

IgG1-FITC / IgG1-PE

Изотипический контроль

КАТАЛОЖНЫЙ НОМЕР A07794

50 тестов; 1 мл

20 мкл / тест



IOTest

Конъюгаты антител

**ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
IN VITRO**



	Спецификации первого компонента	Спецификации второго компонента
Специфичность	—	—
Клон	679.1Mc7	679.1Mc7
Гбридома	P3-X63-Ag.8.653 x Balb/c	P3-X63-Ag.8.653 x Balb/c
Иммуноген	Небиологический гаптен	Небиологический гаптен
Иммуноглобулин	IgG1	IgG1
Вид животных	Мышь	Мышь
Источник	Асциты	Асциты
Способ очистки	Аффинная хроматография с иммобилизованным белком А	Аффинная хроматография с иммобилизованным белком А
Флуорохром	Флуоресцинизотиоцианат (FITC)	Фикоэритрин R (PE)
λ возбуждения	488 нм	488 нм
Пик эмиссии	525 нм	575 нм
Буфер	PBS pH 7.2, БСА 2 мг/мл, 0.1% NaN ₃	

НАЗНАЧЕНИЕ

Данная смесь изотипических контролей IgG1-FITC / IgG1-PE из группы реагентов IOTest, приготавливаемых на основе конъюгатов мышинового IgG1 с FITC и PE, используется при выполнении анализа образцов крови человека на проточных цитофлуориметрах. Она позволяет определить неспецифическое окрашивание лейкоцитов и тромбоцитов.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Анализ основан на способности специфических моноклональных антител связываться с антигенными детерминантами на поверхности лейкоцитов и тромбоцитов.

При инкубации образца со специфическим реагентом IOTest происходит окрашивание клеток. Затем выполняется лизис эритроцитов. Интактные лейкоциты или тромбоциты 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 анализируемых популяций можно использовать и другие двухпараметровые диаграммы в зависимости от используемого приложения.

Диаграмма FS - SS позволяет отсеять разрушенные клетки и отделить лимфоциты от моноцитов и полиморфов. Выделение интересующей популяции программными средствами используется для создания однопараметровой гистограммы (количество клеток - интенсивность флуоресценции). Таким образом можно распознать окрашенные и неокрашенные клетки. Результат представляется в виде процентного содержания положительных клеток от всех клеток выбранной популяции.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Стадии дифференцировки кроветворных клеток характеризуются экспрессией или отсутствием экспрессии поверхностных антигенов, которые идентифицируются с помощью специфичных моноклональных антител. Одна из трудностей при анализе этих антигенов - неспецифическое связывание конъюгатов антител при окрашивании, выраженное в большей или меньшей степени. Для точного определения положительных клеток необходимо принимать в расчет данное неспецифическое связывание (1, 2).

Данная смесь изотипических контролей IOTest служит для определения неспецифического связывания моноклональных антител того же изотипа, конъюгированных с флуоресцинизотиоцианатом (FITC) и фикоэритрином R (PE) и принадлежащих к группе реагентов IOTest.

В зависимости от сигнала, полученного при анализе изотипического контроля, для каждой целевой популяции следует изменить границы

между отрицательными и положительными событиями.

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).
- Специфические антитела, конъюгированные с FITC и PE, из группы реагентов IOTest.
- 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. Смесь изотипических контролей IgG1-FITC / IgG1-PE (кат. № A07794) адаптирована для анализа с использованием антител IOTest, конъюгированных с FITC и PE.

1. В пробирки для анализа клинических образцов добавьте по 20 мкл конъюгатов антител IOTest, а в пробирки для анализа контролей – по 20 мкл данной смеси изотипических контролей.
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

Моноклональные антитела 679.1Mс7 принадлежат к подклассу IgG1. Они не связываются специфически с какими-либо поверхностными дифференцировочными антигенами лейкоцитов и тромбоцитов человека.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОКРАШИВАНИЯ ПРИ РАЗВЕДЕНИИ КРАСИТЕЛЯ

Для проверки эффективности неспецифического окрашивания данным реагентом, был выполнен анализ образца нормальной цельной крови, подготовленного в соответствии с описанной выше процедурой. Использовалось разведение реагента в два и в десять раз.

В следующих таблицах приводится средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов, окрашенных IgG1-FITC.

Популяция отрицательных лимфоцитов	Количество измерений	СИФ	SD	CV (%)
1 : 1	3	0.119	0.000	0.0
1 : 2	3	0.119	0.002	1.7
1 : 10	3	0.119	0.001	0.5

Популяция отрицательных моноцитов	Количество измерений	СИФ	SD	CV (%)
1 : 1	3	0.435	0.008	1.9
1 : 2	3	0.511	0.003	0.7
1 : 10	3	0.676	0.011	1.7

Популяция отрицательных гранулоцитов	Количество измерений	СИФ	SD	CV (%)
1 : 1	3	0.609	0.009	1.5
1 : 2	3	0.656	0.013	2.1
1 : 10	3	0.665	0.025	3.7

В следующих таблицах приводится средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов, окрашенных IgG1-PE.

Популяция отрицательных лимфоцитов	Количество измерений	СИФ	SD	CV (%)
1 : 1	3	0.128	0.002	1.4
1 : 2	3	0.125	0.003	2.0
1 : 10	3	0.124	0.002	1.6

Популяция отрицательных моноцитов	Количество измерений	СИФ	SD	CV (%)
1 : 1	3	0.250	0.006	2.2
1 : 2	3	0.245	0.005	1.9
1 : 10	3	0.297	0.015	5.0

Популяция отрицательных гранулоцитов	Количество измерений	СИФ	SD	CV (%)
1 : 1	3	0.294	0.005	1.6
1 : 2	3	0.272	0.021	7.7
1 : 10	3	0.280	0.001	0.5

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитометре определялась средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) отрицательных клеток, окрашенных IgG1-FITC, в образце цельной крови здорового взрослого человека. Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты суммированы в следующей таблице:

Отрицательные клетки	Количество измерений	СИФ	SD	CV (%)
IgG1 ⁻ лимфоциты	12	0.17	0.002	1.0
IgG1 ⁻ моноциты	12	0.69	0.010	1.5
IgG1 ⁻ гранулоциты	12	0.83	0.013	1.6

В следующей таблице показана средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) отрицательных клеток, окрашенных IgG1-PE. Измерение выполнялось 12 раз.

Отрицательные клетки	Количество измерений	СИФ	SD	CV (%)
IgG1 ⁻ лимфоциты	12	0.15	0.001	0.7
IgG1 ⁻ моноциты	12	0.30	0.007	2.2
IgG1 ⁻ гранулоциты	12	0.46	0.005	1.0

МЕЖЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на двух цитометрах двумя лаборантами определялась средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) отрицательных клеток (лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов). Измерение выполнялось 12 раз. Результаты, полученные при окрашивании с помощью IgG1-FITC, суммированы в следующих таблицах:

Цитометр # 1

Отрицательные клетки	Количество измерений	СИФ	SD	CV (%)
IgG1 ⁻ лимфоциты	12	0.17	0.002	1.0
IgG1 ⁻ моноциты	12	0.69	0.010	1.5
IgG1 ⁻ гранулоциты	12	0.83	0.013	1.6

Цитометр # 2

Отрицательные клетки	Количество измерений	СИФ	SD	CV (%)
IgG1 ⁻ лимфоциты	12	0.27	0.003	1.0
IgG1 ⁻ моноциты	12	0.70	0.008	1.2
IgG1 ⁻ гранулоциты	12	0.81	0.006	0.8

Результаты, полученные при окрашивании с помощью IgG1-PE, суммированы в следующих таблицах:

Цитометр # 1

Отрицательные клетки	Количество измерений	СИФ	SD	CV (%)
IgG1 ⁻ лимфоциты	12	0.15	0.001	0.7
IgG1 ⁻ моноциты	12	0.30	0.007	2.2
IgG1 ⁻ гранулоциты	12	0.46	0.005	1.0

Цитометр # 2

Отрицательные клетки	Количество измерений	СИФ	SD	CV (%)
IgG1 ⁻ лимфоциты	12	0.27	0.004	1.3
IgG1 ⁻ моноциты	12	0.46	0.012	2.5
IgG1 ⁻ гранулоциты	12	0.61	0.005	0.8

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

- При неправильной настройке цитофлуориметра, неверной компенсации флуоресценции и неправильном расположении регионов могут быть получены недостоверные результаты.
- Рекомендуется выполнять лизис эритроцитов с отмывкой, поскольку данный реагент не оптимизирован для процедуры без отмывки.
- Для получения точных и воспроизводимых результатов необходимо соблюдать все приведенные инструкции и нормы лабораторной работы.
- 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.
- При гиперлейкоцитозе разведите образец PBS так, чтобы получить примерную концентрацию лейкоцитов 5 x 10⁹/л.
- 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 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



A07794EN_A
AC-03-1093

ПРИЛОЖЕНИЕ К РУКОВОДСТВУ № A07794

ПРИМЕРЫ ДИАГРАММ

Ниже показаны двухпараметровые диаграммы (интенсивность флуоресценции - интенсивность флуоресценции), полученные при анализе лизированного образца нормальной цельной крови. Для окрашивания использовался изотипический контроль IOTest IgG1-FITC / IgG1-PE (кат. № A07794). Выполнялось выделение лимфоцитов программными средствами.

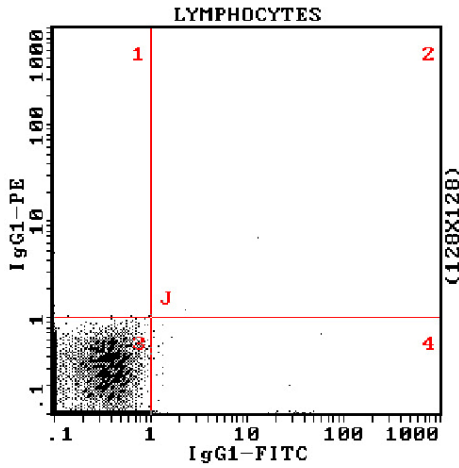


Диаграмма 1. Считывание и анализ данных выполнены с помощью проточного цитофлуориметра COULTER® EPICS® XL™ в программном обеспечении System II™.

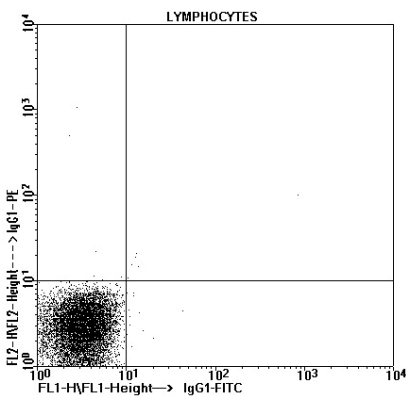


Диаграмма 2. Считывание данных выполнено с помощью проточного цитофлуориметра Vecton Dickinson FACScan™. Анализ выполнен в программном обеспечении LYSYS II™.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Borowitz, M., Bauer, K.D., Duque, R.E., Horton, A.F., Marti, G., Muirhead, K.A., Peiper, S., Rickman, W., "Clinical applications of flow cytometry: Quality assurance and immunophenotyping of lymphocytes; approved guideline", 1998, NCCLS, 21, 18.
2. Stewart, C.C., Stewart, S.J., "Cell preparation for the identification of leukocytes", 1994, Methods Cell Biol., Chap 3, 41, 39-60.