

ZYMUTEST uPA Antigen

ARK013A

(One step ELISA method for the assay of
Human Urokinase-type Plasminogen Activator Antigen)



Manufactured By: HYPHEN BioMed

For in vitro use only

For research use only

Last revision: 15/04/2008

INTENDED USE:

The ZYMUTEST uPA kit is a one step, two-site immuno-assay for measuring human urokinase- Plasminogen Activator (uPA) in plasma, or in any fluid where uPA can be present.

ASSAY PRINCIPLE:

First, the immunoconjugate, which is a mixture of 2 monoclonal antibodies specific for uPA coupled to horse radish peroxidase (HRP), is introduced into the microwells coated with another monoclonal antibody specific for uPA (1). Then, the diluted tested sample is immediately introduced, and the immunological reaction starts. When present, uPA binds onto the monoclonal antibody coated solid phase through one epitope, and fixes the monoclonal antibodies coupled to HRP by other epitopes. Following a washing step, the peroxidase substrate, 3,3',5,5' – Tetramethylbenzidine (TMB), in presence of Hydrogen Peroxide (H₂O₂), is introduced and a blue colour develops. When the reaction is stopped with Sulfuric Acid, a yellow colour is obtained. The amount of colour developed is directly proportional to the concentration of human uPA in the tested sample.

TEST SAMPLE:

- Trisodium Citrate or Na₂ EDTA anticoagulated human plasma.
- Any biological fluid where uPA: Ag must be measured.

REAGENTS:

1. **COAT:** Micro ELISA plate, containing 12 strips of 8 wells, coated with a murine monoclonal antibody specific for human uPA, then stabilised; the plate is packed in an aluminium pouch hermetically sealed in presence of a desiccant.
 2. **SD:** 2 vials containing 50ml of **F-Sample Diluent**, ready to use.
 3. **Std:** 3 vials of **(h) uPA Standard**, lyophilised. When restored with 2 ml of F-Sample Diluent, a solution containing of recombinant human uPA is obtained. Each vial, when restored with 2 ml of **F-Sample diluent (SD)**, allows obtaining the calibrator plasma. The exact uPA-Ag concentration is indicated on the flyer provided in the kit.
 4. **CI:** 1 vial containing **1 ml** of lyophilised **Plasma Control I (high) (UTA)** (human plasma).
 5. **CIi:** 1 vial containing **1 ml** of lyophilised **Plasma Control II (low) (UTA)** (human plasma).
- Nota:** The uPA concentrations and acceptancy ranges for controls can vary from lot to lot, and are indicated on the flyer provided in the kit.
6. **IC:** 3 vials of **anti-(h)-uPA-HRP immunoconjugate**, a mixture of 2 monoclonal antibodies coupled to HRP, lyophilised.
 7. **CD:** 1 vial of 25 ml of **Conjugate Diluent**, ready to use.
 8. **WS:** 1 vial of 50 ml of 20 fold concentrated **Wash Solution**.
 9. **TMB:** 1 vial of 25 ml peroxidase substrate: 3,3',5,5' – **Tetramethylbenzidine** containing hydrogen peroxide. Ready to use.
 10. **SA:** 1 vial of 6 ml of **0.45M Sulfuric acid** (Stop solution). Ready to use.

Nota: Use only components from kits with the same lot number. Do not mix components from different lots of kits when running the assay.

REAGENTS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED:

- **8-channel** or repeating **pipette** allowing dispensing 50-300 µl.
- **1-channel pipettes** at variable volumes from 0 to 20 µl, 20 to 200 µl and 200 to 1000 µl.
- **Micro ELISA plate** washing equipment and shaker.
- Micro ELISA plate **reader** with a wavelength set up at 450 nm.
- Distilled water.

REAGENTS PREPARATION, STORAGE AND STABILITY:

In their original packaging box, before use, when stored at 2-8°C, the unopened reagents are stable until the expiration date printed on the box.

1. **Micro ELISA plate:** open the plastic pouch and take off the required amount of 8 well strips for the test series. When out of the pouch, the strips must be used within 30 minutes. Unused strips can be stored at **2-8°C** for **4 weeks** in their original aluminium pouch, in presence of the desiccant, hermetically closed and protected from any moisture, and stored in the provided microplate storage bag (minigrip).
2. **F-Sample Diluent:** It is ready to use. When open, it can be used for **4 weeks**, stored at **2-8 °C**, and provided that any bacterial contamination is avoided during use. This reagent contains 0.05% Kathon CG.
3. **(h) uPA Standard:** restore each vial with **2 ml** of F-Sample Diluent. This solution is stable for at least **8 hours** at room temperature.
4. **Plasma Control I** (human plasma, **high, UTA**): restore with **1 ml** distilled water.
5. **Plasma Control II** (human plasma, **low, UTA**): restore with **1 ml** distilled water.

Nota: when restored, uPA controls are stable for **8 hours** at room temperature, **24 hours** at **2-8°C** or **2 months** frozen at **-20°C** or below.

Warning: Plasma uPA controls (4&5) are prepared with normal human plasma. This latter was tested with registered methods and found negative for HIV antibodies, HBs Ag and HVC antibodies. However, no assay may warrant the total absence of infectious agents. Any product of human origin must then be handled with all the required cautions, as being potentially infectious.

6. **Anti-(h)-uPA-HRP immunoconjugate:** each vial must be restored with **2 ml** of **Conjugate Diluent**. Let the pellet to be completely dissolved before use, and shake the vial gently in order to homogenize the content. The restored conjugate is stable for at least **24 hours** at room temperature or for at least **4 weeks** at **2-8°C**.
7. **Conjugate Diluent:** It is ready to use. When open, it can be used for **4 weeks**, stored at **2-8 °C**, and provided that any bacterial contamination is avoided during use. This reagent contains 0.05% Kathon CG.
8. **Wash Solution:** Incubate the vial for 15-30 minutes in a water bath at **37°C** until complete dissolution of solids, when present. Shake the vial and dilute the amount required 1:20 in distilled water (the 50 ml contained in the vial allow preparing 1 liter of Wash Solution). The Wash Solution must be stored at **2-8°C** in its original vial and used within **4 weeks** following opening. The diluted Wash Solution must be used within **7 days**, when protected from any contamination and stored at **2-8°C**. This reagent contains 0.05% Kathon CG.
9. **TMB substrate:** It is ready to use. When open, it can be used for **4 weeks**, stored at **2-8°C**, and provided that any bacterial contamination is avoided during use.
10. **Stop solution:** It is ready to use.
Cautions: Sulfuric acid, although diluted to 0.45M is caustic. As for any similar chemical, handle Sulfuric acid with great care. Avoid any skin and eye contact. Wear protection glasses and gloves when handling.

Nota: Bring the kit at room temperature, at least 30 min. before use. Store the unused reagents at 2-8°C.

PROCEDURE:

Specimen collection:

Blood (9 vol.) must be collected on 0.109M citrate anticoagulant (1 vol.) ; plasma supernatant is decanted following a 20 min. centrifugation at 2,500 g; citrated plasma should be tested within 8 hours or stored frozen at **-20°C** or below for up to 6 months, and thawed for 15 min. at 37°C just before use. Thawed specimen must be tested within 4 hours.

In order to avoid diurnal variations, uPA should be tested preferentially on fasting samples, collected at morning.

EDTA collected human plasma may also be used. Conditions of storage are the same than those for citrated plasma.

D750.02/ZY/013A



6560 Gove Court · Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com

Tested plasma or sample or controls:

The sample must be tested diluted **two fold (1:2)** in F-Sample Diluent. For expected uPA concentrations > 20 ng/ml, plasma or samples can be tested at a higher dilution, **1:4, or more**. Undiluted samples can be used for expected low uPA : Ag concentrations.

Plasma Controls I and II must be tested diluted **two fold (1:2)**, with F-Sample Diluent.

Calibration:

Using the uPA standard provided in the kit, with a uPA Ag concentration "C" indicated, for each lot of reagents, on the flyer provided in the kit, prepare the following standard solutions:

uPA concentration (ng/ml)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Vol. of uPA Standard	1 ml	0.5 ml	0.25 ml	0.1 ml	0.05 ml	0 ml
Vol. of F-Sample Diluent	0 ml	0.5 ml	0.75 ml	0.9 ml	0.95 ml	1 ml

Mix gently for a complete homogenisation.

The standard dilutions are stable for at least **6 hours** at room temperature.

Assay procedure:

Remove the required number of strips from the aluminium pouch, for the series of measures to be performed. Then put the strips in the frame provided. In the different wells of the micro ELISA plate, introduce the reagents and perform the various assay steps as indicated on the following table:

Reagent	Volume	Procedure
Conjugate anti (h)-uPA-HRP (Restored with 2 ml of Conjugate Diluent)	50 µl	Introduce the Anti-(h)-uPA- HRP immunoconjugate in the micro ELISA plate wells
uPA Standard or tested sample or F- Sample Diluent (blank)	200 µl	Introduce immediately the standard solutions or the tested samples in the corresponding micro ELISA plate well
Mix gently on a plate shaker or manually and incubate for 1 hour at room temperature		
Wash Solution (20 fold diluted in distilled water)	300 µl	Proceed to 5 successive washings using the washing instrument. (a)
TMB/H ₂ O ₂ Substrate	200 µl	Immediately after the washing, introduce the substrate into the wells. Nota: The substrate distribution, row by row, must be accurate and at exact time intervals (b, c).
Incubate for exactly 5 minutes at room temperature (18-25 °C) (c)		
0.45 M Sulfuric Acid (5)	50 µl	Following exactly the same time intervals than for the addition of substrate, stop the colour development by introducing the 0.45 M sulfuric acid (b).
Wait for 10 minutes in order to allow the colour to stabilize and measure absorbance at 450 nm (A450) . Subtract the blank value (d).		

Nota:

- Never let the plates empty between the addition of the reagents or following the washing step. The next reagent must be added within 3 minutes, in order to prevent the plate from drying, which could damage the immobilised components. If necessary, keep the plate filled with Wash Solution and empty it just before the introduction of the next reagent. The washing instrument must be adjusted in order to wash the plates gently, and to avoid a too drastic emptying, which could lower plate reactivity.
- For addition of the TMB substrate, the time interval between each row must be accurate and exactly determined. It must be the same when stopping the reaction.
- Avoid letting the plate in the bright sunlight during incubations and more particularly during colour development. A micro-ELISA plate shaker can be used.
- For bichromatic readings, a reference wavelength at 690 nm or at 620 nm can be used.

RESULTS:

On a linear graph paper plot the **uPA: Ag concentrations** on abscissae and the corresponding absorbances (A450) on ordinates.

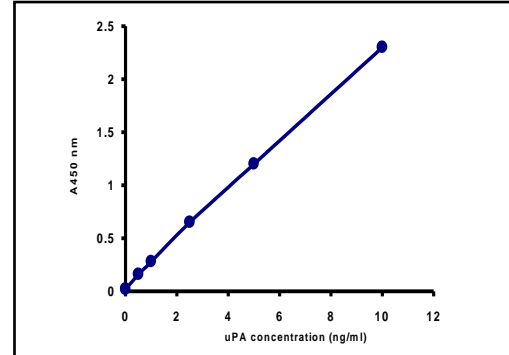
From the calibration curve obtained, deduce the uPA:Ag concentration for the tested sample. For obtaining the uPA:Ag concentration in this sample, the value read on the calibration curve must be multiplied by the dilution factor (i.e. **2, 4,.....**), or directly if undiluted samples are used.

For controls I and II, the concentrations measured must be multiplied by **2**.

Alternatively, an ELISA software (i.e. Dynex, Biolise, etc...) can be used for the calculation of concentrations.

EXAMPLE OF CALIBRATION CURVE:

The calibration curve below is an example only. Users must construct their own calibration curve, obtained using their standard dilutions.



EXPECTED RANGE:

- The normal uPA: Ag concentration in normals is from 0 to 5 ng/ml (2).

BIOCHEMISTRY:

Urinary type Plasminogen Activator (uPA or urokinase) is a 55 Kd glycoprotein, synthesised mainly by kidney cells, by fibroblasts, by pneumocytes but also by tumour cells, as a single chain glycoprotein. It is activated into active High Molecular Weight-uPA, by various enzymes such as plasmin, kallikrein or cathepsins. uPA binds to its receptor uPA-R, present on some normal cells (phagocytic cells, fibroblasts) and on many tumour cells. The uPA-uPA-R complex is involved in reproduction, development, hemostasis, thrombosis, neointima formation, tissue remodeling, brain function, neovascularisation and cancer progression (3,5,7). uPA may also bind to soluble forms of uPA-R (7). uPA promotes fibrinolysis by converting plasminogen to plasmin (4,6). The major inhibitor of uPA is PAI-1. In blood, the half-life of uPA is of about 8 min. in humans (4).

PATHOLOGICAL VARIATIONS:

Blood uPA levels are decreased in non-insulin dependent diabetes mellitus (2). uPA concentrations are elevated in cancer tissues, and are associated with increased malignancy. Along with the assay of PAI-1 and uPA-R, the measurement of uPA in tumour extracts (cytosols) has been described to be a very good prognostic marker for developing metastases.

APPLICATIONS:

- Measurement of uPA in plasma as a marker of fibrinolytic potential.
- Assay of uPA in cancer tissues, as a prognostic marker.

ASSAY CHARACTERISTICS:

This monoclonal antibody based assay, has homogeneous reactivity to the various forms of uPA (HMW-uPA, LMW-uPA, and uPA complexed with PAI-1).

REFERENCES:

- van Boheemen P.A., van den Hoogen C.M., Koolwisk P.: Comparison of the inhibition of Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) Activity by Monoclonal antibodies specific for uPA as Assessed by different Assays: Fibrinolysis, 1995, 9, 343-349.
- Krekora K., Vitacolonna E., Di Castelnuovo, et Al.: Decrease in urokinase type plasminogen activator (uPA) levels in patients with non insulin dependent diabetes mellitus. Fibrinolysis and Proteolysis, 1997, 11, 215-219.
- Schmitt M., Harbeck N., Thomssen C. et Al.: Clinical impact of the plasminogen activation system in tumour invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy: Thromb. Haemostas., 1997, 78, 285-296.
- van Der Kaaden M.E., Rijken D.C., van Berkel T.J.C. and Kuiper J.: Plasma clearance of urokinase type plasminogen activator. Fibrinolysis and Proteolysis, 1998, 12, 251-258.
- Blasi F.: Proteolysis Cell Adhesion, Chemotaxis, and Invasiveness are regulated by the uPA-uPA-R-PAI-1 system. Thromb. Haemostas., 1999, 82, 298-304.
- Paramo J.A., Panizo C., Montes R. et Al.: Markers of fibrinolytic potency and clotting activation in stable angina pectoris: Role of urokinase, assessment of atrioventricular differences and correlation with coronary potency. Fibrinolysis and Proteolysis, 1999, 13, 133-138.
- Schmitt H., Wilhelm O.G., Reuning U. et Al.: The urokinase plasminogen activator system as a novel target for tumour therapy. Fibrinolysis and Proteolysis, 2000, 14, 114-132.

ZYMUTEST uPA Antigen

ARK013A

(Méthode ELISA en un temps pour le dosage de l'uPA Antigène)
(Urokinase Plasminogen Activator)



Fabricant: HYPHEN BioMed

Utilisation *in vitro* exclusivement

Uniquement à usage de recherche

Dernière version: 15/04/2008

MÉTHODE :

La trousse ZYMUTEST uPA Antigen est une méthode ELISA en une étape, destinée à la mesure de l'uPA dans le plasma humain, ou tout autre milieu biologique où l'uPA est présent.

PRINCIPE :

Dans un premier temps, l'immunoconjugué, mélange de 2 anticorps monoclonaux de souris spécifiques de l'uPA et couplé à la peroxydase (HRP), est introduit dans les puits de la plaque Elisa sensibilisée par un autre anticorps monoclonal également spécifique de l'uPA. Immédiatement après, l'échantillon à tester dilué est introduit et la réaction immunologique débute. L'uPA présent dans l'échantillon se fixe sur la phase solide par un de ses épitopes, et réagit avec les autres anticorps monoclonaux couplés à la peroxydase. Après une étape de lavage, le substrat de la peroxydase, 3,3',5,5' - Tetraméthylbenzidine (TMB) en présence d'eau oxygénée (H₂O₂), est introduit dans les puits et une coloration bleue se développe. L'arrêt de la réaction par l'acide sulfurique fait virer la coloration au jaune. Cette coloration est proportionnelle à la quantité d'uPA présente dans l'échantillon testé.

ECHANTILLONS :

- Plasma humain prélevé sur anticoagulant citraté.
- Tout autre liquide biologique où l'uPA doit être mesuré.

REACTIFS:

1. **COAT : Microplaque ELISA** (Micro-ELISA plate), contenant 12 barrettes de 8 puits, sensibilisée par un anticorps monoclonal spécifique de l'uPA humain, stabilisée, et emballée dans un sachet aluminium en présence d'un déshydratant.
 2. **SD** : 2 flacons contenant 50 ml de **tampon de dilution pour échantillons** (F-Sample Diluent), prêt à l'emploi.
 3. **Std** : 3 flacons de **standard uPA** ((h) uPA Standard), lyophilisé. Chaque flacon doit être reconstitué par 2 ml de F-Sample Diluent afin d'obtenir un plasma titré en uPA humain recombinant. Le titre du plasma étalon est indiqué pour chaque lot sur le papillon fourni dans le coffret.
 4. **CI** : 1 flacon lyophilisé contenant 1 ml de **Plasma Control I (UTA), (Plasma contrôle haut)**.
 5. **CII** : 1 flacon lyophilisé contenant 1 ml de **Plasma Control II (UTA), (Plasma contrôle bas)**.
- Nota** : La concentration en uPA et l'intervalle de confiance des contrôles sont indiqués sur le papillon fourni dans le kit.
6. **IC** : 3 flacons d'**immunoconjugué** (Anti-(h)-uPA-HRP immunoconjugate), anticorps monoclonal de souris couplé à la peroxydase (HRP), lyophilisé.
 7. **CD** : 1 flacon de 25 ml de **tampon de dilution pour l'immunoconjugué** (Conjugate Diluent), prêt à l'emploi.
 8. **WS** : 1 flacon de 50 ml de **solution de lavage** (Wash Solution), 20 fois concentrée.
 9. **TMB** : 1 flacon de substrat : 3,3',5,5' - **Tetraméthylbenzidine**, contenant de l'eau oxygénée, prêt à l'emploi.
 10. **SA** : 1 flacon de 6 ml d'**acide sulfurique 0,45 M** (Stop solution), prêt à l'emploi.

Nota : Utiliser uniquement les réactifs provenant de coffrets d'un même lot. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots de kits pour effectuer un dosage.

MATERIEL NECESSAIRE ET NON FOURNI :

- **Pipettes à 8 canaux** permettant de distribuer des volumes de 50 à 300 µl.
- **Pipettes à volume variable** de 0 à 20 µl, de 20 à 200 µl et de 200 µl à 1000 µl.
- **Matériel de lavage** pour microplaques et agitateur.
- **Lecteur de microplaques** ELISA réglé à une longueur d'ondes de 450 nm.
- Eau distillée.

PREPARATION, CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS :

Dans leur emballage d'origine, avant toute utilisation et conservés à 2-8°C, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret.

1. **Micro ELISA plate** : Ouvrir le sachet aluminium et sortir le nombre de barrettes de 8 puits nécessaire pour la série de dosages à effectuer. Les barrettes sorties du

sachet aluminium doivent être utilisées dans les 30 minutes. Les barrettes non utilisées peuvent être conservées jusqu'à **4 semaines** dans leur emballage d'origine, hermétiquement refermé, en présence du déshydratant, à l'abri de l'humidité, à **2 - 8°C**, dans le sachet plastique minigrup fourni.

2. **F-Sample Diluent**: Le réactif est prêt à l'emploi. Après ouverture, il peut être conservé à **2 - 8°C**, pendant **4 semaines**, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation. Ce réactif contient 0,05 % de Kathon CG.
3. **(h) uPA Standard**: reconstitué par **2 ml** de F- Sample Diluent. Cette solution est stable au moins **8 heures** à température du laboratoire.
4. **Plasma Control I** (plasma humain, **high**, UTA): à reconstituer par **1 ml** d'eau distillée.
5. **Plasma Control II** (plasma humain, **low**, UTA): à reconstituer par **1 ml** d'eau distillée.
Nota: Une fois reconstitués, les contrôles sont stables **8 heures** à température du laboratoire, **24 heures à 2-8°C** ou **2 mois** congelés à **-20°C** ou plus.

Précautions : Les plasmas contrôles sont préparés à partir de plasma humain. Ce dernier a été testé par des méthodes enregistrées et est certifié exempt pour l'anticorps VIH, le Hbs Ag et l'anticorps VCH. Toutefois, aucune méthode ne permettant d'exclure totalement le risque d'agent pathogène, ces produits doivent être manipulés avec toutes les précautions requises pour l'utilisation de produits potentiellement infectés.

6. **Anti-(h)-uPA-HRP immunoconjugate**: chaque flacon d'immunoconjugué doit être reconstitué par **2 ml** de Conjugate Diluent au moins 15 minutes avant utilisation. Laisser la galette se dissoudre et agiter délicatement pour homogénéiser. L'immunoconjugué reconstitué est stable au moins **24 heures** à la température du laboratoire et **4 semaines à 2 - 8°C**.
7. **Conjugate Diluent**: Le réactif est prêt à l'emploi. Après ouverture, il peut être conservé à **2 - 8°C**, pendant **4 semaines**, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation. Il contient 0,05% de Kathon CG
8. **Wash Solution**: Incuber, si nécessaire, le flacon de solution de lavage dans un bain-marie à **37°C** jusqu'à totale dissolution des cristaux. Agiter le flacon et diluer la solution de lavage au 1/20 en eau distillée. Les 50 ml de solution concentrée permettent de préparer 1 litre de solution de lavage après dilution. Après ouverture, le flacon est **stable 4 semaines à 2-8°C**, à l'abri de toute contamination. La solution de lavage diluée peut être utilisée jusqu'à **7 jours** après préparation, lorsqu'elle est protégée de toute contamination et conservée à **2-8°C**. Ce réactif contient 0,05% de Kathon CG.
9. **TMB substrate**: Substrat TMB prêt à l'emploi. Après ouverture, il peut être conservé à **2 - 8°C**, pendant **4 semaines**, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation.
10. **Stop solution**: Solution contenant 0,45M d'acide sulfurique, prête à l'emploi.

Précautions : Même dilué à 0,45M, l'acide sulfurique est caustique. Comme pour tout produit chimique semblable, manipuler l'acide sulfurique avec précautions en utilisant des gants et en portant des lunettes de protection. Eviter tout contact avec la peau et les yeux.

Nota : Sortir le coffret du réfrigérateur, au moins 30 min. avant de réaliser le dosage, afin que les divers réactifs s'équilibrent à température du laboratoire. Conserver les réactifs inutilisés à 2-8°C.

MODE OPERATOIRE :

Préparation de l'échantillon :

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur du citrate trisodique 0,109 M (1 volume) ; le plasma est obtenu après 20 minutes de centrifugation à 2500 g ; le plasma citraté doit être utilisé dans les 8 heures ou conservé congelé, à **-20°C** au moins, pendant 6 mois maximum. Juste avant utilisation, décongeler le plasma pendant 15 minutes dans un bain-marie à 37°C. Le plasma décongelé est stable pendant au moins 4 heures à température du laboratoire.

Afin d'éviter toute variation nyctémérale, l'uPA doit être testé de préférence sur des échantillons prélevés le matin.

Le plasma humain prélevé sur EDTA peut aussi être utilisé. Les conditions de conservation sont les mêmes que celles préconisées pour le plasma citraté.



6560 Gove Court - Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

D.750.01/ZY/013A

www.aniara.com

Echantillons et contrôles :

Les échantillons doivent être testés dilués 2 fois (1:2) en F-Sample Diluent. Pour des concentrations d'uPA > 20 ng/ml, le plasma ou les échantillons peuvent être testés à des dilutions plus élevées, 1:4 ou plus. L'échantillon peut être testé non dilué pour des concentrations attendues d'uPA plus faibles.

Les contrôles I et II doivent être testés dilués 2 fois (1:2), en F-Sample Diluent.

Calibration :

Utiliser le standard titré reconstitué par 2 ml de F-Sample Diluent. En utilisant ce plasma, uPA standard ayant un taux "C" de uPA Ag, indiqué pour chaque lot de réactifs, sur le papillon inclus dans le coffret, préparer la gamme d'étalonnage suivante selon le tableau ci-dessous :

Concentration d'uPA (ng/ml)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Vol. d'uPA Standard	1 ml	0,5 ml	0,25 ml	0,1 ml	0,05 ml	0 ml
Vol. de F-Sample Diluent	0 ml	0,5 ml	0,75 ml	0,9 ml	0,95 ml	1 ml

Mélanger délicatement pour obtenir une solution homogène.

Les dilutions de calibration sont stables 6 heures à température du laboratoire.

Mode Opérateur :

Sortir la quantité nécessaire de barrettes de 8 puits du sachet aluminium et les placer dans le cadre fourni. Introduire les réactifs dans les puits des micro-barrettes ELISA et réaliser le dosage comme indiqué dans le tableau ci-après :

Réactif	Volume	Procédure
Conjugué anti (h)-uPA-HRP. (reconstituer avec 2 ml de Conjugate Diluent)	50 µl	Introduire l'immunoconjugué Anti-(h)-uPA-HRP dans les puits de la microplaque ELISA
uPA Standard ou échantillon à tester ou F- Sample Diluent (blanc)	200 µl	Introduire immédiatement les solutions standards ou les échantillons à doser dans les puits correspondants sur la micro plaque ELISA
Mélanger délicatement soit manuellement, soit sur un agitateur de microplaques. Incuber 1 heure à température du laboratoire (18-25°C)		
Wash solution (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation).	300 µl	Effectuer une série de 5 lavages (a).
Substrat TMB/H ₂ O ₂	200 µl	Immédiatement, introduire cette solution dans les puits (a). Nota : la répartition du substrat, barrette par barrette, doit se faire très précisément. (b, c)
Laisser la coloration se développer pendant 5 minutes à température du laboratoire. (c)		
0.45 M Sulfuric Acid (5)	50 µl	Arrêter la réaction en introduisant 0.45M d'acide sulfurique. Respecter le même temps de répartition, barrette par barrette, que celui utilisé pour le substrat. (b).
Attendre 10 minutes pour laisser stabiliser la coloration puis lire la DO obtenue à 450 nm. Soustraire les blancs (d).		

Nota:

- Ne jamais laisser les puits de la plaque ELISA vides entre l'addition des réactifs ou après les étapes de lavage afin de préserver les protéines insolubilisées. Le réactif suivant doit être ajouté dans les trois minutes afin d'éviter l'assèchement de la plaque. Si nécessaire, garder les puits remplis de solution de lavage et les vider juste avant distribution du réactif suivant. Régler le lavage de manière à effectuer un lavage doux. Une vidange trop violente des puits, lors de l'aspiration, peut endommager le coating et réduire la réactivité.
- Lors de la distribution du substrat TMB, l'intervalle de temps entre chaque rangée doit être défini et respecté avec précision. Il doit être le même lors de l'arrêt de la réaction par l'acide sulfurique.
- Éviter de laisser la plaque en pleine lumière lors des incubations et plus particulièrement lors du développement de la coloration. L'utilisation d'un agitateur pour micro-plaques ELISA est possible.
- Pour une lecture bichromatique, la longueur d'onde de référence utilisée peut être à 620nm ou à 690nm.

RESULTATS :

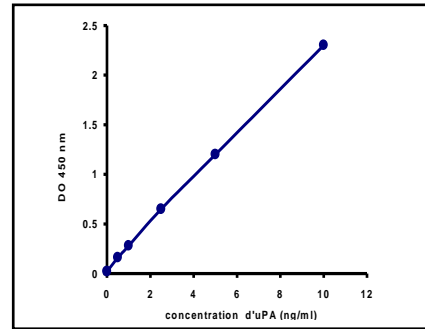
Sur papier millimétré, porter les **concentrations d'uPA** sur l'axe des abscisses et les DO correspondantes en ordonnées.

Sur la courbe ainsi obtenue, en déduire directement le taux d'uPA : Ag de l'échantillon testé. Pour obtenir le taux d'uPA dans l'échantillon, la valeur lue sur la courbe de calibration doit être multipliée par le facteur de dilution (ex : 2,.....). Il est lu directement lorsque l'échantillon est testé non dilué.

Pour les contrôles I et II, la concentration mesurée doit être multipliée par 2.

Alternativement, un logiciel spécifique (ex: Dynex, Biolise, etc...) peut être utilisé pour le calcul des concentrations.

EXEMPLE DE COURBE DE CALIBRATION :



La courbe de calibration ci-dessous est montrée uniquement à titre d'exemple. Les utilisateurs doivent systématiquement tracer la courbe correspondant aux dosages qu'ils ont effectués en utilisant leurs propres solutions standards

VALEURS ATTENDUES :

- La concentration en uPA:Ag d'un plasma normal est habituellement comprise entre 0 et 5 ng/ml.

BIOCHIMIE :

- L'activateur urinaire du plasminogène (uPA ou urokinase) est une glycoprotéine de 55 Kd, synthétisée non seulement par les cellules rénales, les fibroblastes et les pneumocytes mais aussi par les cellules tumorales sous forme d'une glycoprotéine monoclénnaire (scuPA). Il est activé en uPA de haut poids moléculaire par différentes enzymes comme la plasmine, la kallikréine ou les cathepsines. L'uPA se fixe à son récepteur uPA-R, présent sur beaucoup de cellules normales (cellules phagocytaires, fibroblastes) et sur les cellules tumorales. Le complexe uPA-uPA-R est impliqué dans la reproduction, le développement, l'hémostasie et la thrombose, la formation de la neointima des tissus, la fonction cérébrale, la neovascularisation et la progression tumorale (3,5,7). L'uPA peut aussi fixer des formes solubles de uPA-R (7). L'uPA favorise la fibrinolyse en activant le plasminogène en plasmine (4,6). L'inhibiteur majeur de l'uPA est le PAI-1. Dans le sang humain, la demi-vie de l'uPA est d'environ 8 minutes (4).

VARIATIONS PATHOLOGIQUES :

- Le taux de uPA sanguin est diminué chez les diabétiques non insulinodépendants. Les concentrations d'uPA sont élevées dans les tissus cancéreux et corrélient à l'évolution de la maladie. Parallèlement à la mesure du PAI-1 et à celle de l'uPA-R, la mesure de l'uPA dans les extraits tumoraux (cytosols) a été rapportée comme étant un bon marqueur de pronostic pour le développement de métastases.

APPLICATIONS :

- Mesure de l'uPA plasmatique comme marqueur du potentiel de fibrinolyse.
- Utilisation du dosage de l'uPA dans les tissus cancéreux, comme marqueur de pronostic d'évolution de la maladie.

CARACTERISTIQUES DU DOSAGE :

Le dosage ELISA, développé avec 3 anticorps monoclonaux spécifiques de l'uPA permet d'obtenir une réactivité identique pour les différentes formes d'uPA (HMW-uPA, LMW-uPA et l'uPA complexé au PAI-1).

REFERENCES :

- van Boheemen P.A., van den Hoogen C.M., Koolwisk P.: Comparison of the inhibition of Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) Activity by Monoclonal antibodies specific for uPA as Assessed by different Assays: Fibrinolysis, 1995, 9, 343-349.
- Krekora K., Vitaolonna E., Di Castelnuovo, et Al.: Decrease in urokinase type plasminogen activator (uPA) levels in patients with non insulin dependent diabetes mellitus. Fibrinolysis and Proteolysis, 1997, 11, 215-219.
- Schmitt M., Harbeck N., Thomssen C. et Al.: Clinical impact of the plasminogen activation system in tumour invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy: Thromb. Haemostas., 1997, 78, 285-296.
- van Der Kaaden M.E., Rijken D.C., van Berkel T.J.C. and Kuiper J.: Plasma clearance of urokinase type plasminogen activator. Fibrinolysis and Proteolysis, 1998, 12, 251-258.
- Blasi F.: Proteolysis Cell Adhesion, Chemotaxis, and Invasiveness are regulated by the uPA-uPA-R-PAI-1 system. Thromb. Haemostas., 1999, 82, 298-304.
- Paramo J.A., Panizo C., Montes R. et Al.: Markers of fibrinolytic potency and clotting activation in stable angina pectoris: Role of urokinase, assessment of atrioventricular differences and correlation with coronary potency. Fibrinolysis and Proteolysis, 1999, 13, 133-138.
- Schmitt H., Wilhelm O.G., Reuning U. et Al.: The urokinase plasminogen activator system as a novel target for tumour therapy. Fibrinolysis and Proteolysis, 2000, 14, 114-132.