

ЮТест® CD45-FITC

КАТАЛОЖНЫЙ НОМЕР A07782

100 тестов; 2 мл

20 мкл / тест



ЮТест
Конъюгаты антител

ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
IN VITRO



| Спецификации | |
|----------------|--|
| Специфичность | CD45 |
| Клон | J33 |
| Гибридома | NS1 x Balb/c |
| Иммуноген | Клетки линии Laz 221 |
| Иммуноглобулин | IgG1 |
| Вид животных | Мышь |
| Источник | Асциты |
| Способ очистки | Аффинная хроматография с иммобилизованным белком А |
| Флуорохром | Флуоресцинизоотиоцианат (FITC) |
| λ возбуждения | 488 нм |
| Пик эмиссии | 525 нм |
| Буфер | PBS pH 7.2, БСА 2 мг/мл, 0.1% NaN ₃ |

НАЗНАЧЕНИЕ

Данные конъюгированные с флуорохромом антитела позволяют идентифицировать клетки, экспрессирующие антиген CD45, и выполнить их подсчет. Для анализа используются биологические образцы человека. Исследование проводится методом проточной цитофлуориметрии.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Данный тест основан на способности специфических моноклональных антител связываться с антигенными детерминантами на поверхности лейкоцитов.

При инкубации образца с реагентом ЮТест происходит окрашивание лейкоцитов. Затем выполняется лизис эритроцитов. Интактные лейкоциты анализируются на проточном цитофлуориметре.

Проточный цитометр измеряет светорассеяние и флуоресценцию клеток. Он позволяет выделить интересующую популяцию на диаграмме, отображающей светорассеяние в боковом направлении (Side Scatter или SS) и светорассеяние в прямом направлении под малыми углами (Forward Scatter или FS). Для выбора популяций можно использовать различные двухпараметровые диаграммы в зависимости от используемого приложения.

Прибор выполняет анализ флуоресценции выбранной популяции, распознавая окрашенные и неокрашенные клетки. Результат представляется в виде процентного содержания положительных клеток от всех клеток выбранной популяции.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Молекула CD45 и ее различные изоформы по разному экспрессируются на лимфоидных (1 - 3) и миелоидных клетках (4). Экспрессия коррелирует со стадией дифференцировки клеток. Таким образом, характеристика плотности CD45 полезна при дискриминации нормальных клеток и злокачественных лейкоцитов (2, 4 - 7). Плотность экспрессии CD45 невелика при остром миелолейкозе, что позволяет отличить опухолевые клетки от нормальных (8). Более того, степень экспрессии CD45 при остром лимфобластном лейкозе может иметь прогностическое значение в отношении прогрессии заболевания (2, 9).

И наконец, моноклональные антитела (mAb) к CD45 позволяют оценить возможную контаминацию нелейкоцитами популяции лимфоцитов на диаграмме светорассеяния в боковом направлении – флуоресценции CD45, окрашенного специфическими конъюгатами антител (10).

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

До и после распечатки флакона жидкие конъюгаты антител необходимо хранить при температуре 2 - 8°C в защищенном от света месте.

Стабильность нераспечатанного реагента приводится на этикетке флакона.

Стабильность распечатанного реагента 90 дней.

ВНИМАНИЕ

1. Не используйте реагент с истекшим сроком годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием необходимо уравновесить реагент при комнатной температуре (18 – 25°C).
4. Воздействие света необходимо свести к минимуму.
5. Избегайте контаминации микроорганизмами, в противном случае возможно получение недостоверных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN₃), требуют осторожного обращения. Не проглатывайте, избегайте любого контакта с кожей, слизистой оболочкой и глазами.

В кислой среде азид натрия способен образовывать взрывоопасную азотистоводородную кислоту. При утилизации перед сливом в водопровод рекомендуется развести реагент большим объемом воды. Это позволит избежать накопления азидов натрия в металлических трубах и предотвратит образование взрывчатого вещества.

7. Все образцы крови следует рассматривать как потенциально инфицированные. При работе с ними необходимо соблюдать все меры предосторожности (в частности, использовать защитные перчатки, халат и очки).
8. Никогда не отбирайте образец через пипетку ртом. Избегайте контакта образца с кожей, слизистой оболочкой и глазами.
9. После завершения работы пробирки с кровью и все одноразовые материалы необходимо поместить в специальные контейнеры для утилизации.

ОБРАЗЦЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отобрать в стерильные пробирки с солью EDTA в качестве антикоагулянта. Использование других антикоагулянтов не рекомендуется.

Образцы должны храниться при комнатной температуре (18 – 25°C). Встряхивание образцов не допускается. Перед отбором аликвоты образец следует гомогенизировать, аккуратно перемешав. Анализ образцов необходимо выполнить в течение 24 часов после отбора.

МЕТОДИКА

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Пробирки и материалы для отбора проб.
- Автоматические пипетки с одноразовыми наконечниками на 20, 100 и 500 мкл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Калибровочные частицы: флуоросферы Flow-Set™ (кат. № 6607007).

- Реагент для лизиса эритроцитов (с предусмотренной стадией отмывки после лизиса). Например: VersaLyse (кат. № A09777).

- Реагент для фиксации лейкоцитов. Например: ЮТест 3 Fixative Solution (кат. № A07800).
- Изотипический контроль: ЮТест reagent. IgG1-FITC (кат. № A07795).
- Буфер (PBS: 0.01 М фосфат натрия; 0.145 М хлорид натрия; pH 7.2).
- Центрифуга.
- Миксер (вортекс).
- Проточный цитофлуориметр.

ПОДГОТОВКА ПРОБ

ЗАМЕЧАНИЕ: Приведенная ниже процедура пригодна для стандартных исследований. При выполнении некоторых приложений Beckman Coulter объем образца и/или реагента VersaLyse может отличаться. В этом случае следуйте указаниям руководства для конкретного приложения.

При исследовании любого образца необходимо также проанализировать контрольный образец (исследуемый образец плюс изотипический контроль, кат. № A07795).

1. В пробирки для анализа клинических образцов добавьте по 20 мкл конъюгатов антител ЮТест, а в пробирки для анализа контролей – по 20 мкл соответствующего изотипического контроля.
2. В пробирки для анализа образца и для анализа изотипического контроля добавьте по 100 мкл образца. Аккуратно перемешайте на вортексе.
3. Инкубируйте в течение 15 - 20 минут при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Если требуется, выполните лизис эритроцитов, следуя рекомендациям изготовителя лизирующего реагента.

Например, при использовании реагента VersaLyse (кат. № A09777) следуйте указаниям инструкции к этому реагенту.

Рекомендуется выполнить процедуру «с одновременной фиксацией». Для этого добавьте к образцу 1 мл свежеприготовленного раствора для фиксации и лизиса. Немедленно перемешайте на вортексе в течение 1 секунды. Инкубируйте 10 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте.

Если образец не содержит эритроцитов, добавьте 2 мл PBS.

5. Отцентрифугируйте в течение 5 минут при 150 x g при комнатной температуре.
6. Удалите супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируйте осадок клеток в 3 мл PBS.
8. Повторите шаг 5.
9. Удалите супернатант аспирацией и ресуспендируйте клетки:
 - в 0.5 или 1 мл PBS с 0.1% раствором формальдегида, если подготовленная проба будет храниться от 2 до 24 часов. (Данный раствор можно получить разведением 12.5 мкл

реагента IOTest 3 Fixative Solution (кат. № A07800) в 10-кратной концентрации в 1 мл PBS.)

- в 0.5 или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

ЗАМЕЧАНИЕ: Независимо от способа подготовки, подготовленные пробы необходимо хранить при температуре 2 - 8°C в защищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

МАТ J33 окрашивают все изоформы молекулы CD45 (от 180 до 220 кДа), являющейся панлейкоцитарным маркером. В 1986 г. на Третьем международном рабочем совещании по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека в Оксфорде, Англия, было подтверждено, что МАТ BL1a направлены против CD5 (Code WS: 818, Section NL) (11).

ДИАПАЗОН ЛИНЕЙНОСТИ

Для проверки линейности окрашивания данным реагентом были в различных пропорциях смешаны положительные клетки линии NAMALWA и отрицательные клетки линии FRN 3.4.14. Общее количество клеток в образце оставалось постоянным. Соотношение положительных и отрицательных клеток изменялось от 0 до 100%.

Аликвоты были окрашены в соответствии с описанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия. Уравнение регрессии можно использовать для определения линейности и диапазона измерений.

| Маркер | Линейная регрессия | Линейность (R ²) | Диапазон (%) |
|--------|---------------------|------------------------------|--------------|
| CD45 | $Y = 0.99 X + 0.62$ | 0.9998 | 2 – 98 |

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Каждая лаборатория должна определить собственные диапазоны нормальных значений на основании исследования образцов нормальных доноров местной популяции. При этом следует учитывать возраст, пол и этническую принадлежность доноров, а также другие местные особенности населения.

В наших лабораториях с использованием данного реагента было проведено исследование образцов цельной крови 10 взрослых людей. В следующих таблицах представлены результаты подсчета положительных событий:

| Лимфоциты | Количество образцов | Среднее (%) | SD | CV (%) |
|-------------------|---------------------|-------------|------|--------|
| CD45 ⁺ | 10 | 99.80 | 0.15 | 0.16 |

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитометре определялось процентное содержание окрашенных положительных клеток (лимфоцитов). Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты суммированы в следующей таблице:

| Положительные лимфоциты | Количество измерений | Среднее (%) | SD | CV (%) |
|-------------------------|----------------------|-------------|------|--------|
| CD45 ⁺ | 12 | 99.92 | 0.07 | 0.07 |

МЕЖЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на двух цитометрах двумя лаборантами определялось процентное содержание окрашенных положительных клеток (лимфоцитов). Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты суммированы в следующих таблицах:

Цитометр # 1

| Лимфоциты | Количество измерений | Среднее (%) | SD | CV (%) |
|-------------------|----------------------|-------------|------|--------|
| CD45 ⁺ | 12 | 99.86 | 0.09 | 0.09 |

Цитометр # 2

| Лимфоциты | Количество измерений | Среднее (%) | SD | CV (%) |
|-------------------|----------------------|-------------|------|--------|
| CD45 ⁺ | 12 | 99.77 | 0.21 | 0.21 |

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

1. При неправильной настройке цитофлуориметра, неверной компенсации флуоресценции и неправильном расположении регионов могут быть получены недостоверные результаты.
2. Рекомендуется выполнять лизис эритроцитов с отмывкой, поскольку данный реагент не оптимизирован для процедуры без отмывки.
3. Для получения точных и воспроизводимых результатов необходимо соблюдать все приведенные инструкции и следовать нормам лабораторной работы.

4. Антитела данного реагента откалиброваны для получения наилучшего соотношения специфического и неспецифического сигнала. Поэтому в каждом исследовании необходимо строго дозировать указанный объем реагента с учетом количества клеток в образце.

5. При гиперлейкоцитозе разведите образец PBS так, чтобы получить примерную концентрацию лейкоцитов 5×10^9 /л.

6. При некоторых заболеваниях, таких как тяжелая почечная недостаточность или гемоглобинопатии, лизис эритроцитов может происходить медленно, не полностью или совсем не происходить. В этом случае перед окрашиванием рекомендуется выделить мононуклеарные клетки в градиенте плотности (например, фикола).

7. Были описаны острые лимфобластные лейкозы, отрицательные по CD45 и с очень слабой экспрессией CD45. В этих случаях лимфоцитарное происхождение бластных клеток следует подтвердить с помощью других маркеров.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

В приложении приводится список литературы и примеры диаграмм.

ТОРГОВЫЕ ЗНАКИ

Логотип Beckman Coulter, COULTER, EPICS, EXPO, Flow-Set, IOTest, System II, XL являются зарегистрированными торговыми знаками компании Beckman Coulter Inc.

BD FACScan и BD LYSYS II являются зарегистрированными торговыми знаками компании BD Biosciences and Company.

ИЗГОТОВЛЕНО:

IMMUNOTECH S.A.
a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France

Отдел по работе с клиентами: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com



ПРИМЕРЫ ДИАГРАММ

Ниже показаны двухпараметровые диаграммы (светорассеяние в боковом направлении - интенсивность флуоресценции), полученные при анализе лизированного образца нормальной цельной крови. Для окрашивания использовались конъюгаты антител IOTest CD45-FITC (кат. № А07782). Выполнялось выделение лейкоцитов программными средствами. Изотипический контроль (кат. № А07795) на диаграммах не показывается.

Диаграмма 1. Считывание и анализ данных выполнены с помощью проточного цитофлуориметра COULTER® EPICS® XL™ в программном обеспечении System II™.

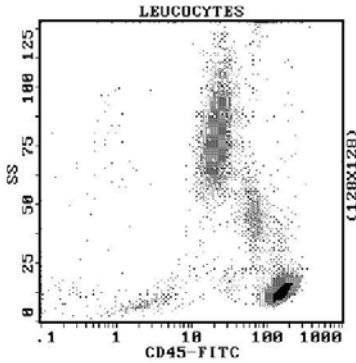
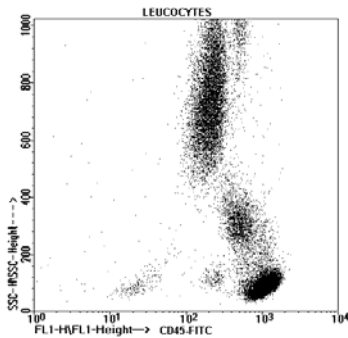


Диаграмма 2. Считывание данных выполнено с помощью проточного цитофлуориметра Becton Dickinson FACScan™. Анализ выполнен в программном обеспечении LYSYS II™.



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Poppema, S., Lai, R., Visser, L., Yan, X.J., "CD45 (Leucocyte Common Antigen) expression in T and B lymphocyte subsets", 1996, *Leuk. Lymphoma*, 20, 217-222.
2. Caldwell, C.W., Patterson, W.P., "Relationship of T200 antigen expression to stages of B-cell differentiation in resurgent hyperplasia of bone marrow", 1987, *Blood*, 4, 70, 1165-1172.
3. Caldwell, C.W., Patterson, W.P., "Relationship between CD45 antigen expression and putative stages of differentiation in B-cell malignancies", 1991, *Am. J. Hematol.*, 36, 111-115.
4. Caldwell, C.W., Patterson, W.P., Toalson, B.D., Yesus, Y.W., "Surface and cytoplasmic expression of CD45 antigen isoforms in normal and malignant myeloid cell differentiation", 1991, *Am. J. Clin. Pathol.*, 95, 180-187.
5. Höffkes, H.G., Schmidtke, G., Uppenkamp, M., Schmücker, U., "Multiparametric immunophenotyping of B cells in peripheral blood of healthy adults by flow cytometry", 1996, *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 1, 3, 30-36.
6. Lacombe, F., Durrieu, F., Briais, A., Dumain, P., Belloc, Bas-cans, E., Reiffers, J., Boisseau, M.R., Bernard, P., "Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia", 1997, *Leukemia*, 11, 1878-1886.
7. Schneider, U., Van Lessen, A., Huhn, D., Serke, S., "Two subsets of peripheral blood plasma cells defined by differential expression of CD45 antigen", 1997, *Br. J. Haematol.*, 97, 56-64.
8. Borowitz, M.J., Guenther, K.L., Shults, K.E., Stelzer, G.T., "Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis. Use of CD45 and right-angle light scatter to gate on leukemic blasts in three-color analysis", 1993, *Am. J. Clin. Pathol.*, 5, 100, 534-540.
9. Behm, F.G., Raimondi, S.C., Schell, M.J., Look, A.T., Rivera, G.K., Pui, C.H., "Lack of CD45 antigen on blast cells in childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with chromosomal hyperdiploidy and other favorable prognostic features", 1992, *Blood*, 4, 79, 1011-1016.
10. Nicholson, J.K.A., Hearn, T.L., Cross, G.D., White, M.D., "1997 Revised guidelines for performing CD4+ T-cell determinations in persons infected with human immunodeficiency virus (HIV), 1997, *Morbidity and Mortality Weekly Report*, RR-2, 46, 1-29.
11. Cobbold, S., Hale, G., Waldmann, H., "Non-lineage, LFA-1 family, and leukocyte common antigens: New and previously defined clusters", 1987, *Leucocyte Typing III*, White Cell Differentiation Antigens, McMichael A.J., et al., Eds., Oxford University Press, 788-803.