

ZYMUTEST tPA – PAI-1 complexes

ARK017A

(Complete ELISA kit for measurement of tPA-PAI-1 complexes)



Manufactured By: HYPHEN BioMed

For in vitro use only

For research use only

Last revision: 14/04/2008

INTENDED USE:

The ZYMUTEST tPA-PAI-1 kit is a two-site immuno-assay for measuring complexes of human tissue plasminogen Activator (tPA) with its major inhibitor PAI-1, in plasma or in any fluid where tPA-PAI-1 complexes can be present.

ASSAY PRINCIPLE:

In a first step, the diluted tested plasma or biological fluid is introduced into a microwell coated with a highly purified monoclonal antibody specific for human tPA. When present, tPA – PAI-1 complexes are captured onto the solid phase through the tPA moiety. Following a washing step, the immunoconjugate, which is an anti-PAI-1 monoclonal antibody coupled to horse radish peroxidase (HRP), is introduced, and binds to its specific epitope on PAI-1 present in tPA-PAI-1 complexes. Following a new washing step, the peroxidase substrate, Tetramethylbenzidine (TMB) in presence of hydrogen peroxide (H₂O₂), is introduced and a blue colour develops. The colour turns yellow when the reaction is stopped with Sulfuric Acid. The amount of colour developed is directly proportional to the concentration of human tPA-PAI-1 complexes in the tested sample.

TEST SAMPLE:

- Trisodium Citrate or Na₂ EDTA anticoagulated human plasma.
- Any biological fluid where tPA-PAI-1 complexes must be measured.

REAGENTS:

1. **COAT:** Micro ELISA plate, containing 12 strips of 8 wells, coated with a highly purified murine monoclonal antibody specific for human tPA, 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. **Cal:** 3 vials of tPA-PAI-1 Calibrator, lyophilised. Each vial, when restored with 2 ml of F-Sample diluent (SD), allows obtaining the calibrator plasma. The exact tPA-PAI-1 concentration is indicated on the flyer provided in the kit.
4. **CI:** 1 vial containing 0.5 ml of lyophilised Plasma Control I (High) (human plasma).
5. **CII:** 1 vial containing 0.5 ml of lyophilised Plasma Control II (Low) (human plasma).

Nota: The tPA concentrations and acceptancy ranges for controls can vary from lot to lot, but are precisely indicated for each lot on the flyer provided in the kit.

6. **IC:** 3 vials of Anti-(h)-PAI-1-HRP immunoconjugate, a monoclonal antibody 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. **tPA-PAI-1 Calibrator:** restore each vial with 2 ml of F-Sample Diluent in order to obtain a solution of tPA-PAI-1 complexes. This solution is stable for at least 8 hours at room temperature.
4. **Plasma Control I (human plasma, High):** restore with 0.5 ml distilled water.
5. **Plasma Control II (human plasma, Low):** restore with 0.5 ml distilled water.

Nota: when restored, plasma controls I and II 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 controls I and II (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)-PAI-1-HRP immunoconjugate:** each vial must be restored with 7.5 ml of Conjugate Diluent. Let the pellet to be completely dissolved before use, and shake the vial gently in order to homogeneize 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.) by a clean venipuncture; plasma supernatant is decanted following a 20 min. centrifugation at 2,500 g; citrated plasma should be tested within 4 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.

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

In order to avoid diurnal variations, tPA-PAI-1 complexes must be preferentially measured on fasting samples, collected in the morning.

D.750.02/ZY/017A



8580 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 the F-Sample Diluent. For expected tPA-PAI-1 concentrations > 20ng/ml, plasma or samples can be tested at a higher dilution, 1:5, or 1:10, or more.

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

Calibration:

Using the tPA-PAI-1 complexes with a concentration "C" indicated, for each lot of reagents, on the flyer provided in the kit, prepare the following standard solutions.

tPA-PAI-1 concentration (ng/ml)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Vol. of tPA-PAI-1 calibrator	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
tPA-PAI-1 calibrator or tested sample or controls diluted 1:2 or F-sample diluent (blank)	200 µl	Introduce the standard solutions or the tested samples in the corresponding micro ELISA plate well (a).
Incubate for 1 hour at room temperature (18-25°C) (b)		
Wash Solution (20 fold diluted in distilled water)	300 µl	Proceed to 5 successive washings using the washing instrument (c).
Conjugate (anti PAI-1 monoclonal antibody coupled with peroxidase. Restored with 7.5 ml of Conjugate Diluent)	200 µl	Introduce the Anti-(h)-PAI-1- HRP immunoconjugate in the micro ELISA plate wells (c).
Incubate for 1 hour at room temperature (18-25°C) (b)		
Wash Solution (20 fold diluted in distilled water)	300 µl	Proceed to 5 successive washings using the washing instrument (c).
TMB/H ₂ O ₂ Substrate	200 µl	Immediately after the washing, introduce the substrate into the wells. <i>Nota:</i> The substrate distribution, row by row, must be accurate and at exact time intervals (c, d).
Incubate for exactly 5 minutes at room temperature (18-25 °C) (b)		
0.45M Sulfuric Acid	50 µl	Following exactly the same time intervals than for the addition of substrate, stop the colour development by introducing the 0.45M sulfuric acid.
Wait for 10 minutes in order to allow the colour to stabilize and measure absorbance at 450 nm (A450) (e) . Subtract the blank values		

Nota:

- The two fold dilutions can be performed directly into the reactive well by introducing 100 µl of F-sample diluent and 100 µl of tested plasma sample or control.
- Avoid letting the plate in the bright sunlight during incubations and more particularly during colour development. A micro-ELISA plate shaker can be used.
- 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 immobilized 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.
- For bichromatic readings, a reference wavelength at 690 nm or at 620 nm can be used.

RAPID PROCEDURE (ONE STEP METHOD):

The assay can be performed with a one step method. In this case, the calibration curve is unchanged (from 0 to C), the tPA-PAI-1 calibrator being reconstituted with **2 ml** of F-Sample Diluent.

The immunoconjugate must be reconstituted with **2 ml** of Conjugate Diluent.

Tested plasma must be assayed at a **two fold (1:2)** dilution or at higher dilutions in F-Sample Diluent. In the microwell, 50µl of immunoconjugate (anti-(h)-PAI-1 peroxidase) are first introduced, then 200µl of the diluted tested specimen. Following a 1 hour incubation at room temperature and a washing step, the colour development with TMB is allowed to develop for 5 min, and is then stopped with 50 µl of sulfuric acid. The calibration curve is drawn as indicated in results. The tPA-PAI-1 concentrations read must be multiplied by the sample dilution factor.

RESULTS:

On a linear graph paper plot the **tPA-PAI-1 concentrations** on abscissae and the corresponding absorbances on ordinates.

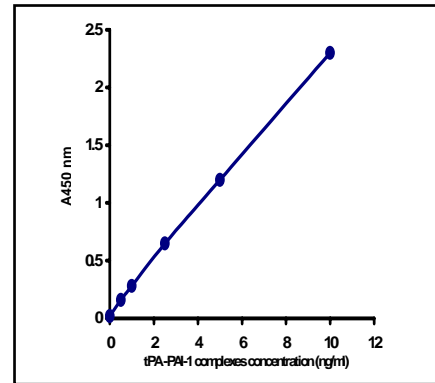
From the curve obtained, deduce the tPA-PAI-1 concentration for the tested sample. For obtaining the tPA-PAI-1 complexes concentration in this sample, the value measured must be multiplied by the dilution factor (i.e. 2,5,10,.....).

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 concentration of tPA-PAI-1 complexes in normal human plasma is usually low (< 5 ng/ml).
- It increases with age, exercise and stress.

BIOCHEMISTRY:

Stoichiometric, stable tPA-PAI-1 complexes are generated when a tPA molecule binds to its major inhibitor PAI-1. The complexes have a MW of 120,000 daltons (70,000 for tPA and 50,000 for PAI-1), and are rapidly cleared from blood circulation.

PATHOLOGICALS VARIATIONS:

Increased concentrations of tPA PAI-1 complexes are usually observed in all clinical situations associated with elevated PAI-1 levels. There is then a reactive release of tPA from endothelial walls and complexes are then formed.

APPLICATIONS:

- Assay of tPA-PAI-1 complexes in clinical samples, as a marker of disease.
- Assay of tPA-PAI-1 complexes in research studies (cell culture supernatants,....)

REFERENCES:

- Booth N.A, Walker E., Maughan R., Bennett R.: Plasminogen Activator in Normal Subjects After Exercise and Venous Occlusion: t-PA Circulates as Complexes With C1-Inhibitor and PAI-1. Blood, 1987, 69: 1600-1604.
- Kolodíe L., Rachail M.: Different Molecular Weight forms of Tissue-type Plasminogen Activator in Ascitic Fluid from Patients with Liver Cirrhosis. Fibrinolysis, 1988, 2: 245-249.
- Bos R., Siegel K., Otter M., Nieuwenhuizen W: Production and characterization of a set of monoclonal antibodies against Tissue-Type Plasminogen Activator (tPA). Fibrinolysis, 1992; 6: 173-182.
- Juhan-Vague I., Alessi M.C.: Fibrinolysis and risk of coronary artery disease. Fibrinolysis, 1996; 10(3): 127-136.
- Stein P., Heins M., Schoebel F.C., Pels K., Jax T.W., Stiegler H., Reinauer H., Strauer B.E., Leschke M. Activation of the fibrinolytic system in patients with coronary artery disease and hyperfibrinogenemia.. Thromb Haemost, 1997; 77(5): 970-974.

ZYMUTEST tPA – PAI-1 complexes

Référence ARK017A

(Dosage ELISA des complexes tPA-PAI-1)



Fabricant: HYPHEN BioMed

Utilisation *in vitro* exclusivement Uniquement à usage de recherche

Dernière révision : 14/04/2008

MÉTHODE :

La trousse ZYMUTEST tPA-PAI-1 est un dosage ELISA sandwich des complexes tPA-PAI-1 (Tissue Type Plasminogen Activator complexé à son inhibiteur PAI-1), utilisable sur plasma humain, ou tout autre milieu biologique où les complexes tPA-PAI-1 Antigène doivent être mesurés.

PRINCIPE :

Le dosage des complexes tPA-PAI-1, avec le coffret ZYMUTEST tPA-PAI-1, est réalisé à l'aide d'une plaque ELISA sensibilisée par un anticorps monoclonal purifié, spécifique du tPA, et stabilisée.

Le plasma ou l'échantillon à tester sont introduits dans l'un des puits de la plaque sensibilisée. Les complexes tPA-PAI-1 se fixent sur la phase solide par le tPA. Après lavage, les complexes tPA-PAI-1 fixés sur la plaque sont révélés par l'immunoconjugué, anticorps monoclonal de souris anti PAI-1 couplé à la peroxydase (HRP), qui réagit avec l'épitope correspondant du PAI-1 dans les complexes tPA-PAI-1. Après lavage, le substrat, Tetraméthylbenzidine (TMB) en présence d'eau oxygénée (H₂O₂), est introduit dans les puits de la plaque et une coloration bleue se développe. L'arrêt de la coloration par l'acide sulfurique fait virer la coloration au jaune. Cette coloration est proportionnelle au taux de complexes tPA-PAI-1 présent dans le plasma ou dans l'échantillon testé.

ECHANTILLONS :

- Plasma humain prélevé sur anticoagulant citraté ou Na₂ EDTA.
- Tout autre échantillon biologique où les complexes tPA-PAI-1 doivent être mesurés.

REACTIFS :

1. **COAT :** Microplaque ELISA (Micro ELISA plate) contenant 12 barrettes de 8 puits, sensibilisée par un anticorps monoclonal de souris, spécifique du tPA-PAI-1 humain, et stabilisée, emballée dans un sachet aluminium en présence d'un déshydratant.
 2. **SD :** 2 flacons de 50 ml de diluant échantillon (F-Sample Diluent) prêt à l'emploi.
 3. **Cal :** 3 flacons de calibrateur tPA-PAI-1 (tPA-PAI-1 Calibrator), lyophilisé. Chaque flacon doit être reconstitué par 2 ml de diluant échantillon (F-Sample Diluent) afin d'obtenir un plasma titré en tPA-PAI-1 humains recombinants. Le titre du plasma étalon est indiqué pour chaque lot sur le papillon fourni dans le coffret.
 4. **Cl :** 1 flacon de 0,5ml de Plasma Control I lyophilisé (Plasma humain, contrôle haut).
 5. **ClI :** 1 flacon de 0,5ml de Plasma Control II lyophilisé (Plasma humain, contrôle bas)
- Nota :** Les concentrations en complexes tPA-PAI-1 et les intervalles de confiance peuvent varier de lot à lot. Les valeurs obtenues sont indiquées sur le papillon fourni dans le coffret.
6. **IC :** 3 flacons d'immunoconjugué (Anti-(h)-PAI-1-HRP immunoconjugué) anticorps monoclonal, spécifique du PAI-1 et couplé à la peroxydase, lyophilisé.
 7. **CD :** 1 flacon de 25 ml de diluant pour 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 25 ml de substrat de la peroxydase: 3,3',5,5' – Tetraméthylbenzidine, contenant de l'eau oxygénée, prêt à l'emploi.
 10. **SA :** 1 flacon contenant 6ml d'Acide Sulfurique 0,45M (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 réaliser 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 à 1000 µl.
- Laveur de microplaques et agitateur.
- Lecteur de microplaques ELISA réglée 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 minigrp 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. **tPA-PAI-1 Calibrator :** Chaque flacon de calibrateur tPA-PAI-1 doit être reconstitué par 2 ml de "F-Sample Diluent" afin d'obtenir un standard titré de complexes tPA-PAI-1. Après reconstitution, ce flacon est stable au moins 8 heures à température du laboratoire.
4. **Plasma Control I (plasma humain, contrôle haut) :** reconstituer avec 0,5ml d'eau distillée.
5. **Plasma Control II (plasma humain, contrôle bas) :** reconstituer avec 0,5ml d'eau distillée.

Nota : Après reconstitution, les plasmas contrôlés I et II sont stables au moins 8 heures à température du laboratoire, 24 heures à 2-8°C, ou 2 mois congelés à -20°C ou en dessous.

Précautions : Les contrôles I et II (4&5) sont préparés à partir de plasmas humains. Ces derniers ont été testés par des méthodes enregistrées et sont certifiés exempts 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. **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. Ce réactif contient 0.05% de Kathon CG.
7. **Anti-(h)-PAI-1-HRP immunoconjugué :** Chaque flacon d'immunoconjugué doit être reconstitué par 7.5 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.
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. **Substrat TMB :** Prêt à l'emploi. A utiliser dans un délai de 4 semaines après ouverture, conservé à 2-8°C, sous réserve de contamination bactériologique lors de l'utilisation.
10. **Solution d'arrêt :** Acide sulfurique 0,45M, prêt à l'emploi

Précaution : Même dilué à 0,45M l'acide sulfurique est caustique. Comme pour tout réactif chimique semblable, manipuler l'acide sulfurique avec précaution en particulier 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 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 doit être correctement déplaqué et est obtenu après 20 minutes de centrifugation à 2500 g ; le plasma citraté doit être utilisé dans les 4 heures ou conservé congelé, à -20°C ou moins, jusqu'à 6 mois. 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. L'utilisation de plasma provenant de sang prélevé sur Na₂ EDTA est possible. Les conditions de conservation sont les mêmes que celles préconisées pour le plasma citraté. Afin d'éviter tout effet lié au rythme nyctéméral, les prélèvements devront préférentiellement être réalisés le matin à jeun.

D.750.01/ZY/017A



8560 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

Plasma ou échantillon à tester et contrôles :

Le plasma ou l'échantillon à tester sont analysés dilués au 1/2 dans le diluant échantillon (F-Sample Diluent). Pour des taux de complexes tPA-PAI-1 > 20 ng/ml, diluer au 1/5 ou au 1/10, ou plus.

Les contrôles I et II doivent être testés dilués au 1/2 en F-Sample Diluent.

Gamme d'étalonnage :

En utilisant le calibrator tPA-PAI-1 à un taux C contenu dans le coffret, préparer la gamme d'étalonnage suivante selon le tableau ci-dessous :

Concentration de tPA-PAI-1 en ng/ml	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Vol. de calibrator tPA-PAI-1	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

Agiter délicatement pour homogénéiser.

Les dilutions sont stables au moins 6 heures à température ambiante.

Réalisation du dosage :

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 microbarrettes ELISA et réaliser le dosage comme indiqué dans le tableau ci-après :

Réactif	Volume	Procédure
tPA-PAI-1 calibrator, échantillon à doser ou contrôles dilués au 1/2 ou F-Sample Diluent (blanc)	200 µl	Introduire la gamme d'étalonnage ou le plasma dilué dans les puits (a).
Incuber 1 heure à température du laboratoire (18-25°C) (b)		
Solution de lavage (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation)	300 µl par puits	Effectuer une série de 5 lavages (c).
Immunoconjugué Anti-(h)-PAI-1-HRP reconstitué par 7.5 ml de diluant pour immunoconjugué	200 µl	Introduire l'immunoconjugué dans les puits (c)
Incuber 1 heure à température du laboratoire (18-25°C) (b)		
Solution de lavage (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation)	300 µl par puits	Effectuer une série de 5 lavages (c).
Substrat TMB / H ₂ O ₂	200 µl	Immédiatement, introduire cette solution dans les puits (c, d). <i>Nota</i> : la répartition du substrat, barrette par barrette, doit se faire très précisément.
Laisser la coloration se développer pendant 5 minutes à température du laboratoire (b)		
Acide sulfurique 0.45 M	50 µl	Respecter le même temps de répartition, barrette par barrette, que celui utilisé pour le substrat.
Attendre 10 minutes pour laisser stabiliser la coloration puis lire la DO obtenue à 450 nm (e). Soustraire la valeur des blancs.		

Remarques :

- La dilution du 1/2 peut être obtenue directement en introduisant 100 µl de F-Sample Diluent et 100 µl de plasma à tester dans la cuvette réactionnelle.
- 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.
- 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 laveur 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.
- Pour une lecture bichromatique, le filtre 620 nm ou 690 nm peut être utilisé comme longueur d'onde de référence.

METHODE RAPIDE (Méthode en une étape) :

Le test peut être réalisé en une étape. Dans ces conditions, la courbe de calibration reste inchangée (de 0 à C), le calibrateur tPA-PAI-1 devant être reconstitué par 2 ml de F-Sample Diluent.

L'immunoconjugué doit être reconstitué par 2 ml de Conjugate Diluent.

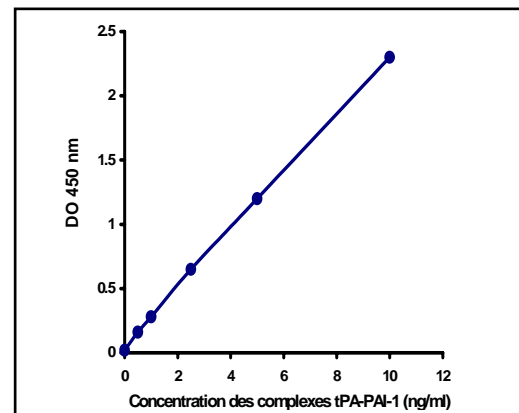
Le plasma à tester doit être dilué au demi (1/2) ou à des dilutions plus élevées en F-Sample Diluent. Dans les puits de la microplaque, introduire dans un premier temps 50 µl d'immunoconjugué (anti-(h)-PAI-1 peroxidase), puis 200 µl d'échantillon dilué à tester. Après 1 heure d'incubation à température ambiante et une étape de lavages, procéder à la révélation de la réaction en introduisant 200 µl de TMB par puits. Après 5 minutes de coloration, la réaction est ensuite arrêtée par 50 µl d'acide sulfurique. La courbe de calibration est réalisée comme indiqué dans le paragraphe "Expression des Résultats". Les concentrations des complexes tPA-PAI-1 lues sur la courbe doivent être multipliées par le facteur de dilution utilisé pour l'échantillon testé.

EXPRESSION DES RESULTATS :

- Sur du papier millimétré, porter en abscisses le taux de complexes tPA-PAI-1, en ng/ml, et en ordonnées les DO 450 correspondantes.
- Sur la courbe obtenue, en déduire la concentration de complexes tPA-PAI-1 dans l'échantillon testé. Pour obtenir la concentration en complexes tPA-PAI-1 de l'échantillon testé, multiplier le taux obtenu par le facteur de dilution utilisé (2, 5, 10, ...).
- Pour les contrôles I et II, la concentration mesurée doit être multipliée par 2.
- Les logiciels spécifiques pour test ELISA (DYNEX, BIOLISE, etc...) peuvent être utilisés pour déterminer directement la concentration de complexes tPA-PAI-1 à partir de la courbe d'étalonnage.

EXEMPLE DE COURBE D'ETALONNAGE

La courbe d'étalonnage ci-dessous n'est qu'un exemple. Pour la mesure des taux de complexes tPA-PAI-1, seule la courbe d'étalonnage effective réalisée pour la série de dosages doit être utilisée.



Valeurs normales :

La concentration des complexes tPA-PAI-1 dans le plasma humain normal est généralement basse (< 5 ng/ml). Ce taux augmente avec l'âge, l'exercice physique et le stress.

Biochimie :

Les complexes tPA-PAI-1 stœchiométriques et stables sont formés quand une molécule de tPA se fixe à une molécule de PAI-1, son inhibiteur principal. Ces complexes ont un poids moléculaire de 120,000 daltons (70,000 pour le tPA et 50,000 pour le PAI-1). Ils sont rapidement éliminés de la circulation sanguine.

Variations pathologiques :

L'augmentation des complexes tPA-PAI-1 est habituellement observée dans toutes les situations cliniques où le taux de complexes PAI-1 est augmenté. Il y a alors une libération réactive de tPA avec formation de complexes.

Applications :

Dosage des complexes tPA-PAI-1 dans des échantillons cliniques, comme marqueur de pathologie.

Dosage des complexes tPA-PAI-1 dans les travaux de recherche (surnageant de culture cellulaire, ...).

REFERENCES :

- Booth N.A., Walker E., Maughan R., Bennett R.: Plasminogen Activator in Normal Subjects After Exercise and Venous Occlusion: t-PA Circulates as Complexes With C1-Inhibitor and PAI-1. Blood, 1987, 69: 1600-1604.
- Kolodí L., Rachail M.: Different Molecular Weight forms of Tissue-type Plasminogen Activator in Ascitic Fluid from Patients with Liver Cirrhosis. Fibrinolysis, 1988, 2: 245-249.
- Bos R., Siegel K., Otter M., Nieuwenhuizen W: Production and characterization of a set of monoclonal antibodies against Tissue-Type Plasminogen Activator (tPA-PAI-1). Fibrinolysis, 1992; 6: 173-182.
- Juhan-Vague I., Alessi M.C.: Fibrinolysis and risk of coronary artery disease. Fibrinolysis, 1996; 10(3): 127-136.
- Stein P., Heins M., Schoebel F.C., Pels K., Jax T.W., Stiegler H., Reinauer H., Strauer B.E., Leschke M. Activation of the fibrinolytic system in patients with coronary artery disease and hyperfibrinogenemia. Thromb Haemost, 1997; 77(5): 970-974.