

helena | BioSciences
Europe
www.helena-biosciences.com

Helena BioSciences Europe
Colima Avenue
Sunderland Enterprise Park
Sunderland
SR5 3XB
tel: +44 (0) 191 549 6064
fax: +44 (0) 191 549 6271
email: info@helena-biosciences.com



HL-2-1301P 2003.08 (8)

Other Helena BioSciences Europe offices:

Helena BioSciences Europe
6 Rue Charles Cros-ZAE
95320 Saint Leu La Foret
France
tel: +33 13 995 9292
fax: +33 13 995 6891
email: helena@helena.fr

Helena BioSciences Europe
Via Enrico Fermi, 24
20090 Assago (Milano)
Italy
tel: +39 02 488 1951
or +39 02 488 2141
fax: +39 02 488 2677

helena | BioSciences
Europe
www.helena-biosciences.com

Instructions For Use

SAS-MX Urine Protein
Cat. No. 100500

SAS-MX Protéines urinaires
Fiche technique
Réf. 100500

SAS-MX Urin-Protein
Anleitung
Kat. Nr. 100500

Proteine Urinarie SAS-MX
Istruzioni per l'uso
Cod. 100500

Proteínas de la orina SAS-MX
Instrucciones de uso
N.º de catálogo 100500

Contents

English	1
Français	6
Deutsch	11
Italiano	16
Español	21

SAS-MX URINE PROTEIN

INTENDED PURPOSE

The SAS-MX Urine Protein Kit is intended for the screening of unconcentrated urine samples by agarose gel electrophoresis.

Urinary proteins are derived primarily from plasma proteins that filter through the kidney. The appearance of abnormal plasma proteins in the urine is of great value in evaluating renal function. The appropriate study of proteinuria should include quantitative and qualitative assessment of the type and amount of proteins excreted^{1,4}. Electrophoresis is a technique which allows the differentiation of several types of proteinuria - Physiological, Glomerular (selective and non-selective), Tubular and proteinuria associated with Dysglobulinaemias^{1,5}.

The SAS-MX Urine Protein kit separates urine proteins according to charge in an agarose gel. The proteins are then stained to allow visualisation and quantitative or qualitative interpretation. The high sensitivity stain used in the kit allows most urine samples to be tested without prior concentration and the use of the Urine Protein Internal Standard allows an approximation of urine total protein, or individual band protein concentrations to be determined by densitometry

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 Urine 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 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. Urine Protein Stain

Contains Coomassie Blue stain powder. The powdered stain is stable until the expiry date indicated on the label. Dissolve the contents of the vial in 1 litre of 50% methanol in water and stir overnight. Acidify by adding 20ml of glacial acetic acid. Mix well and filter before use.

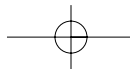
4. Other Kit Components

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 Urine 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 / 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. Urine Protein Stain

The stain concentrate should be stored at 15...30°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Diluted stain 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.

ITEMS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Cat. No. 4063 SAS-MX Chamber
 Cat. No. 1525 EPS600 Power Supply
 Cat. No. 3032 Urine Protein Internal Standard
 Drying oven with forced air capable of 50...60°C
 Fixative Solution: Mix 500ml of purified water and 500ml methanol. Add 100ml of glacial acetic acid. Store in a tightly stoppered bottle.
 Destain Solution: Mix 50ml of glacial acetic acid and 950ml of purified water. Store in a tightly stoppered bottle.
 Purified water

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Freshly collected urine is the specimen of choice. Samples can be stored refrigerated at 2...6°C for up to 72 hours or 2 weeks at -20°C. Samples should initially be used without concentration or dilution, unless the total protein is known to exceed 1000mg/L. If scanning the completed gel by densitometry, an indication of the Urine Total Protein, or the concentration of individual protein zones can be performed by the incorporation of the Urine Protein Internal Standard (Cat. No. 3032) into the sample preparation procedure. Full Instructions For Use are provided with each Urine Protein Internal Standard.

STEP-BY-STEP PROCEDURE

1. Remove the gel from the packaging and place on a paper towel. 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 5µl of sample to each slit and allow to absorb completely. This may take up to 20 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 fix the gel for 5 minutes in fixative solution.

SAS-MX URINE PROTEIN

9. Dry the gel at 50...60°C. **NOTE:** Cloudiness of the gel, leading to problems with destaining may be observed if the gel is dried at temperatures above 60°C.
10. Immerse the dry gel in stain solution for 10 minutes.
11. Destain the gel in 2 x 1 minute washes of destain solution or until the background is clear.
12. Wash the gel briefly in purified water and dry.

QUALITY CONTROL

A normal serum sample (diluted 1:100 in purified water) can be used to identify the position of each band.

INTERPRETATION OF RESULTS

1. Qualitative Evaluation:

Visual interpretation of bands present on the gel:

Type of Proteinuria	Bands Observed On Gel	Proteins Present
Normal urine	small albumin band	albumin
Glomerular	albumin, alpha-1, beta, gamma	albumin, alpha-1 antitrypsin, transferrin, gamma globulins
Tubular	alpha-1, alpha-2, beta	retinol binding protein, beta2-microglobulin, alpha-2 microglobulin
Overflow	gamma or variable	immunoglobulins, free light chains

2. Quantitative Evaluation:

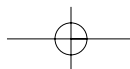
Scan the gels gel, side down, at 595nm.

In either case, the detection of unusual urine components may require further investigation. The completed SAS-MX Urine Protein gel is stable for an indefinite period of time.

The identification of the major urinary protein outlined can be achieved by immunofixation using the Helena BioSciences SAS-MX Urine IFE Kit (Cat. No. 100600).

LIMITATIONS

Samples with obvious crystalline precipitation present should be centrifuged prior to use.



SAS-MX URINE PROTEIN

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

a) Reproducibility

Samples containing 400mg/L and 20mg/L of protein were assayed 5 times each on three gels to determine the within-gel and between-gel reproducibility of elevated and low protein concentrations by densitometry:

Band	Within-Run		Between-Run	
	Mean (%)	CV (%)	Mean	CV (%)
400mg/L	62.8	1.3	62.4	1.6
20mg/L	10.8	7.0	11.9	12.1

b) Sensitivity

25ng per band (equivalent to 5mg/L in the sample), determined as the lowest concentration of protein which was evident as a discrete band on the completed gel.

c) Linearity

Linearity 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.

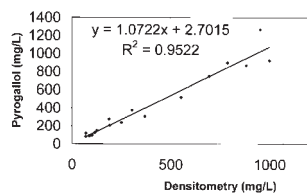
d) Correlation of Total Protein Quantitation

A range of urine samples were tested on the SAS-MX Urine Protein Gel using the Urine Protein Internal Standard (Cat. No. 3032) to determine the total protein by densitometry. The values obtained (in mg/L) were compared to values obtained for urine total protein using a commercially available assay system based upon a pyrogallol red-molybdate complex assay¹.

BIBLIOGRAPHY

1. Fauchier, P. and Catalan, F. 'Interpretive Guide to Clinical Electrophoresis' Alfred Fournier Institute, Paris, France, 1988.
2. Killingsworth, L.M., Cooney, S.K. and Tyllia, M.M. 'Finding Clues to Disease in Urine' Diagnostic Medicine, 1980 ; May/June : 69-75.
3. Umbreit, A. and Wiedemann, G. 'Determination of Urinary Protein Fractions. A Comparison With Different Electrophoretic Methods and Quantitatively Determined Protein Concentrations' Clin. Chim. Acta., 2000; 297 : 163-172.
4. Wiedemann, G. and Umbreit, A. 'Determination of Urinary Protein Fractions by Different Electrophoretic Methods', Clin. Lab., 1999, 45 : 257-262.
5. Wong, W.K., Wieringa, G.E., Stec, Z., Russell, J., Cooke, S., Keevil, B.G. and Lockhart, S. 'A Comparison of Three Procedures for the Detection of Bence-Jones Proteinuria' Ann. Clin. Biochem., 1997, 34 : 371-374.
6. Microprotein-PRTM (Procedure No. 611) Sigma Diagnostics, September 1995.

Total Protein Comparisons



UTILISATION

Le kit SAS-MX Protéines urinaires est utilisé pour le screening d'échantillon d'urine non concentré par électrophorèse en gel d'agarose.

Les protéines urinaires proviennent principalement de la filtration des protéines plasmatiques par le rein. L'apparition de protéines plasmatiques anormales dans l'urine est un élément important dans l'évaluation de la fonction rénale. L'étude de la protéinurie doit inclure l'évaluation qualitative et quantitative du type et de la quantité de protéines excrétées¹⁴. L'électrophorèse est une technique qui permet de différencier plusieurs types de protéinuries: physiologique, glomérulaire (sélective et non sélective), tubulaire et protéinurie associée à une dysglobulinémie¹⁵.

Le kit SAS-MX Protéines urinaires sépare les protéines urinaires en fonction de leur charge en gel d'agarose. Les protéines sont ensuite colorées afin de permettre une interprétation qualitative et quantitative. La haute sensibilité du colorant utilisé permet de tester la plupart des échantillons urinaires sans concentration préalable; de plus, l'utilisation du standard interne Protéines urinaires permet une approximation de la protéinurie ou de la concentration des bandes par densitométrie.

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 urinaires**

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 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 Protéines urinaires

Contient du bleu de Coomassie en poudre. Le colorant en poudre est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Dissoudre le contenu du flacon dans 1 litre de méthanol 50% et laisser sous agitation toute une nuit. Acidifier en ajoutant 20ml d'acide acétique glacial, mélanger et filtrer avant utilisation.

4. 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 urinaires**

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.

SAS-MX PROTÉINES URINAIRES**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. 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 Protéines urinaires

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.

MATÉRIELS NÉCESSAIRES NON FOURNIS

Réf. 4063 Chambre de migration SAS-MX

Réf. 1525 Générateur EPS600

Réf. 3032 Standard interne Protéines Urinaires

Étuve de séchage à convection forcée offrant une température entre 50...60°C

Solution fixative: Mélanger 500ml d'eau distillée avec 500ml de méthanol. Ajouter 100ml d'acide acétique glacial. Conserver en bouteille hermétiquement fermée.

Solution décolorante: Mélanger 50ml d'acide acétique glacial avec 950ml d'eau distillée. Conserver en bouteille hermétiquement fermée.

Eau distillée

PRÉLÈVEMENTS DES ÉCHANTILLONS

L'utilisation d'urine fraîchement recueillie est fortement recommandée. Les échantillons peuvent être conservés 72 heures entre 2...6°C ou 2 semaines à -20°C.

Les échantillons peuvent être utilisés sans concentration ou dilution, jusqu'à une protéinurie n'excédant pas 1000 mg/l.

Si une lecture du gel est réalisée à l'aide d'un densitomètre, il est possible de déterminer la protéinurie ou la concentration des bandes protéiques spécifiques en incorporant le standard interne Protéine Urinaires (Réf. 3032) à chaque échantillon. Se référer à la procédure jointe à chaque flacon de standard interne Protéines Urinaires.

MÉTHODOLOGIE

- Sortir le gel de son emballage et le déposer sur un papier absorbant. Sécher la surface du gel à l'aide d'un buvard C, jeter le buvard.
- 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.
- Déposer 5µl d'échantillon sur chaque fente et laisser absorber complètement. Cette étape peut durer jusqu'à 20 minutes.
- Pendant ce temps, verser 25ml de tampon dans chaque compartiment intérieur de la chambre de migration SAS-MX.
- 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.
- Placer le gel, agarose vers le bas, dans la chambre de migration, en respectant les polarités.
- Faire migrer à 80 volts pendant 25 minutes.

8. Une fois l'électrophorèse terminée, plonger le gel pendant 5 minutes dans un bain de solution fixative.
9. Sécher le gel entre 50...60°C. **REMARQUE:** Si le gel est séché à une température supérieure à 60°C, on observe un aspect floconneux du gel, ce qui entraîne des problèmes de décoloration.
10. Plonger le gel sec dans le colorant pendant 10 minutes.
11. Décolorer le gel dans 2 bains successifs de 1 minute de solution décolorante ou jusqu'à obtention d'un fond de bande clair.
12. Rincer rapidement sous un jet d'eau distillée et sécher.

CONTRÔLE QUALITÉ

Un échantillon de sérum normal (dilution 1/100 en eau distillée) peut être utilisé afin d'identifier la position de chaque bande.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

1. Évaluation qualitative:

Interprétation visuelle des bandes présentes sur le gel:

Type de protéinurie	Bandes observées sur le gel	Protéines présentes
Urine normale Glomérulaire	Petite bande d'albumine Albumine, alpha-1, bêta, gamma	Albumine Albumine, alpha-1 antitrypsine, transferrine, gammaglobulines
Tubulaire	Alpha-1, alpha-2, bêta	Protéine de liaison du rétinol, à-2 microglobuline, à-2 microglobuline
Surcharge	Gamma ou autres	Immunoglobulines, chaînes légères libres

2. Évaluation quantitative:

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

Dans tous les cas, la détection de composés inhabituels doit conduire à d'autres investigations. Après traitement, le gel SAS-MX Protéines urinaires est stable indéfiniment.

L'identification des principales protéines urinaires peut être réalisées par immunofixation en utilisant le gel Helena BioSciences SAS-MX IFE urinaire (réf. 100600).

LIMITES

Les échantillons présentant une précipitation de cristaux doivent être centrifugés avant utilisation.

SAS-MX PROTÉINES URINAIRES

PERFORMANCES

a) Reproductibilité

Des échantillons avec 400mg/l et 20mg/l de protéines ont été dosés par densitométrie 5 fois sur 3 gels différents afin de déterminer la reproductibilité intra-plaque et inter-plaque pour des concentrations faible et élevée.

Bande	Intra-plaque Moyenne (%)	CV(%)	Inter-plaque Moyenne(%)	CV(%)
400 mg/l	62,8	1,3	62,4	1,6
20 mg/l	10,8	7,0	11,9	12,1

b) Sensibilité

Sensibilité de 25ng par bande (équivalent à 5mg/l dans l'échantillon), déterminée comme la concentration la plus faible en protéine qui permet de mettre en évidence une fine bande après coloration.

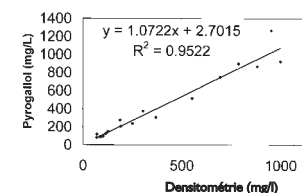
c) Linéarité

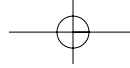
La linéarité est fonction du densitomètre ainsi que des performances du gel. Il est recommandé à chaque client de déterminer la linéarité de cette méthode en fonction du densitomètre utilisé au sein du laboratoire.

d) Corrélation de la protéinurie totale

Divers échantillons d'urine ont été testés sur la plaque SAS-MX Protéines urinaires en utilisant le standard interne Protéines urinaires (réf. 3032) afin de déterminer la protéinurie par densitométrie. Les valeurs obtenues (en mg/l) ont été comparées avec celles obtenues grâce à une trousse de dosage disponible dans le commerce utilisant le complexe rouge de pyrogallol-molybdate.

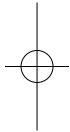
Comparaison des dosages des protéines totales





BIBLIOGRAPHIE

1. Fauchier, P. et Catalan, F. 'Interpretive Guide to Clinical Electrophoresis' Alfred Fournier Institute, Paris, France, 1988.
2. Killingsworth, L.M., Cooney, S.K. et Tyllia, M.M. 'Finding Clues to Disease in Urine' Diagnostic Medicine, 1980 ; mai/juin : 69-75.
3. Umbreit, A. et Wiedemann, G. 'Determination of Urinary Protein Fractions. A Comparison With Different Electrophoretic Methods and Quantitatively Determined Protein Concentrations' Clin. Chim. Acta., 2000; 297 : 163-172.
4. Wiedemann, G. et Umbreit, A. 'Determination of Urinary Protein Fractions by Different Electrophoretic Methods', Clin. Lab.; 1999, 45 : 257-262.
5. Wong, W.K., Wieringa, G.E., Stec, Z., Russell, J., Cooke, S., Keevil, B.G. et Lockhart, S. 'A Comparison of Three Procedures for the Detection of Bence-Jones Proteinuria' Ann. Clin. Biochem., 1997, 34 : 371-374.
6. Microprotein-PRTM (Procédure n° 611) Sigma Diagnostics, septembre 1995.



SAS-MX URIN-PROTEIN

ANWENDUNGSBEREICH

Der SAS-MX Urin-Protein Kit dient zur Untersuchung unkonzentrierter Urinproben durch Elektrophorese im Agarose-Gel.

Proteine im Urin stammen hauptsächlich von durch die Niere gefilterten Plasmaproteinen ab. Das Vorkommen pathologischer Plasmaproteine im Urin ist bei der Beurteilung der Nierenfunktion von großer Bedeutung. Studien der Proteinurie sollten quantitative und qualitative Untersuchungen von Typ und Menge der ausgeschiedenen Proteine umfassen¹⁴. Die Elektrophorese ist ein Verfahren, welches die Unterteilung mehrerer Proteinurieformen ermöglicht: physiologische, glomeruläre (selektiv und nicht-selektiv), tubuläre Proteinurie sowie Proteinurie, die mit Dysglobulinämien in Verbindung steht¹⁵.

Der SAS-MX Urin-Protein Kit trennt im Agarose-Gel Urin-Proteine nach ihrer Ladung auf. Anschließend werden die Proteinbanden durch Färbung sichtbar gemacht und können quantitativ oder qualitativ ausgewertet werden. Der im Kit eingesetzte hochempfindliche Farbstoff ermöglicht das Testen der meisten Urinproben ohne vorherige Konzentrierung, und der Gebrauch des "Urine Protein Internal Standard" (interner Urinprotein-Standard) ermöglicht eine Approximation des Gesamteiweiß im Urin oder Konzentration einzelner Proteinbanden durch Densitometrie.

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 Urin-Protein Gel

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

2. Tris-Barbital-Pufferkonzentrat

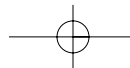
Enthält Barbital und Natriumbarbital mit Natriumazid als Konservierungsmittel. Den Inhalt der Flasche mit dest. Wasser auf 1 Liter verdünnen. Gut schütteln. Puffersalze können beim Stehen leicht kristallisieren. Kristalle mit der verdünnten Pufferlösung aus der Flasche spülen, um eine vollständige Auflösung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

3. Urin-Protein Färbung

Enthält Färbepulver "Coomassie Blue". Der pulverisierte Farbstoff ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum auf dem Etikett haltbar. Den Inhalt des Fläschchens in 1 Liter 50 %-igem Methanol-Wassergemisch auflösen und über Nacht rühren. Mit 20ml Eisessig ansäuern. Gut schütteln und vor Gebrauch filtrieren.

4. Weitere Kit-Komponenten

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



LAGERUNG UND STABILITÄT**1. SAS-MX Urin-Protein 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. Urin-Protein Färbung

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

NICHT MITGELIEFERTES, ABER BENÖTIGTES MATERIAL

Kat. Nr. 4063 SAS-MX Kammer

Kat. Nr. 1525 EPS600 Netzteil

Kat. Nr. 3032 Urin-Protein Interner Standard

Trockenschrank mit Umluft und einer Temperaturleistung von 50...60°C.

Fixierlösung: 500ml dest. Wasser mit 500ml Methanol mischen. 100ml Eisessigsäure hinzufügen.

In einer fest verschlossenen Flasche aufbewahren.

Entfärbelösung: 50ml Eisessig mit 950ml dest. Wasser mischen. In einer fest verschlossenen Flasche aufbewahren.

Dest. Wasser

PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG

Frischer Urin ist das Untersuchungsmaterial der Wahl. Proben können bis zu 72 Stunden bei 2...8°C oder 2 Wochen bei -20°C gelagert werden.

Proben sollten anfänglich ohne Konzentrierung oder Verdünnung verwendet werden, es sei denn der Gesamteiweißgehalt liegt bekannt über 1000mg/L.

Bei der densitometrischen Analyse des Gels zum Schluss gibt die Verwendung des "Urine Protein Internal Standard" (interner Urinprotein-Standard; Kat. Nr. 3032) bei der Probenvorbereitung einen Hinweis auf den Gesamteiweißgehalt oder die Konzentration der einzelnen Eiweißzonen. Ausführliche Arbeitsanleitung wird mit jedem "Urine Protein Internal Standard" mitgeliefert.

SAS-MX URIN-PROTEIN**SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE**

- Das Gel aus der Verpackung nehmen und auf ein Papiertuch legen. Die Geloberfläche mit einem Blotter C blotten und Blotter werfen.
- 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 Schlitz der Schablone streichen, um eine gute Haftung zu gewährleisten. Blotter A entfernen und ihn bis zur Verwendung in Schritt 5 beiseite legen.
- 5µl Probe in jeden Schablonenschlitz pipettieren. Die Probe ins Gel diffundieren lassen. Das kann bis zu 20 Minuten dauern.
- Während die Probe einwirkt, 25ml Puffer in jeden der inneren Bereiche der SAS-MX-Kammer füllen.
- Nach Absorption der Probe den Blotter A aus Schritt 2 auf die Schablone drücken. Anschließend Schablone und Blotter entfernen.
- Das Gel in die Kammer spannen, Agarose nach unten, und auf übereinstimmende Polarisierung achten (Pluszeichen auf dem Gel und Pluszeichen in der Kammer).
- Gel-Elektrophorese durchführen: 80 Volt, 25 Minuten.
- Nach der Elektrophorese das Gel 5 Minuten in Fixativlösung fixieren.
- Das Gel bei 50...60°C trocknen. **BITTE BEACHTEN:** Trübung des Gels, die beim Entfärben Probleme bereiten kann, ist bei Gelen zu beobachten, die bei über 60°C getrocknet wurden.
- Das trockene Gel 10 Minuten in der Färbelösung färben.
- Das Gel zweimal für je 1 Minuten in der Entfärbelösung entfärben (oder bis der Gel-Hintergrund klar ist).
- Gel kurz mit dest. Wasser abspülen und trocknen.

QUALITÄTSKONTROLLE

Eine normale Serumprobe (im Verhältnis 1:100 mit dest. Wasser verdünnt) kann zur Identifizierung der Bandenposition verwendet werden.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE**1. Qualitative Auswertung:**

Visuelle Auswertung der auf dem Gel vorhandenen Banden:

Art der Proteinurie	Auf dem Gel beobachtete Banden	Anwesende Proteine
Normaler Urin	Kleine Albuminbande	Albumin
Glomerulär	Albumin, Alpha-1, Beta, Gamma	Albumin, Alpha-1 Antitrypsin, Transferrin, Gammaglobuline
Tubulär	Alpha-1, Alpha-2, Beta	Retinol bindendes Protein, Beta-2-Mikroglobulin, Alpha-2-Mikroglobulin
Überlauf	Gamma oder Variable	Immunglobuline, freie Leichtketten

2. Quantitative Auswertung:

Die Gele bei einer Wellenlänge von 595nm mit der Gelseite nach unten scannen.

SAS-MX URIN-PROTEIN

In jedem Fall ist eine weitere Untersuchung notwendig, wenn ungewöhnliche Bestandteile im Urin gefunden werden. Das fertige SAS-MX Urin-Protein Gel ist unbegrenzt stabil.

Die Identifizierung des Urin-Proteins, das den größten Anteil hat, lässt sich durch Immunfixation mit dem Helena BioSciences SAS-MX Urin IFE Kit (Kat. Nr. 100600) erzielen.

EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit deutlich kristalliner Ausfällung sind vor Gebrauch zu zentrifugieren.

LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN**a) Reproduzierbarkeit**

Proben mit einem Proteingehalt von 400mg/l und 20mg/l wurden jeweils 5 Mal auf drei Gelen analysiert, um die Reproduzierbarkeit erhöhter und niedriger Eiweißkonzentrationen innerhalb eines und zwischen verschiedenen Gelen mittels Densitometrie zu bestimmen.

Bande	Innerhalb eines Durchlaufs		Zwischen Durchläufen	
	Mittelwert (%)	CV (%)	Mittelwert (%)	CV (%)
400mg/L	62,8	1,3	62,4	1,6
20mg/L	10,8	7,0	11,9	12,1

b) Empfindlichkeit

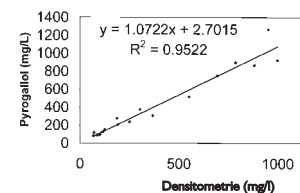
25ng pro Bande (entspricht 5mg/l in der Probe). Dies wurde als niedrigste Proteinkonzentration ermittelt, die als diskrete Bande auf dem fertigen Gel zu erkennen war.

c) Linearität

Die Linearität 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.

d) Korrelation quantitativer Gesamteiweißbestimmung

Eine Reihe von Urinproben wurde auf dem SAS-MX Urin-Protein Gel geprüft. Urin-Protein Interner Standard (Kat. Nr. 3032) wurde bei der densitometrischen Bestimmung des Gesamteiweißgehalts verwendet. Die erhaltenen Werte (in mg/l) wurden mit Werten für den Gesamteiweißgehalt verglichen, die bei Verwendung eines handelsüblichen auf Pyrogallol-Rot-Molybdat-Komplex-Tests basierenden Systems ermittelt wurden.

Vergleiche Gesamteiweiß**LITERATUR**

1. Fauchier, P. and Catalan, F. Interpretive Guide to Clinical Electrophoresis, Alfred Fournier Institute, Paris, France, 1988.
2. Killingsworth, L.M., Cooney, S.K. and Tyllia, M.M. 'Finding Clues to Disease in Urine' Diagnostic Medicine, 1980, Mai/Juni : 69-75.
3. Umbreit, A. and Wiedemann, G. 'Determination of Urinary Protein Fractions. A Comparison With Different Electrophoretic Methods and Quantitatively Determined Protein Concentrations' Clin. Chim. Acta., 2000; 297 : 163-172.
4. Wiedemann, G. and Umbreit, A. 'Determination of Urinary Protein Fractions by Different Electrophoretic Methods', Clin. Lab.; 1999, 45 : 257-262.
5. Wong, W.K., Wieringa, G.E., Stec, Z., Russell, J., Cooke, S., Keevil, B.G. and Lockhart, S. 'A Comparison of Three Procedures for the Detection of Bence-Jones Proteinuria' Ann. Clin. Biochem., 1997, 34 : 371-374.
6. Microprotein-PRTM (Procedure No. 611) Sigma Diagnostics, September 1995.

PRINCIPIO

Il kit per l'analisi delle proteine urinarie SAS-MX è stato formulato per lo screening di campioni di urina non concentrati attraverso elettroforesi su gel di agarosio.

Le proteine presenti nell'urina derivano principalmente dalle proteine plasmatiche filtrate dal rene. La comparsa di proteine del plasma anomale nell'urina è estremamente importante per la valutazione della funzionalità renale. Un accurato esame della proteinuria deve comprendere una valutazione quantitativa e qualitativa del tipo e della quantità di proteine escrete^{1,4}. L'elettroforesi è una tecnica che permette la differenziazione di diversi tipi di proteinuria - fisiologica, glomerulare (selettiva e non selettiva), tubulare e proteinuria associata a disglobulinemie^{1,5}.

Il kit per l'analisi delle proteine urinarie SAS-MX separa le proteine urinarie secondo la loro carica elettrica in un gel di agarosio. Le proteine vengono poi colorate per permetterne la visualizzazione e l'interpretazione quantitativa o qualitativa. Il colorante ad alta sensibilità utilizzato nel kit consente di analizzare la maggior parte dei campioni di urina senza doverli prima concentrare mentre l'uso dello standard interno per proteine urinarie consente di dosare con una certa approssimazione le proteine urinarie totali o di determinare mediante densitometria le singole concentrazioni di proteine nelle bande.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Tutti i reagenti devono essere utilizzati esclusivamente per diagnostica in vitro. Non ingerire né pipettare con la bocca i componenti del kit. Indossare guanti protettivi durante l'uso dei componenti del kit. Fare riferimento alla scheda di sicurezza per avvertenze su rischi e sicurezza ed informazioni sullo smaltimento dei componenti.

COMPOSIZIONE**1. Gel per l'analisi delle proteine urinarie SAS-MX**

Contiene agarosio in un tampone tris/barbital con tiomersale e sodio azide come conservante. Il gel è pronto all'uso così come viene fornito.

2. Tampone Concentrato Tris / barbital

Contiene barbital / sodio barbital con 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 cristallizzarsi velocemente in posizione verticale. Lavare via tutti i cristalli dalla bottiglia con un tampone diluito per assicurarne la completa dissoluzione.

3. Colorante per proteine urinarie

Contiene colorante concentrato Coomassie Blu. Il colorante concentrato è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Sciogliere il contenuto della fiala in acqua e in 1 litro di metanolo al 50% e agitare durante la notte. Acidificare aggiungendo 20ml di acido acetico glaciale. Miscelare bene e filtrare prima dell'uso.

4. Altri componenti del kit

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

PROTEINE URINARIE SAS-MX**CONSERVAZIONE E STABILITÀ****1. Gel per l'analisi delle proteine urinarie SAS-MX**

I gel devono essere conservati a 15...30°C, e sono stabili 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. Colorante concentrato per proteine urinarie

Il colorante concentrato deve essere conservato a 15...30°C, è stabile fino a data di scadenza riportata sull'etichetta del flacone. Il colorante diluito 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.

MATERIALI NECESSARIO NON FORNITO

Cod. 4063 Camera SAS-MX

Cod. 1525 Alimentatore EPS600

Cod. 3032 Standard interno per proteine urinarie

Forno di essiccazione ad aria forzata con temperature di 50...60°

Soluzione fissativa: miscelare 500ml di acqua distillata con 500ml di metanolo. Aggiungere 100ml di acido acetico. Conservare in una bottiglia tappata ermeticamente.

Soluzione decolorante: miscelare 50ml di acido glaciale acetico e 950ml di acqua distillata. Conservare in una bottiglia tappata ermeticamente.

Acqua distillata

RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE

L'urina fresca rappresenta il campione di preferenza. I campioni possono essere conservati in frigorifero ad una temperatura compresa tra 2...6°C per un max. di 72 ore o per 2 settimane a -20°C. Inizialmente i campioni dovrebbero essere utilizzati senza alcuna concentrazione o diluizione, a meno che sia già noto che la quantità di proteine totali supera i 1000 mg/l.

Sottoponendo a scansione il gel ottenuto mediante densitometria è possibile avere una prima quantificazione delle proteine urinarie totali oppure le concentrazioni di singole zone proteiche includendo nella procedura di preparazione del campione lo standard interno per proteine urinarie (Cod. 3032). Con ogni standard interno per proteine urinarie vengono fornite le istruzioni complete per l'uso.



PROTEINE URINARIE SAS-MX

PROCEDURA

1. Rimuovere il gel dalla confezione e collocarlo su una bibula. Far assorbire la superficie del gel con un blotter C. Eliminare il blotter.
2. Allineare la mascherina di applicazione del campione alle frecce sul bordo del gel. Porre un blotter A sopra la 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 5µl di campione in ogni fessura e lasciare assorbire per 5 minuti. La procedura potrebbe richiedere fino a 20 minuti.
4. Durante l'assorbimento, collocare 25ml di tampone in ogni compartimento interno della camera SAS-MX.
5. Dopo l'assorbimento, asciugare leggermente la mascherina con il blotter A, conservato dal passaggio 2, quindi eliminare mascherina e blotter.
6. Collocare il gel nella camera, 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 al gel a elettroforesi a 80 volt per 25 minuti.
8. Al termine dell'elettroforesi, immergere il gel in soluzione fissativa per 5 minuti.
9. Asciugare il gel a 50...60°C. **NOTA:** Se il gel è torbido significa che è stato asciugato a temperature superiori ai 60°C e ciò potrebbe interferire negativamente con la decolorazione.
10. Immergere il gel asciutto nella soluzione colorante per 10 minuti.
11. Decolorare il gel in 2 bagni di soluzione decolorante per 1 minuto ciascuno, fino ad ottenere un fondo chiaro.
12. Sciacquare velocemente il gel con acqua distillata e asciugare.

CONTROLLO QUALITÀ

Un campione di siero normale (diluito 1:100 in acqua distillata) può essere utilizzato per identificare la posizione di ciascuna banda.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

1. Valutazione qualitativa:

Interpretazione visiva delle bande presenti sul gel:

Tipo di proteinuria	Bande osservate sul gel	Proteine presenti
Urina normale	Banda di albumina piccola	Albumina
Glomerulare	Albumina, alfa-1, beta, gamma	Albumina, alfa-1 antitripsina, transferrina, gammaglobuline
Tubulare	alfa-1, alfa-2, beta	Proteina legante retinolo, beta-2-microglobulina, alfa-2-microglobulina
Da iperafflusso	Gamma o variabile	Immunoglobuline, catene leggere libere

2. Valutazione quantitativa:

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

In entrambi i casi, il rilevamento di componenti di urina anomali potrebbe richiedere esami più approfonditi.

Il gel completato di Proteine Urinarie SAS-MX è stabile per un tempo indefinito.

È possibile identificare la principale proteina presente nell'urina mediante immunofissazione, utilizzando il kit SAS-MX Urine IFE di Helena BioSciences (Cod. 100600)

LIMITAZIONI

I campioni che presentano un'evidente precipitazione cristallina dovrebbero essere centrifugati prima dell'uso.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

a) Riproducibilità

Campioni contenenti 400mg/L e 20mg/L di proteina sono stati sottoposti ad analisi per 5 volte su tre gel per determinare la riproducibilità entro la serie e tra la serie di concentrazioni elevate e non di proteina mediante densitometria:

Banda	All'interno della serie		Tra la serie	
	Media (%)	CV (%)	Media (%)	CV (%)
400mg/L	62.8	1.3	62.4	1.6
20mg/L	10.8	7.0	11.9	12.1

b) Sensibilità

25ng per banda (equivalente a 5mg/L nel campione), determinati come la concentrazione più bassa di proteina presente come banda discreta sul gel completato.

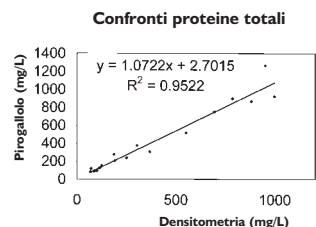
c) Linearità

La linearità è una funzione della specificazione densitometrica nonché delle prestazioni del gel. Si raccomanda di determinare la linearità del metodo sulla base del densitometro in uso nel laboratorio.

d) Correlazione di quantificazione totale della proteina

Una serie di campioni di urina sono stati testati con gel SAS-MX Urine Protein utilizzando lo standard interno per proteine urinarie (Cod. 3032) per determinare la proteina urinaria totale mediante densitometria. I valori ottenuti (in mg/l) sono stati confrontati con quelli ottenuti per le proteine urinarie totali utilizzando un sistema di dosaggio disponibile in commercio e basato su un complesso pirogallolo rosso-molibdato⁶.





BIBLIOGRAFIA

1. Fauchier, P. and Catalan, F. 'Interpretive Guide to Clinical Electrophoresis' Alfred Fournier Institute, Paris, France, 1988.
2. Killingsworth, L.M. Cooney, S.K. and Tyllia, M.M. 'Finding Clues to Disease in Urine' Diagnostic Medicine, 1980; May/June: 69-75.
3. Umbreit, A. and Wiedemann, G. 'Determination of Urinary Protein Fractions. A Comparison With Different Electrophoretic Methods and Quantitatively Determined Protein Concentrations' Clin. Chim. Acta., 2000; 297 : 163-172.
4. Wiedemann, G. and Umbreit, A. 'Determination of Urinary Protein Fractions by Different Electrophoretic Methods', Clin. Lab. 1999, 45 : 257-262.
5. Wong, W.K., Wieringa, G.E., Stec, Z., Russell, J., Cooke, S., Keevil, B.G. and Lockhart, S. 'A Comparison of Three Procedures for the Detection of Bence-Jones Proteinuria' Ann. Clin. Biochem., 1997, 34 : 371-374.
6. Microprotein-PRTM (Procedure No. 61 I) Sigma Diagnostics, September 1995.

PROTEÍNAS DE LA ORINA SAS-MX

USO PREVISTO

El kit de proteínas de la orina SAS-MX tiene como objeto el tamizado de muestras de orina sin concentrar mediante electroforesis con gel de agarosa.

Las proteínas de la orina proceden principalmente de proteínas plasmáticas que se filtran a través del riñón. La aparición de proteínas plasmáticas anormales en la orina tiene un gran valor para la evaluación de las funciones renales. Un estudio adecuado de la proteinuria debiera incluir una valoración cuantitativa y cualitativa del tipo y cantidad de proteínas excretadas^{1,4}. La electroforesis es una técnica que permite diferenciar varios tipos de proteinuria - fisiológica, glomerular (selectiva y no selectiva), tubular y proteinuria asociada con disglobulinemias^{1,5}.

El kit de proteínas de la orina SAS-MX separa las proteínas de la orina de acuerdo con la carga en un gel de agarosa. Luego las proteínas son coloreadas para hacerlas visibles y poder realizar una interpretación cuantitativa y cualitativa. El colorante de alta sensibilidad utilizado en el kit permite examinar la mayoría de las muestras de orina sin una concentración previa, y el uso del Modelo Interno de Proteínas de la Orina permite obtener una aproximación al total de proteínas en la orina, o determinar por densitometría concentraciones de proteínas en bandas individuales.

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 sobre los riesgos de los componentes, avisos de seguridad y consejos para su eliminación.

COMPOSICIÓN

1. **Gel de proteínas de la orina SAS-MX**
Contiene agarosa en un concentrado 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 de proteínas de la orina**
Contiene polvo colorante azul Coomassie. El polvo es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del frasco. Disolver el contenido del vial en litro con 50% de metanol en agua y dejar removiendo durante toda la noche. Acidificar añadiendo 20ml ácido acético cristalizado. Mezclar bien y filtrar antes de usar.
4. **Otros componentes del kit**
Cada kit contiene una hoja de instrucciones y suficientes plantillas de aplicación de la muestra y secantes A y C, hasta completar 10 geles.

ALMACENAMIENTO Y PERÍODO DE VALIDEZ**1. Gel de proteínas de la orina SAS-MX**

Los geles han de almacenarse a una temperatura entre 15...30°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 del resecamiento del gel, o 3) contaminación visible de la agarosa por fuentes bacterianas o micóticas.

2. Concentrado tampón de Tris-Barbital

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

3. Colorante de proteínas de la orina

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 preparada 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 de la solución colorante.

ARTÍCULOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

no de catálogo 4063 Cámara SAS-MX

no de catálogo 1525 Fuente de alimentación EPS600

no de catálogo 3032 Modelo Interno de Proteínas de la Orina

Horno de secado de ventilación forzada con capacidad para 50...60°C

Solución fijadora: Mezclar 500ml de agua purificada con 500ml de metanol. Añadir 100ml de ácido acético cristalizado.

Guardar en un frasco herméticamente cerrado.

Solución decolorante: Mezclar 50ml de ácido acético cristalizado con 950ml de agua purificada.

Guardar en un frasco herméticamente cerrado.

Agua purificada.

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

La muestra elegida es orina recién recogida. Las muestras se pueden guardar en el frigorífico a una temperatura entre 2...6°C hasta 72 horas, o durante 2 semanas a -20°C.

Inicialmente las muestras se utilizarán sin concentración ni dilución, a no ser que se sepa que las proteínas totales exceden los 1000mg/L.

Si se tamiza el gel completado mediante densitometría, se puede obtener una indicación del total de proteínas de la orina, o la concentración de zonas de proteínas individuales, incorporando el Modelo Interno de Proteínas de la Orina (no de catálogo 3032) al procedimiento de preparación de la muestra. Con cada Modelo Interno de Proteínas de la Orina se proporcionan unas instrucciones de uso completas.

PROTEÍNA DE LA URINA SAS-MX**PROCEDIMIENTO PASO A PASO**

1. Sacar el gel del envase y colocarlo sobre una toallita de papel. Secar la superficie del gel con un secante C y luego 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 5µl de la muestra a cada rejilla y dejar que sea absorbida por completo. Este proceso puede durar 20 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 el secante A que e 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, fijar el gel durante 5 minutos en solución fijadora.
9. Secar el gel a una temperatura entre 50...60°C. **NOTA:** Si el gel se seca a una temperatura superior a 60°C, esto podría ocasionar turbidez, lo que conlleva a su vez problemas en la decoloración.
10. Sumergir el gel seco en la solución colorante durante 10 minutos.
11. Decolorar el gel mediante 2 lavados de 1 minuto cada uno con la solución decolorante, o hasta que el fondo esté limpio.
12. Lavar el gel brevemente con agua purificada y secar.

CONTROL DE CALIDAD

Se puede utilizar una muestra normal de suero (diluida en una proporción 1:100 en agua purificada) para identificar la posición de cada banda.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**1. Evaluación cualitativa**

Interpretación visual de bandas existentes en el gel.

Tipo de Proteinuria	Bandas Observadas en el Gel	Proteínas halladas
Orina normal	Banda de albúmina pequeña	albúmina
Glomerular	Albúmina, alfa-1, beta, gamma	albúmina, alfa-1 antitripsina, transferina, gammaglobulinas
Tubular	alfa-1, alfa-2, beta	Proteínas ligadas al retinol beta-2 microglobulina, alfa2-microglobulina
Exceso	gamma o variable	inmunoglobulinas, cadenas ligeras sueltas

2. Evaluación cuantitativa

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

En cualquier caso, la detección de componentes inusuales en la orina puede requerir una investigación posterior. El gel de proteínas de la orina SAS-MX completado es estable durante un período indefinido de tiempo.

La identificación de la proteína urinaria más importante perfilada se puede conseguir por inmunofijación utilizando el kit IFE de orina SAS-MX de Helena Biosciences (no de catálogo 100600).

LIMITACIONES

Las muestras con presencia de una precipitación cristalina obvia se pueden centrifugar antes del uso.

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES

a) Reproducibilidad

Se ensayaron muestras conteniendo 400mg/L y 20mg/L de proteínas, 5 veces cada una en tres geles, para determinar por densitometría la reproducibilidad dentro y entre el gel de concentraciones elevadas y bajas de proteínas.

Banda	Dentro de la ejecución		Entre la ejecución	
	Media (%)	CV(%)	Media (%)	CV(%)
400mg/L	62.8	1.3	62.4	1.6
20mg/L	10.8	7.0	11.9	12.1

b) Sensibilidad

25 ng por banda (equivalentes a 5mg/L en la muestra), determinada como la concentración más baja de proteínas que se hizo evidente en forma de una discreta banda sobre el gel completado.

c) Linealidad

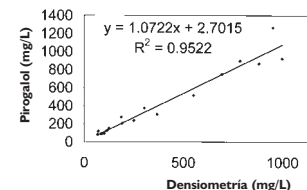
La linealidad es una función de las especificaciones del densiómetro, así como del comportamiento del gel. Es recomendable que cada cliente determine la linealidad del método basándose en el densiómetro utilizado en el laboratorio.

d) Correlación de la cuantificación de proteínas totales

Se probó una serie de muestras de orina con el gel de proteínas de la orina SAS-MX, utilizando el Modelo Interno de Proteínas de la Orina (no de catálogo 3032) para determinar las proteínas totales por densitometría. Los valores obtenidos (en mg/L) se compararon con valores obtenidos para proteínas totales en la orina, utilizando un sistema de ensayos disponible en el mercado basado en el ensayo de un compuesto de pirogalol rojo y molibdato⁶.

PROTEÍNA DE LA ORINA SAS-MX

Comparaciones de Proteínas Totales



BIBLIOGRAFÍA

1. Fauchier, P. y Catalan, F. 'Interpretive Guide to Clinical Electrophoresis' Alfred Fournier Institute, Paris, Francia, 1988.
2. Killingsworth, L.M., Cooney, S.K. y Tyllia, M.M. 'Finding Clues to Disease in Urine' Diagnostic Medicine, 1980 ; mayo/junio : 69-75.
3. Umbreit, A. y Wiedemann, G. 'Determination of Urinary Protein Fractions. A Comparison With Different Electrophoretic Methods and Quantitatively Determined Protein Concentrations' Clin. Chim. Acta., 2000; 297 : 163-172.
4. Wiedemann, G. y Umbreit, A. 'Determination of Urinary Protein Fractions by Different Electrophoretic Methods', Clin. Lab.; 1999, 45 : 257-262.
5. Wong, W.K., Wieringa, G.E., Stec, Z., Russell, J., Cooke, S., Keevil, B.G. y Lockhart, S. 'A Comparison of Three Procedures for the Detection of Bence-Jones Proteinuria' Ann. Clin. Biochem., 1997, 34 : 371-374.
6. Microprotein-PRTM (Procedure No. 611) Sigma Diagnostics, September 1995.