



α -MSH-RIA

RB303RUO

History

Summary of change:

Previous Version: 191011-1	Current Version: 200224-1
	Addition of the following sentence at the end of the English IFU: "Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: https://www.diasource-diagnostics.com/ "

Read entire protocol before use.

α -MSH RIA

I. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the *in vitro* quantitative measurement of α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) in human plasma or cerebrospinal fluid.

For Research use only. Not for use in diagnostic procedures.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource α -MSH RIA
- B. **Catalog number :** RB303RUO : 100 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :

Tel: +32 (0) 10 84.99.11

Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. BACKGROUND

α -Melanocyte stimulating hormone (α -MSH) is a 13 amino acids peptide with a molecular weight of 1665. The N-terminal serin is acetylated and the C-terminal valine is amidated. The amino acid sequence of α -MSH is identical to ACTH 1-13 in man.

α -MSH is derived from pro-opiomelanocortin, a precursor protein which contains, within its structure, the sequences of other melanotropic peptides like α -, β -MSH and ACTH.

α -MSH stimulates melanosome dispersion within dermal melanocytes and melanin biosynthesis within epidermal melanocytes.

α -MSH is a potent modulator of fever and inflammation. Plasma α -MSH increases in human subjects with high fever caused by endotoxin administration. The average plasma α -MSH level has been found higher in subjects with AIDS than in control subjects.

The result shall not be used for clinical diagnosis or patient management.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

α -MSH is analysed by the competitive radioimmunoassay using an antiserum to an α -MSH-albumin conjugate. α -MSH in standards and samples compete with ^{125}I -labelled α -MSH in binding to the antibodies.

^{125}I - α -MSH binds in a reverse proportion to the concentration of α -MSH in standards and samples. In order to increase the sensitivity of the assay a sequential assay with delayed addition of ^{125}I - α -MSH is performed. Antibody-bound ^{125}I - α -MSH is separated from the free fraction using the double antibody polyethylene glycol precipitation technique. The radioactivity of the precipitates is measured. The antiserum used in this kit is directed to the C-terminal part of the α -MSH molecule and shows no cross-reactivity with adrenocorticotrophic hormone.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	100 Tests Kit	Colour Code	Reconstitution
ANTISERUM Anti- α -MSH : Rabbit antiserum raised against α -MSH, conjugated to bovine serum albumin in phosphate buffer with sodium azide and aprotinin.	1 vial lyophilised	Blue	Add 22 ml distilled water
Ag ^{125}I TRACER: ^{125}I iodine labelled α -MSH in phosphate buffer with normal rabbit serum, EDTA disodium salt, sodium azide and aprotinin.	1 vial lyophilised 28 kBq	Red	Add 25 ml distilled water
Ab PEG Double antibody-PEG : goat anti-rabbit-IG antiserum in phosphate buffer with human serum albumin, EDTA disodium salt, NaN_3 and polyethylene glycol.	1 vial 50 mL	Green	Ready for use
DIL BUF Diluent : Phosphate buffer containing human serum albumin, EDTA disodium salt, sodium azide and aprotinin. To be used for the preparation of α -MSH standards.	1 vial 25 mL	Black	Ready for use
CAL α -MSH standard in phosphate buffer containing human serum albumin, EDTA disodium salt, sodium azide (<0.1%) and aprotinin.	1 vial lyophilised	Yellow	Reconstitute with distilled water by the volume stated on vial label
CONTROL N Controls - N = 1 or 2 Contains sodium azide.<0.1%.	2 vials lyophilised	Silver	Add 1 mL distilled water

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

1. Distilled water.
2. 11-13 x 55 mm disposable tubes, glass (for dilution of the standard).
3. 11-13 x 55 mm disposable tubes, polystyrene (for the radioimmunoassay procedure).
4. Pipettes: 1 and 5 mL.
5. Measuring cylinder: 25 mL.
6. Pipettes with disposable tips: 100, 200 and 500 μL .
7. Vortex mixer.
8. Centrifuge, refrigerated, giving minimum 1700 x g.
9. Gamma counter.

VII. REAGENT PREPARATION

- A. Anti- α -MSH** : Reconstitute with 22 mL of distilled water. Store at 2-8° C.
- B. ^{125}I - α -MSH** : Reconstitute with 25 mL of distilled water. Store at -18° C or lower if reused.

- C. Double antibody PEG** : Ready for use. Mix thoroughly before use. Store at 2-8° C.
- D. Diluent** : Ready for use. Store at 2-8° C.
- E. α -MSH standard** : Reconstitute with distilled water by the volume stated on vial label. Store at -18° C or lower if reused.
- F. Controls** : Reconstitute with 1 mL distilled water. Store at -18° C or lower if reused.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

Store all reagents at 2-8° C before reconstitution and use. The water used for reconstitution of lyophilized reagents should be distilled in an all-glass apparatus or be of corresponding purity. Dissolve the contents in a vial by gentle inversion and avoid foaming. The stability of the reagents is found on the label of the vials. For lyophilized reagents the expiry dates are valid for the unreconstituted reagents. Reconstituted reagents are stable for 10 weeks, or until the expiry date is reached, stored correctly.

IX. SPECIMEN COLLECTION

Blood is collected in tubes containing EDTA and aprotinin (Trasylo® or equivalent) (5000 KIU aprotinin (Trasylo® or equivalent) in a 10 mL vacutainer). The sample is cooled in an ice-bath immediately. Plasma is separated by centrifugation at 4° C. The plasma should be frozen within 1 hour and stored at -18° C or lower until assayed. Repeated freezing and thawing should be avoided.

X. PROCEDURE

A. Handling notes

Accuracy in all pipetting steps is essential. The assay is performed with duplicates (standards, controls, samples, control tubes for non-specific binding and total activity).

A complete assay includes:

Standard : 7 concentrations: 0, 4.7, 9.4, 18.8, 37.5, 75 and 150 pmol/L.

Samples

Controls : 2 controls with known concentrations of α -MSH for quality control.

Tubes for determination of the non-specific binding for standards and samples.

Tubes for determination of the total radioactivity added.

B. Procedure

1. Reconstitute the reagents according to the instructions.
2. Prepare the α -MSH working standards by dilution of the α -MSH standard 300 pmol/L with diluent according to the following (use glass-tubes for standard preparation):
 - a/ 1.00 mL standard 300 pmol/L + 1.00 mL diluent = 150 pmol/L.
 - b/ 1.00 mL standard 150 pmol/L + 1.00 mL diluent = 75 pmol/L.
 - c/ 1.00 mL standard 75 pmol/L + 1.00 mL diluent = 37.5 pmol/L.
 - d/ 1.00 mL standard 37.5 pmol/L + 1.00 mL diluent = 18.8 pmol/L.
 - e/ 1.00 mL standard 18.8 pmol/L + 1.00 mL diluent = 9.4 pmol/L.
 - f/ 1.00 mL standard 9.4 pmol/L + 1.00 mL diluent = 4.7 pmol/L.
 - g/ Diluent = 0 pmol/L.

Store the standard solutions at -18° C or lower if reused.
3. Pipette 100 μL of standards a-g (0-150 pmol/L), samples and controls in their respective tubes. Pipette 100 μL of the zero-standard in the NSB-tubes.
4. Add 200 μL anti- α -MSH to all tubes except the NSB- and TOT-tubes.
5. Add 200 μL diluent to the NSB-tubes.
6. Vortex-mix and incubate for 20-24 hours at 2-8° C.
7. Add 200 μL ^{125}I - α -MSH to all tubes. The TOT-tubes are sealed and kept aside.
8. Vortex-mix and incubate for 20-24 hours at 2-8° C.
9. Add 500 μL double antibody-PEG to all tubes except the TOT-tubes (mix this reagent before pipetting).
10. Vortex-mix and incubate for 30-60 minutes at 2-8° C.
11. Centrifuge the tubes for 15 minutes at +4° C (1700 x g).
12. Decant the supernatants immediately after centrifugation.
13. Count the radioactivity of the precipitates in a gamma counter (counting time 2-4 minutes).

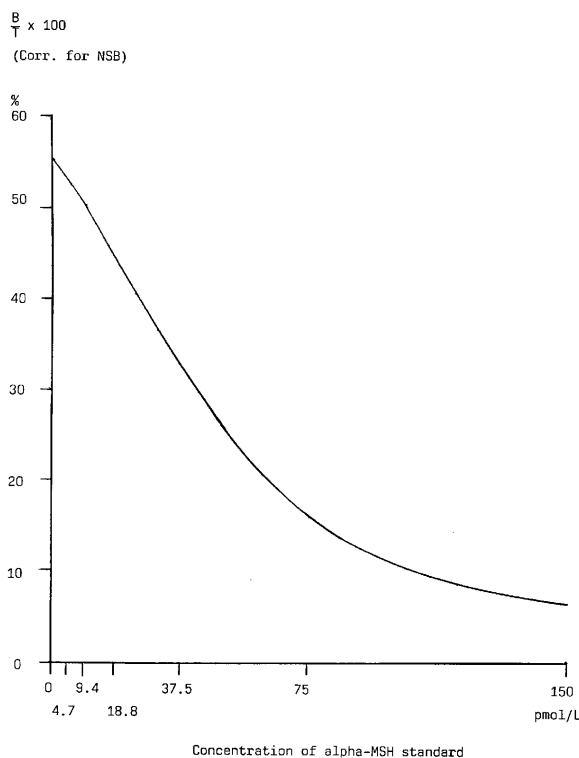
XI. CALCULATION OF RESULTS

1. Subtract the average count rate (CPM) of the non-specific binding from the count rate (CPM) of the replicates of standards, controls and samples.
2. A standard curve is generated by plotting the precipitated CPM, bound fraction (in CPM or %B/TOT) against the concentrations of the α -MSH standards.
3. Interpolate the α -MSH concentrations of the samples and controls from the generated standard curve.

4. The standard curve and the calculation of the concentrations in the samples can also be done by a computer method. A spline method may be used.

XII. TYPICAL DATA

EXAMPLE OF ALPHA-MSH STANDARD CURVE



XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Sensitivity

The sensitivity calculated from a decrease in binding of 2 SD in the zero standard is 3 pmol/L.

B. Precision

Intra assay variation:

Level	Coefficient of variation (%CV)
16.2 pmol/L	11.8
33.6 pmol/L	4.7
77.7 pmol/L	2.9

Total variation (Inter assay):

Level	Coefficient of variation (%CV)
16.5 pmol/L	13.0
37.8 pmol/L	8.4
79.6 pmol/L	4.0

C. Specificity

The following cross reactions have been found:

Peptide	Cross reaction
α -MSH	100.0%
Des-acetyl- α -MSH	100.0%
Des-amido- α -MSH	<0.002%
ACTH 1-13	<0.002%
ACTH 1-24	<0.002%
ACTH 1-39	<0.002%
Beta-MSH	<0.002%
Gamma-MSH	<0.002%

D. Interference

Samples displaying cloudiness, hemolysis, hyperlipemia or containing fibrin may give inaccurate results.

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

In order to enable the laboratory to completely monitor the consistent performance of the assay, the following important factors should be checked.

1. The found concentrations of the controls

The found concentrations of the controls should be within the limits given on the labels of the vials.

2. Total counts

Counts obtained should approximate the expected CPM when adjusted for counter efficiency and radioactive decay. The content of ^{125}I - α -MSH in this kit will give 10.500 CPM

(-5, +20%) at the reference date (counting efficiency: 80%).

3. Maximum binding (Bo/TOT)

Calculate for each assay the % bound radioactivity in the zero-standard:

$$\frac{B_0}{TOT} \times 100$$

4. Non-specific binding (NSB/TOT)

Calculate for each assay the % non-specific binding:

$$\frac{NSB}{TOT} \times 100$$

The non-specific binding should be less than 6%.

5. Slope of standard curve

For example, monitor the 80, 50 and 20% points of the standard curve for run to run reproducibility.

XV. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For research use only.

As the regulations may vary from one country to another, it is essential that the person responsible for the laboratory are familiar with current local regulations, concerning all aspects of radioactive materials of the type and quantity used in this test.

This kit contains components of human origin. They have been tested by immunoassay for hepatitis B surface antigen, antibodies to HCV and for antibodies to HIV-1 and HIV-2 and found to be negative. Nevertheless, all recommended precautions for the handling of blood derivatives, should be observed.

Steps should be taken to ensure the proper handling of the radioactive material, according to local and/or national regulations. Only authorized personnel should have access to the reagents.

The following precautions should be observed when handling radioactive materials:

- Radioactive material should be stored in specially designated areas, not normally accessible to unauthorized personnel.
- Handling of radioactive material should be conducted in authorized areas only.
- Care should be exercised to prevent ingestion and contact with the skin and clothing. Do not pipette radioactive solutions by mouth.
- Drinking, eating or smoking should be prohibited where radioactive material is being used.
- Hands should be protected by gloves and washed after using radioactive materials.
- Work should be carried out on a surface covered by disposable absorbing material.
- Spills of radioactive material should be removed immediately, and all contaminated materials disposed as radioactive waste. Contaminated surfaces should be cleaned with a detergent.

The reagents in this kit contain sodium azide. Contact with copper or lead drain pipes may result in the cumulative formation of highly explosive azide deposits. On disposal of the reagents in the sewerage, always flush with copious amounts of water, which prevents metallic azide formation. Plumbing suspected of being contaminated with these explosive deposits should be rinsed thoroughly with 10% sodium hydroxide solution.

XVII. BIBLIOGRAPHY

1. Noveles, R.R.
Actions of Melanocyte-Stimulating Hormone.
Chap. 35, pp. 347-366.
Knobil, E. and Sawyer, W.H. eds.
Handbook of Physiology, see y, vol. 4, pt. 2.
American Physiological Society, Washington, D.C., 1974.
2. Noveles, R.R.
Cellular Aspects of Hormonally Controlled Pigment Translocations Within Chromatophores of Poikilothermic Vertebrates.
Amer. zool. 23:559-568, 1983.
3. Ralp, C.L., Firth, B.T. and Turner, J.S.
Role of the Pineal Body in Ectotherm Thermoregulation.
Amer. zool. 19:273-293, 1979.
4. Sawyer, T.K., Hruby, V.J., Hadley, M.F. and Engel, M.H.
 α -Melanocyte Stimulating Hormone:
Chemical Nature and Mechanism of Action.
Amer. zool. 23:529-650, 1983.
5. Catania, A., Airaghi, L., Manfredi, M.G., Vivirito, M.C., Milazzo, F., Lipton, J.M. and Zanussi, C.
Proopiomelanocortin-Derived Peptides and Cytokines:
Relations in Patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome.
Clinical Immunology and Immunopathology, vol. 66, no. 1, January, pp 73-79, 1993.
6. Lunec, J., et al.
Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone Immunoreactivity in Melanoma Cells.
Pathobiology (1990), 58(4):193-197.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	Total count	NSB	Calibrators (0-6)	Controls	Samples
Calibrator	-	-	100 μ l	-	-
Controls	-	-	-	100 μ l	-
Samples	-	-	-	-	100 μ l
Anti- α -MSH	-	-	200 μ l		
Diluent	-	200 μ l	-	-	-
Vortex-mix and incubate for 20-24 hours at 2-8°C.					
¹²⁵ I Tracer	200 μ l				
Vortex-mix and incubate for 20-24 hours at 2-8°C.					
Double antibody PEG	-	500 μ l			
Vortex-mix and incubate for 30-60 min at 2-8°C.					
Centrifuge 15 min (1700 g; 4°C)					
Decant and count the radioactivity of the precipitates					

DIAsource Catalogue Nr : RB303RUO	Revision nr : 200224-1
--------------------------------------	---------------------------

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Revision date : 24/02/2020

Leggere integralmente il protocollo prima dell'uso.

α -MSH RIA

I. DESTINAZIONE D'USO

Dosaggio radioimmunologico per la misurazione quantitativa *in vitro* di ormoni stimolanti α -melanociti (α -MSH) nel plasma umano o nel liquido cerebrospinale.

Solo per uso nella ricerca. Non utilizzare in procedure diagnostiche.

II. INFORMAZIONI GENERALI

- A. Nome brevettato :** DIAsource α -MSH RIA
- B. Numero di catalogo :** RB303RUO : 100 test
- C. Fabbricato da :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Per assistenza tecnica o per informazioni sull'ordinazione, contattare:

Tel: +32 (0) 10 84.99.11

Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. ANTEFATTO

L'ormone stimolante il α -melanocite (α -MSH) è un peptide di 13 aminoacidi con peso molecolare di 1665. La serina N-terminale è acetilata e la valina C-terminale è amidata. La sequenza amminoacida di α -MSH è identica a ACTH 1-13 nell'uomo.

α -MSH è derivato dalla proopiomelanocortina, proteina precursore che contiene nella propria struttura la sequenza di altri peptidi melanotropici, come α -, β -MSH e ACTH.

α -MSH stimola la dispersione di melanosoma nei melanociti dermici e la biosintesi della melanina con i melanociti epidermici.

α -MSH è un potente modulatore della febbre e dell'infiammazione. Plasma α -MSH aumenta nei soggetti umani con febbre alta provocata dalla somministrazione di endotossina. Il livello medio di plasma α -MSH è risultato essere più alto nei soggetti con AIDS rispetto ai soggetti di riscontro.

Il risultato non dovrà essere usato a scopo di diagnosi clinica o gestione del paziente.

IV. PRINCIPI DEL METODO

α -MSH è analizzato dal dosaggio radioimmunologico competitivo con un antisiero ad un coniugato α -MSH-albumina. α -MSH negli standard e nei campioni compete con ^{125}I -MSH nel legarsi agli anticorpi.

^{125}I - α -MSH si lega in proporzione inversa alla concentrazione di α -MSH in standard e campioni. Per aumentare la sensibilità del test viene eseguito un test sequenziale con aggiunta ritardata di ^{125}I - α -MSH. ^{125}I - α -MSH legato all'anticorpo è separato dalla frazione libera con la tecnica di precipitazione doppio anticorpo in glicole polietilenico. Viene misurata la radioattività della precipitazione. L'antisiero usato in questo kit è mirato alla parte C-terminale della molecola α -MSH e non denota reattività incrociata con l'ormone adrenocorticotropico.

V. REAGENTI FORNITI

Reagenti	Kit per 100 test	Codice colore	Ricostruzione
ANTISERUM Anti- α -MSH : Antisiero di coniglio contro α -MSH, coniugato a albumina del siero di bovino in tampone fosfato con azoturo di sodio e aprotinina.	1 fiala liofilizzato	Blu	Aggiungere 22 ml di acqua distillata
Ag ^{125}I TRACCIANTE: ^{125}I iodio α -MSH in tampone fosfato con normale siero di coniglio, sale disodico EDTA, azoturo di sodio e aprotinina.	1 fiala liofilizzato 28 kBq	Rosso	Aggiungere 25 ml di acqua distillata
Ab PEG Doppio anticorpo-PEG : antisiero di capra anti-coniglio IG in tampone fosfato con albumina di siero umano, sale disodico EDTA, Na_3 e glicole polietilenico.	1 fiala 50 mL	Verde	Pronto all'uso
DIL BUF Diluyente : Tampone fosfato contenente albumina di siero umano, sale disodico EDTA, azoturo di sodio e aprotinina. Da usare per la preparazione di standard α -MSH.	1 fiala 25 mL	Nero	Pronto all'uso
CAL α -MSH standard in tampone fosfato contenente albumina di siero umano, sale disodico EDTA, azoturo di sodio (<0.1%) e aprotinina.	1 fiala liofilizzato	Giallo	Ricostituire con acqua distillata per il volume indicato sull'etichetta della fiala
CONTROL N Controlli - N = 1 o 2 Contiene azoturo di sodio (<0.1%).	2 fiale liofilizzato	Argento	Aggiungere 1 mL di acqua distillata

VI. NON IN DOTAZIONE

Il seguente materiale è necessario ma non fornito con il kit:

1. Acqua distillata.
2. Tubi usa e getta in vetro 11-13 x 55 mm (per diluire lo standard).
3. Tubi usa e getta in polistirene 11-13 x 55 mm (per la procedura del dosaggio radioimmunologico).
4. Pipette: 1 e 5 mL.
5. Cilindro di misura: 25 mL.
6. Pipette con punte usa e getta: 100, 200 e 500 μL .
7. Agitatore a vortice.
8. Centrifuga, refrigerata, per almeno 1700 x g.
9. Contatore Gamma.

VII. PREPARAZIONE DEL REAGENTE

- A. Anti- α -MSH** : Ricostituire con 22 mL di acqua distillata. Conservare a 2-8° C.
- B. ^{125}I - α -MSH** : Ricostituire con 25 mL di acqua distillata. Conservare a -18° C o a temperature inferiori se riutilizzato.

- C. Doppio anticorpo PEG** : Pronto all'uso. Miscelare accuratamente prima dell'uso. Conservare a 2-8° C.
- D. Diluyente** : Pronto all'uso. Conservare a 2-8° C.
- E. α -MSH standard** : Ricostituire con acqua distillata per il volume indicato sull'etichetta della fiala. Conservare a -18° C o a temperature inferiori se riutilizzato.
- F. Controlli** : Ricostituire con 1 mL di acqua distillata. Conservare a -18° C o a temperature inferiori se riutilizzato.

VIII. CONSERVAZIONE E DATA DI SCADENZA DEI REAGENTI

Conservare tutti i reagenti a 2-8° C prima della ricostituzione e dell'uso. L'acqua usata per la ricostituzione degli agenti liofilizzati deve essere distillata in un apparato completamente in vetro oppure deve avere la stessa purezza. Sciogliere i contenuti in una fiala girandola delicatamente evitando la formazione di schiuma. La stabilità dei reagenti è riportata sull'etichetta delle fiale. Per i reagenti liofilizzati, le date di scadenza sono valide per i reagenti non ricostituiti. I reagenti ricostituiti sono stabili per 10 settimane o fino alla data di scadenza se conservati correttamente.

IX. RACCOLTA DI CAMPIONI

Il sangue è raccolto in tubi contenenti EDTA e aprotinina (Trasylol® o equivalente) (5000 KIU aprotinina (Trasylol® o equivalente) in un vacutainer da 10 mL). Il campione viene raffreddato immediatamente in un bagno di ghiaccio. Il plasma viene separato con una centrifugazione a 4° C. Il plasma deve essere surgelato entro 1 ora e conservato -18° C o a temperatura inferiore fino al test. Evitare di congelare e scongelare più volte.

X. PROCEDURA

A. Note sulla manipolazione

È essenziale eseguire il pipettaggio con precisione. Il test è eseguito con duplicati (standard, controlli, campioni, tubi di controllo per legami non specifici e attività totale).

Un test completo comprende:

Standard : 7 concentrazioni: 0, 4.7, 9.4, 18.8, 37.5, 75 e 150 pmol/L.

Campioni

Controlli : 2 diversi controlli con concentrazione nota di α -MSH per il controllo qualità.

Tubi per la determinazione del legame non specifico per standard e campioni.

Tubi per la determinazione della radioattività totale aggiunti.

B. Procedura

1. Ricostituire i reagenti secondo le istruzioni.
2. Preparare gli standard di lavoro α -MSH diluendo lo standard α -MSH 300 pmol/L con diluyente secondo lo schema seguente (usare tubi in vetro per la preparazione standard):
a/ 1.00 mL standard 300 pmol/L + 1.00 mL diluyente = 150 pmol/L.
b/ 1.00 mL standard 150 pmol/L + 1.00 mL diluyente = 75 pmol/L.
c/ 1.00 mL standard 75 pmol/L + 1.00 mL diluyente = 37.5 pmol/L.
d/ 1.00 mL standard 37.5 pmol/L + 1.00 mL diluyente = 18.8 pmol/L.
e/ 1.00 mL standard 18.8 pmol/L + 1.00 mL diluyente = 9.4 pmol/L
f/ 1.00 mL standard 9.4 pmol/L + 1.00 mL diluyente = 4.7 pmol/L
g/ diluyente = 0 pmol/L.
Conservare le soluzioni standard a -18° C o a temperature più basse se riutilizzate.
3. Pipette da 100 μL di standard a-g (0-150 pmol/L), campioni e controlli nei rispettivi tubi. Pipetta da 100 μL dello zero-standard nei tubi NSB.
4. Aggiungere 200 μL anti- α -MSH a tutti i tubi tranne i tubi NSB e TOT.
5. Aggiungere 200 μL di diluyente ai tubi NSB.
6. Miscelare nell'agitatore a vortice e incubare per 20-24 ore a 2-8° C.
7. Aggiungere 200 μL ^{125}I - α -MSH a tutti i tubi. I tubi TOT sono sigillati e tenuti da parte.
8. Miscelare nell'agitatore a vortice e incubare per 20-24 ore a 2-8° C.
9. Aggiungere 500 μL di doppio anticorpo-PEG a tutti i tubi eccetto i tubi TOT (miscelare questo reagente prima del pipettaggio).
10. Miscelare nell'agitatore a vortice e incubare per 30-60 minuti a 2-8° C.
11. Centrifugare i tubi per 15 minuti a +4° C (1700 x g).
12. Decantare i surnatanti subito dopo la centrifugazione.
13. Misurare la radioattività dei precipitati in un contatore gamma (tempo di conteggio 2-4 minuti).

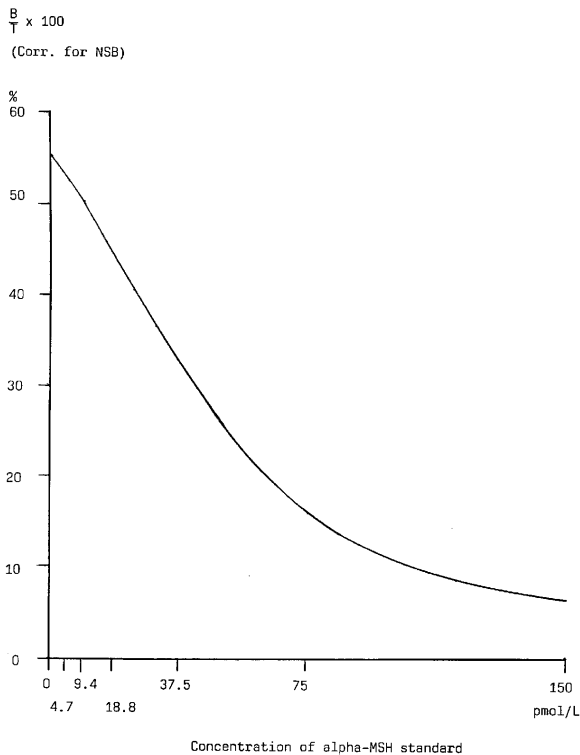
XI. CALCOLO DEI RISULTATI

1. Sottrarre il conteggio (CPM) medio del legante non specifico dal conteggio (CPM) dei replicati di standard, controlli e campioni.
2. Una curva standard viene generata tracciando il CPM precipitato, la frazione legata (in CPM o %B/TOT) rispetto alla concentrazione di standard α -MSH.

3. Interpolare la concentrazione α -MSH di campioni e controlli dalla curva standard generata.
4. La curva standard generata e il calcolo della concentrazione nei campioni possono anche essere effettuati con un metodo computerizzato. Può essere usato il metodo spline.

XII. DATI TIPICI

EXAMPLE OF ALPHA-MSH STANDARD CURVE



XIII. ESECUZIONE E LIMITI

A. Sensibilità

La sensibilità calcolata da una diminuzione del legame di 2 SD nel zero standard è 3 pmol/L.

B. Precisione

Variazione all'interno del test:

Livello	Coefficiente di variazione (% CV)
16.2 pmol/L	11.8
33.6 pmol/L	4.7
77.7 pmol/L	2.9

Variazione totale (interno test):

Livello	Coefficiente di variazione (% CV)
16.5 pmol/L	13.0
37.8 pmol/L	8.4
79.6 pmol/L	4.0

C. Specificità

Sono state trovate le seguenti reazioni incrociate:

Peptide	Reazione incrociata
α -MSH	100.0%
Des-acetil- α -MSH	100.0%
Des-amido- α -MSH	<0.002%
ACTH 1-13	<0.002%
ACTH 1-24	<0.002%

ACTH 1-39	<0.002%
Beta-MSH	<0.002%
Gamma-MSH	<0.002%

D. Interferenza

Campioni con torbidità, emolisi, iperlipemia o contenenti fibrina possono dare risultati imprecisi.

XIV. CONTROLLO INTERNO DI QUALITÀ

Per consentire al laboratorio di monitorare completamente le prestazioni del test, occorre verificare i seguenti importanti fattori.

1. Concentrazioni di controlli riscontrate

La concentrazione di controlli rilevata deve essere compresa nell'intervallo dato sulle etichette delle fiale.

2. Conteggi totali

I conteggi ottenuti dovrebbero avvicinarsi al CPM atteso CPM quando vengono regolati per l'efficienza del contatore e il decadimento radioattivo. Il contenuto di ^{125}I - α -MSH in questo kit darà 10.500 CPM

(-5, +20%) alla data di riferimento (efficienza del conteggio: 80%).

3. Legame massimo (Bo/TOT)

Per ogni test, calcolare la % di radioattività legata nello standard zero:

$$\frac{B_0}{TOT} \times 100$$

4. Legame non specifico (NSB/TOT)

Calcolare per ogni test la % di legame non specifico:

$$\frac{NSB}{TOT} \times 100$$

Il legame non specifico deve essere inferiore a 6%.

5. Discesa della curva standard

Per esempio, monitorare i punti 80, 50 e 20% della curva standard per una riproducibilità interfase.

XV. PRECAUZIONI E AVVERTIMENTI

Sicurezza

Solo per uso a scopo di ricerca.

Dato che le norme potrebbero variare da Paese a Paese, è fondamentale che le persone responsabili del laboratorio acquisiscano dimestichezza con le norme locali in vigore relative a ogni aspetto dei materiali radioattivi del tipo e della quantità usati in questo test.

Questo kit contiene componenti di origine umana. Sono stati testati con il dosaggio immunologico per l'antigene superficiale dell'epatite B, anticorpi di HCV e anticorpi di HIV-1 e HIV-2 e trovati negativi. Ciononostante, vanno osservate tutte le precauzioni raccomandate per la manipolazione dei derivati del sangue.

Adottare misure volte a garantire la corretta manipolazione del materiale radioattivo secondo le norme locali e/o regionali. Soltanto il personale autorizzato deve avere accesso ai reagenti.

Rispettare le seguenti precauzioni quando si maneggiano materiali radioattivi:

- Il materiale radioattivo deve essere conservato in aree appositamente designate, non normalmente accessibili a personale non autorizzato.
- La manipolazione del materiale radioattivo deve essere effettuata soltanto nelle aree autorizzate.
- Prestare attenzione a prevenire l'ingestione e il contatto con pelle e abbigliamento. Non pipettare soluzioni radioattive per bocca.
- Deve essere vietato bere, mangiare o fumare dove viene usato materiale radioattivo.
- Le mani vanno protette con guanti e lavate dopo aver utilizzato materiale radioattivo.
- Eseguire il lavoro su una superficie coperta da materiale assorbente usa e getta.
- Eventuali fuoriuscite di materiale radioattivo vanno rimosse immediatamente e tutti i materiali contaminati gettati come rifiuti radioattivi. Le superfici contaminate vanno pulite con detergente.

I reagenti in questo kit contengono azoturo di sodio. Il contatto con tubi di scarico in rame o piombo potrebbe provocare l'accumulo di depositi di azoturo altamente esplosivi. Quando si gettano i reagenti nella rete fognaria, sciacquare sempre con abbondante acqua per prevenire la formazione di sali metallici. I tubi sospetti di contaminazione con questi depositi esplosivi vanno sciacquati abbondantemente con una soluzione al 10% di idrossido di sodio.

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. Noveles, R.R.
Actions of Melanocyte-Stimulating Hormone.
Chap. 35, pp. 347-366.
Knobil, E. and Sawyer, W.H. eds.
Handbook of Physiology, see y, vol. 4, pt. 2.
American Physiological Society, Washington, D.C., 1974.
2. Noveles, R.R.
Cellular Aspects of Hormonally Controlled Pigment Translocations Within Chromatophores of Poikilothermic Vertebrates.
Amer. zool. 23:559-568, 1983.
3. Ralp, C.L., Firth, B.T. and Turner, J.S.
Role of the Pineal Body in Ectotherm Thermoregulation.
Amer. zool. 19:273-293, 1979.
4. Sawyer, T.K., Hruby, V.J., Hadley, M.F. and Engel, M.H.
 α -Melanocyte Stimulating Hormone:
Chemical Nature and Mechanism of Action.
Amer. zool. 23:529-650, 1983.
5. Catania, A., Airaghi, L., Manfredi, M.G., Vivirito, M.C., Milazzo, F., Lipton, J.M. and Zanussi, C.
Proopiomelanocortin-Derived Peptides and Cytokines:
Relations in Patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome.
Clinical Immunology and Immunopathology, vol. 66, no. 1, January, pp 73-79, 1993.
6. Lunec, J., et al.
Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone Immunoreactivity in Melanoma Cells.
Pathobiology (1990), 58(4):193-197.

XVIII. RIASSUNTO DEL PROTOCOLLO

	Conteggio totale	NSB	Calibratore (0-6)	Controlli	Campioni
Calibratore	-	-	100 μ l	-	-
Controlli	-	-	-	100 μ l	-
Campioni	-	-	-	-	100 μ l
Anti- α -MSH	-	-	200 μ l		
Diluente	-	200 μ l	-	-	-
Miscelare nell'agitatore a vortice e incubare per 20-24 ore a 2-8°C.					
Tracciatore ¹²⁵ I	200 μ l				
Miscelare nell'agitatore a vortice e incubare per 20-24 ore a 2-8°C.					
Doppio anticorpo PEG	-	500 μ l			
Miscelare nell'agitatore a vortice e incubare per 30-60 min a 2-8°C.					
Centrifugare 15 min (1700 g; 4°C)					
Decantare e misurare la radioattività del precipitato					

Catalogo DIAsource N°: RB303RUO	Revisione N° : 200224-1
------------------------------------	----------------------------

Data revisione : 24/02/2020