

FREE soluble RANKL ***High Sensitivity***

(EN) 3rd Generation ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF FREE, SOLUBLE, UNCOMPLEXED HUMAN RANKL* IN SERUM OR HEPARIN PLASMA
CAT. NO. BI-20462 12 X 8 TESTS

(DE) 3. Generation ENZYM IMMUNOASSAY ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON FREIEM, NICHT KOMPLEXIERTEM, LÖSLICHEM HUMANEN RANKL* IN SERUM ODER HEPARIN PLASMA
KAT. NR. BI-20462 12 X 8 TESTE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES

*Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand (RANKL)

rev.no. 190109 (replacing 170216)

This kit was developed and manufactured by:

Biomedica Medizinprodukte GmbH, A-1210 Wien, Divischgasse 4
Tel. +43/1/291 07 45, Fax +43/1/291 07 6389, E-mail info @bmgrp.com



CONTENT / INHALT

ENGLISH **Page 3**
DEUTSCH **Seite 8**

*Additional information on our products is available on our website.
Zusätzliche Information zu unseren Produkten ist auf unserer Homepage erhältlich.*

www.bmgrp.com

1) INTRODUCTION

RANKL, the receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, a member of the tumor necrosis factor (TNF) family (<http://www.uniprot.org/uniprot/O14788>), is the main stimulatory factor for the formation of mature osteoclasts and is essential for their survival. RANKL activates its specific receptor RANK, located on osteoclasts and dendritic cells. The effects are counteracted by OPG which acts as an endogenous soluble receptor antagonist (see: BI-20403 – OPG ELISA).

The major source of RANKL are osteocytes, former osteoblasts that become embedded within the mineralized bone matrix. RANKL is a ~35 kD type II transmembrane-type protein and is cleaved to release a soluble biologically active product that forms a homotrimer.

RANKL and its specific receptor RANK are not only key regulators of bone remodeling but also play an essential role in immunobiology, e.g. lymph node formation, establishment of the thymic microenvironment, mammary gland development during pregnancy, bone metastasis in cancer and sex-hormone, progesterin-driven breast cancer, thermoregulation, and finally in the development of type 2 diabetes mellitus.

Possible Indications:

- Postmenopausal and senile osteoporosis
- Glucocorticoid induced osteoporosis
- Disease with locally increased resorption activity
- Arthritis
- Oncology
- Type 2 diabetes mellitus

2) CONTENTS OF THE KIT

CONT	KIT COMPONENTS	QUANTITY
PLATE	Human recombinant OPG pre-coated microtiter strips in strip holder	12 x 8 tests
WASHBUF	Wash buffer concentrate 20x, natural cap	1 x 50 ml
ASYBUF	Assay buffer, red cap, ready to use	1 x 7 ml
AB	Goat polyclonal biotinylated anti sRANKL antibody, green cap, ready to use	1 x 22 ml
STD	Standards (0; 0.0625; 0.125; 0.25; 0.5; 1; 2 pmol/l), lyophilised, white caps	7 vials
CTRL	Controls A+B, recombinant human RANKL in human serum, lyophilised, yellow caps, exact concentration after reconstitution see label	2 vials
CONJ	Conjugate (streptavidin-polyHRPO), amber cap, ready to use	1 x 22 ml
SUB	Substrate (TMB solution), amber bottle, blue cap, ready to use	1 x 22 ml
STOP	Stop solution, white cap, ready to use	1 x 7 ml

3) ADDITIONAL MATERIAL SUPPLIED IN THE KIT

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

4) MATERIAL AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Precision pipettes calibrated to deliver 50 µl, 150 µl, 200 µl, 300 µl and disposable tips
- Distilled or deionised water
- Plate washer is recommended for washing, alternative multichannel pipette or manifold dispenser
- Refrigerator with 4°C (2-8°C)
- ELISA reader capable of measuring absorbance at 450 nm (with correction wavelength at 630 nm)
- Graph paper or software for calculation of results

5) REAGENTS AND SAMPLE PREPARATION

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

Sample preparation:

Collect venous blood samples by using standardized blood collection tubes for serum or Heparin plasma. We recommend performing plasma or serum separation by centrifugation as soon as possible, e.g. 10 min at 2000 x g, preferably at 4°C (2-8°C). If this is not possible, store the samples at 4°C (2-8°C) prior to centrifugation (maximal one day). The acquired plasma or serum samples should be measured as soon as possible. For longer storage aliquot samples and store at -25°C or lower. Samples should undergo 3 freeze-thaw cycles only. Lipemic or haemolysed samples may give erroneous results. Samples should be mixed well before assaying. We recommend duplicates for all values. If samples read higher than the top standard, we recommend diluting with a low-measuring serum sample and re-measuring the samples.

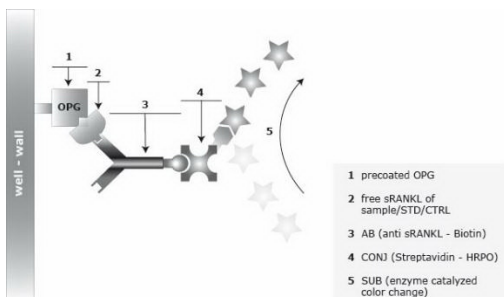
For further information on sample stability please visit our website www.bmgrp.com (see Technical Files) or contact our customer service by e-mail info@bmgrp.com or by phone +43/ 1/ 29107-45.

Reconstitution / Handling:

STD (Standards) and CTRL (Controls): Pipette 700 µl of distilled or deionised water into each vial. Leave at room temperature (18-26°C) for 15 min. Reconstituted STD and CTRL are stable at -25°C or lower until expiry date stated on label. STDs and CTRLs are stable for 3 freeze-thaw cycles.

WASHBUF (Wash buffer): Dilute the concentrate 1:20 (e.g. 50 ml WASHBUF + 950 ml distilled water). Crystals in the buffer concentrate will dissolve at room temperature. The undiluted buffer is stable at 4°C (2-8°C) until expiry date stated on label. The diluted WASHBUF is stable up to one month at 4°C (2-8°C). Only use diluted WASHBUF (Wash buffer) when performing the assay.

6) PRINCIPLE OF THE ASSAY:



7) ASSAY PROTOCOL

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

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

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

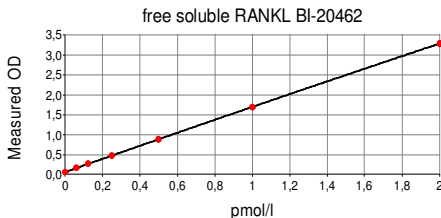
1. **Prewash wells** with 300 µl diluted WASHBUF (wash buffer, natural cap) five times.
Remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel after the last wash.
2. Add 50 µl ASYBUF (assay buffer, red cap) into each well.
3. Pipette 150 µl STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) in duplicate into respective wells, swirl gently.
4. **Cover tightly and incubate at room temperature (18-26°C) for 2 hours.**

5. Aspirate and wash wells with 300 μ l diluted WASHBUF (wash buffer, natural cap) five times. Remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel after the last wash.
6. Add 200 μ l AB (biotinylated anti sRANKL antibody, green cap) into each well. Swirl gently.
- 7. Cover tightly and incubate at 4°C (2-8°C) over night (18-24 hours).**
8. Aspirate and wash wells with 300 μ l diluted WASHBUF (wash buffer, natural cap) five times. Remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel after the last wash.
9. Add 200 μ l CONJ (conjugate, amber cap) into each well, swirl gently.
- 10. Cover tightly and incubate at room temperature (18-26°C) for 1 hour in the dark.**
11. Aspirate and wash wells with 300 μ l diluted WASHBUF (wash buffer, natural cap) five times. Remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel after the last wash.
12. Add 200 μ l SUB (substrate, blue cap) into each well, swirl gently.
- 13. Incubate at room temperature (18-26°C) for 30 min in the dark.**
14. Add 50 μ l STOP (stop solution, white cap) into each well, swirl gently.
15. Measure absorbance immediately at 450 nm with reference 630 nm if available.

8) CALCULATION OF RESULTS

Read the optical density (OD) of all wells on a plate reader using 450 nm wavelength (correction wavelength 630 nm). Construct the standard curve from the OD values of the STD. Use commercially available software or graph paper. Calculate sample concentration from the standard curve. The assay was evaluated with 4PL algorithm. Different curve-fitting methods need to be evaluated by the user.

Example typical STD-curve:



The quality control protocol supplied with the kit shows the results of the final release QC for each kit lot. Data for optical density obtained by customers may differ due to various influences and/or due to the normal decrease of signal intensity during shelf life. However, this does not affect validity of results as long as an OD of 1.50 or more is obtained for the standard with the highest concentration and the values of the CTRLs are in range (target ranges see labels).

9) ASSAY CHARACTERISTICS

Method:	Sandwich ELISA, HRP/TMB, 12x8-well strips
Sample type:	Serum, Heparin plasma
Standard range:	0 to 2 pmol/l (0; 0.0625; 0.125; 0.25; 0.5; 1; 2) 7 standards and 2 controls in a human serum matrix
Conversion factor:	1 pg/ml = 0.05 pmol/l (MW: 20 kD, monomer)
Sample volume:	150 μ l / well
Incubation time:	2 h / overnight / 1 h / 30 min
Detection limit / LLOQ:	LOD: (0 pmol/l + 3 SD): 0.01 pmol/l; LLOQ: 0.008 pmol/l
Specificity:	This assay recognizes endogenous and recombinant human free soluble RANKL.

Cross reactivity:	The sequence homology to various primates is >95%. It is likely that the assay can be used for these species. Internal validations have not been carried out.	
Precision:	Intra-assay (n=5) ≤ 4% , Inter-assay (n=12) ≤ 3%	
Spike/Recovery (av. recovery spiked with 0.25 pmol/l rec. free sRANKL):	Serum (n=8): 91%	Heparin plasma (n=8): 91%
Dilution linearity (average recovery of expected free sRANKL after a 1+1 dilution):	Dilution:	1+1
	Serum (n=9)	112%
	Heparin plasma (n=10)	121%
Values from apparently healthy individuals:	Median serum (n=32): 0.14 pmol/l Median Heparin plasma (n=22): 0.17 pmol/l Each laboratory should establish its own reference range for the samples under investigation. Do not change sample type during the study.	

10) PRECISION

Intra-assay: 2 samples of known concentrations were tested 5 times within one kit lot by one operator.

Inter-assay: 2 samples of known concentrations were tested 12 times within 3 different kit lots and by 3 different operators.

Intra-assay (n=5)	Sample 1	Sample 2	Inter-assay (n=12)	Sample 1	Sample 2
Mean (pmol/l)	0.12	1.00	Mean (pmol/l)	0.12	1.00
SD (pmol/l)	0.005	0.04	SD (pmol/l)	0.004	0.02
CV (%)	4	4	CV (%)	3	2

Further details on validation data and assay characteristics please visit our website www.bmgrp.com (see Technical Files) or contact our customer service by e-mail info@bmgrp.com or by phone +43/ 1/ 29107-45.

11) TECHNICAL HINTS

- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- Do not mix stoppers and caps from different reagents or use reagents between lots.
- Do not use reagents beyond expiration date.
- Protect reagents from direct sunlight.
- Substrate solution should remain colourless until added to the plate.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.

12) PRECAUTIONS

All test components of human source were tested against HIV-Ab, HCV-Ab and HBsAg and were found negative. Nevertheless, they should be handled and disposed as if they were infectious. All liquid reagents contain ≤ 0.1% Proclin 950 as preservative. Avoid contact with skin and mucous membrane. Proclin 950 is not toxic in concentrations used in this kit. It may cause allergic skin reactions – avoid contact with skin or eyes.

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

13) LITERATURE

- Immunology and bone. Danks L and Takayanagi H, J Biochem 2013; 154: 29-39.
- Physiology and pathophysiology of the RANKL/RANK system. Hanada R et al., Biol Chem 2010; 391(12): 1365-1370.
- Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. Nakashima T et al., Nat Med 2011; 17(10): 1231-1234.
- RANKL Employs Distinct Binding Modes to Engage RANK and the Osteoprotegerin Decoy Receptor. Nelson CA et al., Structure, Nov 2012; 20(11): 1971-1982.
- Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progesterin-driven mammary cancer. Schramek D et al., Nature 2010; 468(7320): 98-102.
- RANK ligand mediates progesterin-induced mammary epithelial proliferation and carcinogenesis. Gonzalez-Suarez E et al., Nature 2010; 468: 103-107.
- Central regulation of body temperature by RANKL/RANK pathway. Hanada R and Penninger JM, Clin Calcium 2011; 21(8): 1201-1208.
- Blockade of receptor activator of nuclear factor- κ B (RANKL) signaling improves hepatic insulin resistance and prevents development of diabetes mellitus. Kiechl S et al., Nature Medicine 2013; 19(3):358-363.

1) EINLEITUNG

RANKL, der Rezeptor Activator des Nuklear Faktor (NF) kappa B Ligand, gehört zur Familie der Tumor Nekrose Faktoren (TNF, (<http://www.uniprot.org/uniprot/O14788>)). RANKL ist der wichtigste Faktor für die Reifung und Proliferation der Osteoblasten. RANKL bindet an seinen spezifischen Rezeptor RANK, der von Osteoklasten und dendritischen Zellen exprimiert wird. Als Gegenspieler zu RANKL fungiert Osteoprotegerin (OPG), ein löslicher endogener Rezeptor Antagonist (siehe: BI-20403 – OPG ELISA).

RANKL wird hauptsächlich von Osteozyten gebildet, ehemaligen Osteoblasten, die in der mineralisierten Knochenmatrix eingebettet sind. RANKL ist ein ~35 kD Typ II Transmembran-Protein und bildet bei Freisetzung einen löslichen, biologisch aktiven Komplex aus Homotrimeren.

RANKL und sein spezifischer Rezeptor RANK sind nicht nur Schlüssel-Regulatoren bei der Knochenbildung, sondern spielen auch eine wichtige Rolle in der Immunbiologie, zB bei der Lymphknotenbildung, bei der Schaffung der Mikroumgebung des Thymus, bei der Brustdrüsenentwicklung während der Schwangerschaft, bei Knochenmetastasen sowie Progesterin-bedingtem Brustkrebs, der Wärmeregulation und schließlich in der Entwicklung von Typ-2-Diabetes mellitus.

Indikationen:

- Postmenopausale und senile Osteoporose
- Glukokortikoid induzierte Osteoporose
- Arthritis
- Krankheiten mit lokal induzierter Knochenresorptionsaktivität
- Onkologie
- Typ-2-Diabetes Mellitus

2) INHALT DES KITS

CONT	KIT KOMPONENTEN	MENGE
PLATE	Humanes rekombinantes OPG, beschichtet auf Mikrotiterplattenstreifen im Streifenhalter	12 x 8 Tests
WASHBUF	Waschpuffer, 20fach Konzentrat, durchsichtiger Schraubverschluss	1 x 50 ml
ASYBUF	Verdünnungspuffer, roter Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 7 ml
AB	polyklonaler biotinylierter Ziege anti sRANKL Antikörper, grüner Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
STD	Standards (0; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 pmol/l), weißer Schraubverschluss, lyophilisiert	7 Fläschchen
CTRL	Kontrollen A+B, rekombinantes humanes RANKL in humanem Serum, gelber Schraubverschluss, lyophilisiert, genaue Konzentration nach Rekonstitution siehe Etikett	2 Fläschchen
CONJ	Konjugat (Streptavidin-PolyHRPO), brauner Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
SUB	Substrat (TMB Lösung) braunes Fläschchen, blauer Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
STOP	Stopplösung, weißer Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 7 ml

3) ZUSÄTZLICHES MATERIAL IM KIT

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

4) ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL UND GERÄTE

- Kalibrierte Präzisionspipetten für 50 µl, 150 µl, 200 µl, 300 µl inklusive Pipettenspitzen
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Mikrotiterplattenwascher wird empfohlen
- Kühlschrank 4°C (2-8°C)
- Mikrotiterplattenphotometer mit 450 nm Filter (mit Referenzwellenlänge 630 nm wenn verfügbar)
- Millimeterpapier oder Software

5) REAGENZIEN UND PROBENVORBEREITUNG

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

Probenvorbereitung:

Abnahme von venösem Blut mittels standardisierter Blutabnehmeröhrchen zur Gewinnung von Serum oder Plasma. Wir empfehlen die Zentrifugation des Blutes für 10 Minuten bei 2000g, bevorzugt bei 4°C (2-8°C), so schnell wie möglich. Das Blut kann vor der Zentrifugation bei 4°C (2-8°C) bis zu 24 Stunden gelagert werden. Das gewonnene Serum oder Plasma soll so bald wie möglich gemessen werden. Für eine Lagerung sollen die Proben aliquotiert und bei -25°C oder niedriger gelagert werden. Bis zu drei Frier/Tau-Zyklen verändern die Messwerte nicht. Lipämische und hämolytische Proben können falsche Ergebnisse liefern. Proben vor Verwendung gut mischen. Wir empfehlen Doppelbestimmungen für alle Werte.

Proben mit Ergebnissen über dem höchsten Standard (STD7 = 2 pmol/l) können mit niedrig messendem Serum verdünnt und erneut getestet werden.

Nähere Informationen zur Probenstabilität finden Sie auf unserer Website unter www.bmgrp.com (s. Technical Files) oder kontaktieren Sie unseren Kundenservice, e-mail unter info@bmgrp.com, Tel. unter +43/ 1/ 29107-45.

Rekonstitution / Handhabung:

STD (Standards) und CTRL (Kontrolle): Lösen Sie das Lyophilisat in jeweils 700 µl destilliertem Wasser bei Raumtemperatur (18-26°C) für 15 min. Die rekonstituierten STD und CTRL sind bei -25°C bis zum Ablaufdatum haltbar. STDs und CTRLs sind bis zu drei Frier-/Taufzyklen stabil.

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

6) TESTPRINZIP

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

7) TESTPROTOKOLL

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

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

Nehmen Sie die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Aluminiumbeutel. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können mit Trockenmittel im Aluminiumbeutel bei 4°C (2-8°C) bis zum angegebenen Ablaufdatum gelagert werden.

1. **Wells vorwaschen:** Die vorbereiteten Wells 5x mit 300 µl WASHBUF (Waschpuffer, durchsichtiger Schraubverschluss) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2. Pipettieren Sie 50 µl ASYBUF (Verdünnungspuffer, roter Schraubverschluss) in alle wells.
3. Pipettieren Sie 150 µl STD/PROBE/CTRL (Standard/Probe/Kontrolle) in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen. Gut mischen.
4. **Streifen gut abdecken und 2 Stunden bei Raumtemperatur (18-26°C) inkubieren.**

5. Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer, durchsichtiger Schraubverschluss) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
6. Pipettieren Sie 200 µl AB (biotinylierter sRANKL Antikörper, grüner Schraubverschluss) in alle Wells. Gut mischen.
7. Streifen gut abdecken und über Nacht (18-24 Stunden) bei 4°C (2-8°C) inkubieren.
8. Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer, durchsichtiger Schraubverschluss) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
9. Pipettieren Sie 200 µl CONJ (Konjugat, brauner Schraubverschluss) in alle Wells. Gut mischen.
10. Streifen gut abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren.
11. Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer, durchsichtiger Schraubverschluss) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
12. Pipettieren Sie 200 µl SUB (Substrat, blauer Schraubverschluss) in alle Wells. Gut mischen.
13. 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren.
14. Pipettieren Sie 50 µl STOP (Stoppösung, weißer Schraubverschluss) in alle Wells. Gut mischen.
15. Extinktion unmittelbar bei 450 nm messen, mit 630 nm als Referenz, falls möglich.

8) BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Messen Sie die optische Dichte (OD) von allen Wells mit einem Mikrotiterplattenphotometer mit einem 450 nm Filter (Referenz 630 nm). Konstruieren Sie eine Standardkurve aus den OD Werten der STD unter Verwendung von kommerziell erhältlichem Millimeterpapier oder einer geeigneten Software.

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

Typische STD-Kurve:

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

Auf dem beige packten QC Protokoll sind die Resultate bei der QC Freigabe der jeweiligen Kitlot vermerkt. Vom Verwender erhaltene Daten der OD können abweichend sein, bedingt durch verschiedene Einflüsse und/oder dem normalen Signalverlust des Kits während der Laufzeit. Dieser mögliche Signalverlust hat keinen Einfluss auf die Gültigkeit der Resultate, so lange die OD des höchsten Standards den Wert 1,50 oder höher erreicht und die Werte beider CTRL im gültigen Bereich sind (Bereich siehe Etiketten beider Kontrollen).

9) TESTMERKMALE

Methode:	Sandwich ELISA, HRP/TMB, 12x8-well Streifen
Probentyp:	Serum, Heparin plasma
Standardbereich:	0 – 2 pmol/l (0; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2) 7 Standards und 2 Kontrollen in humaner Serum Matrix
Umrechnungsfaktor pg/ml zu pmol/l:	1 pg/ml = 0,05 pmol/l (MW: 20 kD, Monomer)
Probenvolumen:	150 µl / Vertiefung
Inkubationszeiten:	2 h / über Nacht / 1 h / 30 min
Sensitivität:	LOD: (0 pmol/l + 3 SD); 0,01 pmol/l; LLOQ: 0,008 pmol/l
Spezifität	Dieser Assay erkennt endogenes und rekombinantes humanes ungebundenes lösliches RANKL.
Kreuzreaktivität:	Die Sequenzhomologie bei verschiedenen Primaten ist >95%. Es ist wahrscheinlich, dass aufgrund dessen der Test für jene Spezies verwendet werden kann. Interne Validierungen wurden nicht durchgeführt.

Präzision:	Intra-assay (n=5) ≤ 4%, Inter-assay (n=12) ≤ 3%	
Wiederfindung (durchschnittliche Wiederfindung nach spike mit 0,25 pmol/l rek. freiem sRANKL):	Serum (n=8): 91%	Heparin plasma (n=8): 91%
Verdünnungslinearität (durchschnittliche freie sRANKL Werte nach einer 1+1 Verdünnung):	Verdünnung:	1+1
	Serum (n=9)	112%
	Heparin plasma (n=10)	121%
Werte von anscheinend gesunden Spendern:	Median serum (n=32): 0,14 pmol/l Median Heparin plasma (n=22): 0,17 pmol/l Jedes Labor sollte den Normalbereich für seine Proben evaluieren. Wechseln Sie nicht die Probenmatrix innerhalb einer Studie.	

Nähere Informationen zu den Testmerkmalen finden Sie auf unserer Website unter www.bmgrp.com oder kontaktieren Sie unseren Kundenservice, e-mail unter info@bmgrp.com, Tel. unter +43/ 1/ 29107-45.

10) PRÄZISION

Intra-Assay: 2 Proben mit bekannter Konzentration wurden 5-mal in Doppelbestimmung in einem Test getestet.
Inter-Assay: 2 Proben mit bekannter Konzentration wurden 12-fach in 3 unterschiedlichen Kit Lots von 3 unterschiedlichen Operatoren getestet.

Intra-Assay (n=5)	Probe 1	Probe 2	Intra-Assay (n=12)	Probe 1	Probe 2
Durchschnitt (pmol/l)	0,12	1,00	Durchschnitt (pmol/l)	0,12	1,00
SD (pmol/l)	0,005	0,04	SD (pmol/l)	0,004	0,02
VK (%)	4	4	VK (%)	3	2

Weitere Daten zur Validierung und der Kit Charakterisierung finden Sie auf unserer Webseite www.bmgrp.com (s. Technical Files) oder kontaktieren Sie unseren Kundenservice, e-mail unter info@bmgrp.com, Tel. unter +43/ 1/ 29107-45.

11) TECHNISCHE MERKMALE

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

12) VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Bestandteile humanen Ursprunges wurden auf HIV-Ak, HCV-Ak und HBsAg getestet und negativ gefunden. Trotzdem sollten die Reagenzien als potentiell infektiös behandelt werden. Alle flüssigen Reagenzien enthalten 0,01% Proclin 950 als Konservierungsmittel. Vermeiden Sie Kontakt mit Augen, Haut oder Schleimhaut. Proclin 950 ist in der verwendeten Konzentration nicht toxisch. Allergische Reaktionen sind möglich.

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

13) LITERATUR

Siehe Kapitel 13) LITERATURE im englischen Teil des Beipacktextes.

Notes/Notizen:

Notes/Notizen:

Notes/Notizen:

SYMBOLS



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



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



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



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



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



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



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



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

BI-20462 FREE Soluble RANKL HS ELISA

ASSAY PROTOCOL AND CHECKLIST

PREPARATION OF REAGENTS:

- Bring all reagents to room temperature (18-26°C).
- Prepare reagents and samples as instructed.
- Bring unused and prepared components to the storage temperature mentioned in the package insert.
- Take microtiter strips out of the alu bag and mark positions on the protocol sheet.
- 1. Prewash wells** with 300 µl diluted WASHBUF (wash buffer, natural cap) five times. Remove remaining WASHBUF by tapping plate against paper towel after the last wash.
- 2.** Add 50 µl ASYBUF (assay buffer, red cap) into each well.
- 3.** Add 150 µl STD/SAMPLE/CTRL (standard/sample/control) into respective wells. Swirl gently.
- 4. Cover tightly and incubate at room temperature (18-26°C) for 2 hours.**
- 5.** Aspirate and wash wells with 300 µl diluted WASHBUF (wash buffer, natural cap) five times. Remove remaining buffer by tapping plate against paper towel.
- 6.** Add 200 µl AB (biotinylated anti sRANKL antibody, green cap) into each well. Swirl gently.
- 7. Cover tightly and incubate at 4°C (2-8°C) over night (18-24 hours).**
- 8.** Aspirate and wash wells with 300 µl WASHBUF (wash buffer, natural cap) five times. Remove remaining buffer by tapping plate against paper towel.
- 9.** Add 200 µl CONJ (conjugate, amber cap) into each well. Swirl gently.
- 10. Cover tightly and incubate at room temperature (18-26°C) for 1 hour in the dark.**
- 11.** Aspirate and wash wells with 300 µl WASHBUF (wash buffer, natural cap) five times. Remove remaining buffer by hitting plate against paper towel.
- 12.** Add 200 µl SUB (substrate, blue cap) into each well. Swirl gently.
- 13. Incubate at room temperature (18-26°C) for 30 minutes in the dark.**
- 14.** Add 50 µl STOP (stop solution, white cap) into each well. Swirl gently.
- 15.** Measure absorbance immediately at 450 nm with reference 630 nm, if available.