

ЮТест® FMC7-FITC

КАТАЛОЖНЫЙ НОМЕР A07791

100 тестов; 1 мл

10 мкл / тест



ЮТест
Конъюгаты антител

ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
IN VITRO



Спецификации	
Специфичность	FMC7
Клон	FMC7
Гибридома	P3-NS1-1-Ag4-1 x Balb/c
Иммуноген	Лимфобластоидные В-клетки человека линии HRIK
Иммуноглобулин	IgM
Вид животных	Мышь
Источник	Культуральные клетки
Способ очистки	Хроматография
Флуорохром	Флуоресцинизоцианат (FITC)
λ возбуждения	488 нм
Пик эмиссии	525 нм
Буфер	0.1 M Tris ; 0.5 M NaN ₃ ; 1 мМ глицин, pH 8, 0.2 % БСА

НАЗНАЧЕНИЕ

Данные конъюгированные с флуорохромом антитела позволяют идентифицировать клетки, экспрессирующие антиген FMC7, 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 популяции 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

Анализ антигена FMC7 полезен при характеристике В-лимфоцитов популяций FMC7⁺ и FMC7⁻, определении и мониторинга количества клеток в данных популяциях. Это исследование проводится при злокачественных лимфоидных заболеваниях крови. Например, клетки FMC7⁻ исследуются при плазмоклеточном лейкозе, а FMC7⁺ – при волосовоклеточном и пролимфоцитарном лейкозе (1 - 6).

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 10, 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: мышинный IgM, конъюгированный с FITC.
- Буфер (PBS: 0.01 M фосфат натрия; 0.145 M 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 соответствующий изотипический контроль).

1. В пробирки для анализа клинических образцов добавьте по 10 мкл конъюгатов антител ЮТест, а в пробирки для анализа контролей – рекомендуемое количество 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 ЮТест 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

Антиген, распознаваемый моноклональными антителами (мАт) FMC7, представляет собой трансмембранный гликопротеин с молекулярной массой 104 кДа (7). МАт FMC7 распознают субпопуляцию В-лимфоцитов периферической крови. Экспрессия молекулы FMC7 на Т-лимфоцитах, естественных киллерах, полиморфно-ядерных гранулоцитах, тромбоцитах и эритроцитах не выявлена (7).

Субпопуляция В-лимфоцитов, распознаваемых антителами FMC7, экспрессирует поверхностные иммуноглобулины (6-11), что позволяет определить стадию созревания В-лимфоцитов. Незрелые В-лимфоциты являются FMC7⁻ (7).

ДИАПАЗОН ЛИНЕЙНОСТИ

Для проверки линейности окрашивания данным реагентом были в различных пропорциях смешаны положительные клетки (циркулирующие В-лимфоциты) и отрицательные клетки линии DAUDI и NAMALWA. 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 (%)
FMC7	$Y = 0.934 X + 2.74$	0.9961	4 – 95

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 50 здоровых взрослых людей. В следующей таблице представлены результаты подсчета положительных событий:

Лимфоциты	Количество образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
FMC7 ⁺	50	11.3	5.06	45

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Положительные лимфоциты	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
FMC7 ⁺	12	22.2	1.17	5.3

МЕЖЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Цитометр # 1

Положительные лимфоциты	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
FMC7 ⁺	12	7.2	0.7	9.8

Цитометр # 2

Положительные лимфоциты	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
FMC7 ⁺	12	8.1	0.3	4.2

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).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

В приложении приводится список литературы.

ТОРГОВЫЕ ЗНАКИ

Логотип Beckman Coulter, Flow-Set, IOTest являются зарегистрированными торговыми знаками компании Beckman Coulter Inc.

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



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Davis, B., H., Foucar, K., Szczarkowski, Ball, E., Witzig, T., Foon, K., A., Wells, D., Kotylo, P., Johnson, R., Hanson, C., and Bessman, D. "U.S. – Canada Consensus Recommendations on the Immunophenotypic Analysis of Hematologic Neoplasia by Flow Cytometry: Medical Indication", 1997, *Cytometry*, 30, 249-263.
2. Orfao, A., Ruiz-Arguelles, A., Lacombe, F., Ault, K., Basso, G., Danova, M. "Flow Cytometry: its application in hematology", 1995, *Haematologica*, 80, 69-81.
3. Braylan, R.C., Orfao, A., Borowitz, M.J., Davis, B.H., 2001, *Cytometry*, "Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: Results of an international consensus meeting". 46, 23-27.
4. Rothe, G., Schmitz, G. Adorf, D., Barlage, S., Gramatzki, M., Hanenberg, H., Höffkes H.G., Janossy, G., Knüchel, R., Ludwig, W.D., Nebe, T., Nerl, C., Orfao, A., Serke, S., Sonnen, R., Tichelli, A., Wörmann, B., "Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies", 1996, *Leukemia*, 10, 877-895.
5. Jennings, C.D., Foon, K.A., "Recent advances in flow cytometry: Application to the diagnosis of hematologic malignancy", 1997, *Blood*, 8, 90, 2863-2892.
6. Huh, Y.O., Pugh, W.C., Kantarjian, H.M., Stass, S.A., Cork, A., Trujillo, J.M., Keating, M.J., "Detection of subgroups of chronic B-cell leukemias by FMC7 monoclonal antibody", 1994, *Am. J. Clin. Pathol.*, 101, 283-289.
7. Zola, H., Moore, H.A., Hohmann, A., Hunter, I.K., Nikoloutsopoulos, A., Bradley, J., "The antigen of mature human B cells detected by the monoclonal antibody FMC7: Studies on the nature of the antigen and modulation of its expression", 1984, *J. Immunol.*, 1, 133, 321-326.
8. Ferro, L.M., Zola, H., "Modulation of expression of the antigen identified by FMC7 upon human B-lymphocyte activation: Evidence for differences between activation in vivo and in vitro", 1990, *Immunology*, 69, 373-378.
9. Brooks, D.A., Beckman, I.G.R., Bradley, J., McMara, P.J., Thomas, M.E., Zola, H., "Human lymphocyte markers defined by antibodies derived from somatic cell hybrids", *J. Immunol.*, 4, 126, 1373-1377.
10. Zola, H., Bradley, J.G., Brooks, D.A., Macardle, P.J., McNamara, P.J., Moore, H.A., Nikoloutsopoulos, A., "The human B-cell lineage studied with monoclonal antibodies", 1984, *Leucocyte Typing*, Bernard, A. et al., Springer Verlag, 363-371.
11. Bloem, A.C., Chand, M.A., Dollekamp, I., Rijkers, G.T., "Functional properties of human B cell subpopulations defined by monoclonal antibodies HB4 and FMC7", 1988, *J. Immunol.*, 3, 140, 768-773.