

Instructions For Use

SAS-MX Serum Protein SB

Cat. No. 100200

SAS-MX Protéines Sériques SB

Fiche technique

Réf. 100200

SAS-MX Serum-protein SB

Anleitung

Kat. Nr. 100200

SAS-MX Sieroproteine SB

Istruzioni per l'uso

Cod. 100200

SAS-MX Proteínas Séricas SB

Instrucciones de uso

No de catálogo 100200

Contents

English	1
Français	5
Deutsch	10
Italiano	15
Español	20



INTENDED PURPOSE

The SAS-MX Serum Protein SB 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 6 main classes (albumin, alpha 1-globulin, alpha 2-globulin, beta 1-globulin, beta 2-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 SB 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 barbital and sodium barbital with sodium azide as preservative. Dilute the contents of the bottle to 1 litre with purified water 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 to 2 litres with 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 SB 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 / Barbital 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. Whilst 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°C for standard 5 band patterns⁶, the beta 2-globulin band (Complement C3) will degrade rapidly on storage. 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, 25 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 2 minute washes of destain solution or until the background is clear.
11. Wash the gel briefly in purified water and dry.

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 alpha I 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, 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 SB gel is stable for an indefinite period of time.

QUALITY CONTROL

Kemtrol Serum Controls (Cat. No. 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.

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 (%)	\pm 2SD Range
Albumin	56.8	52.1 - 61.5
Alpha-1	3.6	2.5 - 4.7
Alpha-2	9.8	6.7 - 12.9
Beta-1	8.8	5.9 - 11.7
Beta-2	5.6	3.9 - 7.3
Gamma	15.4	11.9 - 18.8

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Reproducibility

	Within Gel(n=10)		Between Gel(n=100)	
	Mean (%)	CV(%)	Mean(%)	CV(%)
Albumin	59.8	3.6	59.2	1.9
Alpha-1	2.9	5.2	3.5	0.3
Alpha-2	7.5	3.8	8.0	0.6
Beta-1	8.5	3.4	9.2	0.8
Beta-2	6.3	9.6	6.0	0.6
Gamma	15.0	8.8	14.0	1.1

Sensitivity

The method is sensitive to 0.04g/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 SB 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 6 fractions principales (albumine, alpha 1, alpha 2, bêta 1, bêta 2 et gammaglobulines) selon leur charge en gel d'agarose.

Les protéines sont ensuite colorées afin de permettre leur visualisation et l'interprétation quantitative. Chaque fraction, à l'exception de l'albumine, contient au moins 2 composants. La proportion relative de ces différentes fractions peut aider à établir un diagnostic et à s'orienter vers certains stades de maladies^{3,5}.

PRÉCAUTIONS

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 SB

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

2. Tampon concentré Tris / Barbitol

Contient du barbitol et du barbitol sodique avec de l'azide de sodium comme conservateur. Diluer le contenu du flacon dans 1 litre d'eau distillée et bien mélanger. Il est possible que les sels du tampon cristallisent. Rincez ces cristaux avec le tampon dilué afin d'assurer une dissolution complète.

3. Colorant bleu acide

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

4. Solution décolorante

Contient la solution décolorante concentrée. Diluer le contenu du flacon dans 2 litres d'eau distillée. Conserver en bouteille hermétiquement fermée.

5. Autres composants du kit

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

STOCKAGE ET CONSERVATION

1. Plaque SAS-MX Protéines sériques SB

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

2. Tampon Tris / Barbital

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

3. Colorant bleu acide

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 reconstitué est stable 6 mois entre 15...30°C. Il est recommandé de jeter le colorant utilisé afin d'éviter que la capacité de coloration ne diminue. Si la performance de coloration diminue, cela indique une détérioration de la solution colorante.

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 de la solution décolorante.

MATÉRIELS NÉCESSAIRES NON FOURNIS

Réf. 4063 Chambre de migration SAS-MX

Réf. 1525 Générateur EPS600

Étuve de séchage à convection forcée offrant une température entre 60...70°C

Méthanol

Eau distillée

PRÉLÈVEMENTS DES ÉCHANTILLONS

L'utilisation de sérums fraîchement prélevés est fortement recommandée. Bien que les échantillons puissent être conservés 4 jours entre 15...30°C, 2 semaines entre 2...6°C ou 6 mois à -20°C pour les 5 bandes classiques⁶, la bande de bêta 2 globuline (complément C3) se dégrade rapidement en cas de conservation. Il est possible d'utiliser des échantillons d'urine ou de LCR après concentration (50 à 100 fois). L'utilisation de plasma laisse apparaître une bande de fibrinogène entre les fractions bêta et gamma.

Interférences:

- 1) Un sérum hémolysé risque de présenter une bande entre les fractions alpha 2 et bêta.
- 2) Des résultats erronés peuvent être obtenus sur des échantillons ayant subi une concentration par évaporation.

Les échantillons et les contrôles doivent être utilisés dilués au 1/4 (1 + 3) en tampon. Pour obtenir une quantification de l'albumine plus précise par densitométrie, il est possible d'augmenter la dilution jusqu'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.

MÉTHODOLOGIE

1. Sortir le gel de son emballage et le déposer sur un papier absorbant. Retirer le film plastique, sécher la surface du gel à l'aide d'un buvard C, jeter 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 A et le conserver pour l'étape 5.
3. Déposer 3 μ l d'échantillon 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.
5. Une fois l'absorption de l'échantillon terminée, sécher le masque applicateur avec le buvard A conservé à l'étape 2 puis enlever le buvard et le masque applicateur.
6. Placer le gel, agarose vers le bas, dans la chambre de migration, en respectant les polarités.
7. Faire migrer à 80 volts pendant 25 minutes.
8. Une fois l'électrophorèse terminée, sécher le gel entre 60...70°C. **REMARQUE:** Le gel doit être sec en 5 à 10 minutes afin d'éviter la diffusion des bandes. Si cela n'était pas possible, fixer le gel dans un bain de méthanol pendant 5 minutes avant de le sécher.
9. Plonger le gel sec dans le colorant pendant 10 minutes.
10. Décolorer le gel dans 2 bains successifs de 2 minutes de solution décolorante ou jusqu'à obtention d'un fond de bande clair.
11. Rincer rapidement sous un jet d'eau distillée et sécher.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Il est recommandé de réaliser chaque évaluation en comparant les gels à un modèle normal obtenu dans les mêmes conditions pour chaque laboratoire.

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.

Les valeurs normales varient suivant l'âge. Le sang de cordon a des protéines totales diminuées ainsi que l'albumine, les alpha 2 et les bêta; la fraction des alpha 1 est légèrement augmentée et celle des gamma est normale ou augmentée (en partie d'origine maternelle). Les gammaglobulines diminuent rapidement jusqu'à environ 3 mois, pendant que les autres fractions atteignent progressivement les valeurs adultes. La valeur adulte des gammaglobulines n'est pas atteinte avant 10-16 ans. Après 40 ans, l'albumine et les bêta-globulines augmentent.

1. Évaluation qualitative:

Une lecture visuelle des plaques est nécessaire pour rechercher la présence éventuelle de protéines anormales.

2. Évaluation quantitative:

Lire la plaque de gel, face vers le bas, à 595 nm.

Dans tous les cas, une élévation ou une diminution d'un composant particulier du sérum ou la détection d'une protéine inhabituelle doit conduire à d'autres investigations. Après traitement, le gel SAS-MX Protéines sériques SB est stable indéfiniment.

CONTRÔLE QUALITÉ

Les contrôles Kemtrol Serum (réf. 7024 et 7025) peuvent être utilisés afin de vérifier toutes les phases de la technique et doivent être déposés sur chaque plaque. La notice indique les valeurs appropriées du dosage.

LIMITES

Comme les procédures d'électrophorèse ne sont pas linéaires, il est important de respecter scrupuleusement la fiche technique afin d'obtenir une résolution optimale et des résultats reproductibles. Si ce n'est pas le cas, cela peut affecter les résultats obtenus.

VALEURS DE RÉFÉRENCE

Les plages normales suivantes ont été obtenues à partir de 20 échantillons normaux, provenant de donneurs hommes et femmes âgés entre 20 et 59 ans (ces valeurs ne sont données qu'à titre indicatif):

Fraction protéique	Moyenne (%)	Écart-type (intervalle)
Albumine	56,8	52,1 – 61,5
Alpha 1	3,6	2,5 – 4,7
Alpha 2	9,8	6,7 -12,9
Bêta 1	8,8	5,9 – 11,7
Bêta 2	5,6	3,9 -7,3
Gamma	15,4	11,9 – 18,8

PERFORMANCES

Reproductibilité

	Intra-plaque (n=10)		Inter-plaque (n=100)	
	Moyenne (%)	CV(%)	Moyenne(%)	CV(%)
Albumine	59,8	3,6	59,2	1,9
Alpha 1	2,9	5,2	3,5	0,3
Alpha 2	7,5	3,8	8,0	0,6
Bêta 1	8,5	3,4	9,2	0,8
Bêta 2	6,3	9,6	6,0	0,6
Gamma	15,0	8,8	14,0	1,1

Sensibilité

La méthode est sensible à partir de 0,04g/l par bande, concentration la plus faible en protéine permettant la visualisation d'une fine bande une fois le gel terminé.

Linéarité

La linéarité est fonction des caractéristiques du densitomètre ainsi que des performances du gel. Il est recommandé à chaque client de déterminer la linéarité de cette méthode en fonction du densitomètre utilisé au sein du laboratoire.

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 et 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. (éd.), Textbook of Clinical Chemistry, W.B. Saunders Co., Philadelphie, pages 579-582, 1986.
5. Ritzmann, S.E. (éd.), Protein Abnormalities Volume I : Physiology of Immunoglobulins - Diagnostic and Clinical Aspects', Allen R. Liss, Inc., New York, 1982.
6. Tietz, N.W. (éd.), Textbook of Clinical Chemistry, (3e édition), W.B. Saunders Co., Philadelphie, page 524, 1995.

ANWENDUNGSBEREICH

Der SAS-MX Serum-Protein SB Kit dient zur Auftrennung und Auswertung der Proteine im Serum mittels Agarose-Gel-Elektrophorese.

Das Serum enthält über 100 einzelne Proteine, jedes mit einer Reihe spezifischer Funktionen, die unter verschiedenen pathologischen Bedingungen gewissen spezifischen Konzentrationsschwankungen unterliegen¹.

Seit der Einführung der Kapillarelektrophorese durch Tiselius² und die darauf folgende Nutzung der Zonelektrophorese sind Serumproteine aufgrund ihrer elektrischen Ladung bei einem bestimmten pH-Wert fraktioniert worden.

Mit dem SAS-MX Serum-Protein Kit werden die Serumproteine entsprechend ihrer Ladung im Agarose-Gel in 6 Hauptfraktionen (Albumin, Alpha-1-Globulin, Alpha-2-Globulin, Beta-1-Globulin, Beta-2-Globulin und Gammaglobulin) 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. Beim Umgang mit den Kit-Komponenten ist das Tragen von Handschuhen erforderlich. Bitte lesen Sie das Sicherheitsdatenblatt mit den Gefahrenhinweisen und Sicherheitsvorschlägen sowie die Informationen zur Entsorgung.

INHALT

1. SAS-MX Serum-Protein-SB Gel

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

2. Tris-Barbital-Pufferkonzentrat

Enthält Barbital und Natriumbarbital mit Natriumazid als Konservierungsmittel. Den Inhalt der Flasche mit dest. Wasser auf 1 Liter verdünnen. Gut schütteln. Puffersalze können beim Stehen lassen leicht kristallisieren. Kristalle mit der verdünnten Pufferlösung aus der Flasche spülen, um eine vollständige Auflösung sicherzustellen.

3. „Saures-Blau“ Farbstoffkonzentrat

Enthält konzentrierte „Saures-Blau“ Farbstofflösung. Den Inhalt der Flasche auf 700ml mit dest. Wasser verdünnen. Über Nacht rühren und vor dem Gebrauch filtrieren. In einer fest verschlossenen Flasche aufbewahren.

4. Entfärbelösung-Konzentrat

Enthält konzentrierte Entfärbelösung. Den Inhalt der Flasche auf 2 Liter mit dest. Wasser verdünnen. In einer fest verschlossenen Flasche aufbewahren.

5. Weitere Kit-Komponenten

Jedes Kit enthält eine Gebrauchsanweisung sowie die zur Durchführung der Elektrophorese notwendigen Auftragschablonen und Blotter A und Blotter C für 10 Gele.

LAGERUNG UND STABILITÄT**1. SAS-MX Serum-Protein-SB Gel**

Gele sollten bei 15...30°C gelagert werden und sind bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. NICHT IM KÜHLSCHRANK ODER TIEFKÜHLSCHRANK AUFBEWAHREN! Der Zustand des Gels kann sich verschlechtern. Dafür gibt es folgende Merkmale: 1) Kristallisation weist auf vorangegangenes Einfrieren hin, 2) Risse und Ablösen weisen auf ein Austrocknen des Gels hin, und 3) sichtbare Kontamination der Agarose durch Bakterien oder Pilze.

2. Tris-Barbital-Puffer

Das Pufferkonzentrat sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Die verdünnte Pufferlösung ist bei einer Temperatur von 15...30°C für 2 Monate stabil. Trübung oder schlechte Ergebnisse des verdünnten Puffers können auf einen Verfall hinweisen.

3. „Saures-Blau“ Farbstoff

Das Farbstoffkonzentrat sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Die verdünnte Farbstofflösung ist bei einer Temperatur von 15...30°C für 6 Monate stabil. Es wird empfohlen, benutzten Farbstoff sofort zu entsorgen, um eine Minderung der Färbeleistung zu verhindern. Eine schlechte Färbeleistung kann auf eine Verschlechterung der Färbelösung hinweisen.

4. Entfärbelösung

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

NICHT MITGELIEFERTES, ABER BENÖTIGTES MATERIAL

Kat. Nr. 4063 SAS-MX Kammer

Kat. Nr. 1525 EPS600 Netzteil

Trockenschrank mit Umluft und einer Temperaturleistung von 60...70°C

Methanol

Dest. Wasser

PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG

Frisch entnommenes Serum ist das Untersuchungsmaterial der Wahl. Für das Standard-5-Bandenmuster⁶ können die Proben bei 15...30°C bis zu 4 Tagen, bei 2...6°C bis zu 2 Wochen, oder bei -20°C 6 Monate gelagert werden. Die Beta-2-Globulinbande (Komplement C3) degeneriert allerdings bei Lagerung sehr schnell. Urin und Liquorproben können nach einem angemessenen Konzentrierungsschritt (50-100-fach) ebenfalls verwendet werden. Die Verwendung von Plasma resultiert in einer Fibrinogen-Bande im Bereich zwischen Beta- und Gamma-Fraktion.

Störfaktoren:

- 1) Hämolytische Proben können falsche Alpha-2- und Beta-Werte zeigen.
- 2) Proben, die über längere Zeit unbedeckt stehen, 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 Probenverdünnung 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 mini-monoklonaler Banden.

SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE

1. Das Gel aus der Verpackung nehmen und auf ein Papiertuch legen. Die Schutzfolie entfernen und das Gel mit Blotter C blotten. Blotter verwerfen.
2. Die Auftragschablone so auf das Gel legen, dass die Pfeile am Rand des Gels liegen. Blotter A auf die Schablone legen und mit einem Finger über die Schlitze der Schablone streichen, um eine gute Haftung zu gewährleisten. Blotter A entfernen und ihn bis zur Verwendung in Schritt 5 beiseite legen.
3. 3µl Probe in die jeweiligen Schablonenschlitze pipettieren. Probe für 4 Minuten ins Gel diffundieren lassen.
4. Während die Probe einwirkt, 25ml Puffer in jeden der inneren Bereiche der SAS-MX-Kammer füllen.
5. Nach Absorption der Probe den Blotter A aus Schritt 2 auf die Schablone drücken. Anschließend Schablone und Blotter entfernen.
6. Das Gel in die Kammer spannen, Agarose nach unten, und auf übereinstimmende Polarisierung achten (Pluszeichen auf dem Gel und Pluszeichen in der Kammer).
7. Gel-Elektrophorese durchführen: 80 Volt, 25 Minuten.
8. Nach dem Elektrophoreselauf, das Gel bei 60...70°C trocknen. **Bitte beachten:** Der Trocknungsvorgang sollte nicht länger als 5-10 Minuten dauern, da sonst Diffusionsphänomene auftreten können. Die Proteine können aber auch vor dem Trocknen 5 Minuten in Methanol fixiert werden.
9. Das trockene Gel 10 Minuten in der Färbelösung färben.
10. Das Gel zweimal für je 2 Minuten in der Entfärbelösung entfärben (oder bis der Gel-Hintergrund klar ist).
11. Gel kurz mit dest. Wasser abspülen und trocknen.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Es wird empfohlen, jegliche Auswertung der Gele im Vergleich zu Normalwerten durchzuführen, die in dem jeweiligen Labor für diese Methode ermittelt wurden.

Für eine komplette Überprüfung der Auswertung von Serumproteinen verweisen wir auf Ritzmann, S.E. 1982⁵. Studien zeigen, dass die Werte bei Männern und nicht schwangeren Frauen identisch sind. Einige Abweichungen hat man bei schwangeren Frauen nahe dem 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 werden bei den Gammaglobulinen erst im Alter zwischen 10 und 16 Jahren erreicht. Im Alter von über 40 Jahren verringert sich das Albumin und das Betaglobulin wird erhöht.

- 1. Qualitative Auswertung:** Gele visuell auf das Vorhandensein bzw. Fehlen von Banden hin untersuchen.
- 2. Quantitative Auswertung:** Die Gele mit der Gelseite nach unten bei 595 nm scannen.

In Fällen der Erhöhung oder Verringerung von bestimmten Serum-Komponenten bzw. der Entdeckung von ungewöhnlichen Serum-Komponenten ist eine weitere Untersuchung erforderlich. Das fertige SAS-MX Serum-Protein-SB Gel ist praktisch unbegrenzt haltbar.

QUALITÄTSKONTROLLE

Zur Überprüfung des gesamten Elektrophoreselaufs sollten Sie bei jeder Trennung Kontrollen mitführen, z.B. Kemtrol Kontrollseren (Kat. Nr. 7024 und 7025). Siehe Packungsbeilage für die entsprechenden Testergebnisse.

EINSCHRÄNKUNGEN

Da kein Elektrophoreseverfahren linear verläuft, ist es wichtig, dass diese Anleitungen streng befolgt werden, um eine optimale Auflösung und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Ein Nichteinhalten dieser Anleitungen kann sich negativ auf die Ergebnisse auswirken.

REFERENZWERTE

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

Proteinfraktion	Mittelwert (%)	± 2 s-Bereich
Albumin	56,8	52,1 - 61,5
Alpha-1	3,6	2,5 - 4,7
Alpha-2	9,8	6,7 - 12,9
Beta-1	8,8	5,9 - 11,7
Beta-2	5,6	3,9 - 7,3
Gamma	15,4	11,9 - 18,8

LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

Reproduzierbarkeit

	Im Gel (n=10)		Zwischen Gel (n=100)	
	Mittelwert (%)	CV (%)	Mittelwert (%)	CV (%)
Albumin	59,8	1,9	57,3	2,6
Alpha -1	2,9	5,2	3,5	0,3
Alpha -2	7,5	3,8	8,0	0,6
Beta-1	8,5	3,4	9,2	0,8
Beta-2	6,3	9,6	6,0	0,6
Gamma	15,0	8,8	14,0	1,1

Empfindlichkeit

Die Sensibilität der Methode beträgt 0,04g/L pro Bande und wurde als die niedrigste Protein-Konzentration ermittelt, die als 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 jedem Kunden empfohlen, die Linearität der Methode mit dem im Labor verwendeten Densitometer selbst zu bestimmen.

LITERATUR

1. Alper, C.A. 'Plasma Protein Measurements as a Diagnostic Aid', N. Eng. J. Med., 1974; 291 : 287-290. 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, page 524, 1995.

PRINCIPIO

Il kit SAS-MX Sieroproteine SB viene utilizzato per la separazione e quantizzazione delle proteine seriche 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.

Dall'invenzione dell'elettroforesi a fronte mobile ad opera di Tiselius², e il successivo utilizzo dell'elettroforesi di zona, le proteine del siero sono state frazionate in base alla loro carica ad un particolare pH.

Il Kit SAS-MX Sieroproteine permette di separare, in base alla loro carica elettrica, le sieroproteine in 6 bande (albumina, alfa1-globulina, alfa2-globulina, beta1-globulina, beta2-globulina 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 devono essere utilizzati esclusivamente per diagnosi in vitro. Non ingerire né pipettare con la bocca i componenti del kit. Indossare guanti protettivi durante l'uso dei componenti del kit. Riferirsi alle schede tecniche e dati di sicurezza per le avvertenze sui componenti dei Kit.

COMPOSIZIONE**1. Gel SAS-MX Sieroproteine SB**

Contengono agarosio in tampone tris / barbital con thimerosal e sodio azide come conservanti. Il gel è pronto all'uso così come viene fornito.

2. Tampone Concentrato Tris / barbital

Contiene barbital e sodio barbital con l'aggiunta di sodio azide come conservante. Prima dell'uso, diluire l'intero contenuto del flacone con 1 litro di acqua distillata 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 concentrato Acido Blu

Contiene colorante Acido Blu. Diluire l'intero contenuto del flacone con 700ml di acqua distillata. Agitare "overnight" e filtrare prima dell'uso. Conservare in una bottiglia tappata ermeticamente.

4. Soluzione decolorante concentrata

Contiene soluzione decolorante concentrata. Diluire l'intero flacone in 2L di acqua distillata. Conservare in una bottiglia tappata ermeticamente.

5. Altri componenti del kit

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

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

1. Gel SAS-MX Sieroproteine SB

Il gel deve essere conservato a 15...30°C, ed è stabile fino alla data di scadenza riportata sulla confezione. **NON REFRIGERARE NÉ CONGELARE.** Il deterioramento del gel può essere indicato da 1) formazioni cristalline per effetto di congelamento, 2) screpolature e fessurazione per effetto di essiccamento oppure 3) contaminazione visibile dell'agarosio causata da batteri o funghi.

2. Tampone tris-barbital

Il tampone concentrato deve essere conservato a 15...30°C, è stabile fino a data di scadenza riportata sull'etichetta del flacone. Il tampone diluito è stabile per 2 mesi a 15...30°C. La torbidità o le scarse prestazioni del tampone diluito possono indicare un suo deterioramento.

3. Colorant Acido Blu

Il colorante concentrato deve essere conservato a 15...30°C, è stabile fino a data di scadenza riportata sull'etichetta del flacone. La soluzione colorante diluita è stabile per 6 mesi a 15...30°C. Si raccomanda di gettare immediatamente il colorante utilizzato per evitare la riduzione della capacità di colorazione. Risultati insoddisfacenti della colorazione possono indicare un deterioramento della soluzione colorante.

4. Soluzione Decolorante

La soluzione decolorante concentrata deve essere conservata a 15...30°C, è stabile fino a data di scadenza riportata sulla bottiglia. La soluzione decolorante diluita è stabile per 6 mesi a 15...30°C. La presenza di torbidità può indicare il deterioramento della soluzione decolorante.

MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO

Cod. 4063 Camera SAS-MX

Cod. 1525 Alimentatore EPS600

Forno di essiccazione ad aria forzata con temperature di 60...70°C

Metanolo

Acqua distillata

RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE

Si consiglia di utilizzare siero, urine, liquido cerebrospinale freschi. Mentre i campioni possono essere conservati fino a 4 giorni a 15...30°C, fino a 2 settimane a 2...6°C o 6 mesi a -20°C, per i tracciati a 5 bande standard⁶, la banda della beta-2-globulina (complemento C3) subisce un rapido degrado. 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:

- 1) L'emolisi può causare falsi incrementi delle frazioni alfa 2 e beta.
- 2) 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. Rimuovere il gel dalla confezione e collocarlo su una bibula. Asciugare la superficie del gel con un blotter "C" e poi scartarlo.
2. Applicare la mascherina di semina allineandola con i punti laterali del gel. Porre un blotter A sopra alla mascherina ed effettuare una leggera pressione con le dita sulle fessure per verificare il corretto contatto. Rimuovere il blotter e conservarlo per il passaggio 5.
3. Applicare 3 μ l di campione in ogni fessura di semina e lasciare assorbire per 4 minuti.
4. Durante l'assorbimento, collocare 25ml di tampone in ogni compartimento interno della camera di migrazione.
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 a elettroforesi a 80 volt per 25 minuti.
8. Al termine dell'elettroforesi, asciugare il gel a 60...70°C. **NOTA:** L'essiccamento del gel non dovrebbe richiedere più di 5-10 minuti, in modo tale da evitare la diffusione delle bande. Se questo non è possibile, fissare il gel per 5 -10 minuti in metanolo prima dell'asciugatura.
9. Immergere il gel asciutto nella soluzione colorante per 10 minuti.
10. Decolorare la piastra in 2 o più bagni di soluzione decolorante, fino ad ottenere un fondo chiaro.
11. Sciacquare velocemente il gel con acqua e asciugare.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

Per una valutazione completa delle sieroproteine, vedere Ritzmann, S.E., 1982⁵. Alcuni studi dimostrano che i valori proteici rimangono invariati negli uomini e nelle donne non in gravidanza. Alcune differenze si possono verificare nelle gestanti a termine e in donne che utilizzano contraccettivi orali.

L'età produce alcuni effetti sui valori normali. Il sangue ombelicale mostra una riduzione delle proteine totali, dell'albumina e delle frazioni alfa-2 e beta; si riscontra un lieve aumento di alfa-1, mentre rimane invariata oppure aumenta la frazione gamma (in gran parte di origine materna). Le gamma globuline si riducono rapidamente fino ai 3 mesi di età circa, mentre altre frazioni hanno raggiunto i livelli dell'età adulta già in questa fase. Le gammaglobuline non raggiungono i livelli dell'età adulta fino ai 10-16 anni. Oltre i 40 anni, l'albumina diminuisce e le beta globuline aumentano.

1. Valutazione qualitativa:

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

2. Valutazione quantitativa:

Analizzare i gel (con il lato del gel rivolto verso il basso) a 595 nm.

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 QUALITÀ

I controlli del siero Kemtrol (Cod. 7024 e 7025) possono essere utilizzati per verificare tutte le fasi della procedura e devono inoltre essere utilizzati su ogni piastra. Per maggiori informazioni sui valori attesi, fare riferimento al foglietto illustrativo presente nella confezione.

LIMITAZIONI

Dal momento che tutte le procedure elettroforetiche sono non-lineari, è importante seguire attentamente queste istruzioni per l'uso per ottenere un ottimale risoluzione e riproducibilità dei risultati. Il mancato rispetto di queste istruzioni per l'uso può compromettere i risultati ottenuti.

VALORI DI RIFERIMENTO

Utilizzando 20 campioni normali provenienti da donatori di entrambi i sessi e di età compresa tra 20 e 59 anni, sono stati ottenuti i seguenti range (forniti a puro titolo indicativo):

Frazioni proteiche	Media (%)	± 2SD (range)
Albumina	56.8	52.1 - 61.5
Alfa-1	3.6	2.5 - 4.7
Alfa-2	9.8	6.7 - 12.9
Beta-1	8.8	5.9 - 11.7
Beta-2	5.6	3.9 - 7.3
Gamma	15.4	11.9 - 18.8

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONALI

Riproducibilità

	entro la serie (10 gel)		tra la serie (100 gel)	
	Media (%)	CV (%)	Media (%)	CV (%)
Albumina	59.8	3.6	59.2	1.9
Alfa-1	2.9	5.2	3.5	0.3
Alfa-2	7.5	3.8	8.0	0.6
Beta-1	8.5	3.4	9.2	0.8
Beta-2	6.3	9.6	6.0	0.6
Gamma	15.0	8.8	14.0	1.1

Sensibilità

Il metodo è sensibile fino a 0,4g/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 è 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 SAS-MX Proteínas Séricas SB tiene por objeto la separación y cuantificación de las seroproteínas por electroforesis en gel de agarosa.

El suero contiene más de 100 proteínas individuales, cada una con grupo específico de funciones sujetas a variaciones específicas de concentración bajo diferentes condiciones patológicas¹.

Desde que Tiselius² introdujera la electroforesis de límites móviles, y el subsiguiente uso de electroforesis por zonas, las seroproteínas han sido fraccionadas sobre la base de su carga con un pH determinado.

El kit SAS-MX Proteínas Séricas separa las seroproteínas en 6 clases principales (albúmina, alfa1-globulina, alfa2-globulina, beta1-globulina, beta2-globulina, y gammaglobulina) según su carga en un gel de agarosa.

Luego las proteínas son coloreadas para hacerlas visibles y poder realizar una interpretación cuantitativa y cualitativa. Cada una de las electroforesis de zona, con excepción de la albúmina, normalmente contienen 2 o más componentes. Se ha comprobado que las proporciones relativas de estas fracciones son de gran ayuda en el diagnóstico y pronóstico de ciertas enfermedades^{3,5}.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Todos los reactivos son exclusivamente para uso diagnóstico in-vitro. No ingerir ni chupar con la boca ningún componente del kit. Usar guantes para manejar todos los componentes del kit. Consultar la hoja con los datos de seguridad del producto acerca de los riesgos de los componentes, avisos de seguridad y consejos para su eliminación.

COMPOSICIÓN

1. SAS-MX Proteínas Séricas SB Gel

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

2. Concentrado tampón de Tris-Barbital

Contiene barbital y barbital sódico con azida de sodio como conservante. Diluir el contenido del frasco en 1 litro de agua purificada y mezclar bien. Las sales tampón pueden cristalizar ligeramente al quedar en reposo. Lavar todos los cristales del frasco con el tampón diluido para asegurar una disolución completa.

3. Colorante azul ácido concentrado

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

4. Concentrado de solución decolorante

Contiene solución decolorante concentrada. Diluir el contenido del frasco en 2 litros de agua purificada. Guardar en un frasco herméticamente cerrado.

5. Otros componentes del kit

Cada kit contiene una hoja de instrucciones y suficientes plantillas de aplicación de la muestra y secantes A y C, para completar 10 geles.

ALMACENAMIENTO Y PERÍODO DE VALIDEZ**1. SAS-MX Proteínas Séricas SB Gel**

Los geles han de almacenarse entre 15...0°C y permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en el envase. **NO REFRIGERAR NI CONGELAR.** Pueden indicar deterioro del gel: 1) apariencia cristalina, indicativo de que el gel ha sido congelado, 2) agrietamiento y descamación, indicativo de que el gel se ha resecado o 3) contaminación visible de la agarosa por fuentes bacterianas o micóticas.

2. Tampón de Tris-Barbital

El concentrado tampón debe almacenarse entre 15...30°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del frasco. El tampón diluido es estable durante 2 meses a una temperatura entre 15...30°C. Evite la contaminación: la turbiedad o un mal comportamiento del tampón diluido pueden ser indicios de deterioro.

3. Colorante azul ácido

El colorante concentrado debe guardarse a una temperatura entre 15...30°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del frasco. 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 resultados erróneos de coloración pueden ser indicio de deterioro de la solución colorante.

4. Solución decolorante

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

ARTÍCULOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

no de catálogo 4063 Cámara

no de catálogo 1525 Fuente de alimentación EPS600

Horno de secado de ventilación forzada con capacidad de 60...70°C

Metanol

Agua purificada.

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Se elegirá como muestra suero recién recogido. Mientras que las muestras se pueden conservar hasta 4 días entre 15...30°C, hasta 2 semanas entre 2...6°C o hasta 6 meses a -20°C para patrones normales de 5 bandas⁶, la banda beta2-globulina (Complemento C3) se deteriorará rápidamente si se almacena. También se puede utilizar orina y LCR tras una fase de concentración adecuada (50 – 100X). El uso de plasma ocasionará una banda de fibrinógeno entre las fracciones beta y gamma.

Factores problemáticos:

- 1) La hemólisis puede ocasionar una falsa elevación en las fracciones alfa 2 y beta.
- 2) Es posible que se obtengan resultados erróneos en muestras que se han dejado descubiertas, debido a la evaporación.

Las muestras/ controles deben diluirse 1:4 (1+3) con concentrado tampón antes de su utilización. Para obtener cuantificaciones de albúmina por densimetría más exactas, la dilución de la muestra puede aumentarse a 1:8 (1+7). La cantidad exacta deberá determinarse en cada laboratorio individual. El uso de una muestra diluida aumentada incrementará la cuantificación de albúmina, pero reducirá la eficacia del método para detectar las bandas minimonoclonales.

PROCEDIMIENTO PASO A PASO

1. Sacar el gel del envase y colocarlo sobre una toallita de papel. Retirar el revestimiento, secar la superficie del gel con secante C, desechar el secante.
2. Alinear la plantilla de aplicación de la muestra con las flechas existentes en el borde del gel. Aplicar un secante A sobre la parte superior de la plantilla y frotar con un dedo a lo largo de las rejillas para asegurar un buen contacto. Retirar el secante A y conservarlo para utilizarlo luego en el paso 5.
3. Aplicar 3µl de muestra en cada ranura y dejar que absorba durante 4 minutos.
4. Mientras la muestra es absorbida, verter aproximadamente 25ml del concentrado tampón en cada hueco interior de la cámara SAS-MX.
5. Finalizada la absorción de la muestra, secar la plantilla con secante A que se ha conservado del paso 2 y 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. Realizar la electroforesis del gel: 80 voltios, 25 minutos.
8. Finalizada la electroforesis, secar el gel a 60...70°C. **NOTA:** Al secar el gel, no debe tardarse más de 5-10 minutos para evitar la difusión de las bandas. De no poderse lograr esto, poner el gel en metanol durante 5 minutos antes de proceder al secado.
9. Sumergir el gel seco en la solución colorante durante 10 minutos.
10. Decolorar el gel mediante 2 lavados de 2 segundos cada uno con la solución decolorante, o hasta que el fondo esté limpio.
11. Lavar el gel brevemente con agua purificada y secar.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

Se recomienda realizar cualquier evaluación del gel con respecto a modelos normales obtenidos para este método en cada laboratorio individual.

Consultar Ritzmann, S:E. 1982⁵, donde se expone un análisis completo sobre la seroproteína y se muestra que los valores son los mismos tanto para varones como para mujeres que no estén embarazadas. Se han observado algunas diferencias en mujeres al final del embarazo y mujeres que toman anticonceptivos orales.

La edad afecta en los niveles normales. La sangre del cordón umbilical presenta un descenso en los niveles de proteína, albúmina y fracciones alfa y beta; un ligero aumento de la fracción alfa y un aumento de los niveles normales de la fracción gamma (en gran medida de origen materno). Las globulinas gamma descienden rápidamente hasta alrededor de los 3 meses de edad, mientras otras fracciones llegan a alcanzar niveles adultos hacia este mismo período. Los niveles adultos de las globulinas gamma no se alcanzan hasta los 10-16 años de edad. La albúmina desciende y la beta globulina aumenta hacia la edad de 40 años.

1. Evaluación cualitativa.

Revisar los geles para observar la presencia o ausencia de bandas de interés.

2. Evaluación cuantitativa.

Escanear los geles, el gel hacia abajo, a 595nm.

En cualquiera de estos casos, un aumento o descenso en los componentes del suero de una muestra en concreto o la detección de componentes del suero inusuales en las muestras requerirá una investigación posterior. El gel SB de Proteínas Séricas SAS-MX completado es estable durante un período indefinido de tiempo.

CONTROL DE CALIDAD

Los controles de suero Kemtrol (no de catálogo 7024 y 7025) pueden usarse para verificar todas las fases del procedimiento y debe usarse en cada prueba. Para obtener los valores apropiados de los ensayos, consultar el folleto adjuntado en el envase.

LIMITACIONES

Debido que todos los procesos de electroforesis son no lineares, es importante seguir estas Instrucciones de uso al pie de la letra para asegurar unos resultados con resolución óptima y reproducibles. De no seguirse estas instrucciones, los resultados obtenidos podrían estar alterados. De no seguirse estas instrucciones, pueden obtenerse resultados erróneos.

VALORES DE REFERENCIA

Utilizando 20 muestras normales procedentes de donantes varones y hembras con edades entre 20 y 59 años, se obtuvieron los siguientes rangos normales (estos datos se presentan sólo como orientación):

Fraciones de proteínas	Media (%)	Rango \pm 2SD
Albúmina	56.8	52.1 - 61.5
Alfa-1	3.6	2.5 - 4.7
Alfa-2	9.8	6.7 - 12.9
Beta-1	8.8	5.9 - 11.7
Beta-2	5.6	3.9 - 7.3
Gamma	15.4	11.9 - 18.8

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES**Reproductibilidad.**

	Dentro del Gel (n=10)		Entre el Gel (n=100)	
	Media (%)	CV (%)	Media (%)	CV (%)
Albúmina	59.8	3.6	59.2	1.9
Alfa-1	2.9	5.2	3.5	0.3
Alfa-2	7.5	3.8	8.0	0.6
Beta-1	8.5	3.4	9.2	0.8
Beta-2	6.3	9.6	6.0	0.6
Gamma	15.0	8.8	14.0	1.1

Sensibilidad

La sensibilidad del método es equivalente a 0.04g/L por banda, lo que se ha fijado como la concentración de proteína más baja evidente como una banda discreta en el gel completado.

Linealidad

La linealidad del método está en función de las especificaciones del densitómetro, así como del rendimiento del gel. Es recomendable que cada cliente determine la linealidad del método basándose en el densitómetro utilizado en el laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

1. '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 y Daniels, J.C. 'Qualitative and Quantitative Assays' en Laboratory Medicine, Harper & 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.

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-2-1276P 2007/07 (7)