

**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

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



HL-2-1303P 2003.08 (8)

**helena** | BioSciences  
Europe  
www.helena-biosciences.com

**Instructions For Use**

**SAS-MX High Resolution**  
Cat. No. 101300

SAS-MX Haute résolution  
Fiche technique  
Réf. 101300

SAS-MX High Resolution  
Anleitung  
Kat. Nr. 101300

SAS-MX ad alta risoluzione  
Istruzioni per l'uso  
Cod. 101300

Alta Resolución SAS-MX  
Instrucciones de uso  
No de catálogo 101300

**Contents**

English .....	1
Français .....	6
Deutsch .....	11
Italiano .....	16
Español .....	21

## **SAS-MX HIGH RESOLUTION**

### **INTENDED PURPOSE**

The SAS-MX High Resolution Kit is intended for the separation of serum or plasma 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 conditions<sup>1</sup>.

Since the introduction of moving boundary electrophoresis by Tiselius<sup>2</sup>, 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 High Resolution kit separates serum proteins beyond the classical 5 band pattern into 10-15 discrete fractions, thereby increasing the diagnostic usefulness of the protein patterns<sup>3,5</sup>. Approximately 15 serum proteins have been studied extensively because they may be measured easily<sup>6,9</sup>.

The SAS-MX High Resolution Kit separates serum / plasma proteins according to charge in a buffered agarose gel. The protein bands are then fixed and stained for visualisation and qualitative interpretation.

### **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 High Resolution Gel**

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

#### **2. Tris / Barbital Buffer Concentrate**

Contains concentrated Tris / Barbital buffer with sodium azide added as preservative. Dilute the contents of the bottle to 1 litre with purified water and mix well.

#### **3. High Resolution Stain Concentrate**

Contains concentrated high resolution stain in a solution containing 5 parts methanol : 5 parts water : 1 part glacial acetic acid. Dilute the contents of the bottle to 700ml with destain solution.

#### **4. Other Kit Components**

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

### **STORAGE AND SHELF-LIFE**

#### **1. SAS-MX High Resolution 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. High Resolution 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. Poor staining performance may indicate deterioration of the stain solution.

**ITEMS REQUIRED BUT NOT PROVIDED**

Cat. No. 4063 SAS-MX Chamber  
 Cat. No. 1525 EPS600 Power Supply  
 Cat. No. 3039 Chamber Cooling Device  
 Cat. No. 5141 High Resolution Protein Marker  
 Drying oven with forced air capable of 60...70°C  
 Destain Solution: Mix 500ml of methanol and 500ml of purified water. Add 100ml of glacial acetic acid.  
 Store in a tightly stoppered bottle.  
 Purified water

**SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION**

Fresh serum or plasma is the specimen of choice. Samples may be stored covered for a maximum of 48 hours at 2...6°C. The use of plasma will result in a fibrinogen band between the beta and gamma fractions. The use of aged samples will cause the C3 band to migrate in the transferrin region. Serum and Plasma samples should be diluted 1 + 1 with buffer (1 part sample + 1 part buffer). Urine and CSF samples can be used as samples following a suitable concentration step:

Total Protein (g/L)	Concentration Factor
<0.5	100 x
0.5 - 1.0	50 x
1.0 - 3.0	25 x
3.0 - 6.0	10 x
6.0 - 10.0	5 x

Following concentration, urine and CSF samples should be applied directly to the gel.

**STEP-BY-STEP PROCEDURE**

**NOTE:** Ensure that the Chamber Cooling Device has been stored at 2...6°C for at least 60 minutes prior to use.

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 2µl of sample to each slit and allow to absorb for 5 minutes. (A 4µl sample can be applied if darker bands are preferred.)
4. Whilst the samples are absorbing, pour 150ml of buffer into each outer section of the SAS-MX Chamber. Place the cooling device into the central trough of the chamber and wet the surface with a few drops of buffer.
5. Following sample absorption, blot the template with the blotter A retained from Step 2 and remove both blotter and template.

2

**SAS-MX HIGH RESOLUTION**

6. Position the gel on top of the cooling device agarose side up, aligning the positive (+) and negative (-) sides with the corresponding positions on the chamber. Take care to avoid trapped air bubbles under the gel.
7. Prepare a wick for each side of the gel by placing 3 wicks together in 2 sets, to make 2 thick wicks. Immerse each wick in the buffer, gently squeeze out excess buffer and attach each wick to the edge of the gel, parallel with the edge of the cooling device. Ensure one edge of the wick is immersed in the buffer and rub one finger across the portion of the wick on the gel to ensure good contact.
8. Electrophorese the gel: 250 volts, 25 minutes.
9. Following electrophoresis, immerse the gel in stain solution for 15 minutes.
10. Destain the gel in destain solution for 30 seconds.
11. Dry the gel at 60...70°C.
12. Destain the gel in 2 x 30 seconds washes of destain solution.
13. Dry the gel.

**ALTERNATIVE STAINING PROCEDURES**

Two alternative staining protocols are available depending on the desired staining requirement of the user.

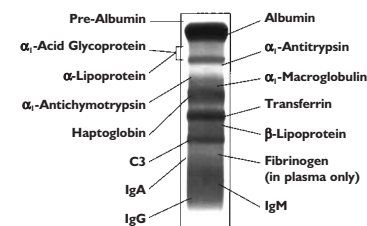
1. Substitute Amido Black Stain (Cat. No. 3048) for the High Resolution Stain. **FOR SERUM OR PLASMA SAMPLES ONLY.** Do not dilute the sample prior to electrophoresis and follow the staining protocol outlined above. The amido black stain is less sensitive than the coomassie stain, but provides a more uniform staining quality, allowing a better qualitative evaluation of differences in band intensity.
2. Double Staining Technique. **FOR CSF AND URINE SAMPLES ONLY.** After electrophoresis perform amido black staining through to the completed gel then perform the coomassie staining technique through to the completed gel. The double stain technique may allow clearer visualisation of urine protein bands and oligoclonal bands in CSF.

**INTERPRETATION OF RESULTS**

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

Visually inspect the gel for the presence or absence of particular protein bands:

Figure 1 illustrates the migration patterns of the main plasma proteins which can be identified using the SAS-MX High Resolution Procedure.



3

English

**SAS-MX HIGH RESOLUTION**

High Resolution protein electrophoresis patterns are primarily interpreted by comparing the relative intensities of the bands obtained on unknown samples with those obtained from normal individuals. One of the most common abnormal serum protein patterns is that observed in the non-specific inflammatory response, which is characterized by an increase in  $\alpha$ 1-antitrypsin and haptoglobin with decreased prealbumin, albumin and transferrin. While it is not useful in establishing a general diagnosis, it is useful in monitoring a patient's response to therapy.

Other examples of clinically important variations are:

1. Elevation of the transferrin band, suggesting low levels of iron.
2. Presence of monoclonal proteins, suggesting abnormalities in the immune system.
3. Low haptoglobin, suggesting elevated red cell turnover, or in-vitro haemolysis.
4. CRP presence, indicating an acute inflammatory response.
5. Low prealbumin, albumin and transferrin with diffuse hypergammaglobulinaemia, suggesting chronic inflammation, infection or antigenic stimulation.
6. Low C3 on fresh samples, suggesting complement consumption.

High Resolution protein electrophoresis is an excellent analytical tool to gain a broad overview of urine proteins<sup>3,10</sup>. Normal urine normally contains a trace of albumin, and sometimes a faint transferrin band. Glomerular-type proteinuria usually consists of strong bands of albumin, both  $\alpha$ 1-acid glycoprotein and  $\alpha$ 1-antitrypsin in a broad  $\alpha$ 1 zone and transferrin in the  $\beta$ 1 region. The serum pattern shows decreases in these proteins, with increases in the proteins retained by the glomerulus. The urine pattern in Tubular proteinuria usually consists of a faint albumin band, a double band in the  $\alpha$ 2 region due to  $\alpha$ 2-microglobulin, a strong band in the mid-beta region due to  $\beta$ 2-microglobulin and sometimes diffuse background staining in the gamma region due to free light chains. Chronic renal disease, or renal failure can lead to a mixed type pattern, caused by damage to both the tubules and glomerulus.

An elevation or decrease in particular sample components or the detection of unusual sample components require further investigation. The completed SAS-MX High Resolution gel is stable for an indefinite period of time.

**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 Approach for Electrophoretic Analysis of Colloidal Mixtures', Trans. Faraday Soc., 1937; 33 : 524.
3. Laurell, C.B. 'Composition and Variation of the Gel Electrophoretic Fractions of Plasma, Cerebrospinal Fluid and Urine' Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1972; 29 (Suppl. 24) : 71.
4. Killingsworth, L.M. et al. 'Protein Analysis, Deciphering Cerebrospinal Fluid Patterns' Diag. Med., 1980; March/April : 1-7.
5. Killingsworth, L.M. et al. 'Protein Analysis, Finding Clues to Disease in Urine' Diag. Med., 1980; May/June : 69-75.
6. Killingsworth, L.M. 'Clinical Applications of Protein Determinations in Biological Fluids Other Than Blood' Clin. Chem., 1982; 28(5) : 1093-1102.
7. Ritzmann, S.E and Daniels, J.C. 'Diagnostic Proteinology: Separation and Characterization of Proteins. Qualitative and Quantitative Assays' in Laboratory Medicine, Harper & Row, Inc., Hagerstown, 1979.
8. Killingsworth, L.M. et al. 'Protein Analysis' Diag. Med., 1980; Jan/Feb : 3-15.

9. Killingsworth, L.M. 'Plasma Protein Patterns in Health and Disease' CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, August 1979.
10. Peterson, P.A., Ervin, P.E. and Beggard, I. 'Differentiation of Glomerular, Tubular and Normal Proteinuria: determination of Urinary Excretion of  $\alpha$ 2-microglobulin, Albumin and Total Protein' J. Clin. Invest., 1969; 48 : 1189-1198.

**UTILISATION**

Le kit SAS-MX Haute résolution est destiné à la séparation des protéines du sérum ou du plasma 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 pathologiques.

Depuis l'introduction par Tiselius<sup>2</sup> de la mobilité électrophorétique, les protéines sériques sont fractionnées en fonction de leur charge à un pH déterminé.

Le kit SAS-MX Haute résolution sépare les protéines sériques au-delà des 5 bandes classiques en 10 à 15 fractions différentes, ce qui augmente l'utilité diagnostique des protéinogrammes<sup>3,5</sup>. Quinze protéines sériques ont été largement étudiées du fait de la facilité de leur dosage.

Le kit SAS-MX Haute résolution sépare les protéines du sérum/plasma en fonction de leur charge en gel d'agarose tamponné.

Les protéines sont ensuite fixées et colorées afin de permettre leur visualisation et une interprétation qualitative.

**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 Haute résolution**

Contient de l'agarose dans un tampon barbital additionné de thimérol et d'azide de sodium comme conservateurs. Le gel est prêt à l'emploi.

**2. Tampon concentré Tris / Barbital**

Contient un tampon Tris / Barbital concentré additionné d'azide de sodium comme conservateur. Diluer le contenu du flacon dans 1 litre d'eau distillée et bien mélanger.

**3. Colorant concentré Haute résolution**

Contient du colorant concentré Haute résolution en solution dans un mélange contenant 5 volumes de méthanol, 5 volumes d'eau et 1 volume d'acide acétique glacial. Diluer le contenu du flacon dans 700ml de solution décolorante.

**4. Autres composants du kit**

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

**STOCKAGE ET CONSERVATION****1. Plaque SAS-MX Haute résolution**

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 HAUTE RÉOLUTION****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 Haute résolution**

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. 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. 3039 Élément réfrigérant (Cooling Device)

Réf. 5141 Marqueur protéique haute résolution

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

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

Eau distillée

**PRÉLÈVEMENTS DES ÉCHANTILLONS**

L'utilisation de sérum ou plasma fraîchement prélevé est fortement recommandée. Les échantillons peuvent être conservés bouchés 48 heures entre 2...6°C. L'utilisation de plasma laisse apparaître une bande de fibrinogène entre les fractions bêta et gamma. L'utilisation d'échantillons anciens peut entraîner l'apparition d'une bande C3 qui migre dans la zone de la transferrine. Les échantillons sériques et plasmatiques doivent être dilués au 1/2 avec du tampon (1 volume d'échantillon + 1 volume de tampon).

Les échantillons d'urine ou de LCR peuvent être utilisés après concentration préalable:

Protéines totales (g/l)	Facteur de concentration
<0,5	100 x
0,5 -1,0	50 x
1,0 -3,0	25 x
3,0 -6,0	10 x
6,0 -10,0	5 x

Après concentration, utiliser les concentrats directement sur le gel.

**MÉTHODOLOGIE**

**REMARQUE:** S'assurer que l'élément réfrigérant (Cooling Device) a été réfrigéré entre 2...6°C pendant au moins 60 minutes avant de l'utiliser.

- 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 2µl d'échantillon sur chaque fente et laisser absorber 5 minutes. (Si vous voulez obtenir des bandes plus foncées, il est possible de déposer 4µl d'échantillon)
- Pendant ce temps, verser 150ml de tampon dans chaque compartiment extérieur de la chambre de migration SAS-MX. Placer l'élément réfrigérant dans la partie centrale de la chambre de migration et humidifier la surface de celui-ci à l'aide de quelques gouttes de tampon.
- 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.
- Déposer le gel, agarose vers le haut, sur la surface de l'élément réfrigérant, en respectant les polarités. Veiller à ce qu'il n'y ait pas de bulles d'air sous le gel.
- Préparer les ponts de papier en joignant 3 ponts de papier fins pour chaque côté. Immerger chaque groupe de ponts de papier dans le tampon de migration, éliminer l'excès de tampon et placer ceux-ci sur le bord du gel, parallèlement à l'élément réfrigérant. S'assurer qu'une extrémité du pont trempe dans le tampon de migration et appuyer légèrement sur l'autre avec le doigt afin d'optimiser le contact avec le gel.
- Faire migrer à 250 volts pendant 25 minutes.
- Une fois l'électrophorèse terminée, plonger le gel dans le colorant pendant 15 minutes.
- Décolorer le gel dans un bain de solution décolorante pendant 30 secondes.
- Sécher le gel entre 60...70°C.
- Décolorer le gel dans 2 bains successifs de 30 secondes de solution décolorante.
- Sécher le gel.

**TECHNIQUES ALTERNATIVES DE COLORATION**

Deux techniques alternatives de coloration sont possibles suivant la coloration requise par l'opérateur.

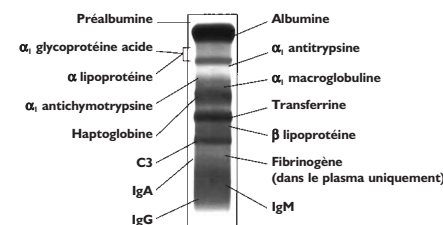
- Substituer le colorant Haute résolution par du colorant noir amido (réf. 3048). **UNIQUEMENT POUR LE SÉRUM OU LE PLASMA.** Ne pas diluer les échantillons avant l'électrophorèse et suivre la procédure de coloration indiquée auparavant. Le noir amido est moins sensible que le bleu de Coomassie, mais il donne une coloration plus uniforme, ce qui permet d'obtenir une meilleure évaluation qualitative des différentes intensités de bandes.
- Technique de double coloration. **UNIQUEMENT POUR L'URINE ET LE LCR.** Après l'étape d'électrophorèse, réaliser le processus complet de coloration du gel d'abord au noir amido puis au bleu de Coomassie. La double coloration permet une visualisation plus claire du protéinogramme urinaire et des bandes oligoclonales dans le LCR.

**SAS-MX HAUTE RÉOLUTION****INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS**

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

Une inspection visuelle permet de déterminer si les bandes d'une protéine spécifique sont présentes ou non:

La figure 1 illustre la migration des principales protéines plasmatiques qui peuvent être identifiées par la technique SAS-MX Haute résolution.



Les migrations électrophorétiques Haute résolution sont d'abord interprétées en comparant l'intensité relative des bandes des échantillons analysés avec celle d'un échantillon normal de référence. Chez un patient ayant une réaction inflammatoire non spécifique, le protéinogramme sérique se caractérise le plus couramment par une augmentation de l'alpha-1-antitrypsine et de l'haptoglobine avec une diminution de la préalbumine, de l'albumine et de la transferrine par rapport aux valeurs normales. Cependant, même s'il ne sert pas à établir un diagnostic, il est utile pour suivre la réponse d'un patient à une thérapie.

Autres exemples de variations cliniques importantes:

- Élévation de la bande de transferrine, suggérant un faible taux de fer.
- Présence de bande monoclonale, suggérant une anomalie dans le système immunitaire.
- Diminution de l'haptoglobine, suggérant un renouvellement élevé des globules rouges ou une hémolyse in-vitro.
- Présence de CRP, indiquant une réponse inflammatoire aiguë.
- Diminution de la préalbumine, de l'albumine et de la transferrine avec une hypergammaglobulinémie diffuse, suggérant une inflammation chronique, une infection ou une stimulation antigénique.
- Diminution du C3 dans un échantillon frais, indiquant une consommation du complément.

L'électrophorèse Haute résolution est un excellent outil analytique pour observer les protéines urinaires<sup>10</sup>. Une urine normale contient généralement des traces d'albumine et parfois une faible bande de transferrine. Une protéinurie de type glomérulaire révèle la présence d'une forte bande d'albumine, avec de l'alpha-1-glycoprotéine acide et de l'alpha-1-antitrypsine dans la zone alpha-1 et de la transferrine dans la zone bêta-1. Le protéinogramme sérique indique une diminution de ces mêmes protéines avec une augmentation des protéines retenues par le glomérule. Une tubulopathie se caractérise en général par une faible bande d'albumine, une bande double dans la zone alpha-2 due à l'alpha-2-microglobuline, une forte bande dans la zone médiane bêta due à la bêta-2-microglobuline avec parfois une coloration diffuse dans les gamma due aux chaînes légères libres. Une atteinte rénale chronique ou une insuffisance rénale donne lieu à un mélange des deux types précédents à cause des lésions des tubules et des glomérules.

Une élévation ou une diminution d'un composant particulier ou la détection d'une protéine inhabituelle doit conduire à d'autres investigations. Après traitement, le gel SAS-MX Haute résolution est stable indéfiniment.

#### 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 Approach for Electrophoretic Analysis of Colloidal Mixtures', Trans. Faraday Soc., 1937 ; 33 : 524.
3. Laurell, C.B. 'Composition and Variation of the Gel Electrophoretic Fractions of Plasma, Cerebrospinal Fluid and Urine' Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1972 ; 29 (suppl. 24) : 71.
4. Killingsworth, L.M. et al. 'Protein Analysis, Deciphering Cerebrospinal Fluid Patterns' Diag. Med., 1980; mars/avril : 1-7.
5. Killingsworth, L.M. et al. 'Protein Analysis, Finding Clues to Disease in Urine' Diag. Med., 1980 ; mai/juin : 69-75.
6. Killingsworth, L.M. 'Clinical Applications of Protein Determinations in Biological Fluids Other Than Blood' Clin. Chem., 1982 ; 28(5) : 1093-1102.
7. Ritzmann, S.E et Daniels, J.C. 'Diagnostic Proteinology: Separation and Characterization of Proteins. Qualitative and Quantitative Assays' in Laboratory Medicine, Harper & Row, Inc., Hagerstown, 1979.
8. Killingsworth, L.M. et al. 'Protein Analysis' Diag. Med., 1980; jan/fév : 3-15.
9. Killingsworth, L.M. 'Plasma Protein Patterns in Health and Disease' CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, août 1979.
10. Peterson, P.A., Ervin, P.E. et Beggard, I. 'Differentiation of Glomerular, Tubular and Normal Proteinuria: determination of Urinary Excretion of ?2-microglobulin, Albumin and Total Protein' J. Clin. Invest., 1969; 48 : 1189-1198.

## SAS-MX HIGH RESOLUTION

### ANWENDUNGSBEREICH

Der SAS-MX High Resolution Kit ist zur Auftrennung von Serum- oder Plasmaproteinen durch Agarose-Gel-Elektrophorese bestimmt.

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

Seit der Einführung der Kapillarelektrophorese durch Tiselius<sup>2</sup> und die darauf folgende Nutzung der Zonenelektrophorese sind Serumproteine aufgrund ihrer elektrischen Ladung bei einem bestimmten pH-Wert fraktioniert worden.

Das SAS-MX High Resolution Kit trennt Serum-Proteine über das klassische 5-Bandenmuster in 10-15 einzelne Fraktionen auf und erhöht damit den diagnostischen Nutzen der Proteinstreifen<sup>3,5</sup>. Ungefähr 15 Serumproteine sind ausführlich untersucht worden, weil sie leicht gemessen werden können.

Das SAS-MX High Resolution Kit trennt in einem gepufferten Agarose-Gel die Serum-/Plasmaproteine nach ihrer Ladung auf.

Die Proteinbanden werden dann fixiert und zur Visualisierung und qualitativen Interpretation angefärbt.

### 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 High Resolution Gel

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

#### 2. Tris-Barbital-Pufferkonzentrat

Enthält konzentrierten Tris-Barbital-Puffer mit Natriumazid als Konservierungsmittel. Den Inhalt der Flasche mit dest. Wasser auf 1 Liter verdünnen. Gut schütteln.

#### 3. High Resolution Farbstoffkonzentrat

Enthält konzentrierten High-Resolution Farbstoff in einer Aufbereitung mit 5 Teilen Methanol : 5 Teile Wasser : 1 Teil Eisessig. Den Inhalt der Flasche auf 700ml mit Entfärbelösung verdünnen.

#### 4. Weitere Kit-Komponenten

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

### LAGERUNG UND STABILITÄT

#### 1. SAS-MX High Resolution 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. High Resolution Färbung**

Das Farbstoffkonzentrat sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Der verdünnte Farbstoff ist bei einer Temperatur zwischen 15...30°C für 6 Monate stabil. Schlechte Färbeleistung kann auf den Verfall der Färbelösung hinweisen.

**NICHT MITGELIEFERTES, ABER BENÖTIGTES MATERIAL**

Kat. Nr. 4063 SAS-MX Kammer

Kat. Nr. 1525 EPS600 Netzteil

Kat. Nr. 3039 Kühlplatte für Kammer

Kat. Nr. 5141 High Resolution Protein-Marker

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

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

In einer fest verschlossenen Flasche aufbewahren.

Dest. Wasser

**PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG**

Frisches Serum oder Plasma ist das Untersuchungsmaterial der Wahl. Proben können abgedeckt maximal 48 Stunden bei 2...6°C gelagert werden. Bei der Verwendung von Plasma entsteht zwischen der Beta- und Gammafraktion eine Fibrinogen-Bande. Altes Probenmaterial lässt die C3-Bande in den Bereich des Transferrins wandern. Serum- und Plasmaproben sollten 1+1 mit Puffer verdünnt werden. (1 Teil Probe + 1 Teil Puffer). Urin und Liquor können nach entsprechender Konzentrierung als Proben eingesetzt werden:

Gesamt-Protein (g/L)	Konzentrierungsfaktor
<0,5	100-fach
0,5 -1,0	50-fach
1,0 -3,0	25-fach
3,0 -6,0	10-fach
6,0 -10,0	5-fach

Nach Konzentrierung sollten die Urin- und Liquorproben direkt auf das Gel aufgetragen werden.

**SAS-MX HIGH RESOLUTION****SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE**

**BITTE BEACHTEN:** Sicherstellen, dass das Kühlelement der Kammer für mindestens 60 Minuten vor Gebrauch bei 2...6°C gelagert wurde.

- Das Gel aus der Verpackung nehmen und auf ein Papiertuch legen. Die Geloberfläche mit einem Blotter C blotten und Blotter C verwerfen.
- 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.
- 2µl Probe in die jeweiligen Schablonenschlitze pipettieren. Probe für 5 Minuten ins Gel diffundieren lassen. (Es kann auch 4µl Probe aufgetragen werden, sollten dunklere Banden erzielt werden.)
- Während die Probe einwirkt, 150ml Puffer in jeden der äußeren Bereiche der SAS-MX-Kammer füllen. Den Kühlblock in den mittleren Teil der Kammer legen und die Oberfläche mit einigen Tropfen Puffer benetzen.
- Nach Absorption der Probe den Blotter A aus Schritt 2 auf die Schablone drücken. Anschließend Schablone und Blotter entfernen.
- Das Gel mit der Agaroseseite nach oben auf den Kühlblock legen und auf übereinstimmende Polarisierung achten (Pluszeichen auf dem Gel und Pluszeichen in der Kammer). Unter dem Gel eingeschlossene Luftblasen unbedingt vermeiden.
- Für jede Seite des Gels einen Elektrodentstreifen vorbereiten, indem 3 Streifen in 2 Sets zusammengelegt werden, damit 2 dicke Streifen entstehen. Jeden Streifen in Puffer eintauchen, sanft den überschüssigen Puffer ausdrücken und jeden Streifen an den Rand des Gels, parallel zum Rand des Kühlblocks anbringen. Sicherstellen, dass ein Teil des Streifens in der Pufferlösung eintaucht. Mit dem Finger über den Streifen auf dem Gel fahren, um einen guten Kontakt zu gewährleisten.
- Gel-Elektrophorese durchführen: 250 Volt, 25 Minuten.
- nach der Elektrophorese das Gel 15 Minuten in die Färbelösung tauchen.
- Das Gel 30 Sekunden in Entfärbelösung entfärben.
- Das Gel bei 60...70°C trocknen.
- Das Gel in zwei jeweils 30 Sekunden dauernden Waschvorgängen mit Entfärbelösung entfärben.
- Gel trocknen.

**ALTERNATIVE FÄRBE-METHODEN**

Zwei alternative Färbemethoden sind je nach gewünschtem Färbebedarf des Anwenders möglich.

- „Amido Schwarz“ Farbstoff (Kat. Nr. 3048) für die High Resolution Färbung. NUR FÜR SERUM ODER PLASMA: Die Probe vor der Elektrophorese nicht verdünnen. Nach der oben gegebenen Färbearbeitung färben. Der „Amido Schwarz“ Farbstoff ist weniger empfindlich als der Coomassie-Farbstoff, liefert aber eine gleichmäßigere Färbequalität und gestattet damit eine bessere qualitative Auswertung von Unterschieden in der Bandenintensität.
- Zweifach Färbemethode NUR FÜR LIQUOR UND URINPROBEN Nach der Elektrophorese das fertige Gel mit „Amido Schwarz“ färben, anschließend die Färbung mit Coomassie durchführen. Die zweifache Färbetechnik gestattet eine deutlichere Visualisierung der Proteinbanden im Urin und der Oligoklonal-Banden im Liquor.

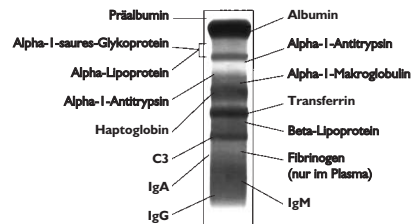


**SAS-MX HIGH RESOLUTION****AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE**

Es wird empfohlen, die Auswertung des Gels gegen Standard-Proteine vorzunehmen, die für diese Methode in dem entsprechenden Labor ermittelt worden sind.

Das Gel optisch auf An- oder Abwesenheit von bestimmten Proteinbanden ansuchen:

Abbildung 1 zeigt die Migrationsmuster der Haupt-Plasmaproteine, die mit der SAS-MX High Resolution Methode differenziert werden können.



Die Proteinmuster der High Resolution Elektrophorese werden in erster Linie durch Vergleich zwischen der relativen Intensität der Banden in der unbekanntenen Probe und derjenigen von normalen Probanden interpretiert. Eine der häufigsten pathologischen Serumproteinmuster ist das der unspezifischen Entzündungsreaktion, die durch einen Anstieg von Alpha-1-Antitrypsin und Haptoglobin bei gleichzeitiger Abnahme von Prälbumin, Albumin und Transferrin charakterisiert ist. Obwohl das für eine allgemeine Diagnosestellung nicht besonders hilfreich ist, so erweist es doch beim Patienten-Monitoring auf eine Therapiereaktion nützlich.

Andere Beispiele wichtiger klinischer Veränderungen sind:

1. Erhöhung der Transferrin-Bande, die auf niedrige Eisenwerte hinweist.
2. Anwesenheit monoklonaler Proteine, die auf Anomalien des Immunsystems hinweisen.
3. Niedriges Haptoglobin weist auf einen erhöhten Erythrozytenumsatz oder in-vitro Hämolyse hin.
4. Die Anwesenheit von CRP weist auf eine akute Entzündungsreaktion hin.
5. Niedriges Prälbumin, Albumin und Transferrin mit diffuser Hypergammaglobulinämie weist auf eine chronische Entzündung, Infektion oder Antigenstimulation hin.
6. Niedriges C3 in frischen Proben weist auf Komplementverbrauch hin.

Die High Resolution Protein-Elektrophorese ist ein ausgezeichnetes Hilfsmittel, um einen umfassenden Überblick über Proteine im Urin zu bekommen<sup>3,10</sup>. Normaler Urin enthält für gewöhnlich eine Spur Albumin und manchmal eine schwache Transferrin-Bande. Glomeruläre Proteinurie besteht gewöhnlich aus starken Albuminbanden, sowohl Alpha-1-saures-Glykoprotein wie auch Alpha-1-Antitrypsin in einem breiten Alpha-1-Bereich und Transferrin in der Alpha-1-Region. Das Serum-Muster zeigt eine Abnahme dieser Proteine mit einer Zunahme der Proteine, die vom Glomerulum zurückgehalten wurden. Das Urinprotein-Muster in der tubulären Proteinurie besteht gewöhnlich aus einer schwachen Albuminbande, einer sich aus dem Alpha-2-Mikroglobulin ergebenden Doppelbande in der Alpha-2-Region, einer sich aus dem Alpha-2-Mikroglobulin ergebenden starken Bande in der

mittleren Beta-Region und manchmal einer diffusen Hintergrundfärbung in der Gamma-Region auf Grund freier Leichtketten. Chronische Nierenerkrankungen oder Nierenversagen können durch Schädigung sowohl des Tubulus wie auch des Glomerulums zu einem Mischtyp-Bandenmuster kommen.

Erhöhung oder Abnahme von bestimmten Probenbestandteilen oder der Nachweis ungewöhnlicher Probenbestandteile machen weitere Untersuchungen notwendig. Das fertige SAS-MX High Resolution Gel ist unbegrenzt stabil.

**LITERATUR**

1. Alper, C.A. 'Plasma Protein Measurements as a Diagnostic Aid', N. Eng. J. Med., 1974; 291 : 287-290.
2. Tiselius, A. 'A New Approach for Electrophoretic Analysis of Colloidal Mixtures', Trans. Faraday Soc., 1937; 33 : 524.
3. Laurell, C.B. 'Composition and Variation of the Gel Electrophoretic Fractions of Plasma, Cerebrospinal Fluid and Urine' Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1972; 29 (Suppl. 24) : 71.
4. Killingsworth, L.M. et al. 'Protein Analysis, Deciphering Cerebrospinal Fluid Patterns' Diag. Med., 1980; March/April : 1-7.
5. Killingsworth, L.M. et al. 'Protein Analysis, Finding Clues to Disease in Urine' Diag. Med., 1980; May/June : 69-75.
6. Killingsworth, L.M. 'Clinical Applications of Protein Determinations in Biological Fluids Other Than Blood' Clin. Chem., 1982; 28(5) : 1093-1102.
7. Ritzmann, S.E and Daniels, J.C. 'Diagnostic Proteinology: Separation and Characterization of Proteins. Qualitative and Quantitative Assays' in Laboratory Medicine, Harper & Row, Inc., Hagerstown, 1979.
8. Killingsworth, L.M. et al. 'Protein Analysis' Diag. Med., 1980; Jan/Feb : 3-15.
9. Killingsworth, L.M. 'Plasma Protein Patterns in Health and Disease' CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, August 1979.
10. Peterson, P.A., Ervin, P.E. and Beggard, I. 'Differentiation of Glomerular, Tubular and Normal Proteinuria: determination of Urinary Excretion of  $\alpha_2$ -microglobulin, Albumin and Total Protein' J. Clin. Invest., 1969; 48 : 1189-1198.

**PRINCIPIO**

Il kit ad alta risoluzione SAS-MX è formulato per la separazione delle proteine sieriche o plasmatiche 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 corso<sup>1</sup>. Dall'invenzione dell'elettroforesi a fronte mobile ad opera di Tiselius<sup>2</sup>, 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 ad alta risoluzione SAS-MX separa le proteine sieriche oltre il pattern classico a 5 bande in 10-15 frazioni distinte, incrementando pertanto l'utilità diagnostica dei pattern proteici<sup>3,4</sup>. Sono state ampiamente studiate circa 15 proteine sieriche, in quanto possono essere misurate facilmente<sup>4,5</sup>.

Il kit ad alta risoluzione SAS-MX separa le proteine sieriche / plasmatiche secondo la loro carica elettrica in un gel di agarosio tamponato.

Le bande proteiche vengono quindi fissate e colorate per consentirne la visualizzazione e l'interpretazione qualitativa.

**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. Per le indicazioni relative ai rischi e alla sicurezza e le informazioni sullo smaltimento, fare riferimento alle schede tecniche dei prodotti.

**COMPOSIZIONE****1. Gel ad alta risoluzione SAS-MX**

Contiene agarosio in tampone barbital con timerosal e sodio azide come conservanti. Il gel è pronto all'uso nella confezione fornita.

**2. Tampone concentrato tris / barbital**

Contiene tampone concentrato tris / barbital con l'aggiunta di sodio azide come conservante. Diluire l'intero contenuto del flacone ad 1 litro con acqua distillata e miscelare bene.

**3. Colorante concentrato ad alta risoluzione**

Contiene colorante concentrato ad alta risoluzione in una soluzione contenente 5 parti di metanolo : 5 parti di acqua : 1 parte di acido acetico glaciale. Diluire l'intero contenuto del flacone a 700ml con soluzione decolorante.

**4. Altri componenti del kit**

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

**SAS-MX AD ALTA RISOLUZIONE****CONSERVAZIONE E STABILITÀ****1. Gel ad alta risoluzione 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 ed è stabile fino a data di scadenza riportata sull'etichetta. 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 ad alta risoluzione**

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. Risultati insoddisfacenti della colorazione possono indicare un deterioramento della soluzione colorante.

**MATERIALI NECESSARI, MA NON IN DOTAZIONE**

Cod. N. 4063 Camera SAS-MX

Cod. N. 1525 Alimentatore EPS600

Cod. N. 3039 Dispositivo di raffreddamento camera

Cod. N. 5141 Marker proteico ad alta risoluzione

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

Soluzione decolorante: Mescolare 500ml di metanolo e 500ml di acqua distillata. Aggiungere 100ml di acido acetico glaciale. Conservare in una bottiglia tappata ermeticamente.

Acqua distillata

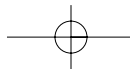
**RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE**

Il campione ideale è costituito da plasma o siero fresco. I campioni possono essere conservati coperti per un massimo di 48 ore a 2...6°C. L'utilizzo del plasma può portare alla comparsa del fibrinogeno tra la frazione beta e la frazione gamma. L'utilizzo di campioni vecchi fa sì che la banda C3 migri nella regione della transferrina. I campioni di siero e plasma devono essere diluiti 1:1 con tampone (1 parte di campione + 1 parte di tampone).

Si possono utilizzare campioni di urine e CSF previa opportuna concentrazione:

Proteina totale (g/L)	Fattore di concentrazione
<0,5	100 x
0,5 - 1,0	50 x
1,0 - 3,0	25 x
3,0 - 6,0	10 x
6,0 - 10,0	5 x

Dopo averli concentrati, applicare i campioni di urina e CSF direttamente sul gel.



## SAS-MX AD ALTA RISOLUZIONE

### PROCEDURA

**NOTA:** Assicurarsi che il dispositivo di raffreddamento della camera sia stato conservato a 2...6°C per almeno 60 minuti prima dell'uso.

1. Rimuovere il gel dalla confezione e collocarlo su una bibula. Asciugare la superficie del gel con un blotter C ed eliminare il blotter.
2. Allineare la mascherina per l'applicazione del campione rispetto alle frecce presenti sul bordo 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 2µl di campione in ogni fessura di semina e lasciare assorbire per 5 minuti. (Se si preferiscono bande più scure, è possibile applicare un campione di 4µl).
4. Durante l'assorbimento dei campioni, collocare 150ml di tampone in ogni compartimento esterno della camera SAS-MX. Sistemare il dispositivo di raffreddamento nel pozzetto centrale della camera e bagnare la superficie con alcune gocce di tampone.
5. Dopo l'assorbimento del campione, asciugare leggermente la mascherina con il blotter A, conservato dal passaggio 2, quindi eliminare mascherina e blotter.
6. Collocare il gel sulla parte superiore del dispositivo di raffreddamento con l'agarosio rivolto verso l'alto, allineando i lati positivo (+) e negativo (-) rispetto alle posizioni corrispondenti sulla camera. Prestare attenzione ad evitare di intrappolare bolle d'aria sotto il gel.
7. Preparare uno stoppino per ogni lato del gel, collocando 3 stoppini insieme in 2 serie, per ottenere 2 stoppini spessi. Immergere ogni stoppino nel tampone, spremere delicatamente per fare fuoriuscire il tampone in eccesso e fissare ogni stoppino al bordo del gel, parallelamente al bordo del dispositivo di raffreddamento. Assicurarsi che un bordo dello stoppino sia immerso nel tampone e strofinare un dito sulla parte dello stoppino presente sul gel, per garantire un contatto ottimale.
8. Sottoporre il gel ad elettroforesi: 250 Volt per 25 minuti.
9. Al termine dell'elettroforesi, immergere il gel in soluzione colorante per 15 minuti.
10. Decolorare il gel in soluzione decolorante per 30 secondi.
11. Asciugare il gel a 60...70°C.
12. Decolorare il gel in 2 lavaggi di 30 secondi nella soluzione decolorante.
13. Asciugare il gel.

### PROCEDURE DI COLORAZIONE ALTERNATIVE

Sono disponibili due protocolli di colorazione alternativi a seconda della colorazione richiesta dall'utilizzatore.

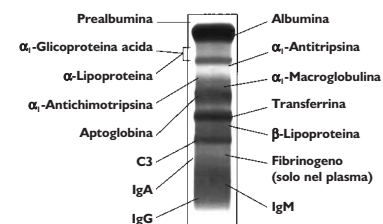
1. Colorante Amido nero sostitutivo (Cod. N. 3048) per il colorante ad alta risoluzione. SOLO PER CAMPIONI SERICI O PLASMATICI. Non diluire il campione prima dell'elettroforesi e seguire il protocollo di colorazione precedentemente illustrato. Il colorante Amido nero è meno sensibile del colorante di Coomassie, ma fornisce una qualità di colorazione più uniforme, consentendo una migliore valutazione qualitativa delle differenze in termini di intensità delle bande.
2. Tecnica a doppia colorazione. SOLO PER CAMPIONI DI CSF E URINE. In seguito ad elettroforesi, eseguire la colorazione con colorante Amido nero sul gel ottenuto e quindi applicare la tecnica di colorazione con colorante di Coomassie sul gel ottenuto. La tecnica a doppia colorazione può consentire una più chiara visualizzazione delle bande proteiche nelle urine e delle bande oligoclonali nel CSF.

### INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Si consiglia ad ogni singolo laboratorio di effettuare la valutazione del gel rispetto ai pattern normali generati per questo metodo.

Ispezionare il gel visivamente per accertare la presenza o assenza di bande proteiche di particolare interesse:

La figura 1 illustra i pattern di migrazione delle principali proteine plasmatiche, che possono essere identificate utilizzando la procedura ad alta risoluzione SAS-MX.

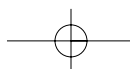


I pattern di elettroforesi proteica ad alta risoluzione vengono interpretati principalmente confrontando le intensità relative delle bande ottenute su campioni sconosciuti con quelle ottenute da individui normali. Uno dei pattern proteici del siero anomali più diffusi è quello osservato nella risposta infiammatoria aspecifica, caratterizzata da un aumento dell' $\alpha$ 1-antitripsina e dell'aptoglobina e da una riduzione di prealbumina, albumina e transferrina. Se non è di alcuna utilità nel definire una diagnosi generale, è però utile nel monitorare la risposta di un paziente alla terapia.

Altri esempi di variazioni clinicamente importanti sono:

1. Innalzamento della banda di transferrina, ad indicare bassi livelli di ferro.
2. Presenza di proteine monoclonali, ad indicare anomalie nel sistema immunitario.
3. Bassi livelli di aptoglobina, ad indicare un elevato ricambio di eritrociti o emolisi in vitro.
4. Presenza di CRP, ad indicare una risposta infiammatoria acuta.
5. Bassi livelli di prealbumina, albumina e transferrina con ipergammaglobulinemia diffusa, ad indicare infiammazione cronica, infezione o stimolazione antigenica.
6. Basso livello di C3 in campioni freschi, ad indicare un consumo di complemento.

L'elettroforesi proteica ad alta risoluzione è un ottimo strumento analitico per ottenere una vasta panoramica delle proteine presenti nelle urine<sup>310</sup>. Le urine normali contengono solitamente tracce di albumina e talvolta una debole banda di transferrina. La proteinuria di tipo glomerulare consiste generalmente in bande fortemente evidenti di albumina, presenza in un'ampia zona  $\alpha$ 1 sia di  $\alpha$ 1-glicoproteina acida che di  $\alpha$ 1-antitripsina, e di transferrina nella regione  $\beta$ 1. Il pattern del siero mostra una diminuzione di queste proteine, con un aumento delle proteine trattenute dal glomerulo. Il pattern dell'urina nella proteinuria tubulare consiste invece in una debole banda di albumina, una doppia banda nella regione  $\alpha$ 2 dovuta alla  $\alpha$ 2-microglobulina, in una forte banda nella regione beta mediana dovuta alla  $\beta$ 2-microglobulina ed a volte da una diffusa colorazione di fondo nella regione



gamma dovuta a catene leggere libere. La malattia renale cronica, o insufficienza renale, può portare ad un pattern di tipo misto, causato da danni sia ai tubuli che al glomerulo.

Un aumento o diminuzione di particolari componenti del campione, oppure la presenza di componenti insolite del campione richiedono un'ulteriore indagine. Il gel ad alta risoluzione SAS-MX ottenuto è stabile per un periodo di tempo indeterminato.

#### 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 Approach for Electrophoretic Analysis of Colloidal Mixtures', Trans. Faraday Soc., 1937; 33 : 524.
3. Laurell, C.B. 'Composition and Variation of the Gel Electrophoretic Fractions of Plasma, Cerebrospinal Fluid and Urine' Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1972; 29 (Suppl. 24) : 71.
4. Killingsworth, L.M. et al. 'Protein Analysis, Deciphering Cerebrospinal Fluid Patterns' Diag. Med., 1980; March/April : 1-7.
5. Killingsworth, L.M. et al. 'Protein Analysis, Finding Clues to Disease in Urine' Diag. Med., 1980; May/June : 69-75.
6. Killingsworth, L.M. 'Clinical Applications of Protein Determinations in Biological Fluids Other Than Blood' Clin. Chem., 1982; 28(5) : 1093-1102.
7. Ritzmann, S.E. and Daniels, J.C. 'Diagnostic Proteinology: Separation and Characterization of Proteins. Qualitative and Quantitative Assays' in Laboratory Medicine, Harper & Row, Inc., Hagerstown, 1979.
8. Killingsworth, L.M. et al. 'Protein Analysis' Diag. Med., 1980; Jan/Feb : 3-15.
9. Killingsworth, L.M. 'Plasma Protein Patterns in Health and Disease' CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, August 1979.
10. Peterson, P.A., Ervin, P.E. and Beggard, I. 'Differentiation of Glomerular, Tubular and Normal Proteinuria: determination of Urinary Excretion of  $\alpha$ 2-microglobulin, Albumin and Total Protein' J Clin. Invest., 1969; 48 : 1189-1198.

## ALTA RESOLUCIÓN SAS-MX

#### USO PREVISTO

El objetivo del kit de alta resolución SAS-MX es la separación de las proteínas del suero o plasma mediante la electroforesis con gel de agarosa.

El suero contiene más de 100 proteínas individuales, cada una de ellas con una serie de funciones específicas que están sujetas a variaciones en su concentración bajo diferentes condiciones patológicas<sup>1</sup>. Desde que Tiselius<sup>2</sup> introdujera la electroforesis de límites móviles, y el uso posterior de la electroforesis por zonas, se han fraccionado las proteínas séricas de acuerdo con su carga a un pH determinado.

El kit de alta resolución SAS-MX separa las proteínas séricas más allá del patrón clásico de 5 bandas en 10-15 fracciones discretas, aumentando así la utilidad diagnóstica de los patrones de proteínas<sup>3,5</sup>. Se han estudiado mucho aproximadamente 15 proteínas séricas porque se pueden medir fácilmente<sup>6,9</sup>.

El kit de alta resolución SAS-MX separa las proteínas del suero/plasma según su carga en el gel de agarosa tamponado.

Luego, se fijan y colorean las bandas de proteínas para su visualización e interpretación cualitativa.

#### ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Todos los reactivos están destinados únicamente 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 e información para su eliminación.

#### COMPOSICIÓN

##### 1. Gel de alta resolución SAS-MX

Contiene agarosa en un tampón de barbital con tiomersal y azida de sodio como conservantes. El gel viene envasado listo para usar.

##### 2. Concentrado tampón de Tris / Barbital.

Contiene tampón concentrado de Tris / barbital con azida de sodio como conservante. Disolver el contenido del frasco en 1 litro con agua destilada y mezclar bien.

##### 3. Concentrado colorante de alta resolución.

Contiene colorante de alta resolución concentrado en una solución con 5 partes de metanol: 5 partes de agua: 1 parte de ácido acético cristalizado. Disolver el contenido del vial en 700ml con solución decolorante.

##### 4. Otros componentes del kit

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

**ALMACENAMIENTO Y PERÍODO DE VALIDEZ****1. Gel de alta resolución SAS-MX**

Los geles han de almacenarse a 15...30°C y permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en el envase. NO REFRIGERAR NI CONGELAR. El deterioro del gel puede ser indicado por: 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 ha de almacenarse a 15...30°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del frasco. El concentrado tampón diluido ha de almacenarse a 15...30°C y permanece estable durante 2 meses. La turbiedad o un mal comportamiento del tampón diluido pueden ser indicios de deterioro.

**3. Colorante de Alta Resolución**

El concentrado colorante ha de almacenarse a 15...°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del frasco. El colorante diluido ha de almacenarse a 15...30°C y permanece estable durante 6 meses. La reducción de la capacidad de coloración puede ser señal 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 3039 Dispositivo de enfriamiento de la cámara

Nº de catálogo 5141 Marcador de Proteínas de Alta Resolución

Horno con aire a presión capaz de alcanzar 60...70°C

Solución decolorante: Mezclar 500ml de metanol y 500ml de agua destilada. Añadir 100ml de ácido acético cristalizado. Guardar en un frasco herméticamente cerrado. Agua destilada.

**RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS**

Se ha de elegir como muestra suero o plasma recién recogidos. Las muestras pueden almacenarse tapadas durante un máximo de 48 horas a 2...6°C. El uso de plasma dará como resultado una banda de fibrinógeno entre las fracciones beta y gamma. El uso de muestras deterioradas provocará que la banda C3 migre en la región de la transferrina. Las muestras de suero y plasma deben diluirse 1+1 con concentrado tampón (1 parte de muestra + 1 parte de concentrado tampón).

Se pueden utilizar muestras de orina y LCR tras una fase de concentración adecuada:

Proteína total (g/l)	Factor de concentración
< 0,5	100 x
0,5 -1,0	50 x
1,0 -3,0	25 x
3,0 -6,0	10 x
6,0 -10,0	5 x

Tras la concentración, las muestras de orina y LCR se aplicarán directamente al gel.

**ALTA RESOLUCIÓN SAS-MX****PROCEDIMIENTO PASO A PASO**

**NOTA:** Asegúrese de que el dispositivo de enfriamiento de la cámara ha estado almacenado a 2...6°C durante al menos 60 minutos antes de su uso.

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 2µl de muestra en cada ranura y dejar que absorba durante 5 minutos. (Se pueden aplicar 4µl de muestra si se prefieren bandas más oscuras.)
4. Mientras la muestra es absorbida, verter 150ml del tampón en cada hueco exterior de la cámara SAS-MX. Colocar el dispositivo de enfriamiento en el hueco central de la cámara y humedecer la superficie del dispositivo de enfriamiento con unas gotas de tampón.
5. Finalizada la absorción de la muestra, secar la plantilla con el secante A que se ha conservado del paso 2, retirar el secante y la plantilla.
6. Colocar el gel sobre el dispositivo de enfriamiento, con la agarosa hacia arriba, alineando los lados positivo (+) y negativo (-) con las posiciones correspondientes en la cámara. Tener cuidado de evitar que queden burbujas de aire atrapadas bajo el gel.
7. Preparar una mecha para cada lado del gel, colocando 3 mechas juntas en 2 grupos, para formar 2 mechas gruesas. Sumergir cada mecha en el tampón, escurrir con cuidado el exceso de tampón y sujetar cada mecha al borde del gel, en paralelo con el borde del dispositivo de enfriamiento. Asegurarse de que un borde de la mecha esté sumergido en el tampón y frotar con un dedo sobre la parte de la mecha que está sobre el gel para asegurar un buen contacto.
8. Realizar la electroforesis del gel: 250 voltios, 25 minutos
9. Después de la electroforesis, sumergir el gel en la solución colorante durante 15 minutos.
10. Decolorar el gel en la solución decolorante durante 30 segundos.
11. Secar el gel a 60...70°C.
12. Desteñir el gel en 2 lavados de 30 segundos en solución decolorante.
13. Secar el gel.

**PROCEDIMIENTOS DE TINCIÓN ALTERNATIVOS**

Existen dos protocolos de tinción alternativos, dependiendo de los requisitos de tinción deseados por el usuario.

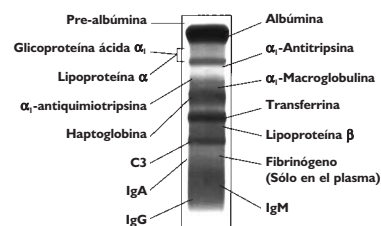
1. Sustituir el colorante Amido Black (no de catálogo 3048) por el colorante de alta resolución. ÚNICAMENTE PARA MUESTRAS DE SUERO O PLASMA. No disolver la muestra antes de la electroforesis y seguir el protocolo de tinción indicado arriba. El colorante amido black (negro amido) es menos sensible que el colorante coomassie, pero proporciona una calidad de tinción más uniforme, permitiendo una mejor evaluación cualitativa de las diferencias en la intensidad de las bandas.
2. Técnica de doble tinción ÚNICAMENTE PARA MUESTRAS DE LCR Y ORINA. Tras la electroforesis, efectuar la coloración con negro amido sobre el gel completado y luego realizar la técnica de tinción coomassie sobre el gel completado. La técnica de doble tinción puede permitir una visualización más clara de las bandas de proteínas en la orina y de las bandas oligoclonales en el LCR.

### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

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

Inspeccionar visualmente el gel para detectar la presencia o ausencia de bandas de proteínas específicas.

La figura 1 muestra los patrones de migración de las principales proteínas del plasma que pueden identificarse utilizando el procedimiento de SAS-MX High-Resolution.



Los patrones de la electroforesis de proteínas de alta resolución se interpretan en primer lugar comparando las intensidades relativas de las bandas obtenidas de muestras desconocidas con aquellas obtenidas de individuos normales. Uno de los patrones de proteínas anormales de suero más frecuente es el que se observa en la respuesta inflamatoria inespecífica, caracterizada por un aumento en la  $\alpha_1$ -antitripsina y la haptoglobina con disminución de la prealbúmina, la albúmina y la transferrina. Aunque no es útil para establecer un diagnóstico general, es útil para monitorizar la respuesta de un paciente al tratamiento.

Otros ejemplos de variaciones clínicamente importantes:

1. Elevación de la banda de transferrina, que sugiere niveles bajos de hierro.
2. Presencia de proteínas monoclonales, que sugieren anomalías en el sistema inmunitario.
3. Baja haptoglobina, que sugiere un recambio elevado de los hematíes, o hemólisis in-vitro.
4. Presencia de PCR, que indica una respuesta inflamatoria aguda.
5. Baja prealbúmina, albúmina y transferrina con hipergammaglobulinemia difusa, que sugiere inflamación crónica, infección o estimulación antigénica.
6. Bajo C3 en muestras recientes, que sugiere consumo de complemento.

La electroforesis de proteínas High Resolution es una excelente herramienta analítica para obtener una amplia visión general de las proteínas de la orina<sup>3,10</sup>. La orina normal suele contener una pequeña cantidad de albúmina, y a veces una débil banda de transferrina. La proteinuria de tipo glomerular está formada normalmente por fuertes bandas de albúmina, de glicoproteína ácida  $\alpha_1$  y  $\alpha_1$ -antitripsina en una amplia zona  $\alpha_1$  y transferrina en la región  $\beta_1$ . El modelo del suero muestra descensos en estas proteínas, con aumentos en las proteínas retenidas por los glomérulos. El modelo de la orina en la proteinuria tubular suele consistir en una débil banda de albúmina, una doble banda en la región  $\alpha_2$  debida a la  $\alpha_2$ -microglobulina, una banda fuerte en la región beta media debida a la

### ALTA RESOLUCIÓN SAS-MX

$\beta_2$ -microglobulina y a veces una coloración difusa de fondo en la región gamma debida a cadenas ligeras sueltas. Las enfermedades renales crónicas o insuficiencia renal pueden dar lugar a un modelo de tipo mixto, causado por los daños en los túbulos y los glomérulos.

Un aumento o descenso en los componentes de una muestra en concreto o la detección de componentes inusuales en las muestras requerirá una investigación posterior. El gel de alta resolución SAS-MX completado permanece estable durante un periodo de tiempo indefinido.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Alper, C.A. 'Plasma Protein Measurements as a Diagnostic Aid', N. Eng. J. Med., 1974; 291 : 287-290.
2. Tiselius, A. 'A New Approach for Electrophoretic Analysis of Colloidal Mixtures', Trans. Faraday Soc., 1937; 33 : 524.
3. Laurell, C.B. 'Composition and Variation of the Gel Electrophoretic Fractions of Plasma, Cerebrospinal Fluid and Urine' Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1972; 29 (Suppl. 24) : 71.
4. Killingsworth, L.M. et alter. 'Protein Analysis, Deciphering Cerebrospinal Fluid Patterns' Diag. Med., 1980; Marzo/Abril : 1-7.
5. Killingsworth, L.M. et alter. 'Protein Analysis, Finding Clues to Disease in Urine' Diag. Med., 1980; Mayo/Junio: 69-75.
6. Killingsworth, L.M. 'Clinical Applications of Protein Determinations in Biological Fluids Other Than Blood' Clin. Chem., 1982; 28(5) : 1093-1102.
7. Ritzmann, S.E y Daniels, J.C. 'Diagnostic Proteinology: Separation and Characterization of Proteins. Qualitative and Quantitative Assays' en Laboratory Medicine, Harper & Row, Inc., Hagerstown, 1979.
8. Killingsworth, L.M. et alter. 'Protein Analysis' Diag. Med., 1980; Ene/Feb: 3-15.
9. Killingsworth, L.M. 'Plasma Protein Patterns in Health and Disease' CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, agosto 1979.
10. Peterson, P.A., Ervin, P.E. y Beggard, I. 'Differentiation of Glomerular, Tubular and Normal Proteinuria: determination of Urinary Excretion of  $\alpha_2$ -microglobulin, Albumin and Total Protein' J. Clin. Invest., 1969; 48 : 1189-1198.