisés.	6 flacons lyophilisés
CTRL	Contrôle lyophilisé, bouchon jaune. Voir l'étiquette pour la concentration exacte après reconstitution	1 flacon lyophilisé
CONJ	Conjugué, (streptavidin- alk.phos.), bouchon ambre, prêt à l'emploi	1 x 22 ml
AMPLIFIER A	Sels inorganiques et solution enzymatique dans un tampon contenant du tétrazolium violet, bouchon bleu, en flacon goutte-à-goutte, prêt à l'emploi.	1 x 13 ml
AMPLIFIER B	Solution NADPH stabilisée, bouchon rouge, en flacon goutte-à-goutte, prête à l'emploi.	1 x 13 ml
STOP	Solution STOP, bouchon blanc, prête à l'emploi	1 x 7 ml

3) AUTRE MATERIEL INCLUS DANS LA TROUSSE

- 2 bandes de film adhésif
- Le protocole Qualité
- Une feuille de protocole
- La notice d'utilisation

4) MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Micropipettes calibrées pour livrer 50 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 300 μ l embouts jetables
- Lecteur de microplaques ELISA pour lire l'absorbance à 490nm
- Papier millimétré ou logiciel pour le calcul des résultats
- Un laveur de microplaques est conseillé pour l'étape de lavage
- Eau distillée ou déionisée
- Incubateur avec agitation horizontale à 300 / 500 rpm

5) PREPARATION DES REACTIFS ET DES ECHANTILLONS

Tous les réactifs de la trousse restent stables à 4°C (2-8°C) jusqu'à la date de péremption (voir étiquette du réactif).

Préparation des échantillons:

Prélever un échantillon de sang veineux en utilisant des tubes de prélèvement standard pour sérum ou plasma. On recommande la séparation du plasma ou du sérum par centrifugation dès que possible (par exemple 20 minutes à 2000 x g, de préférence à 4°C (2-8°C)). Si on est obligé d'attendre pour analyser, stocker les échantillons à 4°C (2-8°C) avant la centrifugation pendant 24 heures au maximum. Le sérum ou le plasma obtenu doit être testé dès que possible. Pour une période de stockage plus longue, préparer un aliquot des échantillons et les entreposer dans une chambre froide à -25°C ou à bas. Le nombre de cycle de congélation/décongélation maximum pour tout échantillon est de 4. Des échantillons lipémiques ou hémolysés peuvent donner des résultats erronés. Les échantillons doivent être agités avant analyse. Pour les surnageants de culture, on peut aussi utiliser la courbe standard d'interprétation habituelle.

Les échantillons dont le résultat est supérieur au premier étalon (2 pmol/l) doivent être dilués au 1:10 avec du tampon de lavage dilué et testés de nouveau.

Vous trouverez de plus amples informations sur la stabilité des échantillons en consultant notre site web à l'adresse www.bmgrp.com/products/assay_characteristics/sample_stability ou contactez notre service clientèle à l'adresse email export@gmgrp.at, ou en composant le numéro de téléphone +43/1/29107-45.

Reconstitution / Manipulation:

STD (Standards) et CTRL (Contrôle): Reconstituer chacun dans 700 µl d'eau déionisée ou distillée pendant 15 minutes à température ambiante (18-26°C). Les standards et le contrôle restent stables à -20°C jusqu'à la date de péremption marquée sur l'étiquette. Eviter les cycles répétés de congélation / décongélation.

WASHBUF (Tampon de lavage): Diluer le concentré 1:20. Par exemple, 50 ml de WASHBUF + 950 ml d'eau distillée. Les cristaux dans le concentré de lavage se dissolvent à température ambiante. Le tampon reste stable à 4°C (2-8°C) jusqu'à la date de péremption mentionnée sur l'étiquette. Utiliser uniquement du WASHBUF (Tampon de lavage) dilué pour l'exécution du dosage.

Amplificateur A/B: L'amplificateur est fourni en flacons goutte-à-goutte. La contamination de l'amplificateur par de la Phosphatase Alcaline exogène (larmes, sueur, etc.) pourrait altérer la qualité des résultats. Pour cette raison, nous déconseillons d'enlever les bouchons des gouttes-à-gouttes!

Conseil : utilisez les goutte-à-goutte pour délivrer uniquement la quantité requise de l'amplificateur A ou B dans les tubes calibrés (une goutte fait environ 50 µl) et pipetez 100 µl par puits. Ne remettez pas de réactif dans les flacons.

6A) PRINCIPE DE L'ESSAI

Voir au chapitre 6A) PRINCIPLE OF THE ESSAY de la version anglaise de la notice.

6B) PRINCIPE DE L'AMPLIFICATION

Voir au chapitre 6B) PRINCIPLE OF THE ESSAY de la version anglaise de la notice.

7) PROTOCOLE DE L'ESSAI

Tous les réactifs et échantillons doivent être à température ambiante (18-26°C) avant l'utilisation.

Marquer la position du BLANK/STD/SAMPLE/CTRL (Blanc/Standard/Echantillon/Contrôle) sur la feuille du protocole.

Sortir du sac alu les barrettes de microtitrage et marquer les correctement, marquant au minimum un puits comme Blanc. Conserver les barrettes non-utilisées, avec leur dessiccateur, à 4°C (2-8°C) dans le sac alu. Les barrettes restent stables jusqu'à la date d'expiration marquée sur l'étiquette.

1. Rajouter 100 µl de STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Echantillon/Contrôle) en double dans chaque puits, sauf le blanc.
2. Rajouter 100 µl AB (anticorps biotinylé anti sRANKL, bouchon vert) dans chaque puits, sauf le blanc, puis agiter doucement.
3. Sceller la plaque et incuber pendant 18 à 24 heures à température ambiante (18-26°C) en agitant sur un agitateur de microplaque (300-500 rpm).
4. Aspirer et laver 5 fois les puits avec 300 µl de WASHBUF (Tampon de lavage) dilué. Après le dernier lavage, taper la plaque contre une serviette afin d'enlever les dernières gouttes de WASHBUF.
5. Rajouter 200 µl de CONJ (Conjugué, bouchon ambre) dans chaque puits, sauf le blanc.
6. Sceller la plaque et incuber pendant 1 heure à température ambiante (18-26°C).
7. Aspirer et laver 5 fois les puits avec 300 µl de WASHBUF (Tampon de lavage) dilué. Après le dernier lavage, taper la plaque contre une serviette afin d'enlever les dernières gouttes de WASHBUF.
8. Rajouter 100 µl d'Amplificateur A (bouchon bleu) dans chaque puits.
9. Rajouter 100 µl d'Amplificateur B (bouchon rouge) dans chaque puits.
10. Incuber pendant 45 minutes à température ambiante (18-26°C). La densité optique attendue pour le standard le plus haut doit être comprise entre 2.0 et 2.8 avec un blanc < 0.2. Le temps d'incubation ci-dessus a été établi pendant le développement de la méthode. Chaque laboratoire doit établir lui-même son temps d'incubation optimal en s'adaptant aux conditions locales d'analyse (par exemple température, humidité, etc). Après 30 minutes la microplaque doit être lue régulièrement (toutes les 5 min) avant d'ajouter la solution stop pour s'assurer du développement adéquat de la densité optique est terminé (>2.0 OD).
11. Rajouter 50 µl de STOP (Solution stop, bouchon blanc) dans chaque puits.
12. Mesurer immédiatement l'absorbance à 490nm avec une référence à 630 nm, si possible.

8) CALCUL DES RESULTATS

Lire la densité optique (DO) de tous les puits sur un lecteur de microplaque. Il faut retirer la valeur du blanc des valeurs des étalons, des contrôles et des échantillons. Etablir la courbe standard d'interprétation à partir des DO des étalons. Utiliser un logiciel disponible dans le commerce ou bien une représentation graphique. Obtenir la concentration des échantillons à partir de la courbe standard. Cette méthode a été évaluée en utilisant un algorithme 4PL. Les autres types de courbes doivent être évaluées par l'utilisateur. Il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres valeurs normales.

Courbe STD typique:

Voir au chapitre 8) CALCULATION OF RESULTS dans la version anglaise de la notice d'utilisation.

Le protocole de contrôle qualité fourni avec le kit présente les résultats de la dernière série QC de chaque trousses. Les données de densité optique obtenues par les utilisateurs peuvent être différentes de celles obtenues par le Laboratoire de Contrôle. Cela dépend de plusieurs facteurs et notamment de la perte du signal que l'on constate pendant la durée de vie d'un kit. Cependant, ceci n'a pas d'incidence sur la validité des résultats, à partir du moment où la D.O. du standard ayant la concentration la plus élevée est au moins égale à 1,00 unités.

9) CARACTERISTIQUES DU DOSAGE

Gamme des valeurs normales:	Median: femmes = 0,37 pmol/l (n = 635); hommes = 0,46 pmol/l (n = 394) Nous recommandons à chaque laboratoire d'établir sa propre gamme de valeurs normales.
Gamme standard:	0; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 pmol/l
Facteur de conversion pg/ml à pmol/l:	1 pg/ml = 0,05 pmol/l (MW: 20 kD)
Volume de l'échantillon:	100 µl plasma EDTA humain, plasma héparin, sérum, surnageant de culture cellulaire
Limite de détection:	(0 pmol/l + 3 SD): 0,02pmol/l
Temps d'incubation :	18-24 h / 1 h / 30 min

Vous trouverez de plus amples informations sur la stabilité des échantillons en consultant notre site web à l'adresse www.bmgrp.com/products/assay_characteristics ou contactez notre service clientèle à l'adresse email export@gmbrp.at, ou en composant le numéro de téléphone +43/1/29107-45.

10) PRECISION

Précision intra-série : 2 échantillons ont été testés 16 fois en double lors d'un essai

Précision inter-séries : 2 échantillons ont été testés 10 fois en double pendant 10 essais

Intra-Essai (n=16)		
Moyenne (pmol/l)	0,45	0,68
SD	0,04	0,06
CV%	8	9

Inter-Essai (n=10)		
Moyenne (pmol/l)	1,60	1,42
SD	0,9	0,05
CV%	6	3

11) CONSEILS TECHNIQUES

- Ne pas remplacer ou mélanger les réactifs qui sont fournis avec ce kit avec ceux de lots ou de sources différents.
- Ne pas mélanger les embouts ou bouchons de réactifs différents, ni utiliser les réactifs d'autres lots.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date d'expiration.
- Protéger les réactifs contre la lumière.
- Les solutions d'amplificateur doivent être incolores.
- Pour obtenir les résultats fiables, il est essentiel de sceller correctement la microplaque pendant les étapes d'incubation.
- Eviter de faire mousser les réactifs lors du mélange.

12) PRECAUTIONS

Les produits d'origine humaine utilisés dans ce test ont été testés avec les essais de troisième génération contre le VIH-Ab et l'Aghbs et ont été trouvés négatifs. Cependant, ils doivent être manipulés comme étant susceptibles de transmettre des maladies infectieuses. Tous les réactifs liquides contiennent 0,01% de Proclin 300 comme conservateur. Eviter tout contact avec la peau et la muqueuse. Proclin 300 n'est pas toxique dans les concentrations utilisées dans cette trousse. Cependant, il peut entraîner les réactions allergiques et tout contact avec la peau ou les yeux doit être évité.

- Ne pas pipetter avec la bouche.
- Ne pas manger, boire, fumer, ni appliquer les produits cosmétiques pendant la manipulation des réactifs.
- Porter les gants pour éviter tout contact avec les réactifs.
- L'acide sulfurique irrite les yeux et la peau. Laver avec de l'eau en cas de contact. Eviter le contact avec la peau et les muqueuses. Les irritations sont possibles – laver avec de l'eau en cas de contact !!

13) LITERATURE

Voir au chapitre 13) LITERATURE dans la version anglaise de cette notice.

1) INTRODUZIONE

SRANKL, soluble receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B ligand (o anche: Osteoprotegerin ligand, OPGL) facente parte della famiglia del tumor necrosis factor (TNF), è il principale fattore stimolatorio per la formazione degli osteoclasti maturi ed è essenziale per la loro sopravvivenza. Il RANKL viene prodotto dalla linea cellulare degli osteoblasti e dai linfociti T attivati. Attiva il suo recettore RANK specifico collocato sulla superficie degli osteoclasti e delle cellule dendritiche. Gli effetti sono contrastati da OPG (confrontare kit BI-20402 OPG ELISA), che viene secreta da diversi tessuti e che agisce come antagonista endogeno del recettore solubile. Poiché la concentrazione di sRANKL nel siero è generalmente molto bassa nei campioni normali, in questo dosaggio ELISA è stato utilizzato un sistema aggiuntivo per incrementare il segnale misurato.

Indicazioni del dosaggio

- Osteoporosi in post-menopausa e senile
- Osteoporosi indotta da uso di glucocorticoidi
- Malattie con attività di rimodellamento osseo localmente aumentata
- Artrite
- Oncologia

2) CONTENUTO DEL KIT

CONT	REATTIVI	QUANTITA'
PLATE	Micropiastre pre-sensibilizzata con OPG ricombinante umano e cornice per le strip	12 x 8 determinazioni
WASHBUF	Tampone per il lavaggio, concentrato 20x, tappo non colorato	1 x 50 mL
AB	Anticorpo capra policlonale biotinilato anti sRANKL, tappo verde, pronto per l'uso	1 x 11 mL
STD	Standard, (0; 0.125; 0.25; 0.5; 1; 2 pmol/l), tappo bianco, liofilizzati	6 flaconi, liofilizzati
CTRL	Controllo, tappo giallo, liofilizzato, vedere l'etichetta per l'esatta concentrazione dopo ricostituzione	1 flacone, liofilizzato
CONJ	Coniugato, (streptavidina-fosfatasi alcalina), tappo ambrato, pronto all'uso	1 x 22 mL
AMPLIFIER A	Sali inorganici e soluzione tampone enzimatica con violetto di tetrazolio, tappo blu, in flaconi dotati di contagocce, pronto all'uso	1 x 13 ml
AMPLIFIER B	Soluzione di NADPH con stabilizzatori, tappo rosso, in flaconi dotati di contagocce, pronta all'uso	1 x 13 ml
STOP	Soluzione di arresto, tappo bianco, pronta all'uso	1 x 7 mL

3) MATERIALE AGGIUNTIVO CONTENUTO NEL KIT

- 2 copripiastre auto-adesivi
- Protocollo QC
- Protocol sheet
- Manuale di istruzioni d'uso

4) MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO

- Micropipette di precisione calibrate per volumi di 50 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 300 μ l e puntali monouso
- Lettore di micropiastre ELISA con filtro a 490 nm
- Carta per grafici o software per il calcolo dei risultati
- Lavatore automatico di micropiastre raccomandato per i lavaggi
- Acqua distillata o deionizzata
- Incubatore con agitazione orizzontale a 300-500 rpm

5) PREPARAZIONE DEI REATTIVI E DEI CAMPIONI

I reattivi contenuti nel kit sono stabili a 4°C (2-8°C) fino alla data riportata sull'etichetta di ciascun flacone.

Preparazione del campione:

Prelevare i campioni di sangue in provette per siero o plasma. Si consiglia di separare il plasma o il siero per centrifugazione il più presto possibile (ad es. 20 min at 2000 x g, preferibilmente a 4°C (2-8°C)). Nel caso ciò non fosse possibile, conservare i campioni a 4°C (2-8°C) prima della centrifugazione (fino ad un giorno). Analizzare i campioni di siero o plasma il più presto possibile. Per conservazioni più prolungate nel tempo, aliquotare i campioni e congelarli a -25°C o a bassa. Ciascun campione può essere sottoposto ad un massimo di 4 cicli di congelamento-scongelo. Campioni lipemici o emolizzati possono dare risultati aberranti. Mescolare bene i campioni prima del dosaggio. Per i surnatanti di colture cellulari, utilizzare la normale curva standard fornita.

I campioni con risultato superiore allo standard a concentrazione più elevata (2 pmol/l) devono essere diluiti 1:10 con WASHBUF diluito e ridosati.

Per ulteriori informazioni sulla stabilità dei campioni si prega di visitare il sito web www.bmgrp.com/products/assay_characteristics/sample_stability o il distributore autorizzato locale.

Ricostituzione / Manipolazione:

STD (Standard) e CTRL (Controllo): A temperatura ambiente (18-26°C), aggiungere 700 µl di acqua deionizzata o distillata a ciascun flacone e lasciare a riposo per 15 min. STD e CTRL ricostituiti sono stabili a -20°C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta di ciascun flacone; evitare cicli di congelamento- scongelamento.

WASHBUF (Tampone di lavaggio): Diluire il tampone concentrato 1:20 (ad es. 50 ml WASHBUF + 950 ml acqua distillata). I cristalli eventualmente presenti nel tampone concentrato, si disciolgono a temperatura ambiente. Il tampone diluito è stabile a 4°C (2-8°C) fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Utilizzare solo il WASHBUF (Tampone di lavaggio) diluito durante l'esecuzione del dosaggio.

AMPLIFIER A / B: Le soluzioni dei due amplificatori sono fornite in flaconi dotati di contagocce pronti all'uso. La contaminazione di tali soluzioni con Fosfatasi Alcalina ubiquitaria (liquido lacrimale, sudore, ecc.) può far diminuire la qualità dei risultati. Non rimuovere il contagocce dai flaconi! Consigli: Utilizzare solo il quantitativo necessario di AMPLIFIER A o B dai flaconi dotati di contagocce; sgocciolare la quantità necessaria di ciascun amplificatore in contenitori puliti (considerare che 1 goccia corrisponde a circa 50 µl) e pipettare 100 µl di AMPLIFIER A e 100 µl di AMPLIFIER B per pozzetto. Non rimettere il liquido avanzato dentro i flaconi con il contagocce.

6A) PRINCIPIO DEL DOSAGGIO:

Vedi capitolo 6A) delle istruzioni in lingua inglese.

6B) PRINCIPIO DEL L'AMPLIFICAZIONE DEL SEGNALE:

Vedi capitolo 6B) delle istruzioni in lingua inglese.

7) PROTOCOLLO DEL DOSAGGIO

Portare tutti i reattivi e i campioni a temperatura ambiente (18-26°C) prima di usarli per il dosaggio.

Evidenziare la posizione di BIANCO/STD/CAMPIONE/CTRL (Bianco/Standard/Campione/Controllo) sul protocol sheet.

Togliere le strip della micropiastra dalla confezione, considerare minimo un pozzetto per il Bianco. Conservare le strip inutilizzate con il desiccante a 4°C (2-8°C) nella confezione. Le strip sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

1.	Aggiungere 100 µl di STD/CAMPIONE/CTRL (Standard/Campione/Controllo) in doppio nei corrispondenti pozzetti, ad eccezione del bianco.
2.	Aggiungere 100 µl di AB (anticorpo anti sRANKL biotinilato, tappo verde) in ciascun pozzetto, ad eccezione del bianco, agitare delicatamente la micropiastra.
3.	Coprire bene la micropiastra con il copripiastra adesivo e incubare overnight (18-24h) a temperatura ambiente (18-26°C) con un agitatore automatico di micro piastre (300-500 rpm).
4.	Aspirare e lavare i pozzetti 5x con 300 µl di WASHBUF (Tampone di lavaggio) diluito, togliere il WASHBUF restante picchiando la micropiastra su carta assorbente dopo l'ultimo lavaggio.
5.	Aggiungere 200 µl di CONJ (Coniugato, tappo ambrato) in tutti i pozzetti, ad eccezione del bianco.
6.	Coprire bene e incubare per 1 ora a temperatura ambiente (18-26°C).
7.	Aspirare e lavare i pozzetti 5x con 300 µl di WASHBUF (Tampone di lavaggio) diluito, togliere il WASHBUF restante picchiando la micropiastra su carta assorbente dopo l'ultimo lavaggio.
8.	Aggiungere 100 µl di AMPLIFIER A (tappo blu) in tutti i pozzetti.
9.	Aggiungere 100 µl di AMPLIFIER B (tappo rosso) in tutti i pozzetti.
10.	Incubare per 45 +/-10 min a temperatura ambiente (18-26°C). La densità ottica (OD) ottimale per lo standard a concentrazione più elevata deve essere compresa tra 2.0 - 2.8 con un bianco <0.2. Il tempo di incubazione suggerito sopra è stato stabilito durante la fase di sviluppo del dosaggio. Ciascun laboratorio deve stabilire il proprio tempo di incubazione ottimale sulla base delle proprie condizioni ambientali (cioè temperatura, orario, ecc). Trascorsi 30 minuti dall'inizio dell'incubazione, occorre leggere periodicamente le OD della micropiastra (ad intervalli di 5 minuti) prima di aggiungere la soluzione di stop, in modo tale da assicurare un adeguato sviluppo del colore (>2.0 OD).
11.	Aggiungere 50 µl di STOP (soluzione di arresto, tappo bianco) in tutti i pozzetti.
12.	Misurare subito l'assorbanza a 490 nm avendo come riferimento la lunghezza d'onda di 630 nm, se possibile.

8) CALCOLO DEI RISULTATI

Leggere le densità ottiche (OD) di ciascun pozzetto su un lettore di micropiastre. Sottrarre la OD del bianco da quelle di STD, CTRL e campioni. Costruire la curva di calibrazione dai valori di OD degli standard. Usare software di calcolo disponibili in commercio oppure carta millimetrata. Calcolare la concentrazione dei campioni da questa curva di calibrazione. Il dosaggio qui presentato è stato valutato con l'algoritmo 4PL. Metodi di calcolo delle curve differenti, devono essere valutati dall'utilizzatore.

Typical STD-curve:

Vedi capitolo 8) delle istruzioni in lingua inglese.

Il foglio di controllo di qualità fornito insieme al kit mostra i risultati ottenuti al rilascio finale di ogni kit dal Controllo di Qualità (QC). I valori di densità ottica ottenuti dagli utilizzatori possono essere differenti a causa di vari fattori e/o alla diminuzione nell'intensità del segnale derivata dal decadimento naturale del kit. In ogni caso, questo aspetto non incide sulla validità dei risultati finché la densità ottica del calibratore con la concentrazione più alta, sia superiore a 1,00.

9) CARATTERISTICHE DEL DOSAGGIO

Range di normalità:	Mediana: donne = 0.37 pmol/l (n = 635); uomini = 0.46 pmol/l (n = 394) I valori normali e i dati sulla precisione (capitolo 10) sono stati ricavati da campioni di siero. Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca i propri intervalli di riferimento in base alla popolazione esaminata
Range standard:	0; 0.125; 0.25; 0.5; 1; 2 pmol/l
Conversione da pg/ml a pmol/l:	1 pg/ml = 0.05 pmol/l (MW: 20 kD)
Volume del campione:	100 µl di plasma-EDTA, plasma-eparina, siero o surnatanti di colture cellulari
Sensibilità:	(0 pmol/L + 3 SD): 0.02 pmol/L
Tempo di incubazione:	18-24 ore / 1 ora / 30 min

Per ulteriori informazioni sulla caratteristiche del dosaggio si prega di visitare il sito web www.bmgrp.com/products/assay_characteristics/sample_stability o il distributore autorizzato locale.

10) PRECISIONE

Intra-Saggio: 2 campioni a concentrazioni sono stati dosati 16 volte per valutare la precisione intra-saggio.

Inter-Saggio: 2 campioni a concentrazioni sono stati dosati in 10 esperimenti diversi per valutare la precisione inter-saggio.

Intra-Saggio (n=16)		
Media (pmol/L)	0.45	0.68
SD	0.04	0.06
CV%	8	9

Inter- Saggio (n=10)		
Media (pmol/L)	1.60	1.42
SD	0.09	0.05
CV%	6	3

11) ACCORGIMENTI TECNICI

- Non mescolare o sostituire i reattivi di lotti differenti.
- Non mescolare tra loro i tappi di differenti reattivi.
- Non usare reattivi oltre la loro data di scadenza.
- Proteggere i reattivi dalla luce solare diretta.
- Le soluzioni di AMPLIFIER A e B devono essere incolore.
- Per assicurare l'ottenimento di risultati accurati, far aderire bene il copripiastra adesivo durante le incubazioni.
- Evitare la formazione di schiuma nel mescolare i reattivi.

12) PRECAUZIONI

Tutti i componenti del kit di origine umana sono stati testati con dosaggi di 3a generazione per HIV-Ab e HBsAg e sono risultati essere negativi. Nonostante ciò, tali componenti devono essere manipolati e smaltiti come materiale potenzialmente infetto. Tutti i reattivi liquidi contengono 0.01% di Proclin 300 come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose. Il Proclin 300 non è tossico nelle concentrazioni utilizzate in questo kit. Può causare reazioni cutanee di tipo allergico – evitare il contatto con la pelle o gli occhi.

- Non pipettare a bocca.
- Non mangiare, bere, fumare o usare cosmetici nei luoghi dove sono manipolati i reattivi.
- Evitare qualsiasi contatto con i reattivi utilizzando guanti monouso.
- La soluzione di arresto contiene acido solforico. L'acido solforico è irritante per gli occhi e la pelle. Lavare con acqua in caso di contatto. Evitare il contatto con la pelle e le mucose. Possibili irritazioni – Lavare con acqua dopo il contatto!!

13) BIBLIOGRAFIA

Vedi capitolo 13) delle istruzioni in lingua inglese.

1) INTRODUCCION

El sRANKL, activador del receptor soluble del ligando del Factor Nuclear (NF)- κ B (también conocido como ligando de la Osteoprotegerina, OPGL) es un miembro de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) y es el principal factor estimulador de la formación de osteoclastos maduros y es esencial para su supervivencia. El RANKL es producido a partir de la líneas celulares osteoblásticas y linfocitos T activados. Activa su receptor específico RANK que se encuentra en los osteoclastos y las células dendríticas. Sus efectos son impedidos por la OPG (comparar BI-20402 OPG ELISA), que es liberada por varios tejidos y actúa como un antagonista del receptor soluble endógeno. Ya que las concentraciones de sRANKL soluble en suero son bastante bajas en muestras normales se utiliza un sistema potencializador adicional en este kit de ELISA.

Indicaciones

- Osteoporosis Postmenopausica y senil
- Osteoporosis inducida Glucocorticoides
- Enfermedades con actividad de resorción local aumentada
- Artritis
- Oncología

2) CONTENIDO DEL KIT

CONT	COMPONENTES DEL KIT	CANTIDAD
PLATE	Tiras de micropocillos recubiertas de OPG recombinante humana, incluidas en un soporte.	12 x 8 tests
WASHBUF	Tampón de lavado concentrado 20x, tapón transparente	1 x 50 ml
AB	Anticuerpo cabra policlonal biotinilado anti sRANKL, tapón verde, listo para usar.	1 x 11 ml
STD	Estándares, (0; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 pmol/l), tapón blanco, liofilizados.	6 viales liofilizados
CTRL	Control, tapón amarillo, liofilizado, consultar en la etiqueta la concentración exacta tras reconstitución.	1 vial liofilizado
CONJ	Conjugado, (estreptavidina-fosfatasa alcalina), tapón ámbar, lista para usar.	1 x 22 ml
AMPLIFIER A	Solución de enzima tamponada y sales inorgánicas con violeta de tetrazolium, tapón azul, en un frasco gotero, lista para usar.	1 x 13 ml
AMPLIFIER B	Solución de NADPH estabilizada, tapón rojo, en un frasco gotero, lista para usar.	1 x 13 ml
STOP	Solución de parada, tapón blanco, lista para usar.	1 x 7 ml

3) MATERIAL ADICIONAL ICLUIDO EN EL KIT

- 2 tiras adhesivas de plástico
- protocolo QC
- Hoja con el esquema de la placa
- Manual de instrucciones

4) MATERIAL AND EQUIPAMIENTO NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

- Pipetas de precisión calibradas para dispensar 50 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 300 μ l y puntas desechables
- Lector de Elisa para absorbancias de 490 nm.
- Papel gráfico o software para el cálculo de resultados
- Se recomienda la utilización de lavador automático de placas
- Agua destilada o desionizada
- Incubador con agitación horizontal a 300-500 rpm

5) REACTIVOS Y PREPARACION DE MUESTRA

Todos los reactivos en el kit son estables a 4°C (2-8°C) hasta la fecha de caducidad establecida en la etiqueta de cada reactivo.

Preparación de la muestra:

Recoger muestras de sangre venosa utilizando tubos de recogida de muestra estandarizados para suero o plasma. Se recomienda utilizar separación de plasma o suero por centrifugación tan pronto como sea posible (ej: 20 min a 2000 x g preferiblemente a 4°C (2-8°C)). Si esto no es posible almacene las muestras a 4°C (2-8°C) antes de la centrifugación (hasta un día). La muestra de suero o plasma recogida deberá ser medida tan pronto como sea posible. Para mantener las alícuotas almacenadas durante más tiempo se pueden congelar a -25°C ó a baja. Todas las muestras deberán tener únicamente 4 ciclos de congelación-descongelación. Muestras que se encuentren lipémicas o hemolizadas pueden dar resultados erróneos. Las muestras deberán ser mezcladas bien antes de cada ensayo. Para sobrenadante de cultivo celular la curva estándar normal se puede usar.

Las muestras con resultados por encima del estándar más alto (2 pmol/l) se deben de diluir 1:10 con WASHBUF diluido y analizadas de nuevo.

Para información adicional sobre estabilidad de la muestra por favor visite nuestra página web www.bmgrp.com/products/assaycharacteristics/sample_stability o contacte con nuestro Servicio al cliente por e-mail export@bmgrp.at o por teléfono +43/1/29107-45.

Reconstitución/ Manipulación:

STD (Standards) y CTRL (Control): Cada uno en 700 µl de agua desionizada o destilada a temperatura ambiente (18-26°C) durante 15 min. Los estándares y controles reconstituídos son estables a -20°C hasta la fecha de caducidad marcada en la etiqueta, evitar ciclos de congelación descongelación.

WASHBUF (Tampón de lavado): Diluir el concentrado 1:20 (e.g. 50 ml WASHBUF + 950 ml de agua destilada). Los cristales en el tampón de concentrado pueden disolverse a temperatura ambiente. El tampón es estable a 4°C (2-8°C) hasta la fecha de caducidad marcada en la etiqueta. Emplear solo WASHBUF diluido para el ensayo.

AMPLIFICADOR A/B: El amplificador se suministra en un frasco gotero listo para usar. La contaminación del amplificador con la ubicua fosfatasa alcalina (arañazos, sudor, etc) puede disminuir la calidad de los resultados. Por esta razón, no se recomienda quitar la tapa de los frascos goteros!

Recomendación: extraer únicamente la cantidad necesaria del amplificador A o B de sus frascos goteros correspondientes, e incluirla en sus respectivos viales limpios con calibración (una gota se corresponde aproximadamente con 50 µl) y añadir 100 µl por pocillo. No devolver el líquido sobrante a los frascos goteros.

6A) PRINCIPIO DEL ENSAYO:

Ver capítulo 6A) principios del ensayo de la versión inglesa del manual de instrucciones del ensayo.

6B) PRINCIPIO DE LA AMPLIFICACIÓN:

Ver capítulo 6B) principios de la amplificación de la versión inglesa del manual de instrucciones del ensayo.

7) PROTOCOLO DEL ENSAYO

Todos los reactivos y las muestras deben estar a temperatura ambiente (18-26°C) antes de utilizarse en el ensayo.

Marcar la posición de BLAN/STD/MUES/CTRL (Blanco/estándar/muestra/Control) en la hoja del protocolo.

Sacar las tiras con los micropocillos de la bolsa de aluminio, y emplear como mínimo un pocillo como blanco. Almacenar las tiras no utilizadas en la bolsa de aluminio con desecante a 4°C (2-8°C). Las tiras son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

1. Añadir 100 µl de STD/MUES/CTRL (Estándar/Muestra/Control) por duplicado en sus respectivos pocillos, excepto para el blanco.
2. Añadir 100 µl de AB (anticuerpo biotinilado anti sRANKL, tapón verde) en cada pocillo, excepto para el blanco, agitar suavemente con movimientos circulares.
3. **Tapar con cuidado con las hojas adhesivas e incubar durante la noche (18-24h) a 18-26°C, en un agitador de placas automático (300-500 rpm).**
4. Aspirar y lavar los pocillos 5x con 300 µl de WASHBUF diluido (Tampón de lavado), eliminar el WASHBUF remanente golpeando suavemente la placa sobre papel absorbente después del último lavado.
5. Añadir 200 µl de CONJ (Conjugado, tapón ámbar) a cada pocillo, excepto para el blanco.
6. **Tapar con cuidado con las hojas adhesivas e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente (18-26°C).**
7. Aspirar y lavar los pocillos 5x con 300 µl de WASHBUF diluido (Tampón de lavado), eliminar el WASHBUF remanente golpeando suavemente la placa sobre papel absorbente después del último lavado.
8. Añadir 100 µl de AMPLIFIER A (tapón azul) a cada pocillo.
9. Añadir 100 µl de AMPLIFIER B (tapón rojo) a cada pocillo.
10. **Incubar durante 45 +/- 10 min a temperatura ambiente (18-26°C).**
La OD óptima para el estándar más alto en el ensayo deberá encontrarse entre 2.0-2.8 con un blanco de < 0.2. El tiempo de incubación sugerido arriba se ha establecido durante el desarrollo del ensayo. Cada laboratorio deberá de establecer su tiempo de incubación óptimo dependiendo de sus condiciones (ej: temperatura, tiempo...etc). Después de 30 min, el ensayo deberá de leerse periódicamente (en un intervalo de 5 min) antes de añadir la solución de parada para asegurar que se produzca un desarrollo de color adecuado (> 2.0 OD).
11. Añadir 50 µl de solución de parada (Stop solution, tapón blanco) a cada pocillo.
12. Medir la absorbancia inmediatamente a 490 nm y si fuera posible con un filtro de referencia de 630 nm.

8) CALCULO DE RESULTADOS

Leer la densidad óptica (OD) de todos los pocillos en un lector de placas. Substraer el OD del blanco de todos los valores de OD de los estándares, controles y muestra. Construir la curva de estándares a partir de los OD de los estándares. Utilizar un software comercialmente disponible ó un papel de gráfica. Obtener la concentración de muestra a partir de esta curva de estándares. El ensayo se ha evaluado con un algoritmo 4PL. El usuario debe de evaluar diferentes métodos de ajuste. Se recomienda establecer los valores de normalidad propios del laboratorio.

Typical STD-curve:

Ver capítulo 8) calculo de resultados del ensayo de la versión inglesa del manual de instrucciones del ensayo.

El certificado del control de calidad que se suministra con el kit muestra los resultados del último control de calidad que se realiza antes de la liberación del cada kit. Los datos de la densidad óptica obtenidos por los clientes pueden diferir debido a diversos factores y/o debido a una disminución normal de la intensidad de la señal a lo largo de la vida media. Sin embargo, esto no afecta a la validez de los resultados siempre que se obtenga un valor de 1,0 para la densidad óptica del estándar de concentración más elevada.

9) CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Rango Normal:	Mediana: mujeres = 0,37 pmol/l (n = 635); hombres = 0,46 pmol/l (n = 394) Los valores de normalidad y de precisión (capítulo 10) se obtuvieron con muestras de suero humano..Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos de normalidad.
Rango estándar:	0; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 pmol/l.
Factor de conversión de pg/ml a pmol/l:	1 pg/ml = 0.05 pmol/l (MW: 20 kD)
Volumen de la muestra:	100 µl EDTA plasma , plasma heparinizado, suero o sobrenadante de cultivos celulares
Límite de Detección:	(0 pmol/l + 3 SD): 0,02 pmol/l
Tiempo de Incubación:	18-24 h / 1 h / 30 min

Para más información en las características del ensayo por favor visite nuestra página web www.bmgrp.com/products/assaycharacteristics o contacte con nuestro servicio de atención al cliente por e-mail export@bmgrp.at o por teléfono +43/1/29107-45.

10) PRECISION

Intra-Ensayo: Para valorar la precisión intra-ensayo se analizaron 16 replicados de 2 muestras de concentraciones conocidas

Inter-Ensayo: Para valorar la precisión inter-ensayo se analizaron 2 muestras de concentraciones conocidas en 10 ensayos

Intra-Ensayo (n=16)		
Media (pmol/l)	0,45	0,68
SD	0,04	0,06
CV%	8	9

Inter-Ensayo (n=10)		
Media (pmol/l)	1,60	1,42
SD	0,09	0,05
CV%	6	3

11) OBSERVACIONES TECNICAS

- No mezclar o sustituir reactivos procedentes de diferentes lotes o fabricantes.
- No mezclar los tapones de los viales de diferentes reactivos o de reactivos de diferentes lotes.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad.
- Proteger los reactivos de la acción directa de la luz solar.
- Las soluciones de amplificación deberían ser incoloras.
- Para asegurar unos resultados más exactos, tapar adecuadamente la placa con el papel adhesivo durante los pasos de incubación.
- Evitar la formación de espuma al mezclar los reactivos.

12) PRECAUCIONES

Todos los componentes de procedencia humana fueron testados con ensayos de 3ª generación frente a la presencia de anticuerpos frente a VIH y frente al antígeno de superficie de la Hepatitis B; con resultado negativo. Sin embargo, deberían manipularse y eliminarse como si se tratara de material potencialmente infeccioso. Todos los reactivos líquidos contienen Proclina 300 al 0.01% como conservante. Evitar el contacto con la piel ó con las membranas mucosas. La Proclina 300 no es tóxica en las concentraciones empleadas en este kit. Puede provocar reacciones alérgicas en la piel, evitar el contacto con la piel ó los ojos.

- No pipetear con la boca.
- No comer o beber o aplicarse cosméticos en las zonas de manipulación de los reactivos.
- Evitar el contacto con los reactivos utilizando guantes.
- La solución de parada contiene ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico es irritante para los ojos y la piel. Enjuagar con abundante agua si se produce contacto. Evitar el contacto con la piel y con las membranas mucosas. Puede presentarse irritación. Si tiene lugar un contacto, enjuagar con abundante agua.

13) LITERATURA

Ver capítulo 13) referencias bibliográficas de la versión inglesa del manual de instrucciones del ensayo.

SYMBOLS



Expiry date / Verfallsdatum / Date de péremption / Data di scadenza / Fecha de caducidad / Data de validade / Uiterste gebruiksdatum / Udløbsdato / Utgångsdatum / Termin Ważności / Lejárati idő / Doba expirácie / Doba expirace



Consider instructions for use / Bitte Gebrauchsanweisung beachten / Consultez la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las instrucciones de utilización / Consulte as instruções de utilização / Raadpleeg de gebruiksaanwijzing / Se brugsanvisningen / Läs anvisningarna före användning / Proszę przeczytać instrukcję wykonania / Vegyük figyelembe a használati utasításban foglaltakat / Postupujte podľa pokynov na použitie / Postupujte dle návodu k použití



In vitro Diagnostic Medical Device (for in Vitro Diagnostic Use) / In vitro Diagnostikum (zur In-vitro-Diagnostik) / Dispositif médical de diagnostic in vitro (Pour usage diagnostique in vitro) / Dispositivo medico per diagnostica in vitro (per uso diagnostico in vitro) / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro (para uso diagnóstico in vitro) / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro (Para utilização de diagnóstico "in vitro") / Medisch hulpmiddel voor diagnostiek in vitro (Voor diagnostisch gebruik in vitro) / Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik (Udelukkende til in vitro diagnostisk anvendelse) / Medicinteknisk produkt avsedd för in vitro-diagnostik (För in vitro-diagnostiskt bruk) / Wyrób medyczny do Diagnostyki In Vitro / In vitro orvosdiagnosztikai termék / In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určené pre diagnostiku „in vitro“) / In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určeno pro diagnostiku „in vitro“)



Lot-Batch Number / Charge-Chargennummer / Lot-Code du lot / Lotto-Numero di lotto / Lote-Código de lote / Lote-Código do lote / Lot-Partijnummer / Lot-Batchkode / Lot-Satskod / Numer serii / Lot-Batch szám / Číslo šarže / Číslo šarže



Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por / Vervaardigd door / Fabrikation af / Tillverkad av / Wyprodukowane pr / Gyártotta / Vyrobené / Vyrobeno



Catalogue Number / Bestellnummer / Numéro de référence / Numero di riferimento / Número de referencia / Número de referência / Referentienummer / Referencenummer / Katalognummer / Numer katalogowy / Katalógusszám / Katalógové číslo / Katalogové číslo



Store at between / Lagerung bei zwischen / Conserver à entre / Conservare a tra / Conservar a temp. entre / Armazene a entre / Bewaar bij tussen / Opbevares mellem / Förvaras vid / Przechowywać w / Tároljuk között / Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí



Contains sufficient for x tests / Inhalt ausreichend für x Tests / Contient suffisant pour x tests / Contenido suficiente per x test / Contiene suficiente para x pruebas / Contém suficiente para x testes / Bevat voldoende voor x bepalingen / Indeholder tilstrækkeligt til x prøver / Innehållet räcker till x analyser / Zawartość na x testów / Tartalma X teszt elvégzésére elegendő / Obsahuje materiál pre x testov / Obsahuje materiál pro x testů

BI-20452 ampli sRANKL human

ASSAY PROTOCOL AND CHECKLIST

PREPARATION OF REAGENTS:

- ☐ Bring all reagents to room temperature (18-26°C).
- ☐ Prepare reagents and samples as instructed.
- ☐ Bring unused and prepared components to the storage temperature mentioned in the package insert.
- ☐ Take microtiter strips out of the alu bag and mark positions on the protocol sheet.

TEST PROCEDURE:

- ☐ Step 1) Pipette 100 µl STD/SAMPLE/CTRL (standard/sample/control) into each well, except blank.
- ☐ Step 2) Add 100 µl AB (biotinylated anti sRANKL ab, green cap) into each well except blank, swirl gently.
- ☐ **Step 3) Cover tightly and incubate over night (18-24h) at room temperature (18-26°C) while shaking on an automatic plate shaker (300-500 rpm).**
- ☐ Step 4) Aspirate and wash wells with 300 µl WASHBUF (Wash buffer) five times. Remove remaining buffer by hitting plate against paper towel.
- ☐ Step 5) Add 200 µl CONJ (Conjugate, amber cap) into each well except blank.
- ☐ **Step 6) Cover tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C).**
- ☐ Step 7) Aspirate and wash wells with 300 µl WASHBUF (Wash buffer) five times. Remove remaining buffer by hitting plate against paper towel.
- ☐ Step 8) Add 100 µl Amplifier A (blue cap) into each well.
- ☐ Step 9) Add 100 µl Amplifier B (red cap) into each well.
- ☐ **Step 10) Incubate for 45 +/-10 min at room temperature (18-26°C).**

The optimal OD for the highest standard in the assay should recover between 2.0 - 2.8 with a blank of <0.2. The suggested incubation time above was established during the development of the assay. Each laboratory should establish its own optimal incubation time based on their conditions (i.e. temperature, time, etc). After 30 minutes, the assay should be read periodically (at 5 minute intervals) prior to adding stop solution to ensure that adequate color development (>2.0 OD) is achieved.
- ☐ Step 11) Add 50 µl STOP (Stop solution, white cap) into each well.
- ☐ Step 12) Measure absorbance immediately at 490 nm with reference 630 nm, if available.