

# ZYMUTEST PAI-1 Activity

# ARK019A

(Complete ELISA kit for Tissue- Plasminogen Activator Inhibitor Type I Activity)

For in vitro use only

For research use only



Manufactured By: HYPHEN BioMed

Last revision: 06/05/2008

## INTENDED USE:

The ZYMUTEST PAI-1 Activity kit is a bio-immuno-assay for measuring the activity of human Tissue- Plasminogen Activator Inhibitor, type I (PAI-1), in plasma, or in any fluid where active PAI-1 can be present.

## ASSAY PRINCIPLE:

The diluted tested plasma or biological fluid is introduced into a microwell coated with recombinant tPA. When present, PAI-1 binds to coated tPA. Only the active PAI-1 reacts with tPA and is fixed on the solid phase. Following a washing step, the immunoconjugate, which is a mouse monoclonal antibody specific for human PAI-1 and coupled to horse radish peroxidase (HRP), is introduced, and binds to its specific epitope on immobilized PAI-1. Following a new washing step, the peroxidase substrate, Tetramethylbenzidine (TMB) in presence of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 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 amount of human PAI-1 Activity in the tested sample.

## TEST SAMPLE:

- Trisodium Citrate or Na<sub>2</sub> EDTA anticoagulated human plasma.
- Any biological fluid where the PAI-1 Activity must be measured.

## REAGENTS:

1. **COAT:** Micro ELISA plate, containing 12 strips of 8 wells, coated with tPA, then stabilised; the plate is packed in an aluminium pouch hermetically sealed in presence of a desiccant.
  2. **SD:** 2 vials containing 50 ml of F-Sample Diluent, ready to use.
  3. **Cal:** 3 vials of PAI-1 Activity Calibrator, lyophilised. Each vial, when restored with 2 ml of F-Sample Diluent, allows obtaining the calibrator. The exact PAI-1 Activity concentration is indicated on the flyer provided in the kit (about 10 ng/ml).
  4. **CI:** 1 vial containing 1 ml of lyophilised Plasma PAI-1 Control I High (human plasma).
  5. **CLI:** 1 vial containing 1 ml of lyophilised Plasma PAI-1 Control II Low (human plasma).
- Nota:** The PAI-1 Activity and acceptancy ranges for controls I and II can vary from lot to lot, and are indicated 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. **PAI-1 Activity Calibrator:** restore each vial with 2 ml of F-Sample Diluent. This solution is stable for at least 8 hours at room temperature, or 24 hours at 2-8°C.
4. **Plasma PAI-1 Control I (human plasma, High):** restore with 1 ml distilled water.
5. **Plasma PAI-1 Control II (human plasma, Low):** restore with 1 ml distilled water.

**Nota:** when restored, PAI-1 Activity 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 PAI-1 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)-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 to prepare 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.) or on CTAD (Citrate-Theophylline-Adenoside-Dipyridamole) tubes; 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.

PAI-1: Ag can be released from platelets upon activation or disruption. However, most of the PAI-1 released from platelets is inactive or latent. In order to avoid an overestimation of PAI-1 activity, platelets must be accurately removed. Use of CTAD tubes, which prevent from platelet activation, is recommended.

In order to avoid diurnal variations, PAI-1 should be tested 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.



8560 Gove Court • Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1901

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

D.750.02/ZY/019A

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 PAI-1 concentrations > 20 ng/ml, plasma or samples can be tested at a higher dilution, 1:5, or 1:10, or more.

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

### Calibration:

Using the PAI-1 calibrator with a PAI-1 Activity concentration "C" (indicated, for each lot of reagents, on the flyer provided in the kit), prepare the following standard solutions:

PAI-1 Activity conc. (ng/ml)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Vol. of PAI-1 Activity 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 **4 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
PAI-1 Activity standard solution or tested sample or sample diluent (blank)	200 µl	Introduce the standard solutions or the tested samples or the sample diluent in the corresponding micro ELISA plate well.
<b>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 (a)
Conjugate (anti (h) 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.
<b>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.
TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 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 (b, c).
<b>Incubate for exactly 5 minutes at room temperature (18-25 °C) (c)</b>		
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 0.45M sulfuric acid (b).
Wait for <b>10 minutes</b> in order to allow the colour to stabilize and measure absorbance at <b>450 nm (A450)</b> . 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. An incubation temperature of 18-25°C must be respected. Results are affected by a too high (>25°C) or too low (<18°C) temperature, and measured A450 are then too high or too low. It has to be considered when

analyzing the results. In the same way, if a microplate shaker is used, it should be used only at the beginning of each step (sample introduction, immunoconjugate introduction, stop solution introduction), for 1 to 2 minutes, in order to obtain a good homogeneity. A450 values generated in the assay are significantly increased if shaking is used throughout the incubation steps.

- For bichromatic readings, a reference wavelength at 690 nm or at 620 nm can be used.

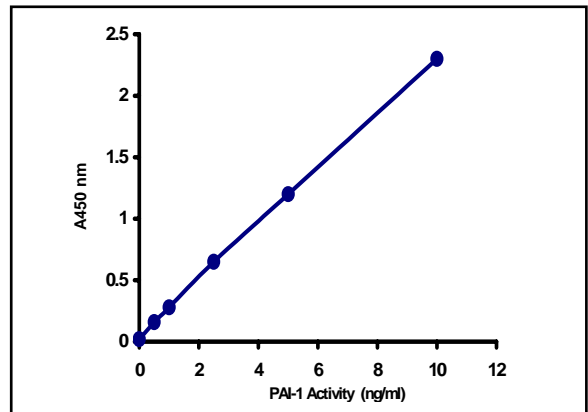
### RESULTS:

On a linear graph paper plot the **PAI-1 Activity concentrations** on abscissae and the corresponding absorbances (A450) on ordinates.

From the calibration curve obtained, deduce the concentration of PAI-1 Activity of the tested sample. For obtaining the PAI-1 Activity concentration in this sample, the value read on the calibration curve must be multiplied by the dilution factor (i.e. 2, 5, 10, 20.....).

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 PAI-1 Activity in normals is usually low (< 5 ng/ml), as most of the PAI-1 is in the latent or in the inactive forms.

### BIOCHEMISTRY:

- PAI-1 is a single chain glycoprotein, synthesised by endothelial cells and hepatocytes and with a molecular weight of 50,000 daltons. In plasma it is stabilised by binding to vitronectin.
- PAI-1 is also present in platelets, but in the latent form. PAI-1 regulates fibrinolysis by inhibiting tPA or urokinase.

### PATHOLOGICAL VARIATIONS

- PAI-1 Activity usually reflects the excess of PAI-1 (fibrinolysis inhibitor), over that of tPA and uPA (fibrinolysis activators). Measuring PAI-1 Activity is then a good index for appreciating the excess of fibrinolysis inhibition in blood.
- PAI-1 Antigen is increased in thrombosis, malignant diseases, hepatic disorders, post surgical period, sepsis.
- Recent studies have demonstrated a relationship between increased PAI-1 concentrations and cardiovascular risk factors (obesity, hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia, arteriothrombosis...).

### APPLICATIONS:

- Assay of PAI-1 Activity in clinical samples.
- Measurement of PAI-1 Activity as a cardiovascular risk factor.

### ASSAY CHARACTERISTICS:

This monoclonal antibody based assay, is specific for the active form of PAI-1, which is captured by coated tPA.

### REFERENCES:

- Declerck P.J., Alessi M.C., Verstreken M., Kruitthof E.K.O., Juhan-Vague I., Collen D.: Measurement of Plasminogen Activator Inhibitor 1 in biologic fluids with a murine monoclonal antibody based enzyme-linked-immunosorbent assay. *Blood*; 1998, 71, 220-25.
- Fujii S.: PAI-1 in Thrombosis and Arteriosclerosis. *Fibrinolysis and Proteolysis*, 1997, 11, 137-140.
- Smith F.B., Lee A.J., Rumley A., Fowkes G.R., Lowe G.O.R.: Tissue-Plasminogen-Activator, Plasminogen Activator Inhibitor and risk of peripheral arterial disease. *Arteriosclerosis*, 1995, 115, 35-43.
- Loskutoff D.J., Samad F.: The adipocyte and hemostatic balance in obesity. *Studies on PAI-1. Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.*, 1998, 18, 1-6.
- De Maat MPM, De Bart A.C.W., Hennis BC, Meijer P., Havelmaar AC, Mulder PG, Klufft C.: Interindividual and Intraindividual variability in plasma Fibrinogen, tPA antigen, PAI-1 Activity and CRP in healthy, young volunteers and patients with angina pectoris. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.*, 1996, 16, 1156-62.

# ZYMUTEST PAI-1 Activity

Réf ARK019A

(Méthode ELISA en un temps pour le dosage du PAI-1 actif)  
(Tissu Plasminogen Activator Inhibitor Type I)



Fabricant: HYPHEN BioMed

Utilisation *in vitro* exclusivement

Uniquement à usage de recherche

Dernière révision: 06/05/2008

## MÉTHODE

La trousse ZYMUTEST PAI-1 Activity est une méthode ELISA, destinée à la mesure de l'activité PAI-1 dans le plasma humain, ou tout autre milieu biologique où le PAI-1 actif est présent.

## PRINCIPE :

Le plasma dilué ou l'échantillon à tester sont introduits dans les puits d'une plaque ELISA, coâtée avec du tPA recombinant et stabilisée. Quant il est présent, le PAI-1 actif réagit avec le tPA immobilisé. Seules les formes actives de PAI-1 sont retenues sur la phase solide. Après une étape de lavages, l'immunoconjugué, anticorps monoclonal de souris spécifique du PAI-1 humain et couplé à la peroxydase, est introduit et réagit avec le PAI-1 immobilisé. Après une étape de lavage, le substrat de la peroxydase, 3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine (TMB) en présence d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 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 de PAI-1 actif présente dans l'échantillon testé.

## ECHANTILLONS :

- Plasma humain prélevé sur anticoagulant citraté.
- Tout autre liquide biologique où le PAI-1 actif doit être mesuré.

## REACTIFS :

1. **COAT :** Microplaque ELISA (Micro ELISA plate), contenant 12 barrettes de 8 puits, sensibilisée par du tPA recombinant et stabilisée, puis 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. **Cal :** 3 flacons de **calibrateur PAI-1** (PAI-1 Activity Calibrator), lyophilisé. Reconstitué avec 2 ml de F-Sample Diluent, la solution contient une concentration « C » (environ 10 ng/ml) de PAI-1 humain recombinant actif. Le titre du calibrateur est indiqué pour chaque lot sur le papillon fourni dans le coffret
  4. **CI :** 1 flacon lyophilisé contenant 1 ml de **Plasma PAI-1 Control I (Plasma contrôle haut)**.
  5. **CII :** 1 flacon lyophilisé contenant 1 ml de **Plasma PAI-1 Control II (Plasma contrôle bas)**.
- Nota :** La concentration en PAI-1 actif et l'intervalle de confiance des contrôles sont indiqués sur le papillon fourni dans le Kit.
6. **IC :** 3 flacons d'**immunoconjugué** (Anti-(h)-PAI-1-HRP immunoconjugué), 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' - Tetramethylbenzidine, 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 kit 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 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 minigrip 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. **PAI-1 Activity Calibrator :** reconstitué par 2 ml de F-Sample Diluent. Cette solution est stable au moins 8 heures à température du laboratoire, ou 24 heures à 2-8°C.
4. **Plasma PAI-1 Control I** (plasma humain, haut): à reconstituer par 1 ml d'eau distillée.
5. **Plasma PAI-1 Control II** (plasma humain, bas): à reconstituer par 1 ml d'eau distillée.

**Nota :** Une fois reconstitués, les contrôles I et II (4 & 5) 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)-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.
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) ou sur tube spécial type CTAD (Citrates, Théophilline, Adénoside, Dipyridamole) ; le plasma 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 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.

Le PAI-1 peut être relargué des plaquettes après activation ou lyse. Pour éviter toute surestimation de l'activité PAI-1, les plaquettes doivent être correctement éliminées. L'utilisation de tubes CTAD, prévenant l'activation plaquettaire est alors recommandée. Toutefois le PAI-1 plaquettaire est essentiellement latent ou inactif.

Afin d'éviter toute variation nyctémérale, le PAI-1 doit être testé sur des échantillons prélevés le matin, à jeun.

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



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

D.750.01/ZY/019A

### Echantillons et contrôles :

Les échantillons doivent être testés dilués 2 fois (1/2) en F-Sample Diluent. Pour des concentrations de PAI-1 > 20 ng/ml, le plasma ou les échantillons peuvent être testés à des dilutions plus élevées, 1/5, ou 1/10, ou plus.

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

### Calibration :

En utilisant le standard PAI-1 ayant un taux "C" de PAI-1 activité, 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'activité PAI-1 (ng/ml)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0 ng/ml
Vol. de PAI-1 Activity Calibrator	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 4 heures à température du laboratoire.

### Mode Opératoire :

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
Gamme d'étalonnage ou plasma à tester ou diluant échantillon (blanc)	200 µl	Introduire la gamme d'étalonnage ou le plasma à tester ou le diluant échantillon dans les puits de la microplaque ELISA.
Incuber 1 heure à température du laboratoire (18-25°C)		
Solution de lavage (WS) (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation).	300 µl	Effectuer une série de 5 lavages (a).
Conjugué anti-(h)-PAI-1-HRP (reconstitué avec 7,5 ml de Conjugate Diluent, CD)	200 µl	Introduire l'immunoconjugué anti-(h)-PAI-1-HRP dans les puits de la plaque ELISA.
Incuber 1 heure à température du laboratoire (18-25°C)		
Solution de lavage (WS) (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation).	300 µl	Effectuer une série de 5 lavages (a).
Substrat TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	200 µl	Immédiatement, introduire cette solution dans les puits (a). <i>Nota :</i> 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 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.
- Eviter 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. Bien respecter la température d'incubation (18-25°C). Si la température est trop forte (>25°C) ou trop faible (<18°C), les résultats sont affectés et les DO mesurées à 450 nm sont trop fortes ou trop faibles. En tenir compte pour l'analyse des résultats. De même, si un agitateur de plaques est utilisé, n'agiter qu'au début de chaque étape (dépôt échantillon, dépôt conjugué, solution d'arrêt), pendant 1 à 2 minutes, afin d'obtenir une bonne homogénéité. L'utilisation continue d'un agitateur augmente sensiblement les DO 450 obtenues dans le test.
- Pour une lecture bichromatique, la longueur d'onde de référence utilisée peut être à 620nm ou à 690nm.

### RESULTATS :

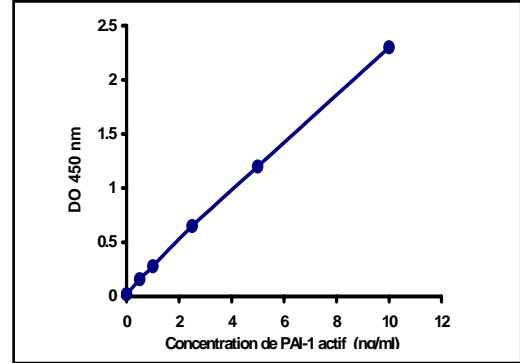
Sur papier millimétré, porter les taux de PAI-1 actif sur l'axe des abscisses et les DO correspondantes en ordonnées.

Sur la courbe ainsi obtenue, en déduire directement le taux d'activité PAI-1 de l'échantillon testé. Pour obtenir le taux d'activité PAI-1 dans l'échantillon, la valeur lue sur la courbe de calibration doit être multipliée par le facteur de dilution (ex : 2, 5, 10 .....).

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 correspondante aux dosages qu'ils ont effectués en utilisant leurs propres solutions standards

### VALEURS ATTENDUES :

- Le taux d'activité PAI-1 dans un plasma normal est habituellement faible (< 5 ng/ml). L'essentiel du PAI-1 est sous forme inactive, latente ou complexée au tPA.
- La concentration en PAI-1 augmente avec l'âge et le métabolisme des lipides, particulièrement en fonction du taux des triglycérides.
- Le PAI-1 présente des variations nyctémérales, et les taux les plus élevés sont dosés le matin.
- Le taux de l'activité PAI-1 augmente pendant la grossesse.

### BIOCHIMIE :

- Le PAI-1 est une glycoprotéine composée d'une seule chaîne protéique, et est synthétisé par la cellule endothéliale et les hépatocytes. Son poids moléculaire est de 50 000 daltons. Dans le plasma, il est stabilisé par fixation à la vitronectine.
- Le PAI-1 est aussi présent dans les plaquettes, mais sous forme latente. Le PAI-1 régule la fibrinolyse en inhibant le tPA et l'urokinase.

### VARIATIONS PATHOLOGIQUES :

- L'activité PAI-1 est augmentée dans les thromboses, les cancers, les maladies hépatiques, en post chirurgie, et lors de septicémies.
- Des études récentes ont montré une bonne corrélation entre l'augmentation du taux de PAI-1 et les facteurs de risque cardiovasculaire (obésité, hyperinsulinémie, hypertriglycéridémie,....).

### APPLICATIONS :

- Dosage du PAI-1 actif dans des études cliniques.
- Mesure du PAI-1 actif en tant que marqueur du risque cardiovasculaire.

### CARACTERISTIQUES :

La trousse de dosage utilise le tPA pour fixer le PAI-1 actif et un anticorps monoclonal de souris spécifique du PAI-1 et couplé à la peroxydase, pour la révélation. Cet anticorps n'est pas inhibiteur et reconnaît les complexes tPA-PAI-1. Le dosage mesure de façon spécifique le PAI-1 actif.

Le calibrateur, titré à 10 ng de PAI-1 actif, peut contenir des taux variables de PAI-1:Ag. Le PAI-1 recombinant étant actif à environ 50%, le taux de PAI-1 antigène est environ 2 fois plus élevé.

### REFERENCES :

- Declerck P.J., Alessi M.C., Verstreken M., Kruihof EK.O., Juhan-Vague I., Collen D.: Measurement of Plasminogen Activator Inhibitor 1 in biologic fluids with a murine monoclonal antibody based enzyme-linked-immunosorbent assay. Blood; 1998, 71, 220-25.
- Fujii S.: PAI-1 in Thrombosis and Arteriosclerosis. Fibrinolysis and Proteolysis, 1997, 11, 137-140.
- Smith F.B., Lee A.J., Rumley A., Fowkes G.R., Lowe G.O.R.: Tissue-Plasminogen-Activator, Plasminogen Activator Inhibitor and risk of peripheral arterial disease. Arteriosclerosis, 1995, 15, 35-43.
- Loskutoff D.J., Samad F.: The adipocyte and hemostatic balance in obesity. Studies on PAI-1. Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol., 1998, 18, 1-6.
- De Maat MPM, De Bart A.C.W., Hennis BC, Meijer P., Havelmaar AC, Mulder PG, Kluit C.: Interindividual and Intraindividual variability in plasma Fibrinogen, tPA antigen, PAI-1 Activity and CRP in healthy, young volunteers and patients with angina pectoris. Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol., 1996, 16, 1156-62.