

## Instructions For Use

---

### SAS-I Serum Protein Cat No. 200100

SAS-I Protéines Sériques  
Fiche technique  
Réf. 200100

SAS-I Serumprotein  
Anleitung  
Kat. Nr. 200100

Sieroproteine SAS-I  
Istruzioni per l'uso  
Cod. 200100

Proteínas Séricas SAS-I  
Instrucciones de uso  
No de catálogo 200100

### Contents

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



**INTENDED PURPOSE**

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

Serum contains over 100 individual proteins, each with a specific set of functions which are subject to specific variation in concentration under different pathological 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-I Serum protein kit separates serum proteins into 5 main classes (albumin, alpha 1-globulin, alpha 2-globulin, beta-globulin, and gamma globulin) according to charge in an agarose gel. The proteins are then stained to allow visualisation and quantitative interpretation. Each of the classical electrophoretic zones, with the exception of albumin, normally contains 2 or more components. The relative proportions of these fractions have proven to be useful aids in the diagnosis and prognosis of certain disease states<sup>3,5</sup>.

**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-I Serum Protein Gel**

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

**2. Acid Blue Stain Concentrate**

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

**3. Destain Solution Concentrate**

Dilute the contents of Destain A to 1 litre with purified water. Then add the contents of Destain B and add a further 1 litre of purified water, slowly.

**4. Other Kit Components**

Each kit contains Instructions For Use and sufficient Blotter C to complete 10 gels.

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

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

**2. Acid Blue Stain**

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

### 3. Destain Solution

The destain concentrate should be stored at 15...30°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Diluted destain solution is stable for 6 months at 15...30°C.

#### ITEMS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Cat. No. 210200 Sample Applicator Blades (1 x 10)

Cat. No. 210300 Sample Applicator Blades (5 x 10)

Cat. No. 210100 Disposable sample cups (100)

Cat. No. 3100 REP Prep

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

Purified water

#### SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

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

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

#### STEP-BY-STEP PROCEDURE

1. Pipette 35µl of the sample into the appropriate well of the SAS-I sample tray or disposable sample cups.
  - i) **SAS-I & SAS-I Plus users:** Carefully place the sample tray onto the applicator drawer. Ensure that the tray is pushed firmly down into position.
  - ii) **SAS-3 users:** Carefully locate the sample tray using the sample base locating pins. Ensure that the tray is positioned securely.
2. Remove the gel from the packaging, discard the overlay and:
  - i) **SAS-I users:** place the gel in the SAS-I, agarose side up, aligning the positive and negative sides with the corresponding electrode posts.
  - ii) **SAS-I Plus users:** dispense 400µL of REP Prep onto the heat sink. Place the gel onto the heat sink, agarose side up, aligning the positive and negative sides with the corresponding electrode posts, taking care to avoid air bubbles under the gel.
  - iii) **SAS-3 users:** place the alignment guide onto the pins and dispense 400µL of REP Prep onto the centre of the chamber. Place the gel into the chamber agarose side up, using the guide, align the positive and negative sides with the corresponding electrode posts, taking care to avoid air bubbles under the gel.
3. Blot the surface of the gel with a blotter C, discard the blotter.
4.
  - i) **SAS-I users:** attach the electrodes onto the top side of the electrode posts so that they are in contact with the gel blocks.
  - ii) **SAS-I Plus users:** (as above). Place the cover over the gel and electrodes and press firmly for 5 seconds to ensure contact.
  - iii) **SAS-3 users:** attach the electrodes onto the the electrode posts so that they are in contact with the gel blocks.

5. Place two applicator blade assemblies in position on the instrument, (**SAS-3 users:** slot A and 10).
6. Perform the Serum Protein electrophoresis:
  - i) **SAS-1 users:** 80 volts, 20 mins, one application.
  - ii) **SAS-1 Plus users:** Electrophoresis: 100 volts, 18 mins, 20°C, one application
  - iii) **SAS-3 users:**

Step	Time (mm:ss)	Temperature (°C)	Voltage	Other
Load Sample	00:30	21		Speed 1
Apply Sample	00:30	21		Speed 1*
Electrophoresis	18:00	20	100	
Dry	08:00	54		

- \* Use Location 2

**NOTE:** Remove gel blocks prior to drying.

7. Following electrophoresis:
  - i) **SAS-1 Plus users:** remove the cover,
  - ii) **SAS-1 and SAS-1 Plus users:** remove the electrodes and remove both gel blocks using the Gel Block Remover.
8. Attach the gel to the staining chamber holder.
9. Select the Serum Protein test program on the staining unit and following the prompts, Fix, Stain, Destain and Dry the gel.
  - a) **SAS-2 (Auto-Stainer)**

Step	Solution	Time (mm:ss)	Port	Temperature (°C)
Stain	Acid Blue Stain	10:00	6	
Wash	Purified water	01:00	1	
Dry	—	15:00		65
Destain	Destain solution	03:00	2	
Destain	Destain solution	03:00	2	
Wash	Purified water	01:00	1	
Dry	—	10:00		65

- b) **SAS-4 (Auto-Stainer)**

Step	Time (mm:ss)	Temperature (°C)	Other
Stain	04:00		Recirculate ON
Destain	02:00		Recirculate ON
Destain	02:00		Recirculate ON
Dry	12:00	63	

- c) **Manual**

Follow the sequence listed for the SAS-2 Auto-Stainer, using a staining bath for the Stain, Destain and Wash steps, and a Drying Oven with forced air at 60...70°C for the Dry steps.

10. At the end of the staining cycle, remove the gel from the staining chamber. The gel is now ready for examination.

## QUALITY CONTROL

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

## INTERPRETATION OF RESULTS

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

For a complete review of serum protein evaluation, see Ritzmann, S.E, 1982<sup>5</sup>. Studies show that the values are the same for both males and non-pregnant females. Some differences are seen in pregnant females at term and women on oral contraceptives.

Age has some effect on normal levels. Cord blood has a decreased total protein, albumin, alpha 2 and beta fractions; slightly increased alpha 1 and normal or increased gamma fraction (largely of maternal origin). The gamma globulins drop rapidly until about 3 months of age, while other fractions have reached adult levels by this time. Adult levels of the gamma globulins are not reached until 10-16 years of age. The albumin decreases and beta globulin increases over the age of 40.

### 1. Qualitative Evaluation:

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

### 2. Quantitative Evaluation:

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

In either case, an elevation or decrease in particular serum components or the detection of unusual serum components require further investigation. The completed SAS-1 Serum Protein gel is stable for an indefinite period of time.

## LIMITATIONS

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

## REFERENCE VALUES

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

Protein Fraction	Mean (%)	$\pm$ 2SD Range
Albumin	60.4	55.8 - 65.0
Alpha1	3.4	2.2 - 4.6
Alpha2	10.3	8.2 - 12.5
Beta	10.7	7.2 - 14.2
Gamma	15.0	11.5 - 18.6

**PERFORMANCE CHARACTERISTICS****Reproducibility**

	Within Gel (n=16)		Between Gel (n=95)	
	Mean (%)	CV (%)	Mean (%)	CV (%)
Albumin	60.1	1.7	60.4	2.3
Alpha 1	4.2	7.5	4.3	7.3
Alpha 2	11.4	4.1	10.3	7.8
Beta	10.5	2.1	11.2	6.8
Gamma	13.8	3.0	13.8	5.5

**Sensitivity**

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

**Linearity**

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

**BIBLIOGRAPHY**

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

## UTILISATION

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

Le sérum contient plus de 100 protéines qui ont chacune une fonction spécifique et qui peuvent subir des variations quantitatives en fonction de diverses conditions pathologiques<sup>1</sup>.

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

## PRECAUTIONS

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

## COMPOSITION

### 1. Plaque SAS-I Protéines Sériques

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

### 2. Colorant Acide Bleu Concentré

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

### 3. Solution décolorante Concentré

Diluer le contenu de décolorant A avec 1 litre d'eau distillée. Ajouter ensuite le contenu de décolorant B puis, lentement, 1 autres litre d'eau distillée.

### 4. Autres composants du kit

Chaque kit contient également 1 fiche technique, des buvards C et pour 10 gels.

## STOCKAGE ET CONSERVATION

### 1. Plaque SAS-I Protéines Sériques

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

### 2. Colorant Acide Bleu

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



### 3. Décolorant

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

#### MATERIELS NECESSAIRES NON FOURNIS

- Réf. 210200 Applicateurs échantillons 1 x 10
- Réf. 210300 Applicateurs échantillons 5 x 10
- Réf. 210100 Cupules échantillons jetables 100
- Réf. 3100 REP Prep
- Etuve ventilée jusqu'à 70°C
- Eau distillée

#### PRELEVEMENTS DES ECHANTILLONS

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

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

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

#### METHODOLOGIE

1. Déposer 35µL de serum ou de contrôle dans les puits échantillon du portoir échantillon SAS-I ou dans les puits à usage unique.
  - i) **Pour les utilisateurs SAS-I et SAS-I Plus:** Délicatement, placer le portoir échantillon sur le chariot applicateur. S'assurer que le portoir est fermement positionner dans son emplacement.
  - ii) **Pour les utilisateurs SAS-3:** Mettre en place le porte-échantillon avec précaution à l'aide des ergots de guidage de l'embase. S'assurer qu'il est solidement mis en place.
2. Sortir le gel de son emballage, retirer le film plastique et:
  - i) **Pour les utilisateurs SAS-I:** Placer le gel dans le SAS-I, agarose vers le haut, en respectant les polarités. L'électrode positive est positionné sur l'avant du chariot.
  - ii) **Pour les utilisateurs SAS-I Plus:** Déposer 400µL de REP Prep dans le dissipateur thermique. Placer le gel dans le SAS-I Plus, agarose vers le haut, en respectant les polarités. L'électrode positive est positionné sur l'avant du chariot, et en veillant à ce qu'il n'y ait pas de bulles d'air sous le gel.
3. Sécher la surface entière du gel à l'aide d'un buvard C, jeter le buvard.
4. **Pour les utilisateurs SAS-I:** Mettre en contact les électrodes avec les plot de fixation. S'assurer que les électrodes soient positionnées sur les ponts d'agarose.  
**Pour les utilisateurs SAS-I Plus:** (même chose que ci-dessus). Mettre le couvercle sur le gel et les électrodes et faire pression 5 secondes pour assurer un bon contact.
5. Placer deux applicateurs en position.
6. Lancer l'électrophorèse des protéines sériques:
  - i) **Pour les utilisateurs SAS-I:** 80 Volts, 20 minutes, 1 Application.
  - ii) **Pour les utilisateurs SAS-I Plus:** 100 Volts, 18 minutes, 20°C, 1 Application.

iii) **Pour les utilisateurs SAS-3:**

Étape	Temps (mm:ss)	Température (°C)	Voltage	Autre
Prélevement Ech	00:30	21		Vitesse I
Application Ech	00:30	21		Vitesse I*
Electrophorese	18:00	20	100	
Séchage	08:00	54		

\* - Utiliser LOC. 2

**REMARQUE:** Enlever les ponts d'agarose avant de procéder au séchage.

7. A la fin de l'électrophorèse:

i) **Pour les utilisateurs SAS-1:** Enlever le couvercle,

ii) **Pour les utilisateurs SAS-1 et SAS-1 Plus:** retirer les électrodes et retirer les ponts d'agarose en utilisant la raclette.

8. Fixer le gel sur le portoir de coloration.

9. Sélectionner le programme IFE sur le module de coloration et suivre les étapes, lavage, coloration, décoloration et séchage.

a) **SAS-2 (module de coloration)**

Étape	Solution	Temps (mm:ss)	Port	Température (°C)
Colorant	Colorant Acide Bleu	10:00	6	
Lavage	Eau distillée	01:00	1	
Séchage	—	15:00		65
Décolorant	Solution décolorante	03:00	2	
Décolorant	Solution décolorante	03:00	2	
Lavage	Eau distillée	01:00	1	
Séchage	—	10:00		65

b) **SAS-4 (module de coloration)**

Étape	Temps (mm:ss)	Température (°C)	Autre
Colorant	04:00		Recirculation Oui
Décolorant	02:00		Recirculation Oui
Décolorant	02:00		Recirculation Oui
Séchage	12:00	63	

c) **Manuellement**

Suivre la séquence du SAS-2, en utilisant des bains de solution colorante, décolorant et d'eau. Sécher dans une étuve ventilée entre 60...70°C.

10. A la fin du cycle de coloration, sortir le gel de la chambre de coloration. Le gel est prêt pour l'interprétation.

**CONTROLE DE QUALITE**

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

**LECTURE DES PLAQUES**

Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres normales selon cette méthode. Pour une interprétation complète, se référer à Ritzmann, S.E, 1982<sup>5</sup>. Différentes études montrent que les valeurs normales sont les mêmes pour l'homme et la femme non-enceinte. Certaines modifications sont observées chez la femme à terme et chez la femme sous contraceptif oral.

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

**1. Evaluation Qualitative:**

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

**2. Evaluation Quantitative:**

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

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

**LIMITES**

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

**VALEURS DE REFERENCE**

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

Fraction	Moyenne (%)	± 2SD Intervalle
Albumine	60.4	55.8 - 65.0
Alpha 1	3.4	2.2 - 4.6
Alpha 2	10.3	8.2 - 12.5
Béta	10.7	7.2 - 14.2
Gamma	15.0	11.5 - 18.6

## PERFORMANCES

### Reproductibilité

	Intra-Plaque (n=16)		Inter-Plaque (n=95)	
	Moyenne (%)	CV (%)	Moyenne (%)	CV (%)
Albumine	60.1	1.7	60.4	2.3
Alpha 1	4.2	7.5	4.3	7.3
Alpha 2	11.4	4.1	10.3	7.8
Béta	10.5	2.1	11.2	6.8
Gamma	13.8	3.0	13.8	5.5

### Sensibilité

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

### Linéarité

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

### BIBLIOGRAPHIE

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

## **ANWENDUNGSBEREICH**

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

Serum enthält über 100 Einzelproteine, von denen jedes über eine Reihe von spezifischen Funktionen verfügt, die von der spezifischen Konzentrationsabweichung in unterschiedlichen pathologischen Zuständen abhängen<sup>1</sup>.

Seit der Einführung der Moving-Boundary-Elektrophorese durch Tiselius<sup>2</sup> und der nachfolgenden Verwendung der Zonen-Elektrophorese, wurden Serumproteine basierend auf ihrer elektrischen Ladung bei einem bestimmten pH-Wert aufgetrennt.

Mit dem SAS-I Serumprotein Kit werden die Serumproteine entsprechend ihrer Ladung im Agarosegel in die 5 Hauptfraktionen (Albumin, Alpha-1-Globulin, Alpha-2-Globulin, Beta-Globulin und Gamma-Globulin) aufgetrennt. Nach einer anschließenden Färbung können die Proteinbanden visuell oder quantitativ ausgewertet werden. Jede der klassischen Elektrophorese-Zonen, mit Ausnahme von Albumin, enthält üblicherweise 2 oder mehr Komponenten. Die relativen Ausma<sup>3,4</sup>e dieser Fraktionen haben sich als nützliche Hilfsmittel in der Diagnose und Prognose von bestimmten Krankheitsstadien erwiesen<sup>3,5</sup>.

## **WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN**

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

## **INHALT**

### **1. SAS-I Serumprotein-Gel**

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

### **2. Saures-Blau-Farbstoff**

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

### **3. Entfärbelösung**

Den Inhalt Entfärbelösung A mit 1 Liter destilliertem Wasser verdünnen. Danach den Inhalt Entfärbelösung B und weitere 1 Liter destilliertes Wasser langsam hinzufügen.

### **4. Weitere Kit-Komponenten**

Jeder Kit enthält eine Methodenbeschreibung sowie ausreichend Blotter C für 10 Gele.

## **LAGERUNG UND STABILITÄT**

### **1. SAS-I Serumprotein-Gel**

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

## 2. Saures-Blau-Farbstoff

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

## 3. Entfärbelösung

Das Entfärbelösung-Konzentrat sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Die verdünnte Entfärbelösung ist für 6 Monate stabil bei einer Temperatur zwischen 15...30°C.

## NICHT MITGELIEFERTES ABER BENÖTIGTES MATERIAL

Kat. Nr. 210200 Probenapplikatormembranen (1 x 10)

Kat. Nr. 210300 Probenapplikatormembranen (5 x 10)

Kat. Nr. 210100 Einweg-Probenbecher (100)

Kat. Nr. 3100 REP Prep

Ofen mit Umluft und einer Temperaturleistung von 70°C

Wasser

## PROBENAHEME UND VORBEREITUNG

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

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

## SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE

1. Pipettieren Sie 35µl der Probe in die geeignete Vertiefung der Probenschale oder der Einweg-Probenbecher.
  - i) **Nur für SAS-I und SAS-I Plus:** Stellen Sie die Probenschale vorsichtig auf den Applikatoreinschub. Achten Sie darauf, dass die Schale fest in Position ist.
  - ii) **Nur für SAS-3:** Mit den Haltestiften der Probenbasis die Probenplatte vorsichtig einrichten. Sicherstellen, dass die Platte richtig eingesetzt ist.
2. Nehmen Sie das Gel aus der Verpackung, entfernen Sie die Schutzfolie und:
  - i) **Nur für SAS-I:** Legen Sie das Gel es in das SAS-I (Agarose nach oben). Die positiven und negativen Seiten sind auf die entsprechenden Elektrodenhalter auszurichten. Die positiven Elektrodenhalter sind vorne am Einschub.
  - ii) **Nur für SAS-I Plus:** 400µL REP-Prep-Lösung auf die Kühlplatte verteilen. Legen Sie das Gel es in das SAS-I Plus (Agarose nach oben). Die positiven und negativen Seiten sind auf die entsprechenden Elektrodenhalter auszurichten. Die positiven Elektrodenhalter sind vorne am Einschub. Darauf achten, dass unter dem Gel keine Luftblasen sind.
3. Blotzen Sie die Geloberfläche mit einem Blotter C und werfen Sie den Blotter anschließend.

4. **Nur für SAS-I:** Befestigen Sie die Elektroden oben auf den Elektrodenhaltern, damit sie mit den Pufferblöcken in Kontakt sind.

**Nur für SAS-I Plus:** (wie oben). Die Abdeckung über Gel und Elektroden geben und für einen guten Kontakt 5 Sekunden lang fest aufdrücken.

5. Bringen Sie die beiden Applikatormembran-Einheiten auf dem Instrument in Position.  
6. Führen Sie die Elektrophorese des Serumproteins:

- i) **Nur für SAS-I:** 80 Volt, 20 Minuten, 1 Applikation.  
ii) **Nur für SAS-I Plus:** 100 Volt, 18 Minuten, 20°C, 1 Applikation.  
iii) **Nur für SAS-3:**

Schritt	Dauer(mm:zz)	Temperatur (°C)	Spannung	Sonstiges
Probe laden	00:30	21		Geschwind. I
Probe auftragen	00:30	21		Geschwind. I*
Elektrophorese	18:00	20	100	
Trocknen	08:00	54		

- \* Standort 2

**BITTE BEACHTEN:** Gel-Blöcke vor dem Trocknen entfernen.

7. Am Ende der Elektrophorese

- i) **Nur für SAS-I:** Abdeckung entfernen.  
ii) **Nur für SAS-I und SAS-I Plus:** entfernen beide Elektroden und entfernen beide Gelblöcke mit dem speziellen Gelblock-Entferner.

8. Befestigen das Gel Sie es am Färbekammerhalter.

9. Wählen Sie das IFE-Testprogramm auf der Färbereinheit an. Folgen Sie den Anweisungen und waschen, färben und trocknen Sie das Gel.

- a) **SAS-2 (Auto-Stainer)**

Schritt	Lösung	Dauer (mm:zz)	öffnung	Temperatur (°C)
Färben	Saures-Blau-Farbstoff	10:00	6	
Waschen	Wasser	01:00	1	
Trocknen	—	15:00		65
Entfärben	Entfärbelösung	03:00	2	
Entfärben	Entfärbelösung	03:00	2	
Waschen	Wasser	01:00	1	
Trocknen	—	10:00		65

- b) **SAS-4 (Färbekammer)**

Schritt	Dauer(mm:zz)	Temperatur (°C)	Sonstiges
Färben	04:00		Umlauf EIN
Entfärben	02:00		Umlauf EIN
Entfärben	02:00		Umlauf EIN
Trocknen	12:00	63	

- c) **Manuell**

Folgen Sie der für den SAS-2 Auto-Stainer angegebenen Reihenfolge. Verwenden Sie ein Färbebad für das Färben, Entfärben und Waschen und einen Trockner für das Trocknen.

10. Am Ende des Färbevorgangs nehmen Sie das Gel aus der Färbekammer heraus. Das Gel ist jetzt prüfbar.

## **QUALITÄTSKONTROLLE**

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

## **INTERPRETATION DER ERGEBNISSE**

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

Für eine komplette Überprüfung der Serumprotein-Auswertung verweisen wir auf Ritzmann, S.E. 1982<sup>5</sup>. Studien zeigen, dass die Werte bei Männern und nicht schwangeren Frauen identisch sind. Einige Abweichungen werden bei schwangeren Frauen am Geburtstermin und bei Frauen, die orale Verhütungsmittel benutzen, festgestellt.

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

### **1. Qualitative Auswertung:**

Untersuchen Sie die Gele visuell auf das Vorhandensein bzw. Fehlen von Banden hin.

### **2. Quantitative Auswertung:**

Scannen Sie die Trennungen bei einer Wellenlänge von 595nm (Gelseite nach unten!).

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

## **EINSCHRÄNKUNGEN**

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



**REFERENZWERTE**

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

Protein-Fraktion	Mittel (%)	± 2SD Bereich
Albumin	60.4	55.8 - 65.0
Alpha I	3.4	2.2 - 4.6
Alpha2	10.3	8.2 - 12.5
Beta	10.7	7.2 - 14.2
Gamma	15.0	11.5 - 18.6

**LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN****Reproduzierbarkeit**

	Intra Assay (n=16)		Inter Assay (n=95)	
	Mittel (%)	CV (%)	Mittel (%)	CV (%)
Albumin	60.1	1.7	60.4	2.3
Alpha I	4.2	7.5	4.3	7.3
Alpha 2	11.4	4.1	10.3	7.8
Beta	10.5	2.1	11.2	6.8
Gamma	13.8	3.0	13.8	5.5

**Sensibilität**

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

**Linearität**

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

**LITERATUR**

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

## PRINCIPIO

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

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

Le sieroproteine si separano in base alla loro carica elettrica ad un particolare pH<sup>2</sup>.

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

Le proteine, vengono quindi colorate per permettere una visualizzazione ed interpretazione quantitativa.

Ciascuna delle classiche zone elettroforetiche, ad eccezione dell'albumina, contiene normalmente 2 o più componenti. Le relative proporzioni, di queste frazioni, dimostrano l'utilità nella diagnosi e prognosi di certe malattie<sup>3,5</sup>.

## AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Tutti i reagenti sono solo per uso diagnostico in vitro. Non ingerire o pipettare con la bocca alcun componente del kit. Indossare i guanti quando si maneggiano tutti i componenti del kit.

Fare riferimento alle schede dati di sicurezza del prodotto per conoscere i rischi dei componenti, la sicurezza nell'utilizzarli ed ulteriori informazioni.

## COMPOSIZIONE

### 1. Piastre SAS-I Sieroproteine

Contengono agarosio in tampone tris / barbital con thimerosal e sodio azide come conservanti. Il gel é pronto per l'uso.

### 2. Colorante Acido blu concentrato

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

### 3. Soluzione decolorante concentrata

Diluire il contenuto di decolorante A con 1 litri di acqua distillata. Poi aggiungere lentamente il contenuto di decolorante B e altri 1 litri di acqua distillata.

### 4. Altri componenti del Kit

Ogni kit contiene la metodica originale, blotter C ed applicatori ed cuvette porta campioni in quantità sufficiente per 10 gel.

## CONSERVAZIONE E STABILITA'

### 1. Piastre SAS-I Sieroproteine

I gels devono essere conservati a 15...30°C, e sono stabili fino alla data di scadenza indicata sulla confezione. Non refrigerare o congelare.

Il deterioramento del gel può essere indicato da:

- 1) presenza di cristalli sulla superficie, dovuta al congelamento.
- 2) rottura o assottigliamento, dovuti all'asciugatura.
- 3) visibile contaminazione dell'agarosio da parte di batteri o funghi sporigeni.

**2. Colorante Acido Blu**

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

**3. Soluzione decolorante**

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

**MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO**

Cod. 210200 Applicatori 1 x 10

Cod. 210300 Applicatori 5 x 10

Cod. 210100 Cuvette portacampioni, monouso 100

Cod. 3100 REP Prep

Forno ad aria forzata con temperature fino a 70°C

Acqua

**RACCOLTA E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE**

Si consiglia di utilizzare siero fresco.

I campioni possono essere anche conservati come segue:

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

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

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

**Fattori interferenti:**

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

**PROCEDURA**

1. Pipettare 35µl di ogni campione oppure siero di controllo nelle apposite cuvette portacampioni SAS-I.
- i) **Solo per SAS-I e SAS-I Plus:** Posizionare gentilmente il portacampioni nel cassetto dell'applicatore. Assicurarsi che il portacampioni sia posizionato correttamente e fermamente nel proprio alloggiamento.
- ii) **Solo per SAS-3:** Collocare con cautela il vassoio per campioni utilizzando i fermi di posizionamento della base di campioni. Assicurarsi che il vassoio sia posizionato saldamente.
2. Rimuovere il gel dalla confezione ed rimuovere il film protettivo:
- i) **Solo per SAS-I:** Collocare il gel nel SAS-I, con il lato di agarsoio rivolto verso l'alto, allineando il polo positivo e negativo con i rispettivi lati di polarità. Il polo positivo è situato nella parte anteriore della camera (verso l'operatore) mentre il polo negativo è in quella posteriore (verso l'interno della camera).

- ii) **Solo per SAS-I Plus:** Distribuire 400 $\mu$ L di preparazione REP sul dissipatore di calore. Positionare il gel nel SAS-I, con il lato di agarsoio rivolto verso l'alto, allineando il polo positivo e negativo con i rispettivi lati di polarità. Il polo positivo è situato nella parte anteriore della camera (verso l'operatore) mentre il polo negativo è in quella posteriore (verso l'interno della camera), prestando attenzione ad evitare bolle d'aria sotto il gel.
3. Asciugare la superficie del gel con un blotter C, poi scartarlo.
4. **Solo per SAS-1:** Posizionare gli elettrodi nella parte superiore dei blocchi magnetici in modo da creare un contatto con i ponti.
- Solo per SAS-I Plus:** (come sopra). Sistemare il coperchio sul gel e sugli elettrodi e premere con decisione per 5 secondi per consentire il contatto.
5. Collocare 2 applicatori nelle apposite scanalature, che si trovano nella parte frontale del pannello.
6. Eseguire l'elettroforesi sieroproteine:
- i) **Solo per SAS-1:** 80 Volts, 20 Minuti, 1 Applicazione.
- ii) **Solo per SAS-I Plus:** 100 Volts, 18 Minuti, 20°C, 1 Applicazione.
- iii) **Solo per SAS-3:**

Passaggio	Tempo (mm:ss)	Temperatura (°C)	Voltaggio	Altro
Caricamento campione	00:30	21		Velocità I
Applicazione campione	00:30	21		Velocità I*
Elettroforesi	18:00	20	100	
Asciugatura	08:00	54		

\* Utilizzare la posizione 2.

**NOTA:** Rimuovere i blocchi di gel prima dell'essiccazione.

7. Al termine dell'elettroforesi:
- i) **Solo per SAS-I Plus:** rimuovere il coperchio,
- ii) **Solo per SAS-1 / SAS-I Plus:** rimuovere gli elettrodi e rimuovere entrambi i ponti di gel utilizzando l'apposito "Rimuovi ponti di gel".
8. Fissarlo il gel al supporto della camera di colorazione.
9. Selezionare il programma IFE.
- a) **SAS-2 (Colorazione Automatica)**

Passaggio	Soluzione	Tempo (mm:ss)	Numero di Porta	Temperatura (°C)
Colorazione	Acido Blu	10:00	6	
Lavaggio	Acqua	01:00	1	
Asciugatura	—	15:00		65
Decolorazione	Soluzione decolorante	03:00	2	
Decolorazione	Soluzione decolorante	03:00	2	
Lavaggio	Acqua	01:00	1	
Asciugatura	—	10:00		65

- a) **SAS-4 (Colorazione Automatica)**

Passo	Tempo (mm:ss)	Temperatura (°C)	Altro
Colorante	04:00		Ricircolo ON
Decolorante	02:00		Ricircolo ON
Decolorante	02:00		Ricircolo ON
Asciugatura	12:00	63	

**b) Procedura Manuale**

Seguendo la sequenza del coloratore automatico SAS-2: colorare, decolorare, lavare, e al termine asciugare il gel in una stufa da laboratorio.

10. I termine del ciclo di colorazione, rimuovere il gel dalla camera. Il gel è ora pronto per essere esaminato.

**INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

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

Per una completa valutazione delle sieroproteine, vedere Ritzmann, S.E., 1982<sup>5</sup>.

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

L'età produce alcuni effetti sui valori normali.

Legami di sangue portano:

- una diminuzione delle proteine totali, albumina, alfa2 e beta.
- lieve aumento alfa1.
- rimane invariata oppure aumenta la frazione gamma (in gran misura da origini materne).

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

**1. Valutazione qualitativa:**

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

**2. Valutazione quantitativa:**

leggere i gels, a 595.

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

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

**CONTROLLO DI QUALITA'**

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

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

**LIMITAZIONI**

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

**VALORI DI RIFERIMENTO**

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

Frazioni proteiche	Media (%)	± 2SD (range)
Albumina	60.4	55.8 - 65.0
Alfa1	3.4	2.2 - 4.6
Alfa2	10.3	8.2 - 12.5
Beta	10.7	7.2 - 14.2
Gamma	15.0	11.5 - 18.6

## CARATTERISTICHE

### Riproducibilità

	entro la serie (16 gel)		tra la serie (95 gel)	
	Media (%)	CV (%)	Media (%)	CV (%)
Albumina	60.1	1.7	60.4	2.3
Alfa1	4.2	7.5	4.3	7.3
Alfa2	11.4	4.1	10.3	7.8
Beta	10.5	2.1	11.2	6.8
Gamma	13.8	3.0	13.8	5.5

### Sensibilità

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

### Linearità

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

### BIBLIOGRAFIA

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

## **USO PREVISTO**

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

El suero contiene más de 100 proteínas individuales, cada una de ellas con una serie de funciones específicas que están sujetas a variaciones en su concentración bajo diferentes condiciones patológicas<sup>1</sup>. Desde la introducción de la electroforesis marginal móvil por Tiselius<sup>2</sup> y el empleo subsiguiente de la electroforesis de zona, las proteínas séricas se han fraccionado tomando como base su carga con un pH determinado.

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

## **ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES**

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

## **COMPOSICION**

### **1. Gel de proteínas séricas SAS-I.**

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

### **2. Colorante azul ácido concentrado.**

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

### **3. Solución decolorante concentrada.**

Diluya el contenido de decolorante A en 1 litro de agua destilada. A continuación añade el contenido de decolorante B y añade lentamente un poco más de 1 litro de agua destilada.

### **4. Otros componentes del kit.**

Cada kit contiene una hoja de instrucciones y secantes C hasta completar 10 geles

## **ALMACENAMIENTO Y PERIODO DE VALIDEZ**

### **1. Gel de proteínas séricas SAS-I.**

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

## 2. Colorante azul ácido.

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

## 3. Solución decolorante.

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

## ACCESORIOS NECESARIOS, NO SUMINISTRADOS

No de catálogo 210200 Aplicadores de muestras 1 x 10

No de catálogo 210300 Aplicadores de muestras 5 x 10

No de catálogo 210100 Vasos de recogida de muestras desechables 100

No de catálogo 3100 REP Prep

Horno con aire a presión capaz de alcanzar 70°C

Agua

## RECOGIDA Y PREPARACION DE MUESTRAS

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

### Factores de interferencia:

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

## PROCEDIMIENTO PASO A PASO

1. Con una pipeta, introducir 35µl de la muestra en la cavidad correspondiente de la bandeja de muestras o en vasos de recogida de muestras desechables.
- ii) **Solo para SAS-I y SAS-I Plus:** Colocar cuidadosamente la bandeja con la muestra en la gaveta del aplicador. Asegurarse de que la bandeja está firmemente introducida en su posición.
- ii) **Solo para SAS-3:** Colocar cuidadosamente la bandeja con la muestra utilizando los pasadores de localización de la base de la muestra. Asegurar que la bandeja está en una posición segura.
2. Sacar el gel del envase, desechar la lámina sobrepuesta y:
  - ii) **Solo para SAS-I:** Colocar el gel en el SAS-I, con la agarosa hacia arriba, alineando los lados positivo y negativo con los bornes de los electrodos correspondientes. Los bornes del electrodo positivo se encuentran en la parte frontal de la gaveta.
  - ii) **Solo para SAS-I Plus:** pipetear 400µL de REP Prep en el disipador térmico. Colocar el gel en el SAS-I, con la agarosa hacia arriba, alineando los lados positivo y negativo con los bornes de los electrodos correspondientes. Los bornes del electrodo positivo se encuentran en la parte frontal de la gaveta, teniendo cuidado de evitar las burbujas aéreas debajo del gel.



3. Secar la superficie del gel con un secante C y luego desechar el secante.
4. **Solo para SAS-I:** Conectar los electrodos a la parte superior de los bornes, de forma que estén en contacto con los bloques tampón.  
**Solo para SAS-I Plus:** (igual que el anterior). Colocar la cubierta del gel sobre el gel y los electrodos, presionar con firmeza durante 5 segundos para asegurar un buen contacto.
5. Colocar dos juegos de aplicadores en posición en el instrumento.
6. Realizar la electroforesis de las seroproteínas:
  - i) **Solo para SAS-I:** 80 voltios, 20 minutos, 1 Aplicacion
  - ii) **Solo para SAS-I Plus:** 100 voltios, 18 minutos, 20°C, 1 Aplicacion
  - ii) **Solo para SAS-3:**

Paso	Tiempo (mm:ss.)	Temperatura (°C)	Voltaje	Otros
Cargar muestra	00:30	21		Velocidad I
Aplicar muestra	00:30	21		Velocidad I*
Electroforesis	18:00	20	100	
Secar	08:00	54		

- \* Utilizar la posición 2

**NOTA:** Retirar los bloques de gel antes del secado.

7. Finalizada la electroforesis:
    - i) **Solo para SAS-I Plus:** retirar la cubierta,
    - ii) **Solo para SAS-I y SAS-I Plus:** sacar ambos los electrodos y sacar ambos bloques de gel utilizando el extractor de bloques de gel.
  8. Sujetarlo el gel al soporte de la cámara de coloración.
  9. Seleccionar el programa de pruebas IFE en la unidad de coloración y, siguiendo las indicaciones, colorear y secar el gel.
- a) **SAS-2 (Colorador automático):**

Paso	Solución	Tiempo (mm:ss)	Orificio	Temperatura (°C)
Colorar	Colorante azul ácido	10:00	6	
Lavar	Agua	01:00	1	
Secar	—	15:00		65
Decolorar	Solución decolorante	03:00	2	
Decolorar	Solución decolorante	03:00	2	
Lavar	Agua	01:00	1	
Secar	—	10:00		65

- b) **SAS-4 (Colorador automático):**

Paso	Tiempo (mm:ss.)	Temperatura (°C)	Otros
Colorar	04:00		Recirculación activada
Decolorar	02:00		Recirculación activada
Decolorar	02:00		Recirculación activada
Secar	12:00	63	

**b) Manual:**

Seguir la secuencia indicada para el colorador automático SAS-2, utilizando un baño de coloración para los pasos de colorear, decolorar y lavar, y un horno de secado por aire para los pasos de secado.

10. Finalizado el ciclo de coloración, sacar el gel de la cámara de coloración. Ahora el gel está listo para examinar.

**CONTROL DE CALIDAD**

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

**INTERPRETACION DE RESULTADOS**

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

Para obtener un análisis completo de la evaluación de proteínas séricas, leer a S. E. Ritzmann, 1982<sup>5</sup>. Los estudios muestran que los valores son los mismos tanto para hombres como para mujeres no embarazadas. Se han detectado algunas diferencias en mujeres al término de su embarazo y en mujeres que utilizan anticonceptivos orales.

La edad tiene algún efecto sobre los niveles normales. La sangre del cordón umbilical tiene fracciones totales de proteínas, albúmina, alfa 2 y beta reducidas, la fracción alfa 1 ligeramente incrementada y gamma normal o incrementada (en gran parte de origen materno). Las gammaglobulinas se reducen rápidamente cerca de los 3 meses de edad, mientras que otras fracciones ya han alcanzado niveles adultos. Los niveles adultos de las gammaglobulinas no son alcanzados hasta los 10 - 16 años de edad. La albúmina decrece y la betaglobulina aumenta a partir de los 40 años de edad.

**1. Evaluación cuantitativa:**

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

**2. Evaluación cuantitativa:**

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

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

**LIMITACIONES**

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

**VALORES DE REFERENCIA**

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

Fracción proteínica	Media (%)	Margen $\pm$ 2SD
Albúmina	60.4	55.8 - 65.0
Alfa 1	3.4	2.2 - 4.6
Alfa 2	10.3	8.2 - 12.5
Beta	10.7	7.2 - 14.2
Gamma	15.0	11.5 - 18.6

**CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES****Reproductibilidad**

	Dentro del gel (n=16)		Entre el gel (n=95)	
	Media (%)	CV (%)	Media (%)	CV (%)
Albúmina	60.1	1.7	60.4	2.3
Alfa 1	4.2	7.5	4.3	7.3
Alfa 2	11.4	4.1	10.3	7.8
Beta	10.5	2.1	11.2	6.8
Gamma	13.8	3.0	13.8	5.5

**Sensibilidad**

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

**Linealidad**

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

**BIBLIOGRAFIA**

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

# helena | BioSciences Europe

[www.helena-biosciences.com](http://www.helena-biosciences.com)

---

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

tel: +44 (0) 191 482 8440  
fax: +44 (0) 191 482 8442

email: [info@helena-biosciences.com](mailto:info@helena-biosciences.com)

