

TITAN III[®] Serum Protein Electrophoresis

Instructions For Use

REF. 3023

Électrophorèse des protéines sériques TITAN III[®]
Fiche technique

TITAN III[®] Serum-Protein Elektrophorese
Anleitung

Elettroforesi delle proteine sieriche TITAN III[®]
Istruzioni per l'uso

Electroforesis de proteínas séricas de TITAN III[®]
Instrucciones de uso

Contents

English	I
Français	7
Deutsch	13
Italiano	19
Español	25



INTENDED PURPOSE

The Helena Serum Protein Electrophoresis procedure is intended for the separation and quantitation of serum proteins by electrophoresis on cellulose acetate.

Serum contains over one hundred individual proteins, each with a specific set of functions and subject to specific variation in concentration under different pathologic conditions. Since the introduction of moving-boundary electrophoresis by Tiselius² and the subsequent use of zone electrophoresis, serum proteins have been fractionated on the basis of their electrical charge into five classical fractions: albumin, α_1 , α_2 , beta, and gamma proteins. Each of these classical electrophoretic zones (with the exception of albumin) normally contains two or more components. Approximately fifteen serum proteins have been studied extensively because they may be measured easily.

Proteins are large molecules composed of covalently linked amino acids. Depending on electron distributions resulting from covalent or ionic bonding of structural subgroups, proteins have different electrical charges at a given pH. In the Helena Serum Protein procedure, the proteins are separated according to their respective electrical charges at pH 8.8 on a cellulose acetate plate using both the electrophoretic and electroendosmotic forces present in the system. After the proteins are separated, the plate is placed in a solution of sulfosalicylic acid and trichloroacetic acid (to immobilize the proteins) and Ponceau S (to stain the protein bands). The staining intensity is related to protein concentration. After dehydration in methanol, the plate background is then rendered transparent by treatment with a clearing solution.

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. Ponceau S Stain (Cat. No. 5526)

The stain is supplied as a powder and is a mix of Ponceau S and Sulphosalicylic Acid. Dissolve the contents of the bottle in 1 litre of deionised water and mix for 30 minutes or until completely dissolved.

2. Electra[®] HR Buffer (Cat. No. 5805)

Contains a Tris-barbital Sodium Barbital buffer, pH 8.6-9.0. Dissolve one pack of dry buffer in 750ml of purified water. The buffer is ready for use when all material is dissolved and completely mixed.

3. Clear Aid (Cat No. 5005)

Contains polyethylene glycol. To prepare the clearing solution, mix 30 parts glacial acetic acid, 70 parts absolute methanol, and 4 parts Clear Aid. Stir until well mixed.

4. Titan III[®] Cellulose Acetate Plate (Cat. No. 3023 or 3024)

Contains a cellulose acetate plate. Refer to instructions for use for preparation instructions.

5. Other kit components

Each kit contains Instructions For Use.

STORAGE AND SHELF-LIFE

1. Ponceau S Stain (Cat. No. 5526)

The stain may be stored as packaged or in a tightly closed staining dish at 15...30°C. Unused stain is stable until the expiry date indicated on the label. Deterioration may be indicated by excessive evaporation or large amounts of precipitate occurring.

2. Electra® HR Buffer (Cat. No. 5805)

The packaged buffer is stable until the expiry date indicated on the label. Diluted buffer is stable for 2 months at 15...30°C when stored tightly closed. Deterioration may be indicated by signs of dampness or discoloration or if it becomes turbid.

3. Clear Aid (Cat No. 5005)

Clear Aid is stable at 15...30°C until the expiry date indicated on the label. Deterioration may be indicated by gross contamination or discoloration. Discard if the plates appear cloudy after the clearing procedure.

4. Titan III® Cellulose Acetate Plate (Cat. No. 3023 or 3024)

The cellulose acetate plate should be stored at 15...30°C and is stable until the expiry date indicated on the label.

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Serum is the preferred specimen. The use of plasma should be avoided, as fibrinogen will appear as a distinct narrow band between the beta and gamma fractions. Cereospinal fluid may be used if concentrated approximately 100 times; urine may be used if concentrated up to 300 times, depending on original protein concentration.

Interfering factors:

1. Hemolysis may cause false elevation in the alpha₂ and beta fractions.
2. Inaccurate results may be obtained on specimens left uncovered, due to evaporation.

Storage and Stability: Fresh serum or plasma is the specimen of choice. If storage is necessary, samples may be stored covered at 2...6°C for 48 hours. Cerebrospinal fluid and urine specimens may be used after proper concentration with a concentrator.

ITEMS REQUIRED BUT NOT PROVIDED:

5% acetic acid: Add 50ml of glacial acetic acid to 950ml of purified water.

Absolute methanol, reagent grade

Cat. No. 3024 Titan® III Cellulose Acetate Plates (94 x 76 mm)

Cat. No. 3023 Titan® III Cellulose Acetate Plates (60 x 76mm)

Cat. No. 4084 Super Z Applicator

Cat. No. 4090 Super Z-12 Applicator

Cat. No. 4085 Super Z-12 Sample Well Plate (2)

Cat. No. 4096 Super Z-12 Sample Well Plate (2)

Cat. No. 4094 Super CPK Aligning Base

Cat. No. 4086 Super Z Aligning Base

Cat. No. 5114 700 Staining Set

Cat. No. 5122 1000 Staining Set

Cat. No. 5526 Ponceau S

Cat. No. 5093 Bufferizer

Cat. No. 5005 Clear Aid

- Cat. No. 5090 Zip Zone® Prep
- Cat. No. 1283 Zip Zone® Chamber
- Cat. No. 5081 Zip Zone® Chamber Wicks
- Cat. No. 5037 Blotter Pads (102 x 108 mm)
- Cat. No. 5034 Blotter Pads (76 x 102mm)
- Cat. No. 5805 Electra® HR Buffer
- Cat. No. 5053 Titan Plastic Envelopes (102 x 120 mm)
- Cat. No. 5052 Titan Plastic Envelopes (63 x 120mm)
- Cat. No. 6008 Microdispenser and Tubes
- Cat. No. 8008 Micro-Hood (220V)
- Cat. No. 5205 Electrophoresis Manual
- Cat. No. 5211 Serum Protein Report Forms
- Cat. No. 5000 Helena Marker
- Cat. No. 5109 Quality Control Chart
- Cat. No. 5015 Titan Identification Labels
- Cat. No. 5002 Glue Stick

STEP-BY-STEP PROCEDURE

1. Properly code the required number of Titan III Plates by marking on the glossy, hard (Mylar)® side with a Helena BioSciences marker. It is suggested that the identification mark be placed in one corner so that it is always aligned with sample No. 1.
2. Soak the plates for 20 minutes in diluted HR buffer. The plates should be soaked in the Bufferizer according to the instructions for use included with the Bufferizer. Alternatively, the plates may be wetted by slowly and uniformly lowering a rack of plates into the buffer such that air is not trapped in the plates. **NOTE:** The same soaking buffer may be used for soaking up to 12 plates or for approximately one week if stored tightly closed. If used for a more prolonged period residual solvents from the plate may build up in the buffer or evaporation may alter buffer concentration.
3. Pour approximately 100ml of diluted HR Buffer into each outer section of the chamber.
4. Wet two disposable wicks in the buffer and drape one over each support bridge, ensuring it makes contact with the buffer and that there are no air bubbles under the wicks.
5. Cover the chamber to prevent buffer evaporation.
6. Fill each well in the sample plate with 3 μ l of sample using the microdispenser. Expel the samples as a bead on the tip of the glass tube; then touch this bead to the well. Cover the samples with a glass slide if they are not used within 2 minutes.
7. Prime the applicator by depressing the tips into the sample wells 3 or 4 times. Apply this loading to a piece of blotter paper. DO NOT load the applicator again at this point, but proceed to the next step.
8. Remove the wetted plate from the buffer and blot once firmly between two blotters. Before placing the plate in the aligning base place a drop of water or buffer on the center of the aligning base. This prevents the plate from shifting during the sample application. Place the plate in the aligning base, cellulose acetate side up, aligning the bottom edge of the plate with the black scribe line marked "CENTER APPLICATION". The identification mark should be aligned with sample No. 1.
9. Apply the sample to the plate by depressing the applicator tips into the sample well 3 or 4 times and transfer the applicator to the aligning base. Press the button down and hold it for 5 seconds.

10. Place the plate(s), cellulose acetate side down, in the chamber. Place a weight on the plate(s) to ensure contact with the wicks. Cover the chamber securely and wait 30 seconds for the plate(s) to equilibrate.
11. Electrophorese the plate(s): 15 minutes, 180 volts. **NOTE:** Power must be applied within 5 minutes after the plate(s) has been placed in the chamber.
12. Following electrophoresis, remove the plate(s) from the chamber and place in 40-50ml of Ponceau S stain for 6 minutes. (When staining 2 or more plates, carry out the protocol vertically in a rack. **NOTE:** The stain may be reused until the plate background contains stain precipitate.
13. Destain in 3 x 2 minute washes of 5% acetic acid or until the plate background is white. The plate(s) may be dried and stored as a permanent record at this point. If a transparent background is desired (i.e. for densitometry), proceed to the next step.
14. Dehydrate by rinsing the plate in 2 absolute methanol washes of 2 minutes each wash. Allow the plate to drain for 5-10 seconds before placing in the next solution.
15. Place the plate into the clearing solution for 5-10 minutes.
16. Drain off excess solution, then place the plate, acetate side up, onto a blotter, and into a drying oven at 50...60°C for 15 minutes or until dry.

Evaluation of the Protein Bands

Scan the plates in a densitometer using a 525 nm filter and the narrow slit.

Stability of End Product

The completed, dried Serum Protein plate is stable for an indefinite period of time and may be stored in Titan Plastic Envelopes,

Calibration

The Optical Density Step Tablet (Cat. No. 1030) should be used to ensure the linearity of the instrument and a Neutral Density Densitometer Standard should be used to validate the zero adjustment and sensitivity of the instrument.

INTERPRETATION OF RESULTS^{5,7}

The fastest moving band, and normally the most prominent is the albumin band found closest to the anodic edge of the plate. The faint band next to this is alpha₁ globulin, followed by alpha₂ globulin, beta, and gamma globulins.

Calculation of the Unknown

The Helena BioSciences CliniScan™ Densitometer and other Helena BioSciences densitometers with computer accessories will automatically print the relative percent and the absolute values for each band. Alternately, the relative percent of each band can be calculated manually from the integrator scale on the scan. Refer to the Operator's Manual provided with the densitometer. The relative percent of each band is calculated by the following formula:

$$\frac{\text{No. Integration Units of the Band}}{\text{Total Integration Units}} \times 100 = \text{Relative Percent of the Band}$$

$$\text{Relative Percent of the Band} \times \text{Total Serum Protein} = \text{Absolute Value of Protein in each band.}$$

QUALITY CONTROL

Two different types of normal range quality control materials are available for use with the serum protein electrophoresis kits. Use at least one of these control sera on each plate run.

Cat. No. 5112 Electrophoresis Serum Control

Cat. No. 7024 Kentrol Serum Control-Normal

REFERENCE VALUES

The expected values for serum protein electrophoresis on cellulose acetate stained with Ponceau S were determined from a study of 51 normal subjects. These values are for illustrative purposes only. Each laboratory should establish its own range.

Protein Fraction	Range gd/L
Albumin	3.63 - 4.91
Alpha ₁	0.11 - 0.35
Alpha ₂	0.65 - 1.17
Beta	0.74 - 1.26
Gamma	0.58 - 1.74

Variations of Expected Values⁴

Studies show that values are the same for both males and nonpregnant females. (Some differences are seen in pregnant females at term and in women on oral contraceptives). Age has some effect on normal levels. Cord blood has decreased total protein, albumin, alpha₂ and beta fractions, slightly increased alpha₁, and normal or increased gamma fractions (largely of maternal origin). The gamma drops rapidly until about 3 months of age, while the 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 globulins increase after the age of 40.

Results on normal individuals will cover age and sex-related variations and day-to-day biologic variations. Disease states in which abnormal patterns are observed include inflammatory response, rheumatic disease, liver diseases, protein-loss disorders, plasma cell dysorasis, and genetic deficiencies. Variant patterns have also been observed during pregnancy.

Further Testing Required

The serum protein electropherogram or densitometric tracing should be evaluated for abnormalities. If abnormalities are observed, appropriate follow-up studies should be initiated. These may include Immunoelectrophoresis, immunofixation, quantitation of individual component immunoglobulins, bone marrow examination, and other appropriate tests.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

A normal serum was run 26 consecutive times using the method described above. The following data was obtained:

Protein Fraction	Mean (Relative %)	SD (+/-)	CV (%)
Albumin	55.7	1.4	2.5
Alpha ₁	3.1	0.4	12.5
Alpha ₂	11.3	0.4	3.8
Beta	11.6	0.5	4.0
Gamma	18.1	0.6	3.5

BIBLIOGRAPHY

1. Alper, C.A., Plasma Protein Measurements as a Diagnostic Aid, N Eng J Med, 291:287-290, 1974.
2. Tiselius, A., A New Approach for Electrophoretic Analysis of Colloidal Mixtures, Trans Faraday Soc, 33:524-531, 1937.
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. Ritzmann, S.E. and Daniels, J.C., Serum Protein Abnormalities: Diagnostic and Clinical Aspects, Little, Alan R. Liss Inc., 1982.
5. Killingsworth, L.M. et al, Protein Analysis, Diag Med, Jan/Feb., 47-58, 1980.
6. Henry, R.J., Cannon, D.C., and Winkelman, J.W., ed., Clinical Chemistry Principals and Techniques, 437, Harper and Row, Hagerstown, 1974.
7. Killingsworth, L.M., Plasma Protein Patterns in Health and Disease, CRC Crit Rev in Clin Lab Sci, 1-30, August, 1979.

UTILISATION

La méthode d'électrophorèse des protéines sériques Helena est utilisée pour la séparation et la quantification des protéines sériques par électrophorèse sur acétate de cellulose.

Le sérum contient plus de cent protéines qui ont chacune une fonction spécifique et qui peuvent subir des variations quantitatives en raison de diverses conditions pathologiques. Depuis l'introduction par Tiselius² de la mobilité électrophorétique, les protéines sériques sont fractionnées en fonction de leur charge électrique en cinq bandes classiques : albumine, alpha 1, alpha 2, bêta et gamma. Chaque zone électrophorétique, à l'exception de celle de l'albumine, contient normalement au moins deux composants. Quinze protéines sériques ont été largement étudiées du fait de la facilité de leur dosage.

Les protéines sont de grosses molécules composées d'acides aminés liés par covalence. Suivant la répartition des électrons résultant des liaisons ioniques ou covalentes des sous-groupes structurels, les protéines ont des charges électriques différentes à un pH donné. Dans la méthode Helena Protéines sériques, les protéines sont séparées en fonction de leurs charges électriques respectives, à un pH de 8,8, sur une plaque d'acétate de cellulose en utilisant les forces électrophorétiques et les forces électro-endosmotiques présentes dans le système. Une fois les protéines séparées, la plaque est placée dans une solution d'acide sulfosalicylique et d'acide trichloroacétique (pour immobiliser les protéines) puis de colorant Ponceau S (pour colorer les bandes de protéines). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en protéines. Après la déshydratation au méthanol, le fond de plaque devient transparent grâce à un traitement avec une solution d'éclaircissement.

PRÉCAUTIONS

Tous les réactifs sont à usage diagnostique 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. Colorant Ponceau S (réf. 5526)

Le colorant, fourni sous forme de poudre, est un mélange de Ponceau S et d'acide sulfosalicylique. Dissoudre le contenu de flacon dans 1 litre d'eau désionisée et mélanger pendant 30 minutes ou jusqu'à la dissolution complète.

2. Tampon Electra® HR (réf. 5805)

Contient un tampon tris-barbital-barbital sodique, pH 8,6 – 9,0. Dissoudre un sachet de tampon sec dans 750 ml d'eau distillée. Le tampon est prêt à l'emploi lorsque la dissolution est complète et qu'il est bien mélangé.

3. Réactif d'éclaircissement (réf. 5005)

Contient du polyéthylène glycol. Pour préparer la solution d'éclaircissement, mélanger 30 volumes d'acide acétique glacial, 70 volumes de méthanol absolu et 4 volumes de réactif d'éclaircissement. Remuer jusqu'à qu'elle soit bien mélangée.

4. Plaque d'acétate de cellulose Titan III® (réf. 3023 ou 3024)

Contient une plaque d'acétate de cellulose. La fiche technique indique la procédure de préparation.

5. Autres composants du kit

Chaque kit contient une fiche technique.

STOCKAGE ET CONSERVATION

1. Colorant Ponceau S (réf. 5526)

Le colorant peut être conservé dans son emballage d'origine ou dans un bac de coloration hermétiquement fermé entre 15...30°C. Le colorant non utilisé est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Une évaporation excessive ou l'apparition de grandes quantités de précipités indique une détérioration du produit.

2. Tampon Electra® HR (réf. 5805)

Le tampon non reconstitué est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Après reconstitution, le tampon est stable 2 mois entre 15...30°C s'il est conservé hermétiquement. S'il présente des signes d'humidité ou de décoloration ou s'il devient trouble, cela indique une détérioration du produit.

3. Réactif d'éclaircissement (réf. 5005)

Le réactif d'éclaircissement est stable entre 15...30°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Des signes de contamination importante ou une altération de la couleur indiquent une détérioration du produit. Ne pas l'utiliser et le jeter si les plaques sont troubles après l'étape d'éclaircissement.

4. Plaque d'acétate de cellulose Titan III® (réf. 3023 ou 3024)

La plaque d'acétate de cellulose doit être conservée entre 15...30°C ; elle est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

L'utilisation de sérum est fortement recommandée. Il convient d'éviter d'utiliser du plasma car cela entraînerait l'apparition d'une bande de fibrinogène sous la forme d'une bande étroite différenciée entre les fractions bêta et gamma. Il est possible d'utiliser du liquide céphalo-rachidien après une étape de concentration (environ 100 fois) ; il est possible d'utiliser de l'urine si elle est concentrée (jusqu'à 300 fois suivant la concentration d'origine en protéines).

Facteurs interférents :

1. En cas d'hémolyse de l'échantillon, vous risquez d'obtenir des résultats faussement élevés pour les fractions alpha-2 et bêta.
2. Vous risquez d'obtenir des résultats erronés avec des échantillons ayant subi une concentration par évaporation.

Conservation et stabilité : L'utilisation de sérum ou de plasma fraîchement prélevé est fortement recommandée. Il est possible de conserver les échantillons couverts pendant 48 heures entre 2...6°C, si nécessaire. Il est possible d'utiliser des échantillons de liquide céphalo-rachidien ou d'urine après concentration avec un concentrateur.

MATÉRIELS NÉCESSAIRES NON FOURNIS

Acide acétique à 5% : Mélanger 50ml d'acide acétique glacial avec 950ml d'eau distillée.

Méthanol absolu, de qualité réactif

Réf. 3024 Plaques d'acétate de cellulose Titan® III (94 x 76mm)

Réf. 3023 Plaques d'acétate de cellulose Titan® III (60 x 76mm)

Réf. 4084 Applicateur Super Z

Réf. 4090 Applicateur Super Z-12

Réf. 4085 Masque échantillon Super Z-12 (2)

Réf. 4096 Masque échantillon Super Z-12 (2)

- Réf. 4094 Embase d'alignement Super CPK
Réf. 4086 Embase d'alignement Super Z
Réf. 5114 Kit de coloration 700
Réf. 5122 Kit de coloration 1000
Réf. 5526 Colorant Ponceau S
Réf. 5093 Bac tampon Bufferizer
Réf. 5005 Réactif d'éclaircissement
Réf. 5090 Zip Zone® Prep
Réf. 1283 Chambre Zip Zone®
Réf. 5081 Ponts papier pour chambre Zip Zone®
Réf. 5037 Blocs buvards (102 x 108 mm)
Réf. 5034 Blocs buvards (76 x 102 mm)
Réf. 5805 Tampon Electra® HR
Réf. 5053 Enveloppes plastiques Titan (102 x 120 mm)
Réf. 5052 Enveloppes plastiques Titan (63 x 120 mm)
Réf. 6008 Micropipette et capillaires
Réf. 8008 Micro-hotte (220 V)
Réf. 5205 Manuel d'électrophorèse
Réf. 5211 Fiches de résultats de protéines sériques
Réf. 5000 Marqueur Helena
Réf. 5109 Graphique de contrôle qualité
Réf. 5015 Étiquettes d'identification Titan
Réf. 5002 Bâton de colle

MÉTHODOLOGIE

1. Identifier correctement le nombre nécessaire de plaques Titan III en écrivant sur le côté dur et brillant (Mylar)® avec un marqueur Helena BioSciences. Il est recommandé de placer la marque d'identification dans un coin de sorte qu'elle soit toujours alignée avec l'échantillon n° 1.
2. Tremper les plaques dans le tampon HR reconstitué pendant 20 minutes. Elles doivent être trempées dans le bac tampon Bufferizer en suivant les instructions fournies. Sinon, il est possible d'imbibes les plaques en plongeant lentement et uniformément un support de plaques dans le tampon de sorte qu'il ne reste pas d'air. **REMARQUE :** Le même tampon de trempage peut être utilisé pour imbibes 12 plaques et il se conserve environ une semaine dans un récipient hermétiquement fermé. S'il est utilisé pendant une période plus longue, il risque de se produire une accumulation de solvants résiduels provenant des plaques ou une évaporation, ce qui modifierait la concentration du tampon.
3. Verser environ 100ml de tampon HR dilué dans chaque compartiment extérieur de la chambre.
4. Humidifier deux ponts papier jetables dans le tampon et en déposer un sur chaque pont du support, en veillant à ce qu'ils soient bien en contact avec le tampon et qu'aucune bulle d'air ne reste dessous.
5. Couvrir la chambre pour éviter que le tampon ne s'évapore.
6. Remplir chaque puits du masque applicateur avec 3µl d'échantillon en utilisant la micropipette. Faire sortir l'échantillon sous forme de goutte à l'extrémité du tube en verre ; ensuite, mettre en contact cette goutte avec le puits. Couvrir les échantillons avec une lame de verre s'ils ne vont pas être utilisés dans les 2 minutes.

7. Amorcer l'applicateur en abaissant les embouts dans les puits échantillons 3 ou 4 fois. Déposer cette charge sur un morceau de papier buvard. Ne pas charger à nouveau l'applicateur, mais passer à l'étape suivante.
8. Enlever la plaque du tampon et la sécher entre deux buvards. Avant de placer la plaque sur l'embase d'alignement, déposer une goutte d'eau ou de tampon au centre de celle-ci pour éviter que la plaque de se déplacer lors du dépôt de l'échantillon. Placer la plaque sur l'embase d'alignement, acétate de cellulose vers le haut, en faisant correspondre le bas de la plaque avec la ligne de séparation noire signalée par CENTRE DÉPÔT. Le repère d'identification doit être aligné avec l'échantillon n° 1.
9. Déposer l'échantillon sur la plaque en abaissant les embouts de l'applicateur dans le puits échantillon 3 ou 4 fois puis transférer l'applicateur sur l'embase d'alignement. Appuyer sur le bouton et le maintenir appuyé pendant 5 secondes.
10. Placer la ou les plaques dans la chambre, acétate de cellulose vers le bas. Placer un poids dessus de façon à assurer un bon contact avec les ponts papier. Couvrir la chambre et attendre 30 secondes qu'elles s'équilibrent.
11. Faire migrer pendant 15 minutes, à 180 volts. **REMARQUE** : L'électricité doit être appliquée dans les 5 minutes suivant la mise en place de la ou des plaques dans la chambre.
12. Une fois l'électrophorèse terminée, enlever les plaques de la chambre et les placer dans 40-50ml de colorant Ponceau S pendant 6 minutes. Si vous colorez plusieurs plaques, utiliser un support vertical pour cette opération. **REMARQUE** : Il est possible de réutiliser le colorant jusqu'à ce que le fond de bande de la plaque présente un précipité de colorant.
13. Décolorer dans 3 bains de 2 minutes d'acide acétique à 5% ou jusqu'à ce que le fond de bande de la plaque soit blanc. Les plaques doivent être séchées et conservées à ce moment si vous désirez un résultat permanent. Si vous désirez un fond de bande transparent (pour la densitométrie), passer à l'étape suivante.
14. Déshydrater en rinçant les plaques dans 2 bains de méthanol absolu de 2 minutes chacun. Laissez les plaques s'égoutter pendant 5 à 10 secondes avant de les placer dans la solution suivante.
15. Placer les plaques dans la solution d'éclaircissement pendant 5 à 10 minutes.
16. Éliminer l'excès de solution puis placer la plaque, acétate de cellulose vers le haut, sur un buvard dans une étuve de séchage entre 50...60°C pendant 10 minutes ou jusqu'à ce qu'elle soit sèche.

Évaluation des bandes de protéines

Lire les plaques dans un densitomètre en utilisant un filtre à 525nm et une fente étroite.

Stabilité du produit final

Les plaques de protéines sériques terminées et sèches sont stables indéfiniment et peuvent être conservées dans les enveloppes plastiques Titan.

Étalonnage

Utiliser la gamme de densités optiques (réf. 1030) pour vérifier la linéarité de l'instrument et un étalon de densité neutre pour valider le réglage du zéro et la sensibilité de l'instrument.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS^{5,7}

La bande migrant le plus rapidement, et normalement la plus importante aussi, est la bande d'albumine qui se trouve de côté anodique de la plaque. La bande étroite suivante celle des alpha-1 globulines, suivie des alpha-2 globulines, des bêta-globulines et des gammaglobulines.

Calcul de l'inconnue

Le densitomètre CliniScan™ Helena BioSciences ainsi que d'autres densitomètres Helena équipés de périphériques informatiques impriment automatiquement le pourcentage relatif et les valeurs absolues pour chaque bande. Sinon, il est possible de calculer manuellement le pourcentage relatif de chaque bande à partir de l'échelle des densités lors de la mesure. Consulter le manuel d'utilisation fourni avec le densitomètre. La formule suivante permet de calculer le pourcentage relatif de chaque bande :

$$\frac{\text{Valeur intégration de la bande}}{\text{Valeur intégration totale}} \times 100 = \text{Pourcentage relatif de la bande}$$

Pourcentage relatif de la bande x Protéines sériques totales = Valeur absolue des protéines de chaque bande

CONTRÔLE QUALITÉ

Deux types différents de contrôle qualité normal pouvant être utilisés avec les kits d'électrophorèse des protéines sériques sont disponibles. Utilisez au moins l'un des ces sérums de contrôle sur chaque plaque.

Réf. 5112 Sérum de contrôle pour électrophorèse

Réf. 7024 Contrôle normal Kemtrol Serum

VALEURS DE RÉFÉRENCE

Les valeurs usuelles pour l'électrophorèse des protéines sériques sur acétate de cellulose colorées avec du Ponceau S ont été déterminées à partir d'une étude de 51 sujets normaux. Ces valeurs ne sont données qu'à titre indicatif. Il appartient à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs usuelles.

Fraction protéique	Intervalle g/dl
Albumine	3,63 - 4,91
Alpha-1	0,11 - 0,35
Alpha-2	0,65 - 1,17
Bêta	0,74 - 1,26
Gamma	0,58 - 1,74

Variations par rapport aux valeurs attendues⁴

Différentes études montrent que les valeurs normales sont les mêmes pour l'homme et la femme non-enceinte. Certaines modifications sont observées chez la femme à terme et chez la femme sous contraceptif oral. Les valeurs normales varient suivant l'âge. Le sang de cordon a des protéines totales diminuées ainsi que l'albumine, les alpha-2 et les bêta ; la fraction des alpha-1 est légèrement augmentée et celle des gamma est normale ou augmentée (en partie d'origine maternelle). Les gammaglobulines diminuent rapidement jusqu'à un âge d'environ 3 mois, alors que les autres fractions atteignent progressivement les valeurs adultes. La valeur adulte des gammaglobulines n'est pas atteinte avant 10-16 ans. Après 40 ans, l'albumine diminue et les bêta-globulines augmentent.

Les résultats chez les sujets normaux varient en fonction de l'âge et du sexe et présentent aussi des variations biologiques d'un jour à l'autre. Divers états pathologiques entraînent un protéinogramme anormal : réaction inflammatoire, rhumatisme, maladies hépatiques, déperdition protéique, dyscrasie plasmocytaire et anomalies génétiques. Des bandes de variants ont aussi été observées lors de la grossesse.

Analyses supplémentaires nécessaires

Examiner le protéinogramme des protéines sériques ou le tracé densitométrique à la recherche d'anomalies. Si vous observez des anomalies, il est nécessaire de réaliser des études supplémentaires (immunoélectrophorèse, immunofixation, dosage des immunoglobulines individuelles et examen de moelle osseuse, entre autres).

PERFORMANCES

Un sérum normal a été analysé 26 fois consécutives en utilisant la méthode décrite auparavant. Voici les résultats obtenus :

Fraction protéique	Moyenne (% relatif)	Écart-type (+/-)	CV (%)
Albumine	55,7	1,4	2,5
Alpha-1	3,1	0,4	12,5
Alpha-2	11,3	0,4	3,8
Bêta	11,6	0,5	4,0
Gamma	18,1	0,6	3,5

BIBLIOGRAPHIE

1. Alper, C.A., Plasma Protein Measurements as a Diagnostic Aid, N Eng J Med, 291:287-290. 1974.
2. Tiselius, A., A New Approach for Electrophoretic Analysis of Colloidal Mixtures, Trans Faraday Soc, 33:524-531, 1937.
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. Ritzmann, S.E. and Daniels, J.C., Serum Protein Abnormalities: Diagnostic and Clinical Aspects, Little, Alan R. Liss Inc., 1982.
5. Killingsworth, L.M. et al, Protein Analysis, Diag Med, Jan/Feb., 47-58, 1980.
6. Henry, R.J., Cannon, D.C., and Winkelman, J.W., ed., Clinical Chemistry Principles and Techniques, 437, Harper and Row, Hagerstown, 1974.
7. Killingsworth, L.M., Plasma Protein Patterns in Health and Disease, CRC Crit Rev in Clin Lab Sci, 1-30, August, 1979.

ANWENDUNGSBEREICH

Das Helena Serum-Protein Elektrophorese-Verfahren dient zur Auftrennung und Quantifizierung der Serum-Proteine mittels Elektrophorese auf Zellulose-Acetat.

Serum enthält über hundert einzelne Proteine, jedes mit einer Reihe spezifischer Funktionen, die unter verschiedenen pathologischen Bedingungen gewissen spezifischen Konzentrationsschwankungen unterliegen. Seit der Einführung der Kapillarelektrophorese durch Tiselius² und die darauf folgende Nutzung der Zonen-Elektrophorese sind Serum-Proteine aufgrund ihrer elektrischen Ladung in fünf klassische Fraktionen aufgetrennt worden: Albumin, Alpha-1, Alpha-2, Beta und Gamma-Proteine. Mit Ausnahme des Albumins enthält jede der klassischen Elektrophorese-Zonen in der Regel zwei oder mehrere Komponenten. Ungefähr fünfzehn Serum-Proteine sind ausführlich untersucht worden, da sie leicht gemessen werden können.

Proteine sind große, aus kovalent gebundenen Aminosäuren bestehende Moleküle. Je nach der aus der kovalenten oder ionogenen Bindung struktureller Untergruppen resultierenden Elektronenverteilung haben Proteine bei einem bestimmten pH unterschiedliche elektrische Ladungen. Bei dem Serum-Protein-Verfahren von Helena werden die Proteine nach ihren jeweiligen elektrischen Ladungen unter Verwendung von sowohl elektrophoretischer als auch elektroosmotischer Kräfte dieses Systems auf einer Zellulose-Acetat-Platte bei pH 8,8 aufgetrennt. Nach Auftrennung der Proteine wird die Platte in eine Lösung aus Sulphosalicylsäure und Trichloressigsäure (um die Proteine zu immobilisieren) und Ponceau S (um die Protein-Banden anzufärben) gegeben. Die Intensität der Färbung hängt dabei von der Proteinkonzentration ab. Nach Dehydratisierung mit Methanol wird der Plattenhintergrund durch Behandlung mit einer Clearing-Lösung durchsichtig gemacht.

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. Siehe Sicherheitsdatenblatt mit den Gefahrenhinweisen und Sicherheitsvorschlägen sowie Informationen zur Entsorgung.

INHALT

1. Ponceau S-Farbstoff (Kat. Nr. 5526)

Der Farbstoff wird als Pulver geliefert und besteht aus Ponceau S und Sulfosalizylsäure. Den Inhalt der Flasche in 1 liter deionisiertem Wasser auflösen und 30 min., bzw. bis der Farbstoff vollständig gelöst ist, mischen.

2. Electra®-HR Puffer (Kat. Nr. 5805)

Enthält einen Tris-Natriumbarbital-Barbital Puffer, pH 8,6-9,0. Eine Packung Trocken-Puffer in 750 ml destilliertem Wasser auflösen. Der Puffer ist gebrauchsfertig, wenn die Substanz aufgelöst und vollständig gemischt ist.

3. Clear Aid (Kat. Nr. 5005)

Enthält Polyethylenglycol. Zur Herstellung der Clearing-Lösung 30 Teile Eisessig, 70 Teile reines Methanol und 4 Teile Clear Aid mischen. So lange rühren, bis er gut gemischt ist.

4. Titan-III® Zellulose-Acetat Platte (Kat. Nr. 3023 oder 3024)

Enthält eine Zellulose-Acetat-Platte. Zur Vorbereitung siehe die Gebrauchsanweisung.

5. Weitere Kit-Komponenten

Jedes Kit enthält eine Gebrauchsanweisung.

LAGERUNG UND STABILITÄT

1. Ponceau S-Farbstoff (Kat. Nr. 5526)

Der Farbstoff kann in seiner Verpackung oder in einer fest verschlossenen Färbeschale bei 15...30°C gelagert werden. Nicht gebrauchter Farbstoff ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Übermäßige Verdunstung oder eine große Anzahl Präzipitate können auf Verfall hinweisen.

2. Electra®-HR Puffer (Kat. Nr. 5805)

Der verpackte Puffer ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar. Verdünnter Puffer ist fest verschlossen aufbewahrt bei 15...30°C 2 Monate stabil. Verfall kann durch Feuchtigkeit, Verfärbung oder Trübung angezeigt werden

3. Clear Aid (Kat. Nr. 5005)

Clear Aid ist bei 15...30°C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Starke Kontamination oder Verfärbung kann auf Verfall hinweisen. Erscheinen die Platten nach dem Clearing-Prozess trübe, sind sie zu verwerfen.

4. Titan-III® Zellulose-Acetat Platte (Kat. Nr. 3023 oder 3024)

Die Zellulose-Acetat-Platte sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil.

PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG

Serum ist das Probenmaterial der Wahl. Plasma sollte vermieden werden, da Fibrinogen als eine deutliche schmale Bande zwischen der Beta- und Gammafraktion erscheint. Liquor kann in ungefähr 100-facher Konzentrierung verwendet werden. Urin kann nach einer je nach ursprünglicher Proteinkonzentration bis zu 300-facher Konzentrierung eingesetzt werden.

Störfaktoren:

1. Hämolytische Proben können falsche Alpha-2- und Beta-Werte zeigen.
2. Proben, die nicht abgedeckt über längere Zeit stehen, können durch Verdunstungseffekt falsche Ergebnisse liefern.

Lagerung und Stabilität: Frisches Serum oder Plasma ist das Untersuchungsmaterial der Wahl. Sollte eine Lagerung notwendig sein, können die Proben abgedeckt bei 2...6°C 48 Stunden gelagert werden. Liquor und Urin-Proben können nach entsprechender Konzentration mit einem Konzentrator eingesetzt werden.

NICHT MITGELIEFERTES, ABER BENÖTIGTES MATERIAL:

5% Essigsäure: 50ml Eisessig zu 950ml destilliertem Wasser geben.

Reines Methanol, Reagent Grade

Kat. Nr. 3024 Titan® III Zellulose-Acetat Platten (94 x 76 mm)

Kat. Nr. 3023 Titan® III Zellulose-Acetat Platten (60 x 76mm)

Kat. Nr. 4084 Super Z-Applikator

Kat. Nr. 4090 Super Z-12 Applikator

Kat. Nr. 4085 Super Z-12 Probenplatten (2)

Kat. Nr. 4096 Super Z-12 Probenplatten (2)

Kat. Nr. 4094 Super CPK Ausrichtungsschiene

Kat. Nr. 4086 Super Z-Ausrichtungsschiene

Kat. Nr. 5114 700 Farbe-Set

Kat. Nr. 5122 1000 Farbe-Set

Kat. Nr. 5526 Ponceau S

- Kat. Nr. 5093 Pufferbad
- Kat. Nr. 5005 Clear Aid
- Kat. Nr. 5090 Zip Zone® Prep
- Kat. Nr. 1283 Zip Zone® Kammer
- Kat. Nr. 5081 Zip Zone® Kammer-Elektrodenstreifen
- Kat. Nr. 5037 Blotter Pads (102 x 108 mm)
- Kat. Nr. 5034 Blotter Pads (76 x 102mm)
- Kat. Nr. 5805 Electra®-HR Puffer
- Kat. Nr. 5053 Titan Plastik-Umschläge (102 x 120 mm)
- Kat. Nr. 5052 Titan Plastik-Umschläge (63 x 120 mm)
- Kat. Nr. 6008 Mikrodispenser und Röhrchen
- Kat. Nr. 8008 Micro-Hood (220V)
- Kat. Nr. 5205 Elektrophorese-Anleitung
- Kat. Nr. 5211 Serum-Protein Befundblätter
- Kat. Nr. 5000 Helena Marker
- Kat. Nr. 5109 Tabelle für die Qualitätskontrolle
- Kat. Nr. 5015 Titan Etiketten zur Beschriftung
- Kat. Nr. 5002 Klebestift

SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE

1. Die erforderliche Anzahl an Titan III-Platten durch Markierung auf der glänzenden, harten (Mylar®) Seite mit einem Helena BioSciences-Marker richtig kodieren. Es ist zu empfehlen, das Identifizierungs-Kennzeichen dabei in eine Ecke zu setzen, so dass es immer an Probe Nr. 1 ausgerichtet ist.
2. Platten 20 Minuten in verdünntem HR-Puffer einweichen. Die Platten sollten laut beiliegender Anleitung im „Pufferbad“ eingeweicht werden. Alternativ können die Platten durch, zur Vermeidung von Lufteinschlüssen, langsames und gleichmäßiges Senken eines Platten-Racks in den Puffer angefeuchtet werden. **BITTE BEACHTEN:** Der gleiche Soaking-Puffer kann zum Einweichen für bis zu 12 Platten verwendet oder fest verschlossenen für maximal eine Woche aufbewahrt werden. Wird er darüber hinaus verwendet, können sich Restlösungsmittel aus den Platten in Puffer aufbauen oder Verdunstung kann die Pufferkonzentration verändern.
3. Jeweils ungefähr 100ml verdünnten HR-Puffer in die äußeren Bereiche der Kammer gießen.
4. Zwei Einweg-Elektrodenstreifen in Puffer anfeuchten und über jede Trägerbrücke legen. Dabei darauf achten, dass sie mit dem Puffer in Kontakt stehen und unter den Streifen keine Luftblasen sind.
5. Die Kammer abdecken, um Verdunstung zu verhindern.
6. Mit dem Mikrodispenser je 3µl Probe in die Vertiefungen der Probenplatte geben. Die Proben dabei als Tropfen an den Rand des Glasröhrchens abgeben, dann diesen Tropfen mit der Vertiefung in Berührung bringen. Mit einem Objektträger abdecken, sollten sie nicht innerhalb 2 Minuten verarbeitet werden.
7. Den Applikator durch 3 bis 4-maliges Herunterdrücken der Spitzen in die Probenvertiefungen einspülen. Diese Füllung auf ein Stück Blotterpapier auftragen. Applikator nicht wieder füllen, sondern sofort zum nächsten Schritt übergehen.

8. Die angefeuchteten Platten aus dem Puffer nehmen und einmal kräftig zwischen zwei Blotter blotten. Vor dem Positionieren der Platte in die Ausrichtungsschiene einen Tropfen Wasser oder Puffer auf die Mitte der Ausrichtungsschiene geben. Das verhindert, dass die Platte sich während der Probenapplikation verschiebt. Die Platte mit der Acetatseite nach oben in die Ausrichtungsschiene geben und die untere Kante der Platte an der schwarzen Strichmarkierung „MITTE-APPLIKATION“ ausrichten. Das Identifizierungs-Kennzeichen sollte dabei an Probe Nr. 1 ausgerichtet werden.
9. Probe durch 3 oder 4-maliges Herunterdrücken der Applikatorspitzen in die Probenvertiefung auf der Platte auftragen, den Applikator auf die Ausrichtungsschiene übertragen. Den Knopf herunterdrücken und 5 Sekunden halten.
10. Die Platte(n) mit der Zelluloseacetat-Seite nach unten in die Kammer geben. Ein Gewicht auf die Platte(n) legen, um Kontakt mit den Streifen zu gewährleisten. Die Kammer fest verschließen und 30 Sekunden warten, damit die Platten sich ausgleichen können.
11. Elektrophorese der Platte(n) durchführen: 15 Minuten, 180 Volt. **BITTE BEACHTEN:** Nachdem die Platte(n) in die Kammer gelegt worden sind muss innerhalb von 5 Minuten Strom angelegt werden.
12. Nach der Elektrophorese die Platte(n) aus der Kammer nehmen und 6 Minuten in 40-50ml Ponceau S-Färbelösung legen. (Beim Anfärben von 2 oder mehr Platten sollte der Färbeprozess vertikal in einem Färb-Rack durchgeführt werden.) **BITTE BEACHTEN:** Der Farbstoff kann solange wieder verwendet werden, bis der Plattenhintergrund Farbstoff-Präzipitate aufweist.
13. In Waschschritten von 3 x 2 Minuten, oder bis der Hintergrund weiß ist, mit 5 % Essigsäure entfärben. Zu diesem Zeitpunkt können die Platten getrocknet und archiviert werden. Wird ein durchsichtiger Hintergrund gewünscht (d. h. für die Densitometrie) mit dem nächsten Schritt weitergehen.
14. Die Platte durch 2-maliges Spülen von je 2 Minuten mit reinem Methanol dehydrieren. Die Platte 5-10 Sekunden abtropfen lassen, bevor sie in die nächste Lösung gegeben wird.
15. Die Platte 5-10 Minuten in Clearing-Lösung geben.
16. Überschüssige Lösung abtropfen lassen, anschließend die Platte 15 Minuten, oder bis sie trocken ist, mit der Acetat-Seite nach oben bei 50...60°C in einen Trockenschrank geben.

Auswertung der Protein-Banden

Die Platten in einem Densitometer mit Filter 525nm und engem Schlitz scannen.

Stabilität des Endprodukts

Die fertigen getrockneten Serum-Protein-Platten können unbegrenzt in den Titan Plastik-Umschlägen aufbewahrt werden.

Kalibration

Zur Gewährleistung der Linearität des Geräts die Eichkarte (Kat. Nr. 1030) und zur Validierung seiner Nulleinstellung und Empfindlichkeit einen „Neutral Density Densitometer Standard“ (Weißstandard) verwenden.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE^{5,7}

Die Bande, die am schnellsten wandert und normalerweise am stärksten hervor tritt, ist die Albumin-Bande, die sich der Anoden-Seite der Platte am nächsten befindet. Die schwache Bande daneben ist das Alpha-I-Globulin gefolgt von den Alpha-2-, Beta- und Gammaglobulinen.

Errechnung der Unbekannten

Das Helena BioSciences CliniScan™ Densitometer und andere Helena BioSciences Densitometer mit Computerzubehör druckt automatisch für jede Bande die relativen Prozentzahlen und absoluten Werte. Der relative Prozentsatz kann auch von Hand aus der Anzeige auf dem Scan errechnet werden. Siehe mitgelieferte Bedienungsanweisung des Densitometers. Der relative Prozentsatz der einzelnen Banden wird nach der folgenden Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl Integration-Units der Bande}}{\text{Integration-Units, gesamt}} \times 100 = \text{Relativer Prozentsatz der Bande}$$

Relativer Prozentsatz der Bande x Gesamt-Protein im Serum = Absolutwert des Proteins der einzelnen Banden.

QUALITÄTSKONTROLLE

Zum Gebrauch mit den Serum-Protein Elektrophorese-Kits gibt es für den Normalbereich zwei Arten von Kontrollen. Mindestens eine dieser Kontrollseren bei jedem Lauf mitführen.

Kat. Nr. 5112 Elektrophorese-Serumkontrolle

Kat. Nr. 7024 Kemtrol Serum-Kontrolle - Normal

REFERENZWERTE

Die erwarteten Werte für die auf Zellulose-Acetat und mit Ponceau S angefärbte Serum-Protein-Elektrophorese wurde aus einer Studie mit 51 normalen Probanden bestimmt. Diese Werte gelten nur der Veranschaulichung. Jedes Labor muss seinen eigenen Bereich ermitteln.

Protein-Fraktion	Bereich g/dl
Albumin	3,63 - 4,91
Alpha-1	0,11 - 0,35
Alpha-2	0,65 - 1,17
Beta	0,74 - 1,26
Gamma	0,58 - 1,74

Abweichungen von den erwarteten Werten⁴

Studien haben gezeigt, dass für Männer und nicht schwangere Frauen die Werte gleich sind. (Man hat bei schwangeren Frauen nahe dem Geburtstermin und bei Frauen, die orale Verhütungsmittel benutzen, einige Abweichungen festgestellt.) Das Alter kann Auswirkungen auf die Normalwerte haben. 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 bis zum Alter von 3 Monaten rasch ab, wohingegen andere Fraktionen bis dahin bereits Erwachsenenwerte erreicht haben. Bei den Gammaglobulinen werden Erwachsenenwerte erst im Alter zwischen 10 und 16 Jahren erreicht. Im Alter von über 40 Jahren verringert sich das Albumin, und das Betaglobulin ist erhöht.

Ergebnisse von normalen Personen schließen Alter, geschlechtsspezifische Abweichungen und Tagesschwankungen mit ein. Zu den Krankheitsbildern, bei denen abnormaler Muster gefunden werden, gehören Entzündungsreaktion, Rheumaerkrankungen, Lebererkrankungen, Störungen mit Proteinverlust, Plasmazellendyskrasie und genetisch bedingte Mangelzustände. Es wurden auch abweichende Muster während der Schwangerschaft beobachtet.

Weitere Untersuchungen erforderlich

Abnormalitäten sollten mit dem Elektropherogramm oder densitometrischer Aufzeichnung befundet werden. Beim Nachweis von Abnormalitäten sollten entsprechende weitergehende Untersuchungen eingeleitet werden. Dazu gehören Immunelektrophorese, Immunfixation, Quantifizierung einzelner Immunglobulin-Komponenten, Knochenmark-Untersuchung und ähnliche Tests.

LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

Ein Normalserum wurden 26-mal hintereinander mit der oben beschriebenen Methode untersucht. Man erhielt folgende Daten:

Protein-Fraktion	Mittelwert (Relative %)	s (+/-)	VK (%)
Albumin	55,7	1,4	2,5
Alpha-1	3,1	0,4	12,5
Alpha-2	11,3	0,4	3,8
Beta	11,6	0,5	4,0
Gamma	18,1	0,6	3,5

LITERATUR

1. Alper, C.A., Plasma Protein Measurements as a Diagnostic Aid, N Eng J Med, 291:287-290.1974.
2. Tiselius, A., A New Approach for Electrophoretic Analysis of Colloidal Mixtures, Trans Faraday Soc, 33:524-531, 1937.
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. Ritzmann, S.E. and Daniels, J.C., Serum Protein Abnormalities: Diagnostic and Clinical Aspects, Little, Alan R. Liss Inc., 1982.
5. Killingsworth, L.M. et al, Protein Analysis, Diag Med, Jan/Feb., 47-58, 1980.
6. Henry, R.J., Cannon, D.C., and Winkelman, J.W., ed., Clinical Chemistry Principals and Techniques, 437, Harper and Row, Hagerstown, 1974.
7. Killingsworth, L.M., Plasma Protein Patterns in Health and Disease, CRC Crit Rev in Clin Lab Sci, 1-30, August, 1979.

PRINCIPIO

La procedura di elettroforesi delle proteine sieriche Helena è stata formulata per la separazione e la quantificazione delle proteine sieriche mediante elettroforesi su acetato di cellulosa.

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. Dall'invenzione dell'elettroforesi a fronte mobile ad opera di Tiselius² e dal successivo utilizzo dell'elettroforesi di zona, le proteine sieriche sono state suddivise in 5 frazioni classiche in base alla loro carica elettrica: albumina, alfa1, alfa2, beta e gamma. Ciascuna di queste classiche zone elettroforetiche (ad eccezione dell'albumina) contiene normalmente 2 o più componenti. Sono state studiate approfonditamente circa 15 proteine sieriche data la facilità con cui potevano essere misurate.

Le proteine sono grosse molecole costituite da aminoacidi legati covalentemente. In funzione delle distribuzioni degli elettroni derivanti dal legame covalente o ionico di sottogruppi strutturali, le proteine possiedono cariche elettriche diverse ad un determinato pH. Nella procedura di rilevamento delle proteine sieriche Helena, le proteine vengono separate in base alle rispettive cariche elettriche ad un pH pari a 8.8 su una piastra di acetato di cellulosa, utilizzando sia le forze elettroforetiche sia quelle elettroendosmotiche presenti nel sistema. In seguito alla separazione delle proteine, la piastra viene collocata in una soluzione di acido sulfosalicilico e acido tricloroacetico (per immobilizzare le proteine) e Ponceau S (per colorare le bande proteiche). L'intensità di colorazione è correlata alla concentrazione delle proteine. Successivamente alla disidratazione in metanolo, il fondo della piastra viene reso trasparente mediante un trattamento con una soluzione chiarificante.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Tutti i reagenti sono destinati esclusivamente alla diagnostica in vitro. Non ingerire né pipettare con la bocca i componenti del kit. Indossare i guanti durante la manipolazione di tutti i componenti del kit. Per le indicazioni relative ai rischi e alla sicurezza e per le informazioni sullo smaltimento, fare riferimento alle schede tecniche dei prodotti.

COMPOSIZIONE

1. Colorante Ponceau S (Cod. N. 5526)

Il colorante si presenta sotto forma di polvere ed è costituito da una miscela di Ponceau S e acido sulfosalicilico. Sciogliere il contenuto del flacone in 1 litro di acqua deionizzata e miscelare per 30 minuti o fino al completo scioglimento.

2. Tampone Electra® HR (Cod. N. 5805)

Contiene tampone tris-barbital-sodio barbital, pH 8.6-9.0. Sciogliere una confezione di tampone secco in 750ml di acqua depurata. Il tampone è pronto per l'uso non appena tutto il materiale appare disciolto e completamente miscelato.

3. Clear Aid (Cod. N. 5005)

Contiene polietilenglicole. Per preparare la soluzione chiarificante, miscelare 30 parti di acido acetico glaciale, 70 parti di metanolo assoluto e 4 parti di Clear Aid. Miscelare accuratamente agitando.

4. Piastra di acetato di cellulosa Titan III® (Cod. N. 3023 o 3024)

Contiene una piastra di acetato di cellulosa. Per la procedura di preparazione fare riferimento alle istruzioni per l'uso.

5. Altri componenti del kit

Ogni kit contiene un foglio procedurale.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

1. Colorante Ponceau S (Cod. N. 5526)

Il colorante può essere conservato confezionato o in un piatto di colorazione chiuso ermeticamente a 15...30°C. Il colorante non utilizzato è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Il deterioramento può essere indicato da eccessiva evaporazione o dalla presenza di grandi quantità di precipitato.

2. Tampone Electra® HR (Cod. N. 5805)

Il tampone confezionato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. Il tampone diluito è stabile per 2 mesi a 15...30°C se conservato ermeticamente chiuso. Il deterioramento può essere indicato da segni di umidità o scolorimento o da torbidità.

3. Clear Aid (Cod. N. 5005)

Il Clear Aid è stabile a 15...30°C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Il deterioramento può essere indicato da evidente contaminazione o scolorimento. Gettare il prodotto se le piastre appaiono torbide dopo la procedura di chiarificazione.

4. Piastra di acetato di cellulosa Titan III® (Cod. N. 3023 o 3024)

La piastra di acetato di cellulosa deve essere conservata a 15...30°C ed è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Il siero è il campione da preferire. L'utilizzo del plasma deve essere evitato, in quanto il fibrinogeno compare come una banda stretta separata tra le frazioni beta e gamma. Il liquido cerebrospinale può essere utilizzato se concentrato di circa 100 volte; le urine possono essere utilizzate se concentrate fino a 300 volte, a seconda della concentrazione proteica iniziale.

Fattori d'interferenza:

1. L'emolisi può causare falsi incrementi delle frazioni alfa₂ e beta.
2. Si possono ottenere risultati inattendibili se i campioni vengono conservati non coperti, a causa dell'evaporazione.

Conservazione e stabilità: Il campione ideale è costituito da plasma o siero fresco. Qualora sia necessaria la conservazione, i campioni possono essere conservati coperti a 2...6°C per 48 ore. I campioni di liquido cerebrospinale e di urine possono essere utilizzati in seguito ad adeguata concentrazione con un concentratore.

MATERIALI NECESSARI MA NON IN DOTAZIONE

Acido acetico al 5%: Aggiungere 50ml di acido acetico glaciale a 950ml di acqua depurata.

Metanolo assoluto, per reagenti

Cod. N. 3024 Piastre di acetato di cellulosa Titan® III (94 x 76 mm)

Cod. N. 3023 Piastre di acetato di cellulosa Titan® III (60 x 76 mm)

Cod. N. 4084 Applicatore Super Z

Cod. N. 4090 Applicatore Super Z-12

Cod. N. 4085 Piastra a pozzetti per campioni Super Z-12 (2)

Cod. N. 4096 Piastra a pozzetti per campioni Super Z-12 (2)

Cod. N. 4094 Base di allineamento Super CPK

Cod. N. 4086 Base di allineamento Super Z

Cod. N. 5114 Set di colorazione 700

Cod. N. 5122 Set di colorazione 1000

- Cod. N. 5526 Ponceau S
- Cod. N. 5093 Bufferizer
- Cod. N. 5005 Clear Aid
- Cod. N. 5090 Prep Zip Zone®
- Cod. N. 1283 Camera Zip Zone®
- Cod. N. 5081 Stoppini per camera Zip Zone®
- Cod. N. 5037 Blocchetti di blotter (102 x 108 mm)
- Cod. N. 5034 Blocchetti di blotter (76 x 102 mm)
- Cod. N. 5805 Tampone Electra® HR
- Cod. N. 5053 Buste in plastica Titan (102 x 120 mm)
- Cod. N. 5052 Buste in plastica Titan (63 x 120 mm)
- Cod. N. 6008 Microdispenser e provette
- Cod. N. 8008 Micro-Hood (220V)
- Cod. N. 5205 Manuale di elettroforesi
- Cod. N. 5211 Moduli di report sulle proteine sieriche
- Cod. N. 5000 Marcatore Helena
- Cod. N. 5109 Diagramma di controllo qualità
- Cod. N. 5015 Etichette di identificazione Titan
- Cod. N. 5002 Colla in stick

PROCEDURA

1. Codificare adeguatamente il numero richiesto di piastre Titan III contrassegnandole sul lato rigido lucido (Mylar®) con un marcatore Helena BioSciences. Si consiglia di effettuare il segno di identificazione su un solo angolo, in modo tale che risulti sempre allineato con il campione n. 1.
2. Immergere le piastre nel tampone HR diluito per 20 minuti. Le piastre devono essere immerse nel "bufferizer" (contenitore di immersione in tampone) conformemente alle istruzioni per l'uso ad esso accluse. In alternativa, le piastre possono essere inumidite introducendo, in modo lento ed uniforme, un rack di piastre nel tampone, cosicché l'aria non rimanga intrappolata nelle piastre.
NOTA: Lo stesso tampone di immersione può essere utilizzato per immergere fino a 12 piastre o conservato per circa una settimana in un contenitore ermeticamente chiuso. In caso di impiego per periodi più prolungati, i solventi residui provenienti dalla piastra possono accumularsi nel tampone oppure l'evaporazione può alterare la concentrazione del tampone stesso.
3. Versare circa 100ml di tampone HR diluito in ogni sezione esterna della camera.
4. Inumidire 2 stoppini monouso nel tampone e stenderne uno su ogni ponticello di supporto, assicurandosi che entri a contatto con il tampone e che non vi siano bolle d'aria sotto gli stoppini.
5. Coprire la camera per evitare l'evaporazione del tampone.
6. Riempire ogni pozzetto della piastra per campioni con 3µl di campione utilizzando il microdispenser. Fare fuoriuscire una goccia di campione dalla punta della provetta in vetro; quindi applicare la goccia sul pozzetto. Se i campioni non vengono utilizzati entro 2 minuti, coprirli con un vetrino.
7. Per innescare l'applicatore, premere le punte per 3-4 volte all'interno dei pozzetti per campioni. Applicare la carica ad un blotter. A questo punto non ricaricare l'applicatore, ma passare alla fase successiva.
8. Rimuovere dal tampone la piastra inumidita ed asciugare una volta con decisione tra 2 blotter. Prima di collocare la piastra nella base di allineamento, applicare una goccia di acqua o di tampone sul centro della base stessa. Ciò consente di evitare che la piastra si sposti durante l'applicazione dei campioni. Collocare la piastra nella base di allineamento, con il lato dell'acetato di cellulosa

verso l'alto, allineando il bordo inferiore della piastra stessa rispetto alla linea nera contrassegnata da "CENTER APPLICATION". Il contrassegno di identificazione dovrà essere allineato con il campione n. 1.

9. Per applicare il campione alla piastra, premere le punte dell'applicatore per 3-4 volte all'interno dei pozzetti per campioni e trasferire l'applicatore alla base di allineamento. Premere il pulsante e tenerlo premuto per 5 secondi.
10. Introdurre la(e) piastra(e) nella camera con il lato dell'acetato di cellulosa verso il basso. Sistemare un peso sulla(e) piastra(e), per garantire il contatto con gli stoppini. Coprire adeguatamente la camera e attendere 30 secondi affinché la(e) piastra(e) si stabilizzi(no).
11. Sottoporre la(e) piastra(e) ad elettroforesi: 180 volt per 15 minuti. **NOTA:** È necessario attivare l'alimentazione entro 5 minuti dall'introduzione della(e) piastra(e) nella camera.
12. In seguito all'elettroforesi, rimuovere la(e) piastra(e) dalla camera ed introdurre in 40-50ml di colorante Ponceau S per 6 minuti. (Durante la colorazione di 2 o più piastre, eseguire il protocollo verticalmente su un rack. **NOTA:** Il colorante può essere riutilizzato sino a quando il fondo della piastra contiene precipitato di colorante.
13. Decolorare in 3 bagni da 2 minuti ciascuno di acido acetico al 5% o sino a quando il fondo della piastra non apparirà bianco. A questo punto la(e) piastra(e) può(possano) essere essiccata(e) e conservata(e) in modo permanente. Se si desidera un fondo trasparente (per la densitometria), procedere alla fase successiva.
14. Disidratare la piastra risciacquandola in 2 bagni di metanolo assoluto per 2 minuti ciascuno. Lasciare scolare la piastra per 5-10 secondi prima di introdurla nella soluzione successiva.
15. Introdurre la piastra nella soluzione chiarificante per 5-10 minuti.
16. Rimuovere la soluzione in eccesso, quindi collocare la piastra su un blotter con il lato dell'acetato verso l'alto, introducendola poi in un forno di essiccazione a 50...60°C per 15 minuti o sino a quando non risulterà essiccata.

Valutazione delle bande proteiche

Analizzare le piastre in un densitometro utilizzando un filtro a 525nm e la fessura stretta.

Stabilità del prodotto finale

La piastra di proteine sieriche essiccata e completata è stabile per un intervallo di tempo indefinito e può essere conservata nelle buste in plastica Titan.

Calibrazione

La scala dei grigi per densità ottica (Cod. N. 1030) deve essere utilizzata per garantire la linearità dello strumento, mentre è necessario impiegare uno standard per densitometro a densità neutra per confermare la regolazione dello zero e la sensibilità dello strumento.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI^{5,7}

La banda in più rapido movimento, e solitamente la più pronunciata, è la banda dell'albumina, che risulta essere la più vicina al bordo anodico della piastra. La banda debole accanto ad essa è l'alfa I-globulina, seguita dall'alfa 2-globulina e dalle beta- e gamma-globuline.

Calcolo dei valori non noti

Il densitometro CliniScan™ di Helena BioSciences ed altri densitometri di Helena BioSciences con accessori per computer sono in grado di stampare automaticamente la percentuale relativa e i valori assoluti di ogni banda. In alternativa, la percentuale relativa delle singole bande può essere calcolata manualmente utilizzando la scala di integrazione sulla scansione. Fare riferimento al manuale utente fornito in dotazione con il densitometro. La percentuale relativa di ciascuna banda viene calcolata mediante la seguente formula:

$$\frac{\text{N. Unità di integrazione della banda}}{\text{Unità di integrazione totali}} \times 100 = \text{Percentuale relativa della banda}$$

Percentuale relativa della banda x Proteine sieriche totali = Valore assoluto delle proteine in ciascuna banda

CONTROLLO QUALITÀ

Sono disponibili 2 diversi tipi di materiali di controllo qualità del range normale, da utilizzare con i kit per elettroforesi delle proteine sieriche. Utilizzare almeno uno di questi sieri di controllo su ciascuna piastra analizzata.

Cod. N. 5112 Controllo del siero per elettroforesi

Cod. N. 7024 Controllo del siero Kentrol - Normale

VALORI DI RIFERIMENTO

I valori previsti per l'elettroforesi delle proteine sieriche su acetato di cellulosa colorato con Ponceau S sono stati determinati in base ad uno studio su 51 soggetti normali. Questi valori hanno uno scopo puramente illustrativo. Ciascun laboratorio dovrà pertanto elaborare il proprio range.

Frazione proteica	Range gd/L
Albumina	3.63 - 4.91
Alfa I	0.11 - 0.35
Alfa2	0.65 - 1.17
Beta	0.74 - 1.26
Gamma	0.58 - 1.74

Variazioni dei valori previsti⁴

Alcuni studi dimostrano che i valori rimangono invariati negli uomini e nelle donne non in gravidanza. (Alcune differenze si possono verificare nelle gestanti a termine e in donne che utilizzano contraccettivi orali). L'età produce alcuni effetti sui valori normali. Il sangue cordale presenta minori frazioni di proteine totali, albumina, alfa2 e beta e un lieve aumento dell'alfa I, mentre rimangono normali oppure aumentano le frazioni gamma (in gran parte di origine materna). Le gamma-globuline si riducono rapidamente fino ai 3 mesi di età circa, mentre altre frazioni hanno raggiunto i livelli dell'età adulta già in questa fase. Le gamma-globuline non raggiungono i livelli dell'età adulta fino ai 10-16 anni. Oltre i 40 anni, l'albumina diminuisce e le beta-globuline aumentano.

I risultati relativi ad individui normali comprendono le variazioni legate all'età e al sesso e le variazioni biologiche quotidiane. Tra gli stati patologici in cui si osservano pattern anormali rientrano la risposta infiammatoria, le patologie reumatiche, le malattie del fegato, i disordini con perdite proteiche, le discrasie plasmacellulari e le carenze genetiche. Pattern alterati sono stati osservati anche in gravidanza.

Ulteriori esami necessari

Per rilevare le anomalie è opportuno ricorrere alla valutazione dell'elettroferogramma delle proteine sieriche o del tracciato densitometrico. Se si osservano anomalie, è necessario intraprendere studi di follow-up appropriati. Tra questi studi possono rientrare l'immuno-elettroforesi, l'immunofissazione, la quantificazione delle singole immunoglobuline costitutive, l'esame del midollo osseo ed altri test pertinenti.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Un siero normale è stato analizzato per 26 volte consecutive utilizzando il metodo illustrato in precedenza. Sono stato ricavati i seguenti dati:

Frazione proteica	Media (% relativa)	DS (+/-)	CV (%)
Albumina	55.7	1.4	2.5
Alfa1	3.1	0.4	12.5
Alfa2	11.3	0.4	3.8
Beta	11.6	0.5	4.0
Gamma	18.1	0.6	3.5

BIBLIOGRAFIA

1. Alper, C.A., Plasma Protein Measurements as a Diagnostic Aid, N Eng J Med, 291:287-290, 1974.
2. Tiselius, A., A New Approach for Electrophoretic Analysis of Colloidal Mixtures, Trans Faraday Soc, 33:524-531, 1937.
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. Ritzmann, S.E. and Daniels, J.C., Serum Protein Abnormalities: Diagnostic and Clinical Aspects, Little, Alan R. Liss Inc., 1982.
5. Killingsworth, L.M. et al, Protein Analysis, Diag Med, Jan/Feb., 47-58, 1980.
6. Henry, R.J., Cannon, D.C., and Winkelman, J.W., ed., Clinical Chemistry Principles and Techniques, 437, Harper and Row, Hagerstown, 1974.
7. Killingsworth, L.M., Plasma Protein Patterns in Health and Disease, CRC Crit Rev in Clin Lab Sci, 1-30, August, 1979.

USO PREVISTO

El procedimiento de electroforesis de proteínas séricas de Helena tiene como objeto la separación y cuantificación de las proteínas séricas mediante electroforesis en acetato de celulosa.

El suero contiene más de cien proteínas individuales, cada una de ellas con una serie de funciones específicas que están sujetas a variaciones en su concentración bajo diferentes condiciones patológicas. Desde que Tiselius² introdujera la electroforesis de límites móviles y el uso posterior de la electroforesis por zonas, se han separado las proteínas séricas de acuerdo con su carga eléctrica en cinco fracciones clásicas: albúmina, proteínas gamma, alfa1, alfa2 y beta. Cada una de las zonas electroforéticas clásicas (con la excepción de la albúmina) contiene normalmente 2 o más componentes. Se han estudiado aproximadamente quince proteínas séricas porque se pueden medir con facilidad.

Las proteínas son moléculas grandes compuestas de aminoácidos unidos de forma covalente. Dependiendo de las distribuciones de los electrones que se producen de enlaces covalentes o iónicos de subgrupos estructurales, las proteínas tienen diferentes cargas eléctricas a un pH dado. En el procedimiento de proteínas séricas de Helena, las proteínas se separan de acuerdo con sus respectivas cargas eléctricas a un pH 8,8 en una placa de acetato de celulosa usando tanto las fuerzas electroforéticas como electroendosmóticas presentes en el sistema. Después de que se separen las proteínas, la placa se coloca en una solución de ácido sulfosalicílico y ácido tricloroacético (para inmovilizar las proteínas) y Ponceau S (para teñir las bandas de proteínas). La intensidad de coloración tiene relación con la concentración de las proteínas. Después de la deshidratación en metanol, el fondo de la placa se convierte en transparente por el tratamiento con una solución de limpieza.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

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

COMPOSICIÓN

1. Colorante Ponceau S (N° Cat. 5526)

La tinción se suministra en forma de polvo y es una mezcla de Ponceau S y ácido sulfosalicílico. Disolver el contenido del frasco en 1 litro de agua desionizada y mezclar durante 30 minutos o hasta que esté completamente disuelto.

2. Tampón HR Electra® (N° Cat. 5805)

Contiene un tampón Tris-barbital Barbital sódico, pH 8,6-9,0. Disolver un paquete de tampón seco en 750 ml de agua destilada. El tampón está listo para usar cuando todo el material está disuelto y completamente mezclado.

3. Ayuda de limpieza (N° Cat. 5005)

Contiene polietilenglicol. Para preparar la solución de limpieza, mezclar 30 partes de ácido acético glacial, 70 partes de metanol absoluto y 4 partes de ayuda de limpieza. Agitar hasta que esté bien mezclado.

4. Placa de acetato de celulosa Titan III® (N° Cat. 3023 ó 3024)

Contiene una placa de acetato de celulosa. Seguir las instrucciones de uso para la preparación.

5. Otros componentes del kit

Cada kit contiene instrucciones de uso.

ALMACENAMIENTO Y PERÍODO DE VALIDEZ

1. Colorante Ponceau S (Nº Cat. 5526)

El colorante puede conservarse tal como se envasa o en un plato de coloración cerrado herméticamente a 15...30°C. El colorante no usado es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. El deterioro puede verse indicado por la aparición de una excesiva evaporación o de grandes cantidades de precipitados.

2. Tampón HR Electra® (Nº Cat. 5805)

El tampón envasado permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. El tampón diluido permanece estable durante 2 meses a 15...30°C cuando se envasa herméticamente cerrado. Puede indicarse el deterioro por los signos de humedad o decoloración o si se hace turbio.

3. Ayuda de limpieza (Nº Cat. 5005)

La ayuda a la limpieza es estable a 15...30°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. La aparición de contaminación macroscópica o cambio de coloración puede ser un indicio de deterioro. Desechar si las placas aparecen turbias después del procedimiento de limpieza.

4. Placa de acetato de celulosa Titan III® (Nº Cat. 3023 ó 3024)

La placa de acetato de celulosa debe almacenarse a una temperatura entre 15...30°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

La muestra de elección es suero. Debe evitarse el uso de plasma, porque el fibrinógeno aparecerá como una banda estrecha diferenciada entre las fracciones beta y gamma. El líquido cefalorraquídeo puede usarse si se concentra aproximadamente 100 veces; puede usarse la orina si se concentra hasta 300 veces, dependiendo de la concentración de proteínas original.

Factores que interfieren:

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.

Conservación y estabilidad: Se ha de elegir como muestra suero o plasma recién recogidos. Si fuera necesario guardar las muestras, pueden almacenarse cubiertas a 2...6°C durante 48 horas. Las muestras de líquido cefalorraquídeo y de orina pueden usarse después de una concentración adecuada con un concentrador.

ARTÍCULOS NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS:

Ácido acético al 5%: Mezclar 50 ml de ácido acético cristalizado con 950 ml de agua destilada.

Metanol absoluto, grado reactivo

Nº Cat. 3024 Placas de acetato de celulosa Titan® III (94 x 76 mm)

Nº Cat. 3023 Placas de acetato de celulosa Titan® III (60 x 76 mm)

Nº Cat. 4084 Aplicador Super Z

Nº Cat. 4090 Aplicador Super Z-12

Nº Cat. 4085 Placa del pozo de muestra Super Z-12 (2)

Nº Cat. 4096 Placa del pozo de muestra Super Z-12 (2)

Nº Cat. 4094 Base de alineamiento Super CPK

Nº Cat. 4086 Base de alineamiento Super Z

Nº Cat. 5114 Equipo de tinción 700

- Nº Cat. 5122 Equipo de tinción 1000
- Nº Cat. 5526 Ponceau S
- Nº Cat. 5093 Tamponizador
- Nº Cat. 5005 Ayuda de limpieza
- Nº Cat. 5090 Prep. Zip Zone®
- Nº Cat. 1283 Cámara Zip Zone®
- Nº Cat. 5081 Mechass de Cámara Zip Zone®
- Nº Cat. 5037 Láminas secantes (102 x 108 mm)
- Nº Cat. 5034 Láminas secantes (76 x 102mm)
- Nº Cat. 5805 Tampón HR Electra
- Nº Cat. 5053 Sobres de plástico Titan (102 x 120 mm)
- Nº Cat. 5052 Sobres de plástico Titan (63 x 120 mm)
- Nº Cat. 6008 Microdispensador y tubos
- Nº Cat. 8008 Micro Caperuza (220 V)
- Nº Cat. 5205 Manual de electroforesis
- Nº Cat. 5211 Impresos de informes de proteínas séricas
- Nº Cat. 5000 Marcador Helena
- Nº Cat. 5109 Gráfica de Control de calidad
- Nº Cat. 5015 Etiquetas de identificación Titan
- Nº Cat. 5002 Palo de pegamento

PROCEDIMIENTO PASO A PASO

1. Codificar adecuadamente el número necesario de Placas Titan III marcando en el lado brillante, duro (Mylar®), con un Marcador Helena Biosciences. Se sugiere que se coloque la marca de identificación en una esquina de la placa de manera que esté siempre alineada con la muestra Nº 1.
2. Empapar las placas en tampón HR diluido durante 20 minutos. Las placas deben empaparse en el Tamponizador de acuerdo con las instrucciones de uso incluidas con el tamponizador. Otra alternativa es humedecer las placas haciendo descender lenta y uniformemente un soporte de placas en el tampón de manera que no quede aire atrapado en las placas. **NOTA:** Puede usarse el mismo tampón de empapar para empapar hasta 12 placas o durante aproximadamente una semana si se conserva herméticamente cerrado. Si se usa durante períodos más prolongados, los disolventes residuales de las placas pueden acumularse en el tampón o la evaporación puede alterar la concentración de tampón.
3. Verter aproximadamente 100 ml de tampón HR diluido en cada una de las secciones externas de la cámara.
4. Humedecer dos mechas desechables en el tampón y envolver una sobre cada puente de soporte, asegurándose de que hace contacto con el tampón y de que no hay burbujas de aire bajo las mechas.
5. Cubrir la cámara para impedir la evaporación del tampón.
6. Llenar cada pozo en la placa de muestra con 3 ml de muestra usando el microdispensador. Expeler las muestras como una gota en la punta del tubo de vidrio; luego tocar con esta gotita en el pozo. Cubrir las muestras con un portaobjetos de vidrio si no se usan en 2 minutos.
7. Cebarr el aplicador hundiendo las puntas en los pozos de muestra 3 ó 4 veces. Aplicar esta carga a una pieza de papel secante. No cargar el aplicador de nuevo en este momento, sino pasar al paso siguiente.

8. Retirar la placa humedecida del tampón y secar una vez con firmeza entre dos secantes. Antes de colocar la placa en la base de alineación, colocar una gota de agua o tampón en el centro de la base de alineación. Así se evitará que la placa se desplace durante la aplicación de la muestra. Colocar la placa en la base de alineación, con el lado de acetato de celulosa hacia arriba, alineando el borde inferior de la placa con la línea negra marcada "APLICACIÓN DEL CENTRO". La marca de identificación debe estar alineada con la muestra N° 1.
9. Aplicar la muestra a la placa deprimiendo las puntas del aplicador en el pozo de muestra 3 ó 4 veces y transferir el aplicador a la base de alineación. Pulsar el botón y mantenerlo pulsado 5 segundos.
10. Colocar la(s) placa(s) en la cámara, con el lado de acetato de celulosa hacia abajo. Colocar un peso sobre la(s) placa(s) para asegurar el contacto con las mechas. Cubrir la cámara con firmeza y esperar 30 segundos para que la(s) placa(s) se equilibren.
11. Realizar la electroforesis de la(s) placa(s): 15 minutos, 180 voltios. **NOTA:** Debe aplicarse corriente en 5 minutos después de que la(s) placa(s) se haya colocado en la cámara.
12. Después de la electroforesis, retirar la placa de la cámara y colocar en 40-50 ml de colorante Ponceau S durante 6 minutos. (Cuando se tiñen 2 o más placas, realizar el protocolo verticalmente en un soporte. **NOTA:** El colorante puede reutilizarse hasta que el fondo de la placa contenga precipitado de colorante.
13. Decolorar en 3 lavados de 2 minutos de ácido acético al 5% o hasta que el fondo de la placa esté blanco. En este punto, la(s) placa(s) se pueden secar y guardar como registro permanente. Si se desea lograr un fondo transparente (es decir, para una densitometría), pasar al siguiente paso.
14. Deshidratar enjuagando la placa en 2 lavados de metanol absoluto de 2 minutos cada lavado. Dejar que la placa se drene durante 5-10 segundos antes de colocar en la solución siguiente.
15. Colocar la placa en la solución de limpieza durante 5-10 minutos.
16. Drenar el exceso de solución, luego colocar la placa, con el lado de acetato hacia arriba, en un secante y en un horno de secado a 50...60°C durante 15 minutos o hasta que esté seco.

Evaluación de las bandas de proteínas

Estudiar las placas en un densitómetro usando un filtro de 525 nm y la hendidura estrecha.

Estabilidad del producto final

La placa de proteína sérica terminada, seca, es estable durante un período de tiempo indefinido y puede conservarse en sobres de plástico Titan,

Calibración

Debe usarse la Tableta de Pasos de Densidad Óptica (N° Cat. 1030) para asegurar la linealidad del instrumento y debe usarse un estándar de densitómetro de densidad neutra para validar el ajuste a cero y la sensibilidad del instrumento.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS^{5,7}

La banda de movimiento más rápido y normalmente la más prominente es la banda de albúmina que se encuentra más próxima al borde anódico de la placa. La banda tenue siguiente a ésta es la alfa globulina, seguida por la alfa2 globulina y las globulinas beta y gamma.

Cálculo de los desconocidos

El densitómetro CliniScan™ de Helena BioSciences y otros densitómetros de Helena BioSciences con accesorios de ordenador imprimirán automáticamente el porcentaje relativo y los valores absolutos para cada banda. Otra alternativa es calcular manualmente el porcentaje relativo de cada banda a partir de la escala del integrador en el estudio. Consultar el manual del operador suministrado con el densitómetro. El porcentaje relativo de cada banda se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Nº de unidades de integración de la banda}}{\text{Unidades totales de integración}} \times 100 = \text{Porcentaje relativo de la banda}$$

$$\text{Porcentaje relativo de la banda} \times \text{proteína sérica total} = \text{Valor absoluto de proteína en cada banda}$$

CONTROL DE CALIDAD

Se dispone de dos tipos diferentes de materiales de control de calidad del intervalo normal para usar con los kits de electroforesis en las proteínas séricas. Utilizar al menos uno de estos sueros control en cada desarrollo.

Nº Cat. 5112 Control de suero de electroforesis

Nº Cat. 7024 Control de suero normal Kentrol

VALORES DE REFERENCIA

Los valores esperados para la electroforesis de proteínas séricas en acetato de celulosa teñido con Ponceau S se determinaron a partir de un estudio de 51 sujetos normales. Estos valores son sólo para fines ilustrativos. Cada laboratorio debe establecer su propio intervalo.

Fracción de proteínas	Intervalo gd/l
Albúmina	3,63 - 4,91
Alfa1	0,11 - 0,35
Alfa2	0,65 - 1,17
Beta	0,74 - 1,26
Gamma	0,58 - 1,74

Variaciones de los valores esperados⁴

Hay estudios que muestran que los valores son los mismos para varones y 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 presenta un descenso en los niveles de proteínas totales, albúmina y fracciones alfa2 y beta; un ligero aumento de la fracción alfa1 y un aumento o nivel normal de la fracción gamma (en gran medida de origen materno). Las gamma se reducen rápidamente cerca de los 3 meses de edad, mientras que otras fracciones ya han alcanzado niveles adultos en ese momento. 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.

Los resultados en individuos normales cubrirán las variaciones relacionadas con la edad y el sexo y las variaciones biológicas día a día. Entre las enfermedades en las que se observan patrones anormales están la respuesta inflamatoria, la enfermedad reumática, las enfermedades hepáticas, los trastornos por pérdida de proteínas, las discrasias de células plasmáticas y las deficiencias genéticas. Se han observado patrones variantes durante el embarazo.

Otras pruebas adicionales necesarias

Deben evaluarse el electroferograma o el trazado densitométrico para ver si hay anomalías. Si se observan anomalías, deben iniciarse estudios de seguimiento adecuados. Entre estos pueden estar la inmunoelectroforesis, la inmunofijación, la cuantificación de las inmunoglobulinas componentes individuales, el estudio de la médula ósea y otras pruebas adecuadas.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Se estudió un suero normal 26 veces consecutivas usando el método descrito antes. Se obtuvieron los siguientes datos:

Fracción de proteína	Media (% relativo)	DE (+/-)	CV (%)
Albumina	55,7	1,4	2,5
Alfa 1	3,1	0,4	12,5
Alfa 2	11,3	0,4	3,8
Beta	11,6	0,5	4,0
Gamma	18,1	0,6	3,5

BIBLIOGRAFÍA

1. Alper, C.A., Plasma Protein Measurements as a Diagnostic Aid, N Eng J Med, 291:287-290. 1974.
2. Tiselius, A., A New Approach for Electrophoretic Analysis of Colloidal Mixtures, Trans Faraday Soc, 33:524-531, 1937.
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. Ritzmann, S.E. and Daniels, J.C., Serum Protein Abnormalities: Diagnostic and Clinical Aspects, Little, Alan R. Liss Inc., 1982.
5. Killingsworth, L.M. et al, Protein Analysis, Diag Med, Jan/Feb., 47-58, 1980.
6. Henry, R.J., Cannon, D.C., and Winkelman, J.W., ed., Clinical Chemistry Principles and Techniques, 437, Harper and Row, Hagerstown, 1974.
7. Killingsworth, L.M., Plasma Protein Patterns in Health and Disease, CRC Crit Rev in Clin Lab Sci, 1-30, August, 1979.

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

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

HL-2-1436P 2007/06 (5)