



**ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
IN VITRO**



	Спецификации
Специфичность	Гликофорин А
Клон	11E4В-7-6 (KC16)
Гибридома	NS/1-Ag4 x Balb/c
Иммуноген	Эритроциты человека
Иммуноглобулин	IgG1
Вид животных	Мышь
Источник	Асциты
Способ очистки	Хроматография с иммобилизованным белком А
Флуорохром	Фикоэритрин R (PE)
λ возбуждения	488 нм
Пик эмиссии	575 нм
Буфер	PBS pH 7.2, БСА 2 мг/мл, 0.1% NaN ₃

НАЗНАЧЕНИЕ

Данные конъюгированные с флуорохромом антитела используются для идентификации и количественного анализа популяций клеток, экспрессирующих гликофорин А (CD235a). Для исследования используются биологические образцы человека. Анализ выполняется методом проточной цитофлуориметрии.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Данный тест основан на способности специфических моноклональных антител связываться с антигенными детерминантами, экспрессирующихся на поверхности некоторых клеток крови.

При инкубации с реагентом IOTest происходит окрашивание образца.

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 дупараметровые диаграммы в зависимости от используемого приложения.

Выбор 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

Гликофорин А является сиалогликопротеином, который экспрессируется на поверхности эритробластических клеток-предшественниц (начиная со стадии проэритробласта), ретикулоцитов и зрелых эритроцитов (1 – 3).

Данный реагент позволяет охарактеризовать и выполнить подсчет клеток эритроцитарного ряда.

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: IOTest 3 Fixative Solution (кат. № A07800).
- Изотипический контроль: IOTest reagent. IgG1-PE (кат. № A07796).
- Буфер (PBS: 0.01 М фосфат натрия; 0.145 М хлорид натрия; pH 7.2).
- Центрифуга.
- Миксер (вортекс).
- Проточный цитофлуориметр.

ПОДГОТОВКА ПРОБ

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. № A07796).

1. В пробирки для анализа клинических образцов добавьте по 20 мкл конъюгатов антител IOTest, а в пробирки для анализа контролей – по 20 мкл соответствующего изотипического контроля.
2. В пробирки для анализа образца и для анализа контроля добавьте по 100 мкл образца. Аккуратно перемешайте на вортексе.

ВНИМАНИЕ: Слишком большое количество эритроцитов в образце может привести к увеличению количества неокрашенных лейкоцитов целевой популяции. В этом случае разведите образец PBS, чтобы получить концентрацию клеток (эритроцитов и лейкоцитов) примерно 1×10^4 / мкл. Для анализа используйте 100 мкл этой суспензии. Можно выделить мононуклеарные клетки в градиенте плотности (например, фикола) и также использовать 100 мкл суспензии в концентрации 1×10^4 клеток / мкл.

3. Инкубируйте пробы 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

Моноклональные антитела 11E4В-7-6 (KC16) взаимодействуют с 27-39 N-концевыми аминокислотными остатками гликофорина А и не распознают гликофорин В (3). В 2000 г. на Седьмом международном рабочем совещании по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека в Харрогите, Англия, было подтверждено, что данные моноклональные антитела направлены против CD235a (WS Code: 70359, Section: Red Cells) (4).

ДИАПАЗОН ЛИНЕЙНОСТИ

Для проверки линейности окрашивания данным реагентом были в различных пропорциях смешаны клетки положительной линии HEL и клетки отрицательной линии FRN 17.4.14.33. 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 (%)
Гликофорин А	$Y = 0.97 X + 0.81$	0.997	1 – 98

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

У здоровых взрослых людей нелизирванная кровь (для окрашивания эритроцитов) 100% положительна по гликофору А. После лизиса эритроцитов положительное окрашивание лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов не наблюдается. Поэтому ожидаемые значения не приводятся.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитометре определялось процентное содержание положительных клеток смеси, состоящей из примерно 30% положительных клеток линии HEL и отрицательных клеток линии FRN 17.4.14.33. Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты представлены в следующей таблице:

Целевая популяция	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
Клетки линии HEL	12	26.5	0.7	2.5

МЕЖЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на двух цитометрах двумя лаборантами определялось процентное содержание положительных клеток смеси, состоящей из примерно 30% положительных клеток линии HEL и отрицательных клеток линии FRN 17.4.14.33. Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты представлены в следующих таблицах:

Цитометр # 1

Целевая популяция	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
Клетки линии HEL	12	26.5	0.7	2.5

Цитометр # 2

Целевая популяция	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
Клетки линии HEL	12	24.7	0.6	2.6

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

1. При неправильной настройке цитофлуориметра, неверной компенсации флуоресценции и неправильном расположении регионов могут быть получены недостоверные результаты.
2. Рекомендуется выполнять подготовку образцов 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 большом количестве клеток разведите образец PBS так, чтобы получить примерную концентрацию 5×10^9 клеток/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, COULTER, EPICS, EXPO, Flow-Set, IOTest, System II, XL 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. Chasis, J.A., Mohandas, N., "Red blood cell Glycophorins", 1992, Blood, 80, 1869-1879.
2. Chasis, J.A., Reid, M.E., Ronald, H.J., Mohandas, N., "Signal transduction by glycophorin A: Role of extracellular and cytoplasmic domains in a modulatable process", 1988, J. Cell Biol., 107, 1351-1357.
3. Catimel, B., Wilson, K.M., Kemp, B.E., "Kinetics of the autologous red cell agglutination test", 1993, J. Immunol. Methods, 165, 183-192.
4. Van der Schoot, C.E., Baardman, R., Ligthart, P., de Jong, I., EG KR von dem Borne, A., de Haas, M., "Red Cell Section: Section Report", 2000, Leucocyte Typing VII, White Cell Differentiation Antigens, D. Masson, et al., Eds., Oxford University Press, 566-604.