

SAS-MX Serum Protein

Instructions For Use

REF 100100

SAS-MX Protéines Sériques

Fiche technique

SAS-MX Serumprotein

Anleitung

Sieroproteine SAS-MX

Istruzioni per l'uso

Proteínas Séricas SAS-MX

Instrucciones de uso

Contents

English	1
Français	5
Deutsch	9
Italiano	14
Español	19



INTENDED PURPOSE

The SAS-MX Serum Protein kit is intended for the separation and quantitation of serum proteins by agarose gel electrophoresis.

Serum contains over 100 individual proteins, each with a specific set of functions which are subject to specific variation in concentration under different pathological conditions¹.

Since the introduction of moving boundary electrophoresis by Tiselius², and the subsequent use of zone electrophoresis, serum proteins have been fractionated on the basis of their charge at a particular pH. The SAS-MX Serum protein kit separates serum proteins into 5 main classes (albumin, alpha 1-globulin, alpha 2-globulin, beta-globulin, and gamma globulin) according to charge in an agarose gel. The proteins are then stained to allow visualisation and quantitative interpretation. Each of the classical electrophoretic zones, with the exception of albumin, normally contains 2 or more components. The relative proportions of these fractions have proven to be useful aids in the diagnosis and prognosis of certain disease states^{3,5}.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

All reagents are for in-vitro diagnostic use only. Do not ingest or pipette by mouth any kit component. Wear gloves when handling all kit components. Refer to the product safety data sheet for risk and safety phrases and disposal information.

COMPOSITION**1. SAS-MX Serum Protein Gel**

Contains agarose in a Tris / Barbitol buffer with thiomersal and sodium azide as preservative. The gel is ready for use as packaged.

2. Tris / Barbitol Buffer Concentrate

Contains barbitol and sodium barbitol with sodium azide as preservative. Dilute the contents of the bottle (100ml) with purified water (400ml) and mix well. Buffer salts may crystallize slightly on standing. Wash any crystals from the bottle with diluted buffer to ensure complete dissolution.

3. Acid Blue Stain Concentrate

Contains concentrated Acid Blue stain. Dilute the contents of the bottle to 700ml with purified water. Stir overnight and filter before use. Store in a tightly stoppered bottle.

4. Destain Solution Concentrate

Contains concentrated Destain Solution. Dilute the contents of the bottle in 2 litres of purified water. Store in a tightly stoppered bottle.

5. Other Kit Components

Each kit contains Instructions For Use and sufficient Sample Application Templates and Blotters A and C to complete 10 gels.

STORAGE AND SHELF-LIFE**1. SAS-MX Serum Protein Gel**

Gels should be stored at 15...30°C and are stable until the expiry date indicated on the package. DO NOT REFRIGERATE OR FREEZE. Deterioration of the gel may be indicated by 1) crystalline appearance indicating the gel has been frozen, 2) cracking and peeling indicating drying of the gel or 3) visible contamination of the agarose from bacterial or fungal sources.

2. Tris / Barbitol Buffer

The buffer concentrate should be stored at 15...30°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Diluted buffer is stable for 2 months at 15...30°C. Cloudiness or poor performance of the diluted buffer may indicate deterioration.

3. Acid Blue Stain

The stain concentrate should be stored at 15...30°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Diluted stain solution is stable for 6 months at 15...30°C. It is recommended to discard used stain immediately to prevent depletion of staining capability. Poor staining performance may indicate deterioration of the stain solution.

4. Destain Solution

The destain concentrate should be stored at 15...30°C and is stable until the expiry date indicated on the label. The diluted destain solution is stable for 6 months at 15...30°C. Cloudiness may indicate deterioration of the destain solution.

ITEMS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Cat. No. 4063 SAS-MX Chamber

Cat. No. 1525 EPS600 Power Supply

Drying oven with forced air capable of 60...70°C

Methanol

Purified water

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Freshly collected serum is the specimen of choice. Samples can be stored at 15...30°C for up to 4 days, 2...6°C for up to 2 weeks or 6 months at -20°C⁶. Urine and CSF can also be used following a suitable concentration step (50 - 100X). The use of plasma will result in a fibrinogen band between the beta and gamma fractions.

Interfering Factors: 1) Haemolysis may cause false elevation in the alpha 2 and beta fractions.
2) Inaccurate results may be obtained on specimens left uncovered, due to evaporation.

Samples / controls should be diluted 1:4 (1+3) with buffer before use. For more accurate albumin quantitations by densitometry, the sample dilution can be increased to 1:8 (1+7). The exact amount should be determined in each individual laboratory. The use of increased sample dilution will increase the quantitation of albumin, but will reduce the sensitivity of the method for minimonoclonal bands.

STEP-BY-STEP PROCEDURE

1. Remove the gel from the packaging and place on a paper towel. Remove the overlay and blot the gel surface with a blotter C, discard blotter.
2. Align the sample application template with the arrows at the edge of the gel. Place a blotter A on top of the template and rub a finger across the slits to ensure good contact. Remove the blotter and retain for use in Step 5.
3. Apply 3µl of sample to each slit and allow to absorb for 4 minutes.
4. Whilst the samples are absorbing, pour 25ml of buffer into each inner section of the SAS-MX Chamber.
5. Following sample absorption, blot the template with the blotter A retained from step 2 and remove both blotter and template.

6. Position the gel in the chamber agarose side down, aligning the positive (+) and negative (-) sides with the corresponding positions on the chamber.
7. Electrophorese the gel: 80 volts, 30 minutes.
8. Following electrophoresis, dry the gel at 60...70°C. **NOTE:** The drying of the gel should take no more than 5 - 10 minutes to prevent diffusion of bands. If this cannot be achieved, fix the gel for 5 minutes in methanol prior to drying.
9. Immerse the dry gel in stain solution for 10 minutes.
10. Destain the gel in 2 x 1 minute washes of destain solution or until the background is clear.
11. Wash the gel briefly in purified water and dry.

QUALITY CONTROL

Kemtrol Serum Controls (Cat. No's. 7024 and 7025) can be used to verify all phases of the procedure and should be used on each plate run. Refer to the package insert provided for appropriate assay values.

INTERPRETATION OF RESULTS.

It is recommended that any evaluation of the gels is performed against normal values produced for this method in each individual laboratory.

For a complete review of serum protein evaluation, see Ritzmann, S.E, 1982⁵. Studies show that the values are the same for both males and non-pregnant females. Some differences are seen in pregnant females at term and women on oral contraceptives.

Age has some effect on normal levels. Cord blood has a decreased total protein, albumin, alpha2 and beta fractions; slightly increased alpha1 and normal or increased gamma fraction (largely of maternal origin). The gamma globulins drop rapidly until about 3 months of age, while other fractions have reached adult levels by this time. Adult levels of the gamma globulins are not reached until 10-16 years of age. The albumin decreases and beta globulin increases over the age of 40.

1. Qualitative Evaluation:

The gels may be visually inspected for the presence or absence of particular bands of interest.

2. Quantitative Evaluation:

Scan the gels gel, side down, at 595nm.

In either case, an elevation or decrease in particular serum components or the detection of unusual serum components require further investigation. The completed SAS-MX Serum Protein gel is stable for an indefinite period of time.

LIMITATIONS

Since all electrophoresis procedures are non-linear, it is important to follow these Instructions For Use closely to ensure optimal resolution and reproducible results. Failure to follow these Instructions For Use may affect the results obtained.

REFERENCE VALUES

Using 20 normal specimens from male and female donors with an age range of 20-59 years, the following normal ranges were obtained (these are presented as a guideline only):

Protein Fraction	Mean (%)	± 2SD Range
Albumin	56.4	50.8 - 62.1
Alpha I	3.8	2.5 - 5.0
Alpha2	11.3	8.8 - 13.8
Beta	12.6	10.0 - 15.1
Gamma	16.0	11.6 - 20.4

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Reproducibility

	Within Gel (n=10)		Between Gel (n=100)	
	Mean (%)	CV (%)	Mean (%)	CV (%)
Albumin	57.2	1.9	57.3	2.6
Alpha I	5.2	3.2	5.2	5.4
Alpha 2	12.4	3.5	12.0	4.3
Beta	10.5	5.5	10.7	5.1
Gamma	14.7	4.6	14.7	5.2

Sensitivity

The method is sensitive to 0.3 g/L per band, determined as the lowest concentration of protein which was evident as a discrete band on the completed gel.

Linearity

The linearity of the method is a function of densitometer specification as well as gel performance. It is recommended that each customer determine the linearity of the method based upon the densitometer in use in the laboratory.

BIBLIOGRAPHY

1. Alper, C.A. 'Plasma Protein Measurements as a Diagnostic Aid', N. Eng. J. Med., 1974; 291 : 287-290.
2. Tiselius, A. 'A New Apparatus for Electrophoretic Analysis of Colloidal Mixtures', Trans. Faraday Soc., 1937; 33 : 524.
3. Ritzmann, S.E. and Daniels, J.C. 'Diagnostic Proteinology: Separation and Characterization of Proteins, Qualitative and Quantitative Assays' in Laboratory Medicine, Harper and Row, Inc., Hagerstown, 1979.
4. Tietz, N.W. (Ed.), Textbook of Clinical Chemistry, W.B. Saunders Co., Philadelphia, pages 579-582, 1986.
5. Ritzmann, S.E. (Ed.), Protein Abnormalities Volume I : Physiology of Immunoglobulins - Diagnostic and Clinical Aspects', Allen R. Liss, Inc., New York, 1982.
6. Tietz, N.W. (Ed.), Textbook of Clinical Chemistry, (3rd Edition), W.B. Saunders Co., Philadelphia, page 524, 1995.

UTILISATION

Le kit SAS-MX Protéines Sériques est utilisé pour la séparation et la quantification des protéines sériques par électrophorèse en gel d'agarose.

Le sérum contient plus de 100 protéines qui ont chacune une fonction spécifique et qui peuvent subir des variations quantitatives en fonction de diverses conditions pathologiques¹.

Depuis l'introduction par Tiselius² de la mobilité électrophorétique, les protéines sériques sont fractionnées en fonction de leur charge à un pH déterminé.

Le kit SAS-MX Protéines sériques sépare les protéines sériques en 5 fractions principales (albumine, alpha 1, alpha 2, bêta et gammaglobulines) selon leur charge en gel d'agarose. Les protéines sont ensuite colorées pour permettre leur visualisation et l'interprétation semi-quantitative. Chaque fraction, à l'exception de l'albumine, contient au moins 2 composants. La proportion relative de ces différentes fractions peut aider à poser un diagnostic et à s'orienter vers certains stades de maladies^{3,5}.

PRECAUTIONS

Tous les réactifs sont à usage diagnostic in-vitro uniquement. Ne pas ingérer ou pipeter à la bouche aucun composant. Porter des gants pour la manipulation de tous les composants. Se reporter aux fiches de sécurité des composants du kit pour la manipulation et l'élimination.

COMPOSITION

1. Plaque SAS-MX Protéines Sériques

Contient de l'agarose dans un tampon Tris / Barbitol additionné de thimérosal et d'azide de sodium comme conservateur. Le gel est prêt à l'emploi.

2. Tampon concentré Tris / Barbitol

Contient du barbitol et sodium barbitol avec de l'azide de sodium comme conservateur. Diluer la bouteille (100ml) avec eau distillée (400ml) et mélanger. Le tampon concentré peut cristalliser, il est nécessaire de rincer la bouteille avec la tampon dilué afin d'assurer une dissolution complète du réactif.

3. Colorant Acide Bleu

Contient de colorant acide bleu concentré. Dissoudre le contenu du bouteille dans 700ml d'eau distillée, laisser sous agitation toute une nuit. Filtrer avant utilisation. Conserver en bouteille récipient fermé.

4. Solution décolorante concentrée

Contient de solution décolorante concentrée. Diluer le contenu du bouteille dans 2 litres d'eau distillée. Conserver en bouteille récipient fermé.

5. Autres composants du kit

Chaque kit contient également 1 fiche technique, des buvards A et C et des masques applicateur (Template) pour 10 gels.

STOCKAGE ET CONSERVATION

1. Plaque SAS-MX Protéines Sériques

Les gels doivent conservés entre 15...30°C, ils sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage. **NE PAS REFRIGERER OU CONGELER.** Les conditions suivantes indiquent une détérioration du gel: 1) cristaux visibles indiquant que le gel a été congelé, 2) de craquelures témoins d'une déshydratation du gel, 3) une contamination visible bactérienne ou fongique.

2. Tampon Tris / Barbitol

Le tampon concentré doit être conservé entre 15...30°C, il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Le tampon dilué est stable 2 mois entre 15...30°C. Un aspect floconneux ou une perte de performance indique une détérioration.

3. Colorant Acide Bleu

Le colorant concentré doit être conservé entre 15...30°C, il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Le colorant dilué est stable 6 mois entre 15...30°C. Il est recommandé de rejeter le colorant utilisé afin de prévenir une diminution de la capacité de coloration. Une performance de coloration diminuée, indique une détérioration.

4. Solution décolorante

Le décolorant concentré doit être conservé entre 15...30°C, il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Le décolorant dilué est stable 6 mois entre 15...30°C. Un aspect floconneux indique une détérioration.

MATERIELS NECESSAIRES NON FOURNIS

Réf. 4063 Chambre de migration SAS-MX

Réf. 1525 Générateur EPS600

Etuve ventilée jusqu'à 70°C

Méthanol

Eau distillée

PRELEVEMENTS DES ECHANTILLONS

L'utilisation de sérums fraîchement prélevés est fortement recommandée. Les échantillons peuvent être conservés 4 jours à 15...30°C, 2 semaines à 2...6°C ou 6 mois à -20°C⁶. Urine et LCR peuvent être utilisés après une concentration préalable (50 à 100 fois). L'utilisation de plasma laisse apparaître une bande entre les Béta et les gammaglobulines: le Fibrinogène.

Interférences: Un sérum hémolysé présente une bande entre les fractions alpha 2 et bêta.

Des résultats erronés peuvent être obtenus sur des échantillons ayant subi une concentration par évaporation.

Les échantillons / contrôles doivent être utilisés dilués au 1/4 (1+3) en tampon. Pour obtenir une quantification de l'albumine par densitométrie, les échantillons peuvent être dilués au 1/8 (1+7). La dilution exacte doit être déterminée par chaque laboratoire. L'augmentation de la dilution de l'échantillon, augmente la précision de détermination de l'albumine mais diminue en proportion la sensibilité pour la détection de fines bandes monoclonales.

METHODOLOGIE

1. Sortir le gel de son emballage et le déposer sur un papier absorbant. Retirer le film et sécher toute la surface du gel à l'aide d'un buvard C, jeter ensuite le buvard.
2. Disposer le masque applicateur échantillon en faisant correspondre les flèches avec les 2 fentes latérales. Placer un buvard A sur le masque et passer délicatement le doigt sur les fentes afin d'assurer un contact optimal. Retirer le buvard et le conserver pour l'étape 5.
3. Déposer 3µL d'échantillon dilué sur chaque fente et laisser absorber 4 minutes.

4. Pendant ce temps, verser 25ml de tampon dans chaque compartiment intérieur de la chambre de migration SAS-MX.
5. A l'aide du buvard A, retirer l'excès d'échantillon. Jeter le buvard et le masque applicateur.
6. Déposer le gel, agarose vers le bas, dans la chambre de migration, en respectant les polarités.
7. Faire migrer à: 80 Volts, 30 minutes.
8. A la fin de migration, sécher le gel à 60...70°C. **NOTE:** le gel doit être sec en 5 à 10 minutes afin d'éviter la diffusion des bandes. En cas d'impossibilité, fixer avant le séchage le gel dans un bain de méthanol pendant 5 minutes.
9. Plonger le gel dans le colorant pendant 10 minutes.
10. Décolorer dans la solution décolorante 2 x 1 minute ou jusqu'à l'obtention d'un fond de bande clair.
11. Rincer rapidement sous l'eau distillée et sécher le gel.

CONTROLE DE QUALITE

Les contrôles KEMTROL (Réf. 7024 ou 7025) doivent être utilisés pour vérifier toutes les étapes de la manipulation sur chaque plaque. Se reporter à la fiche des contrôles pour la vérification des valeurs.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres normales selon cette méthode.

Pour une interprétation complète, se référer à Ritzmann, S.E, 1982⁵. Différentes études montrent que les valeurs normales sont les mêmes pour l'homme et la femme non-enceinte. Certaines modifications sont observées chez la femme à terme et chez la femme sous contraceptif oral.

L'âge a quelques effets sur les valeurs normales. Le sang de cordon a des protéines totales diminuées, ainsi que l'Albumine, les Alpha 2 et les Béta. Les Alpha 1 sont légèrement augmentées et les Gamma sont normales ou augmentées (en partie d'origine maternelle). Les gamma diminuent rapidement aux environs de 3 mois, pendant que les autres fractions atteignent progressivement les valeurs adultes. Les Gamma augmentent encore de 10 à 16 ans. Après 40 ans, l'albumine et les Bétoglobulines augmentent.

1. **Evaluation Qualitative:** une lecture visuelle des plaques est nécessaire pour rechercher la présence éventuelle de protéines anormales.
2. **Evaluation Quantitative:** Lire la plaque de gel, agarose vers le bas à 595 nm.

Dans certains cas, une élévation ou diminution des composés particuliers du sérum ou la détection des protéines inhabituelles doit déclencher d'autres investigations. Après lecture, la plaque de gel peut-être conservée indéfiniment.

LIMITES

Comme toutes les procédures d'électrophorèse ne sont pas linéaires, il est très important de respecter scrupuleusement la fiche technique afin d'obtenir une résolution optimale et des résultats reproductifs. Un non respect de la fiche peut affecter les résultats obtenus.

VALEURS DE REFERENCE

L'utilisation de 20 échantillons normaux a permis d'obtenir les valeurs suivantes (données uniquement comme guide à la lecture):

Fraction	Moyenne (%)	± 2SD Intervalle
Albumine	56.4	50.8 - 62.1
Alpha 1	3.8	2.5 - 5.0
Alpha 2	11.3	8.8 - 13.8
Béta	12.6	10.0 - 15.1
Gamma	16.0	11.6 - 20.4

PERFORMANCES

Reproductibilité

	Intra-Plaqué (n=10)		Inter-Plaqué (n=100)	
	Moyenne (%)	CV (%)	Moyenne (%)	CV (%)
Albumine	57.2	1.9	57.3	2.6
Alpha 1	5.2	3.2	5.2	5.4
Alpha 2	12.4	3.5	12.0	4.3
Béta	10.5	5.5	10.7	5.1
Gamma	14.7	4.6	14.7	5.2

Sensibilité

La méthode est sensible jusqu'à 0.3 g/L par bande, déterminé comme la concentration la plus faible permettant la visualisation d'une discrète bande sur le gel.

Linéarité

La linéarité est fonction du densitomètre et du gel. Il est conseillé à chaque utilisateur de déterminer la linéarité en fonction du densitomètre utilisé.

BIBLIOGRAPHIE

1. Alper, C.A. 'Plasma Protein Measurements as a Diagnostic Aid', N. Eng. J. Med., 1974; 291 : 287-290.
2. Tiselius, A. 'A New Apparatus for Electrophoretic Analysis of Colloidal Mixtures', Trans. Faraday Soc., 1937; 33 : 524.
3. Ritzmann, S.E. and Daniels, J.C. 'Diagnostic Proteinology: Separation and Characterization of Proteins, Qualitative and Quantitative Assays' in Laboratory Medicine, Harper and Row, Inc., Hagerstown, 1979.
4. Tietz, N.W. (Ed.), Textbook of Clinical Chemistry, W.B. Saunders Co., Philadelphia, pages 579-582, 1986.
5. Ritzmann, S.E. (Ed.), Protein Abnormalities Volume I : Physiology of Immunoglobulins - Diagnostic and Clinical Aspects', Allen R. Liss, Inc., New York, 1982.
6. Tietz, N.W. (Ed.), Textbook of Clinical Chemistry, (3rd Edition), W.B. Saunders Co., Philadelphia, page 524, 1995.

ANWENDUNGSBEREICH

Der SAS-MX Serumprotein Kit dient zur Auftrennung und Auswertung der Serumproteine mittels Agarosegel-Elektrophorese.

Serum enthält über 100 Einzelproteine, von denen jedes über eine Reihe von spezifischen Funktionen verfügt, die von der spezifischen Konzentrationsabweichung in unterschiedlichen pathologischen Zuständen abhängen¹.

Seit der Einführung der Moving-Boundary-Elektrophorese durch Tiselius² und der nachfolgenden Verwendung der Zonen-Elektrophorese, wurden Serumproteine basierend auf ihrer elektrischen Ladung bei einem bestimmten pH-Wert aufgetrennt.

Mit dem SAS-MX Serumprotein Kit werden die Serumproteine entsprechend ihrer Ladung im Agarosegel in die 5 Hauptfraktionen (Albumin, Alpha-1-Globulin, Alpha-2-Globulin, Beta-Globulin und Gamma-Globulin) aufgetrennt. Nach einer anschließenden Färbung können die Proteinbanden visuell oder quantitativ ausgewertet werden. Jede der klassischen Elektrophorese-Zonen, mit Ausnahme von Albumin, enthält üblicherweise 2 oder mehr Komponenten. Die relativen Ausmaße dieser Fraktionen haben sich als nützliche Hilfsmittel in der Diagnose und Prognose von bestimmten Krankheitsstadien erwiesen^{3,5}.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Reagenzien sind nur zur In-Vitro-Diagnostik bestimmt. Nicht einnehmen oder mit dem Mund pipettieren. Das Tragen von Handschuhen beim Umgang mit den Kit-Komponenten ist erforderlich. Bitte lesen Sie das Sicherheitsdatenblatt mit den Gefahrenhinweisen und Sicherheitsvorschlägen zu den Komponenten, sowie die Informationen zur Entsorgung.

INHALT**1. SAS-MX Serumprotein-Gel**

Enthält Agarose in einem Tris / Barbitalpuffer mit Thiomersal und Natriumazid als Konservierungsmittel. Das Gel ist gebrauchsfertig verpackt.

2. Tris-Barbital-Puffer Konzentrat

Enthält Barbital und Natriumbarbital mit Natriumazid als Konservierungsmittel. Den Inhalt der Flasche (100ml) vor dem Gebrauch mit dest. Wasser (400ml) verdünnen und gut mischen. Puffersalze können beim Stehenlassen leicht kristallisieren. Kristalle mit der verdünnten Pufferlösung aus der Flasche spülen, um eine vollständige Auflösung sicherzustellen.

3. Saures-Blau-Farbstoff

Enthält eine konzentrierte Saures-Blau-Farbstoff-Lösung. Den Inhalt der Flasche mit 700ml dest. Wasser verdünnen. über Nacht rühren und vor dem Gebrauch filtern. Lagerung des Farbstoffs in einer fest verschlossenen Flasche.

4. Entfärbelösung

Enthält konzentrierte Entfärbelösung. Den Inhalt jeder Flasche mit 2 Liter dest. Wasser verdünnen. Lagerung des Farbstoffs in einer fest verschlossenen Flasche.

5. Weitere Kit-Komponenten

Jeder Kit enthält eine Methodenbeschreibung sowie die zur Durchführung der Elektrophorese notwendigen Auftrageschablonen und Blotter A und Blotter C für 10 Gele.

LAGERUNG UND STABILITÄT

1. SAS-MX Serumprotein-Gel

Gele sollten bei 15...30°C gelagert werden und sind bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. NICHT IM KÜHLSCHRANK ODER TIEFKÜHLSCHRANK AUFBEWAHREN! Der Verfall des Gels zeigt sich durch 1) Kristallisation, die auf ein Einfrieren des Gels hindeutet, 2) Brüchigkeit und Abblättern, die auf ein Austrocknen des Gels hindeuten, bzw. 3) sichtbare Kontamination der Agarose durch Bakterien oder Pilze.

2. Tris-Barbital-Puffer

Der ungeöffnete Puffer sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Der verdünnte Puffer ist für 2 Monate stabil bei einer Temperatur zwischen 15...30°C. Trübung oder schlechte Leistung des verdünnten Puffers kann auf einen Verfall hinweisen.

3. Saures-Blau-Farbstoff

Das Farbstoff-Konzentrat sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Die verdünnte Farbstofflösung ist für 6 Monate stabil bei einer Temperatur zwischen 15...30°C. Es wird empfohlen, den benutzten Farbstoff unverzüglich zu entsorgen, um den Verlust der Färbungsfähigkeit zu verhindern. Eine schlechte Färbung weist auf den Verfall der Farbstofflösung hin.

4. Entfärbelösung

Das Entfärbekonzentrat sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Die verdünnte Entfärbelösung ist für 6 Monate stabil bei einer Temperatur zwischen 15...30°C. Trübung kann auf den Verfall der Entfärbelösung hinweisen.

NICHT MITGELIEFERTES ABER BENÖTIGTES MATERIAL

Kat. Nr. 4063 SAS-MX Kammer

Kat. Nr. 1525 EPS600 Netzteil

Ofen mit Umluft und einer Temperaturleistung von 70°C

Methanol

Wasser

PROBENAHEME UND VORBEREITUNG

Frisches Serum ist das Untersuchungsmaterial der Wahl. Die Proben können bis zu 4 Tage bei 15...30°C, bis zu 2 Wochen bei 2...6°C und bis zu 6 Monate bei -20°C aufbewahrt werden. Urin und Liquores können nach einem angemessenen Konzentrierungsschritt (50-100-fach) ebenfalls verwendet werden. Die Verwendung von Plasma resultiert in einer Fibrinogenbande im Bereich zwischen Beta- und Gamma-Fraktion.

Interferenzen: 1) Hämolytische Proben können falsche Alpha-2- und Beta-Werte zeigen. 2) Längere Zeit unbedeckt stehende Proben können durch Verdunstungseffekte falsche Werte ergeben.

Proben / Kontrollen sollten vor dem Gebrauch mit Puffer im Verhältnis 1:4 (1+3) verdünnt werden. Für genauere quantitative Albumin-Bestimmungen mittels Densitometrie, kann die Probe-Verdünnung auf 1:8 (1+7) erhöht werden. Die genaue Menge sollte in dem jeweiligen Labor bestimmt werden. Eine höhere Verdünnung erlaubt zwar eine genaue Albuminquantifizierung, reduziert aber die Sensitivität der Methode bei der Identifizierung minimonoklonaler Banden.

SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE

1. Nehmen Sie das Gel aus der Verpackung und legen Sie es auf ein Papiertuch. Entfernen Sie die Schutzfolie, blotten Sie kurz die Geloberfläche mit einem Blotter C und entfernen Sie diesen.
2. Legen Sie die Auftrageschablone so auf das Gel, dass die Pfeile am Rand des Gels liegen. Legen Sie einen Blotter A auf die Schablone und streichen Sie mit einem Finger über die Schlitz der Schablone, um eine gute Haftung sicherzustellen. Entfernen Sie den Blotter und legen Sie ihn bis zur Verwendung in Schritt 5 beiseite.
3. Pipettieren Sie $3\mu\text{l}$ der Probe in die jeweiligen Schablonenschlitze. 4 Minuten die Probe ins Gel diffundieren lassen.
4. Füllen Sie je 25ml Puffer in die beiden inneren Bereiche der SAS-MX-Kammer.
5. Drücken Sie nach den 4 Minuten den Blotter A aus Schritt 2 sanft auf die Schablone und entfernen Sie Schablone und Blotter.
6. Spannen Sie das Gel in die Kammer, Agarose nach unten, und achten Sie auf übereinstimmende Polarisierung (Pluszeichen auf dem Gel und Pluszeichen in der Kammer).
7. Gel-Elektrophorese durchführen: 30 Minuten, 80 Volt.
8. Nach der Elektrophorese trocknen Sie das Gel bei $60\text{...}70^{\circ}\text{C}$. **HINWEIS:** Der Trocknungsvorgang sollte nicht länger als 5-10 Minuten dauern, da es sonst zu Diffusionsphänomenen kommt. Die Proteine können aber auch vor dem Trocknen 5 Minuten in Methanol fixiert werden.
9. Färben Sie das trockene Gel 10 Minuten in der Färbelösung.
10. Entfärben Sie das Gel zweimal für je 1 Minuten in der Entfärbe-Lösung (oder bis der Gelhintergrund klar ist).
11. Spülen Sie das Gel kurz mit dest. und trocknen Sie das Gel.

QUALITÄTSKONTROLLE

Zur Überprüfung des gesamten Elektrophoreseablaufs sollten Sie bei jeder Trennung Kontrollen mitlaufen lassen, z.B. die Kemptrol-Kontrollseren: Kat. Nr. 7024 und 7025. Die entsprechenden Vertrauenswerte finden sich in der Packungsbeilage.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Es wird empfohlen, dass jegliche Auswertung der Gele im Vergleich mit Normalwerten durchgeführt wird, die in dem jeweiligen Labor für diese Methode ermittelt werden.

Für eine komplette Überprüfung der Serumprotein-Auswertung verweisen wir auf Ritzmann, S.E. 1982¹. Studien zeigen, dass die Werte bei Männern und nicht schwangeren Frauen identisch sind. Einige Abweichungen werden bei schwangeren Frauen am Geburtstermin und bei Frauen, die orale Verhütungsmittel benutzen, festgestellt.

Das Alter hat Auswirkungen auf die Normalwerte. Nabelschnurblut hat einen verringerten Gesamtproteingehalt, Albumin, Alpha-2- und Beta-Fraktionen; leicht erhöhte Alpha-1 und normale bzw. erhöhte Gamma-Fraktion (weitgehend mütterlicher Herkunft). Die Gammaglobuline fallen rasch bis zum Alter von 3 Monaten, während andere Fraktionen bis dahin bereits Erwachsenenwerte erreicht haben. Erwachsenenwerte der Gammaglobuline werden erst im Alter zwischen 10 und 16 Jahren erreicht. Albumin verringert und Betaglobulin erhöht sich im Alter von 40+.

- 1. Qualitative Auswertung:** Untersuchen Sie die Gele visuell auf das Vorhandensein bzw. Fehlen von Banden hin.
- 2. Quantitative Auswertung:** Scannen Sie die Trennungen bei einer Wellenlänge von 595nm (Gelseite nach unten!).

In Fällen der Erhöhung oder Verringerung von bestimmten Serumkomponenten bzw. der Entdeckung von ungewöhnlichen Serumkomponenten ist eine weitere Untersuchung erforderlich. Das fertige, trockene SAS-MX ist praktisch unbegrenzt haltbar.

EINSCHRÄNKUNGEN

Da alle Elektrophoreseverfahren nicht linear verlaufen, ist es wichtig, diese Anleitungen streng zu befolgen, um eine optimale Auflösung und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Die Nichteinhaltung dieser Anleitungen kann sich negativ auf die Ergebnisse auswirken.

REFERENZWERTE

Bei 20 normalen Proben von männlichen und weiblichen Spendern zwischen 20 und 59 Jahre wurden die folgenden Normalwerte ermittelt (diese gelten nur als Richtlinie):

Protein-Fraktion	Mittel (%)	± 2SD Bereich
Albumin	56.4	50.8 - 62.1
Alpha 1	3.8	2.5 - 5.0
Alpha 2	11.3	8.8 - 13.8
Beta	12.6	10.0 - 15.1
Gamma	16.0	11.6 - 20.4

LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

Reproduzierbarkeit

	Intra Assay (n=10)		Inter Assay (n=100)	
	Mittel (%)	CV (%)	Mittel (%)	CV (%)
Albumin	57.2	1.9	57.3	2.6
Alpha 1	5.2	3.2	5.2	5.4
Alpha 2	12.4	3.5	12.0	4.3
Beta	10.5	5.5	10.7	5.1
Gamma	14.7	4.6	14.7	5.2

Sensibilität

Die Sensibilität der Methode beträgt 0,3 g/L pro Bande und wurde als die niedrigste Protein-Konzentration ermittelt, die als eine diskrete Bande auf dem fertigen Gel zu erkennen war.

Linearität

Die Linearität der Methode ist abhängig von der Densitometer-Spezifikation sowie der Leistung des Gels. Es wird empfohlen, dass jeder Kunde die Linearität der Methode basierend auf dem im Labor verwendeten Densitometer selbst bestimmt.

LITERATUR

1. Alper, C.A. 'Plasma Protein Measurements as a Diagnostic Aid', N. Eng. J. Med., 1974; 291 : 287-290.
2. Tiselius, A. 'A New Approach for Electrophoretic Analysis of Colloidal Mixtures', Trans. Faraday Soc., 1937; 33 : 524.
3. Ritzmann, S.E. and Daniels, J.C. 'Diagnostic Proteinology: Separation and Characterization of Proteins, Qualitative and Quantitative Assays' in Laboratory Medicine, Harper and Row, Inc., Hagerstown, 1979.
4. Tietz, N.W. (Ed.), Textbook of Clinical Chemistry, W.B. Saunders Co., Philadelphia, Seite 579-582, 1986.
5. Ritzmann, S.E. (Ed.), Protein Abnormalities Volume I : 'Physiology of Immunoglobulins - Diagnostic and Clinical Aspects', Allen R. Liss, Inc., New York, 1982.
6. Tietz, N.W. (Ed.), Textbook of Clinical Chemistry (3rd Edition), W.B. Saunders Co., Philadelphia, Seite 524, 1995.

PRINCIPIO

Il kit SAS-MX SIEROPROTEINE viene utilizzato per la separazione e quantizzazione delle proteine sieriche mediante elettroforesi su gel di agarosio.

Il siero contiene oltre 100 singole proteine, ciascuna con specifiche funzioni, le quali variano la loro concentrazione a seconda delle differenti condizioni patologiche in corso¹.

Le sieroproteine si separano in base alla loro carica elettrica ad un particolare pH².

Il Kit SAS-MX SIEROPROTEINE permette di separare, in base alla loro carica elettrica, le sieroproteine in 5 bande (albumina, alfa1-globulina, alfa2-globulina, beta-globuline e gamma-globuline).

Le proteine, vengono quindi colorate per permettere una visualizzazione ed interpretazione quantitativa. Ciascuna delle classiche zone elettroforetiche, ad eccezione dell'albumina, contiene normalmente 2 o più componenti. Le relative proporzioni, di queste frazioni, dimostrano l'utilità nella diagnosi e prognosi di certe malattie^{3,5}.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Tutti i reagenti sono solo per uso diagnostico in vitro. Non ingerire o pipettare con la bocca alcun componente del kit. Indossare i guanti quando si maneggiano i componenti del kit. Fare riferimento alle schede dati di sicurezza del prodotto per conoscere i rischi dei componenti, la sicurezza nell'utilizzarli ed ulteriori informazioni.

COMPOSIZIONE

1. Piastre SAS-MX Sieroproteine

Contengono agarosio in tampone Tris / Barbitol con thimerosal e sodio azide come conservanti. Il gel è pronto per l'uso.

2. Tampone Tris / Barbitol concentrato

Contiene barbitol e sodio barbitol con l'aggiunta di sodio azide come conservante. Diluire l'intero contenuto del bottiglia (100ml) con acqua distillata (400ml) e miscelare bene. I sali del tampone possono cristallizzare. Rimuovere i cristalli dalla bottiglia, lavando con tampone diluito per assicurare la completa dissoluzione.

3. Colorante Acido blu concentrato

Contiene colorante acido blu concentrato. Diluire l'intero contenuto del bottiglia con 700ml di acqua distillata. Agitare tutta la notte e filtrare prima dell'uso. Conservare il colorante in una bottiglia ben chiusa.

4. Soluzione decolorante concentrata

Contiene di soluzione decolorante concentrata. Prima dell'uso diluire il contenuto di ogni bottiglia con 2 litri di acqua distillata. Conservare il decolorante in una bottiglia ben chiusa.

5. Altri componenti del Kit

Ogni kit contiene inoltre un foglio procedurale, bibule, blotter A, mascherine per l'applicazione del campione, in quantità sufficiente per 10 piastre di gel.

CONSERVAZIONE E STABILITA'**1. Piastre SAS-MX Sieroproteine**

I gels devono essere conservati a 15...30°C, e sono stabili fino alla data di scadenza indicata sulla confezione. **NON REFRIGERARE O CONGELARE.** Il deterioramento del gel può essere indicato da: 1) presenza di cristalli sulla superficie, dovuta al congelamento, 2) rottura o assottigliamento, dovuti all'asciugatura, 3) visibile contaminazione dell'agarosio da parte di batteri o funghi sporigeni.

2. Tampone Tris / Barbitol

Il tampone non ricostituito deve essere conservato a 15...30°C, ed è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. Il tampone ricostituito è stabile per 2 mesi, se conservato a 15...30°C. Torbidità oppure una scarsa risoluzione delle bande, indicano un deterioramento.

3. Colorante Acido Blu

Il colorante concentrato deve essere conservato a 15...30°C, ed è stabile fino alla data riportata sull'etichetta. Il colorante ricostituito è stabile per 6 mesi, se conservato a 15...30°C. Scartare immediatamente il colorante utilizzato. La scarsa colorazione può indicare un deterioramento.

4. Soluzione decolorante

Il decolorante concentrato deve essere conservato a 15...30°C ed è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. Il decolorante ricostituito è stabile per 6 mesi, se conservato a 15...30°C. La presenza di torbidità indica il deterioramento.

MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO

Cod. 4063 Camera elettroforetica "SAS-MX"

Cod. 1525 Alimentatore "EPS600"

Forno ad aria forzata con temperature fino a 70°C

Metanolo

Acqua depurata

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Si consiglia di utilizzare siero fresco.

I campioni possono essere anche conservati come segue:

- 4 giorni a 15...30°C
- 2 settimane a 2...6°C
- 6 mesi a -20°C

Si possono utilizzare campioni di urine e CSF previa opportuna concentrazione (50-100X).

L'utilizzo del plasma può portare alla comparsa del fibrinogeno tra la frazione beta e la frazione gamma.

Fattori interferenti:

- l'emolisi può causare falsi incrementi delle frazioni alfa2 e beta.
- si possono ottenere risultati inattendibili se il campione viene conservato non correttamente (ex. se non sigillata la provetta il campione si concentra a causa dell'evaporazione dello stesso).

I campioni ed i controlli, prima dell'uso, devono essere diluiti 1:4 (1+3) con tampone. Per una più accurata quantizzazione densitometrica dell'albumina, la diluizione del campione può essere aumentata a 1:8 (1+7). La concentrazione esatta deve essere determinata in ogni singolo laboratorio. Aumentando la diluizione del campione, per una più accurata quantizzazione dell'albumina, si riduce la sensibilità del metodo verso le bande minimonoclonali.

PROCEDURA

1. Estrarre la piastra di gel dalla confezione, collocarla su una bibula, rimuovere il film protettivo e asciugare la superficie del gel con un blotter C; scartare il blotter.
2. Applicare la mascherina di semina allineandola con i punti laterali del gel. Collocare sopra la mascherina un blotter A ed esercitare una leggera pressione su tutte le fessure per assicurare un buon contatto. Rimuovere il blotter e conservarlo per lo step n. 5
3. Applicare 3 μ l di campione nelle apposite fessure, lasciare assorbire per 4 minuti.
4. Durante l'assorbimento, collocare 25ml di tampone ricostituito in ogni compartimento interno della camera elettroforetica. Coprire la camera fino al momento dell'uso.
5. Dopo l'assorbimento del campione, collocare sopra alla mascherina il blotter A per asciugare l'eventuale eccesso di campione non assorbito. Eliminare il blotter e la maschera per l'applicazione del campione.
6. Collocare la piastra nella camera, curvandola in modo tale che il lato di agarosio sia rivolto verso il basso, allineando il segno positivo (+) ed il negativo (-) con le corrispondenti posizioni nella camera.
7. Sottoporre il gel ad elettroforesi a: 80 V per 30minuti.
8. Al termine dell'elettroforesi rimuovere la piastra dalla camera e collocarla in Forno ad aria forzata a 60...70°C. **NOTA:** eventualmente per evitare la diffusione delle bande, fissare il gel per 5 minuti in metanolo prima dell'asciugatura.
9. Immergere la piastra per 10 minuti nella soluzione colorante.
10. Decolorare la piastra in 2 o più bagni di soluzione decolorante, fino ad ottenere un fondo chiaro.
11. Sciacquare velocemente con acqua distillata ed asciugare il gel.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Si consiglia ad ogni singolo laboratorio di creare, con questo metodo, il proprio range di normalità.

Per una completa valutazione delle sieroproteine, vedere Ritzmann, S.E., 1982⁵.

Studi dimostrano che i valori proteici rimangono invariati per entrambi i sessi. Alcune differenze si possono verificare nelle gestanti a termine e in donne che utilizzano contraccettivi orali.

L'età produce alcuni effetti sui valori normali.

Legami di sangue portano:

- una diminuzione delle proteine totali, albumina, alfa2 e beta.
- lieve aumento alfa 1.
- rimane invariata oppure aumenta la frazione gamma (in gran misura da origini materne).

Le gamma globuline calano rapidamente sotto i 3 mesi di età ed i livelli restano sconosciuti fino a 10/16 anni. Oltre i 40 anni, l'albumina diminuisce e le beta globuline aumentano.

1. Valutazione qualitativa:

I gels possono essere visualizzati qualitativamente per la presenza o assenza di particolari bande.

2. Valutazione quantitativa:

leggere i gels, a 595.

In altri casi, un aumento o diminuzione di particolari componenti del siero, oppure la presenza di componenti del siero non conosciute, richiede una nuova investigazione.

La piastra completata di SIEROPROTEINE SAS-MX, è stabile per un tempo indefinito.

CONTROLLO DI QUALITA'

Per verificare la correttezza della procedura e controllare la lettura delle singole bande proteiche si consiglia di usare il controllo Kemtrol - Normal cod. 7024 e Kemtrol - Abnormal cod. 7025.

Per verificare i valori ottenuti, riferirsi alle istruzioni allegate nella confezione.

LIMITI

Dal momento che tutte le procedure elettroforetiche sono non-lineari, è importante seguire attentamente queste istruzioni per l'uso per ottenere una ottimale risoluzione e riproducibilità dei risultati.

VALORI DI RIFERIMENTO

Il seguente range di normalità è stato ottenuto utilizzando 20 campioni normali.

Frazioni proteiche	Media (%)	± 2SD (range)
Albumina	56.4	50.8 - 62.1
Alfa I	3.8	2.5 - 5.0
Alfa2	11.3	8.8 - 13.8
Beta	12.6	10.0 - 15.1
Gamma	16.0	11.6 - 20.4

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Riproducibilità

	entro la serie (n=10)		tra la serie (n=100)	
	Media (%)	CV (%)	Media (%)	CV (%)
Albumina	57.2	1.9	57.3	2.6
Alfa I	5.2	3.2	5.2	5.4
Alfa2	12.4	3.5	12.0	4.3
Beta	10.5	5.5	10.7	5.1
Gamma	14.7	4.6	14.7	5.2

Sensibilità

Il metodo é sensibile fino a 0,3 g/L per banda, determinato come la bassa concentrazione di proteine, le quali sono visibili con una discreta banda presente sul gel terminato.

Linearità

La linearità del metodo é una funzione delle specifiche del densitometro. Si raccomanda che ogni cliente determini la linearità del metodo in base al densitometro in uso nel laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

1. Alper, C.A. 'Plasma Protein Measurements as a Diagnostic Aid', N. Eng. J. Med., 1974; 291 : 287-290.
2. Tiselius, A. 'A New Apparatus for Electrophoretic Analysis of Colloidal Mixtures', Trans. Faraday Soc., 1937; 33 : 524.
3. Ritzmann, S.E. and Daniels, J.C. 'Diagnostic Proteinology: Separation and Characterization of Proteins, Qualitative and Quantitative Assays' in Laboratory Medicine, Harper and Row, Inc., Hagerstown, 1979.
4. Tietz, N.W. (Ed.), Textbook of Clinical Chemistry, W.B. Saunders Co., Philadelphia, pages 579-582, 1986.
5. Ritzmann, S.E. (Ed.), Protein Abnormalities Volume I : Physiology of Immunoglobulins - Diagnostic and Clinical Aspects', Allen R. Liss, Inc., New York, 1982.
6. Tietz, N.W. (Ed.), Textbook of Clinical Chemistry, (3rd Edition), W.B. Saunders Co., Philadelphia, page 524, 1995.

USO PREVISTO

El kit de proteínas séricas SAS-MX tiene como objeto la separación y cuantificación de proteínas séricas por electroforesis con gel de agarosa.

El suero contiene más de 100 proteínas individuales, cada una de ellas con una serie de funciones específicas que están sujetas a variaciones en su concentración bajo diferentes condiciones patológicas¹. Desde la introducción de la electroforesis marginal móvil por Tiselius² y el empleo subsiguiente de la electroforesis de zona, las proteínas séricas se han fraccionado tomando como base su carga con un pH determinado.

El kit de proteínas séricas SAS-MX separa, en un gel de agarosa las proteínas de suero en 5 clases principales (albúmina, alfa 1-globulina, alfa 2-globulina, betaglobulina y gammaglobulina) según su carga. Luego las proteínas son coloreadas para permitir su visualización e interpretación cuantitativa. Cada una de las zonas electroforéticas clásicas, con la excepción de la albúmina, contiene normalmente 2 o más componentes. Las proporciones relativas de estas fracciones han demostrado su utilidad como ayuda en el diagnóstico y pronóstico de ciertos estados de enfermedad^{3,5}.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Todos los reactivos son para utilizar únicamente en diagnóstico in vitro. No ingerir ni aspirar por la boca ningún componente del kit. Utilizar guantes para manipular los componentes del kit. Consultar en el prospecto de seguridad del producto las indicaciones sobre riesgos y seguridad así como la información acerca de su eliminación.

COMPOSICION**1. Gel de proteínas séricas SAS-MX.**

Contiene agarosa en un tampón de Tris-Barbital, con Tiomersal y ácida de sodio como conservantes. El gel viene envasado listo para usar.

2. Tampón Tris-Barbital concentrado.

Contiene barbital y barbital sódico con ácida de sodio como conservante. Diluir el contenido del frasco (100ml) en agua destilada (400ml) y mezclar bien. Las sales tampón pueden cristalizarse ligeramente al quedar en reposo. Lavar todos los cristales del frasco con agua destilada para asegurar una completa disolución.

3. Colorante azul ácido concentrado.

Contiene colorante azul ácido concentrado. Diluir el contenido del frasco en 700ml de agua destilada. Dejar agitando durante toda la noche y filtrarlo antes del uso. Guardar el colorante en un frasco de tampon esmerilado herméticamente cerrado.

4. Solución decolorante concentrada.

Contiene de solución decolorante concentrada. Diluir el contenido de cada frasco en 2 litros de agua destilada. Guardar el colorante en un frasco de tampon esmerilado herméticamente cerrado.

5. Otros componentes del kit.

Cada kit contiene una hoja de instrucciones y suficientes plantillas de aplicación de muestras y secantes A y C hasta completar 10 geles.

ALMACENAMIENTO Y PERIODO DE VALIDEZ

1. Gel de proteínas séricas SAS-MX.

Los geles deben guardarse a una temperatura entre 15...30°C y son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el envase. NO REFRIGERAR NI CONGELAR. El deterioro del gel puede ser indicado por: 1) aspecto cristalino, indicio de que el gel se ha congelado, 2) agrietamiento y exfoliación, indicio de que el gel se ha secado, o 3) contaminación visible de la agarosa por fuentes bacterianas o micóticas.

2. Tampón Tris-Barbital.

El frasco sin abrir debe guardarse a una temperatura entre 15...30°C y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. El tampón diluido es estable durante 2 meses a una temperatura entre 15...30°C. Turbiedad o un mal comportamiento del tampón pueden ser indicios de deterioro.

3. Colorante azul ácido.

El colorante concentrado debe guardarse a una temperatura entre 15...30°C y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. La solución colorante diluida es estable durante 6 meses a una temperatura entre 15...30°C. Es aconsejable desechar inmediatamente el colorante usado para prevenir el agotamiento de su capacidad de coloración. Unos malos resultados de coloración pueden ser indicio de deterioro.

4. Solución decolorante.

El decolorante concentrado debe guardarse a una temperatura entre 15...30°C y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. La solución decolorante diluida es estable durante 6 meses a una temperatura entre 15...30°C. La aparición de turbidez puede ser indicio de deterioro.

ARTICULOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

no de catálogo 4063 Cámara SAS-MX

no de catálogo 1525 Fuente de alimentación EPS600

Horno con aire a presión capaz de alcanzar 70°C

Metanol

Agua destilada

RECOGIDA Y PREPARACION DE MUESTRAS

La muestra consistirá en suero recién obtenido. Las muestras se pueden guardar hasta 4 días a una temperatura entre 15...30°C, hasta 2 semanas entre 2...6°C, o 6 meses a -20°C⁶. Orina y CSF también se pueden usar siguiendo una fase de concentración adecuada (50 - 100X). El empleo de plasma tendrá como resultado la aparición de una banda de fibrinógeno entre las fracciones beta y gamma.

Factores de interferencia:

- 1) La hemólisis puede causar una falsa elevación de las fracciones alfa-2 y beta.
- 2) Se pueden obtener resultados imprecisos en muestras que se hayan dejado sin cubrir, debido a la evaporación.

Las muestras / controles deben diluirse en una proporción 1:4 (1+3) con tampón antes del uso. Para realizar cuantificaciones de albúmina por densitometría más precisas, se puede incrementar la dilución de muestra a 1:8 (1+7). La cantidad exacta será determinada por cada laboratorio en particular. El empleo de una dilución de muestra incrementada aumentará la cuantificación de albúmina, pero reducirá la sensibilidad del método para bandas minimonoclonales.

PROCEDIMIENTO PASO A PASO

1. Sacar el gel del envase y colocarlo sobre una toallita de papel. Quitar la lámina protectora y secar la superficie del gel con un secante C; luego desechar el secante.
2. Alinear la plantilla de aplicación de la muestra con las flechas existentes en el borde del gel. Colocar un secante A encima de la plantilla y presionar con un dedo a lo largo de las ranuras para asegurar un buen contacto. Retirar el secante A y conservarlo para utilizarlo luego en el paso 5.
3. Aplicar 3 μ l de la muestra en cada ranura y dejar que sea absorbida durante 4 minutos.
4. Mientras la muestra es absorbida, verter aproximadamente 25ml del tampón diluido en cada hueco interior de la cámara SAS-MX.
5. Tras la absorción de la muestra, secar ligeramente la plantilla con el secante A conservado desde el paso 2 y luego retirar el secante y la plantilla.
6. Colocar el gel en la cámara con la agarosa hacia abajo, alineando los lados positivo (+) y negativo (-) con las posiciones correspondientes en la cámara.
7. Aplicar la electroforesis al gel: 80 V, 30 minutos.
8. Al finalizar la electroforesis, secar el gel a 60...70°C. **NOTA:** El secado de la placa no deberá llevar más de 5 a 10 minutos, para prevenir la difusión de las bandas. En el caso de que esto no se consiga, fijar el gel durante 5 minutos en metanol antes del secado.
9. Sumergir el gel seco en la solución colorante durante 10 minutos.
10. Decolorar el gel mediante 2 lavados de 60 segundos cada uno con la solución decolorante, o hasta que el fondo esté limpio.
11. Lavar brevemente en agua destilada y luego secar.

CONTROL DE CALIDAD

Se pueden aplicar los controles de suero Kemtrol (no de catálogo 7024 y 7025) para verificar todas las fases del procedimiento y también se pueden utilizar en cada placa. Consultar el prospecto del envase, en el que se indican los valores adecuados para los ensayos de laboratorio.

INTERPRETACION DE RESULTADOS

Es aconsejable realizar cualquier evaluación de los geles contrastándola con valores normales obtenidos por este método en cada laboratorio en particular.

Para obtener un análisis completo de la evaluación de proteínas séricas, leer a S. E. Ritzmann, 1982⁵. Los estudios muestran que los valores son los mismos tanto para hombres como para mujeres no embarazadas. Se han detectado algunas diferencias en mujeres al término de su embarazo y en mujeres que utilizan anticonceptivos orales.

La edad tiene algún efecto sobre los niveles normales. La sangre del cordón umbilical tiene fracciones totales de proteínas, albúmina, alfa 2 y beta reducidas, la fracción alfa 1 ligeramente incrementada y gamma normal o incrementada (en gran parte de origen materno). Las gammaglobulinas se reducen rápidamente cerca de los 3 meses de edad, mientras que otras fracciones ya han alcanzado niveles adultos. Los niveles adultos de las gammaglobulinas no son alcanzados hasta los 10 - 16 años de edad.

La albúmina decrece y la betaglobulina aumenta a partir de los 40 años de edad.

1. Evaluación cuantitativa:

Los geles se pueden inspeccionar visualmente, para comprobar la existencia o ausencia de determinadas bandas de interés.

2. Evaluación cuantitativa:

Analizar los geles, con el gel hacia abajo, a 595 nm.

En cualquier caso, una elevación o disminución de determinados componentes del suero o la detección de componentes inusuales en el suero requerirán una investigación posterior. El gel de proteínas séricas SAS-MX completado es estable durante un tiempo indefinido.

LIMITACIONES

Puesto que los procedimientos de electroforesis son no lineales, es importante seguir atentamente estas instrucciones de uso para asegurar unos resultados de resolución y reproducibilidad óptimos. Omitir el seguimiento de estas instrucciones de uso podría afectar a los resultados obtenidos.

VALORES DE REFERENCIA

Los siguientes márgenes nominales se obtuvieron utilizando 20 muestras normales obtenidas de varones y hembras donantes con edades comprendidas entre 20 y 59 años (estos valores, no obstante, se presentan sólo a modo de guía):

Fracción proteínica	Media (%)	Margen \pm 2SD
Albúmina	56.4	50.8 - 62.1
Alfa 1	3.8	2.5 - 5.0
Alfa 2	11.3	8.8 - 13.8
Beta	12.6	10.0 - 15.1
Gamma	16.0	11.6 - 20.4

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES

Reproducibilidad

	Dentro del gel (n=10)		Entre el gel (n=100)	
	Media (%)	CV (%)	Media (%)	CV (%)
Albúmina	57.2	1.9	57.3	2.6
Alfa 1	5.2	3.2	5.2	5.4
Alfa 2	12.4	3.5	12.0	4.3
Beta	10.5	5.5	10.7	5.1
Gamma	14.7	4.6	14.7	5.2

Sensibilidad

El método es sensible a 0,3 g/L por banda, determinado como la concentración más baja de proteínas que se consigue apreciar en forma de banda discreta en el gel completado.

Linealidad

La linealidad del método es una especificación de funcionamiento del densitómetro así como de las características del gel. Es aconsejable que cada cliente determine la linealidad del método basándose en el densitómetro utilizado en el laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

1. Alper, C.A. 'Plasma Protein Measurements as a Diagnostic Aid', N. Eng. J. Med., 1974; 291 : 287-290.
2. Tiselius, A. 'A New Apparatus for Electrophoretic Analysis of Colloidal Mixtures', Trans. Faraday Soc., 1937; 33 : 524.
3. Ritzmann, S.E. and Daniels, J.C. 'Diagnostic Proteinology: Separation and Characterization of Proteins, Qualitative and Quantitative Assays' in Laboratory Medicine, Harper and Row, Inc., Hagerstown, 1979.
4. Tietz, N.W. (Ed.), Textbook of Clinical Chemistry, W.B. Saunders Co., Philadelphia, pages 579-582, 1986.
5. Ritzmann, S.E. (Ed.), Protein Abnormalities Volume 1 : Physiology of Immunoglobulins - Diagnostic and Clinical Aspects', Allen R. Liss, Inc., New York, 1982.
6. Tietz, N.W. (Ed.), Textbook of Clinical Chemistry, (3rd Edition), W.B. Saunders Co., Philadelphia, page 524, 1995.

Helena Biosciences Europe
Queensway South
Team Valley Trading Estate
Gateshead
Tyne and Wear
NE11 0SD

Tel: +44 (0) 191 482 8440
Fax: +44 (0) 191 482 8442
Email: info@helena-biosciences.com
www.helena-biosciences.com

HL-2-1275P 2007/05 (6)