

# CATHEPSIN K

ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF CATHEPSIN K  
IN SERUM OR CELL CULTURE SUPERNATANTS  
CAT. NO. BI-20432 12 X 8 TESTS

ENZYMIMMUNOASSAY ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON CATHEPSIN K  
IN SERUM ODER ZELLKULTURÜBERSTAND  
KAT. NR. BI-20432 12 X 8 TESTE

For Research Purposes Only

FOR RESEARCH USE ONLY  
NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES

rev.no. 080714 (replaces 0800401)

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

**BIOMEDICA**

**BIOMEDICA**

**GRUPPE** 

[www.bmgrp.com](http://www.bmgrp.com)

1/12

## **CONTENT / INHALT**

- 1) ENGLISH ..... 3**
- 2) DEUTSCH .... 7**

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

**[www.bmgrp.com](http://www.bmgrp.com)**

## 1) INTRODUCTION

Cathepsin K is a highly expressed cysteine protease, secreted by osteoclasts. It is produced as a 329 AA pre-cursor, which is cleaved to its active form with a length of 215 AA (MW 23,495) by osteoclasts, when they are resorbing bone. Cathepsin K degrades the collagen matrix of the bone after removal of its mineral components. It is actually the most abundantly synthesised protein of the active, resorbing osteoclast and therefore the most specific marker of resorption activity. Cathepsin K plays a key role in tissue destruction, remodelling and cartilage breakdown of the bone. The high homology of Cathepsin K across various species (mouse 86%, rat 88%, pig 97%, rabbit 96%) should allow the use of this assay for studies in animal models for following diseases

### RESEARCH AREAS

- Primary and secondary osteoporoses
- Inflammatory processes which affect multiple regions of the skeleton
- Antiresorptive drug monitoring
- Bone turnover research

## 2) CONTENTS OF THE KIT

CONT	KIT COMPONENTS	QUANTITY
PLATE	Polyclonal sheep anti-Cathepsin K antibody coated microtiterstrips in strip holder, packed in alu bag with desiccant	12 x 8 tests
WASHBUF	Washing buffer 20x concentrate, natural cap	1 x 50 ml
ASYBUF	Assay Buffer, red cap, ready to use	1 x 25 ml
STD	Standards, (0; 11; 33; 100; 300 pmol/l), white caps, lyophilised with blue dye	5 x lyophilised
CTRL	Control, yellow cap, lyophilised, concentration after reconstitution see label	1 x lyophilised
CONJ	Conjugate, (polyclonal anti-Cathepsin K-HRP), amber cap, ready to use	1 x 22 ml
SUB	Substrate (TMB solution), blue cap, ready to use	1 x 22 ml
STOP	Stop solution, white cap, ready to use	1 x 7 ml

## 3) ADDITIONAL MATERIAL ADDED TO THE KIT

- 1 self-adhesive aluminium plastic film
- QC protocol
- Protocol sheet
- Instruction manual for use

## 4) EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Precision pipettes calibrated to deliver 50, 200 and 1000 µl, disposable tips
- ELISA reader for absorbance at 450 nm (Reference 620 nm)
- Graph paper or software for calculation of results
- Plate washer is recommended for washing
- Distilled or deionised water

## 5) REAGENTS AND SAMPLE PREPARATION

Sample collection:

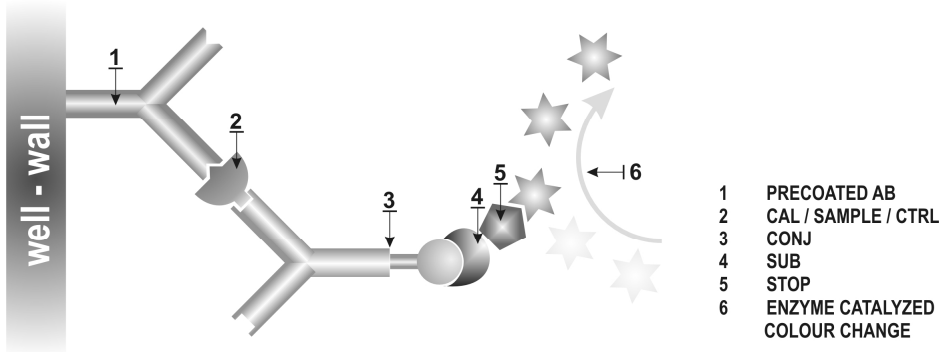
Freshly collected blood samples must be centrifuged and tested within 90 minutes if handled at room temperature. If handled at +4°C Cathepsin K is stable up to 2 days. For long term storage keep the samples at least at -20°C or better at -70°C. Up to 4 freeze/thaw cycles do not change the results. Lipemic or hemolyzed samples may give erroneous results. Samples should be mixed well before assaying.

Cell culture supernatants do not need any special pre-treatment. They can also be read against the supplied STD (standards).

#### Reconstitution / Handling:

- WASHBUF (Wash buffer): Dilute the concentrate 1:20 (1+19) e.g. 50 ml WASHBUF + 950 ml distilled water. Crystals in the buffer concentrate will dissolve at room temperature. The diluted WASHBUF is stable at 2-8°C until expiry date stated on label. Use only diluted WASHBUF (Wash buffer) for the assay performance.
- STD (Standard) and CTRL (Control): Pipette 1ml of ASYBUF (Assay buffer) to the vial. Leave at room temperature (18-26°C) for 20 min. **MIX WELL** on a Vortex Mixer. Aliquot the standards into Eppendorf tubes and freeze the standards as soon as possible after usage. Do not let them stand at room temperature. Reconstituted standard and control are stable at -20°C or -70°C until expiry date stated on the label.  
Avoid freeze – thaw cycles.

### 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 BLANK/STD/SAMPLE/CTRL (Blank/Standard/Sample/Control) on the protocol sheet.
Take microtiter strips out of the alu bag, take a minimum of one well as Blank. Store unused strips with desiccant at 2-8°C in the alu bag. Strips are stable until expiry date stated on the label.
Add 50 µl STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) in duplicate into respective wells, except blank.
Add 200 µl CONJ (anti Cathepsin K-HRPO) into each well, except blank, swirl gently.
<b>Cover tightly and incubate over night (20-24h) at room temperature (18-26°C) in the dark.</b>
Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer), remove remaining WASHBUF by hitting plate against paper towel after the latest wash.
Add 200 µl SUB (Substrate) into each well.
<b>Incubate for 30 min at room temperature (18-26°C) in the dark.</b>
Add 50 µl STOP (Stop solution) into each well.
Measure absorbance immediately at 450 nm with reference 620 nm, if available.

### 8) CALCULATION OF RESULTS

Use commercially available software or graph paper for calculation of the results. Subtract the blank extinction from all values and construct the standard curve from the standard values. Obtain the concentration of the samples from this standard curve. Respective dilution factors have to be considered.

The quality control protocol supplied with the kit shows the results of the final release QC for each kit. Data for optical density obtained by customers may differ due to various influences and/or due to the normal decrease of signal intensity during shelf life. However, this does not affect validity of results as long as an optical density of 1.50 is obtained for the standard with the highest concentration.

### 9) ASSAY CHARACTERISTICS

Normal range:	Median: 8.7 pmol/l (n = 30) It is recommended to establish the normal range for each laboratory.
Standard range:	0 to 300 pmol/l
Sample volume:	50 µl human serum or cell culture supernatant
Detection Limit: (0 pmol/l + 3 SD):	1.1 pmol/l
Incubation time:	Over night (20-24h) / 30 min

### 10) PRECISION

Intra-Assay (n=16)			Inter-Assay (n=10)		
Mean (pmol/l)	72	298	Mean (pmol/l)	62	276
SD	3	18	SD	4	22
CV%	4%	6%	CV%	6%	8%

### 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 with 3<sup>rd</sup> generation tests against HIV Ab and HBsAg; and were found negative. Nevertheless, they should be handled and disposed as if they were infectious.

All liquid reagents contain 0.01% Proclin 300 as preservative.

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

- Do not pipette by mouth.
- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics where reagents are used.
- Avoid all contact with the reagents by using gloves. Sulfuric acid is irritating to eyes and skin. Flush with water if contact occurs. Avoid contact with skin and mucous. Irritations are possible – Flush with water after contact!!

### 13) LITERATURE

- "Cathepsin K, osteoclastic resorption, and osteoporosis therapy".  
Zaidi M. et al.; J Bone Miner Res 2001 Oct;16(10):1747-9
- "New insights into the regulation of cathepsin K gene expression by osteoprotegerin ligand"  
Corisdeo S. et al.; Biochem Biophys Res Commun 2001 Jul 13;285(2):335-9
- "Linking osteopetrosis and pycnodysostosis: regulation of cathepsin K expression by the microphthalmia transcription factor family" Motyckova G. et al.; Proc Natl Acad Sci U S A 2001 May; 98(10):5798-803
- "Human osteoclast cathepsin K is processed intracellularly prior to attachment and bone resorption"  
Dodds RA et al.; Bone Miner Res 2001 Mar;16(3):478-86

For Reference Purposes Only

## 1) EINLEITUNG

Cathepsin K ist eine in Osteoklasten hoch exprimierte Cysteinprotease, die als 329 Aminosäuren langer Pre-Cursor hergestellt wird. Diese Protease wird während der Resorption des Knochens autokatalytisch in die 215 Aminosäuren lange (MW 23.495) aktive Form und ein inaktives Fragment gespalten. Cathepsin K baut die Kollagenmatrix des Knochens ab, sobald die mineralischen Bestandteile aufgelöst worden sind. Es ist das mengenmäßig am meisten hergestellte Protein der aktiven, resorbierenden Osteoklasten und stellt damit den spezifischsten Marker für die Resorptionsaktivität dar. Cathepsin K hat somit eine Schlüsselrolle im Umbau als auch der Zerstörung von Knochengewebe. Die hohe Homologie von Cathepsin K bei verschiedenen Spezies (Maus 86%, Ratte 88%, Schwein 97%, Hase 96%) bietet die Möglichkeit, diesen Test zum Studium der genannten Erkrankungen in Tiermodellen einzusetzen.

### FORSCHUNGSGEBIETE

- Primäre und sekundäre Osteoporose
- Entzündliche Prozesse mit Auswirkungen auf die Knochenmatrix (z.B. rheumatoide Arthritis)
- Monitoring einer antiresorptiven Therapie
- Forschung im Bereich des Knochenstoffwechsels

## 2) INHALT DES KITS

CONT	KIT KOMPONENTEN	MENGE
PLATE	Polyklonaler Schaf anti Cathepsin K Antikörper, beschichtet auf Mikrotiterplattenstreifen im Streifenhalter. Verpackt im Alu Säckchen mit Trockenmittel	12 x 8 Teste
WASHBUF	Waschpuffer, 20fach Konzentrat, durchsichtige Kappe	1 x 50 ml
ASYBUF	Assay Puffer, rote Kappe, gebrauchsfertig	1 x 25 ml
STD	Standards, (0; 11; 33; 100; 300 pg/ml), weiße Kappen, lyophilisiert mit blauer Farbe	5 x lyophilisiert
CTRL	Kontrolle, gelbe Kappe, lyophilisiert, Konzentration nach Rekonstitution siehe Etikett	1 x lyophilisiert
CONJ	Konjugat, (anti Cathepsin K-HRPO), braune Kappe, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
SUB	Substrat (TMB Lösung), blaue Kappe, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
STOP	Stopp Lösung, weiße Kappe, gebrauchsfertig	1 x 7 ml

## 3) ZUSÄTZLICHES MATERIAL IM KIT

- 1 selbstklebende Aluminium-Abdeckfolie
- QC Protokoll
- Protokoll Blatt
- Arbeitsanleitung (Beipacktext)

## 4) ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL UND GERÄTE

- Kalibrierte Präzisionspipetten für 50, 200 und 1000 µl, inkl. Pipettenspitzen
- Mikrotiterplattenphotometer mit 450 nm Filter (620 nm Referenz)
- Millimeterpapier oder Software
- Mikrotiterplatten Wascher wird empfohlen
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

## 5) REAGENZIEN UND PROBENVORBEREITUNG

### Probenbehandlung:

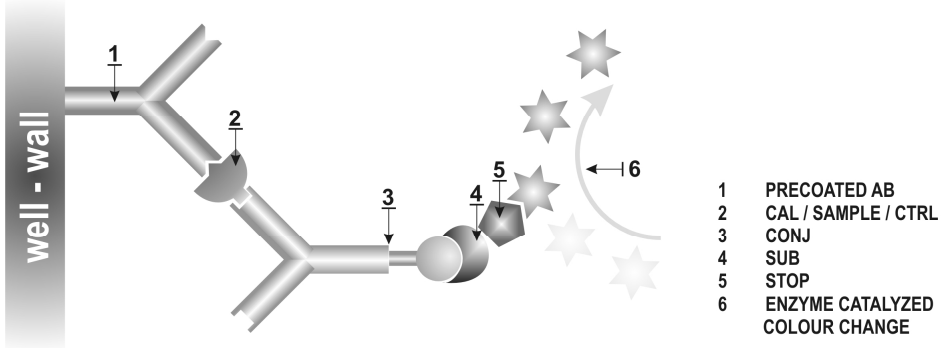
Frisch abgenommene Blutproben sollten, sofern bei Raumtemperatur gelagert, innerhalb von 90 Minuten zur Serumgewinnung zentrifugiert werden. Bei 4°C ist Cathepsin K für 2 Tage stabil. Zur Langzeitlagerung sollten die Proben zumindest bei -20°C oder besser bei -70°C aufbewahrt werden. Bis zu 4 Frier/Tauzyklen verändern die Messwerte nicht. Lipämische und hämolytische Proben können falsche Ergebnisse liefern. Proben vor Verwendung gut mischen

Zellkulturüberstände bedürfen keiner speziellen Vorbehandlung und können gegen die mitgelieferten STD (Standards) gemessen werden.

#### Rekonstitution / Handhabung:

- WASHBUF (Waschpuffer): Das mitgelieferte Konzentrat wird 1:20 verdünnt (zB. 50 ml WASHBUF + 950 ml destilliertes Wasser). Kristalle im Pufferkonzentrat lösen sich bei Raumtemperatur auf. Der verdünnte WASHBUF ist bei 2-8°C bis zum Ablaufdatum haltbar. Im Testsystem darf nur verdünnter WASHBUF (Waschpuffer) verwendet werden.
- STD (Standards) und CTRL (Kontrolle): Lösen Sie das Lyophilisat in jeweils 1ml ASYBUF (Assay Puffer) bei Raumtemperatur (18-26°C) für 20 min. **GUT MISCHEN** (Vortex Mixer). Standards in Eppendorfgefäße aliquotieren und nach Verwendung sobald wie möglich einfrieren. Nicht bei Raumtemperatur stehen lassen. Die rekonstituierten STD und CTRL sind bei -20° oder -70°C bis zum Ablaufdatum haltbar. Vermeiden Sie Frier/Tauzyklen.

#### 6) TESTPRINZIP



#### 7) TESTPROTOKOLL

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen.  
Markieren Sie die Positionen für BLANK/STD/PROBE/CTRL (Leerwert/Standard/Probe/Kontrolle) am Protokoll Blatt.  
Nehmen Sie die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Alu Säckchen. Mindestens 1 Well für den Leerwert reservieren. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können mit Trockenmittel im Alu Säckchen bis zum angegebenen Ablaufdatum gelagert werden.

Pipettieren Sie 50 µl STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Probe/Kontrolle) in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen, mit Ausnahme des Leerwertes.

Pipettieren Sie 200 µl CONJ (anti Cathepsin K-HRPO) in alle Wells mit Ausnahme des Leerwertes, gut mischen.

**Streifen abdecken und über Nacht (20-24h) im Dunklen bei Raumtemperatur (18-26°C) inkubieren.**

Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen.

Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.

Pipettieren Sie 200 µl SUB (Substrat) in alle Wells.

**30 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren.**

Pipettieren Sie 50 µl STOP (Stopplösung) in alle Wells.

Extinktion bei 450 nm messen, mit 620 nm als Referenz, falls möglich.

#### 8) BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Konstruieren Sie eine Standardkurve aus den Werten der Standards unter Verwendung von kommerziell erhältlichem Millimeterpapier oder einer geeigneten Software. Die OD des Leerwertes ist von allen Wells abzuziehen. Die Konzentration der Proben wird aus der Standardkurve abgelesen. Eventuelle Verdünnungen müssen gegebenenfalls berücksichtigt werden.

Auf dem beige packten QC Protokoll sind die Resultate bei der QC Freigabe des Kits vermerkt. Vom Verwender erhaltene Daten der optischen Dichte (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 erreicht.

### 9) TESTMERKMALE

Referenzwerte:	Median: 8,7 pmol/l (n = 30) Es wird jedem Labor empfohlen, eigene Referenzbereiche zu ermitteln.
Standardbereich:	0 bis 300 pmol/l
Probenvolumen:	50 µl humanes Serum oder Zellkulturüberstand
Detektionsgrenze:	1,1 pmol/l
Inkubationszeiten:	Über Nacht (20-24h) / 30 min

### 10) PRÄZISION

Intra-Assay (n=16)			Inter-Assay (n=10)		
Durchschnitt (pmol/l)	72	298	Durchschnitt (pmol/l)	62	276
SD	3	18	SD	4	22
VK%	4%	6%	VK%	6%	8%

### 11) TECHNISCHE HINWEISE

- Reagenzien von verschiedenen Lots oder Testen 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 mit Abdeckfolie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.

### 12) VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Bestandteile humanen Ursprunges wurden mit Testen der 3. Generation auf HIV-Ak und HBsAg getestet und negativ gefunden. Trotzdem sollten die Reagenzien als potentiell infektiös behandelt werden.

Alle flüssigen Reagenzien enthalten 0,01% Proclin 300 als Konservierungsmittel.

Proclin 300 ist in der verwendeten Konzentration nicht toxisch. Allergische Reaktionen sind möglich.

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

### 13) LITERATUR

- "Cathepsin K, osteoclastic resorption, and osteoporosis therapy".  
Zaidi M. et al.; J Bone Miner Res 2001 Oct;16(10):1747-9
- "New insights into the regulation of cathepsin K gene expression by osteoprotegerin ligand"  
Corisdeo S. et al.; Biochem Biophys Res Commun 2001 Jul 13;285(2):335-9
- "Linking osteopetrosis and pycnodysostosis: regulation of cathepsin K expression by the microphthalmia transcription factor family" Motyckova G. et al.; Proc Natl Acad Sci U S A 2001 May; 98(10):5798-803
- "Human osteoclast cathepsin K is processed intracellularly prior to attachment and bone resorption"  
Dodds RA et al.; Bone Miner Res 2001 Mar;16(3):478-86

**NOTES:**

For Reference Purposes Only

# 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 médico per diagnóstico in vitro (per uso diagnóstico 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 orvosdiagnostikai 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 przez / Gyártotta / Vyrobené / Vyrobeno



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



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



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

# **BI-20432 CATHEPSIN K**

## **ASSAY PROTOCOL AND CHECKLIST**

- 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 foil bag and mark positions on the protocol sheet.
- Add 50 µl STD/SAMPLE/CTRL (standard/ sample/control) into all wells, except blank.
- Add 200 µl CONJ (Conjugate) into each well, except blank, swirl gently.
- Cover tightly and incubate over night (20-24h) at room temperature (18-26°C) in the dark.**
- Aspirate and wash wells with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer) five times. Remove remaining buffer by hitting plate against paper towel.
- Add 200 µl SUB (Substrate) into each well.
- Incubate for 30 minutes at room temperature (18-26°C), in the dark.**
- Add 50 µl STOP (Stop solution) into each well.
- Read Optical Density at 450 nm with reference 620 nm, if available.