

IOtest®
IgG1-FITC
Изотипический контроль

REF A07795
100 определений; 2 мл
20 мкл / определение



IOtest
Конъюгированное антитело



РУССКИЙ	Спецификации
Специфичность	Неприменимо
Клон	679.1Mc7
Гибридома	P3-X63-Ag.8.653 x Balb/c
Иммуноген	Небиологический гаптен
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Источник	Асцит
Очистка	Аффинная хроматография на белке А
Флуорохром	Флуоресцеин-изотиоцианат (ФИТЦ)
λ возбуждения	488 нм
Пик эмиссии	525 нм
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN ₃

ПРИМЕНЕНИЕ

Данный мышиный изотипический контроль IgG1-FITC из серии реактивов IOtest может использоваться для анализа образцов крови человека с помощью проточной цитометрии. Реактив позволяет оценить долю неспецифического окрашивания лейкоцитов или тромбоцитов с помощью специфических антител изотипа IgG1, конъюгированных с ФИТЦ, из серии IOtest.

ПРИНЦИП

Данный тест основан на способности специфических моноклональных антител связываться с антигенными детерминантами, которые экспрессированы лейкоцитами и тромбоцитами.

Специфическая окраска осуществляется путем инкубации образца со специфическим реактивом IOtest. После этого эритроциты лизируют, а лейкоциты или тромбоциты, на которые процесс лизиса не оказывает воздействия, исследуют методом проточной цитометрии.

Проточный цитометр измеряет рассеивание света клетками и их флуоресценцию. Он позволяет устанавливать границы целевой популяции клеток внутри электронного окна, задаваемого на гистограмме, которая соотносит рассеивание света под прямым углом (боковое рассеивание – Side Scatter или SS) с рассеиванием света под малым углом (прямое рассеивание – Forward Scatter или FS). На этапе гейтинга можно воспользоваться и другими гистограммами, которые содержат по два различных параметра, измеряемых цитометром, в зависимости от приложения, избранного пользователем.

Гистограмма типа FS versus SS позволяет исключать из рассмотрения обломки клеток, а также отличать лимфоциты от моноцитов и полиморфноядерных лейкоцитов. Окно накопления сигнала, ограничивающее целевую популяцию, используется для создания монопараметрической гистограммы, которая соотносит число событий с флуоресценцией выделенных таким образом клеток или тромбоцитов. Такой анализ позволяет отличить положительно окрашенные события от событий, рассматривающихся как неокрашенные. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи электронного окна.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ПРИЛОЖЕНИЙ

Стадии дифференцировки гемопоэтических клеток характеризуются наличием или отсутствием экспрессии поверхностных антигенов, которые можно идентифицировать с помощью моноклональных антител, имеющих четко определенную специфичность. Одной из трудностей, с которыми сталкиваются при анализе таких антигенов методами проточной цитометрии, является более или менее выраженная неспецифическая фиксация конъюгатов специфических моноклональных антител в процессе окрашивания. Чтобы оценить реальное значение этого положительного окрашивания, необходимо учесть

вклад неспецифической фиксации в уровень измеряемого сигнала (1, 2).

Данный изотипический контроль из серии реактивов IOtest служит для определения неспецифического окрашивания моноклональными антителами того же изотипа, конъюгированными с флуоресцеин-изотиоцианатом (ФИТЦ), из серии реактивов IOtest. При специфическом окрашивании границу между отрицательными и положительными событиями следует устанавливать для каждой исследуемой популяции в зависимости от сигнала, получаемого с изотипическим контролем.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Жидкие конъюгаты до и после вскрытия флакона следует хранить при температуре от 2 до 8°C в защищенном от света месте.

Стабильность в невскрытом флаконе: см. срок годности на флаконе.

Стабильность после вскрытия флакона: реактив сохраняет стабильность в течение 90 дней.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Минимизируйте воздействие света.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN₃), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза. Кроме того, в кислой среде из азид натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азид натрия на поверхности металлических труб рекомендуется перед удалением реактива в отходы развести его большим объемом воды, а затем слить в сток.
7. Все образцы крови следует рассматривать как потенциально инфицированные и принимать соответствующие меры предосторожности (работать в защитных перчатках, халатах и очках).
8. Запрещается набирать раствор в пипетку ртом. Следует избегать попадания образцов на кожу, слизистые оболочки и глаза.
9. Для удаления в отходы пробирок из-под образцов крови, а также одноразовых материалов, использованных при обработке образцов, их помещают в специальные контейнеры и направляют на сжигание.

ОБРАЗЦЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга собирают в стерильные пробирки, содержащие соль ЭДТА в качестве антикоагулянта. Использование других антикоагулянтов не рекомендуется.

Образцы следует хранить при комнатной температуре (18 – 25°C), не встряхивая. Перед забором аликвоты

для исследования образец следует перемешать путем легкого встряхивания пробирки, чтобы обеспечить однородное распределение клеток по объему. Образцы подлежат анализу в течение 24 часов после венопункции.

МЕТОДИКА НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки и одноразовые наконечники вместимостью 20, 100 и 500 мкл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Калибровочные микросферы: Флуоросферы Flow-Set™ Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse™ (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOtest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Специфические антитела, конъюгированные с ФИТЦ, из серии реактивов IOtest.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

ПРИМЕЧАНИЕ: Описанная ниже процедура действительна для стандартных приложений. Для ряда приложений Beckman Coulter объемы образца и реактива VersaLyse могут различаться. В таких случаях необходимо следовать инструкциям, приведенным в описании приложения.

Для каждого анализируемого образца помимо тест-пробирки требуется одна контрольная пробирка. Данный изотипический контроль, IgG1-FITC (Ref. A07795), адаптирован для использования с ФИТЦ-конъюгированными антителами серии IOtest.

1. В каждую тест-пробирку добавляют по 20 мкл специфического конъюгированного антитела IOtest, а в каждую контрольную пробирку – по 20 мкл данного изотипического контроля IgG1-FITC.
2. В тест-пробирку и контрольную пробирку вносят по 100 мкл образца. Осторожно встряхивают пробирки на приборе Vortex.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем производят лизис эритроцитов, при необходимости пользуясь рекомендациями по использованию выбранного реактива для лизиса. Например, если используется VersaLyse (Ref. A09777), следует обратиться к листку-вкладышу и рекомендуется воспользоваться процедурой «с одновременной фиксацией», которая состоит в добавлении 1 мл смеси "Fix-and-Lyse" приготавливаемой ex tempore. Немедленно встряхивают на Vortex в течение одной секунды, а затем инкубируют в течение

10 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте.

Если образец не содержит эритроцитов, добавляют 2 мл ФСБ.

5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:
 - 0,5 мл или 1 мл ФСБ, содержащего 0,1% формальдегида, если препараты предполагается хранить в течение 2–24 часов. (ФСБ, содержащий 0,1% формальдегида, можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800), имеющего концентрацию 10X, в 1 мл ФСБ.)
 - 0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

ПРИМЕЧАНИЕ: Во всех случаях препараты следует хранить при температуре от 2 до 8°C в защищенном от света месте.

ПАРАМЕТРЫ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Моноклональное антитело 679.1Mc7, принадлежащее к подклассу изотипа IgG1, не связывается специфически ни с одним из дифференцировочных антигенов, присутствующих на поверхности лейкоцитов и тромбоцитов человека.

СТОЙКОСТЬ

Чтобы проверить стойкость неспецифического окрашивания образца нормальной цельной крови данным реактивом, использовали его двукратное и десятикратное разведения, а препараты готовили согласно вышеописанной процедуре.

Результаты измерений средней интенсивности флуоресценции (СИФ) лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов приведены в нижеследующих таблицах:

Отрицательные целевые Лимфоциты	Число	СИФ	SD	CV (%)
1 : 1	3	0,123	0,00	3,1
1 : 2	3	0,123	0,00	0,5
1 : 10	3	0,128	0,00	1,4

Отрицательные целевые Моноциты	Число	СИФ	SD	CV (%)
1 : 1	3	0,568	0,01	2,2
1 : 2	3	0,591	0,02	3,4
1 : 10	3	0,962	0,01	0,6

Отрицательные целевые Гранулоциты	Число	СИФ	SD	CV (%)
1 : 1	3	0,697	0,02	2,6
1 : 2	3	0,640	0,01	1,0
1 : 10	3	0,737	0,00	0,2

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Реактивом, описанным выше, был обработан образец крови здорового взрослого человека. Результаты 12 выполненных в течение одного и того же дня с использованием одного и того же цитометра измерений средней интенсивности флуоресценции (СИФ) отрицательных (неокрашенных) событий проанализированы в нижеследующей таблице:

Отрицательные целевые IgG1 ⁻ лимфоциты	Число	СИФ	SD	CV (%)
IgG1 ⁻ лимфоциты	12	0,140	0,00	1,3
IgG1 ⁻ Моноциты	12	0,610	0,02	3,0
IgG1 ⁻ Гранулоциты	12	0,860	0,01	1,4

МЕЖЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

В течение одного и того же дня с использованием одной и той же целевой популяции неокрашиваемых клеток (лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов) было выполнено 12 измерений средней интенсивности флуоресценции (СИФ) отрицательных событий силами двух лаборантов; препараты подверглись анализу на двух различных цитометрах. Полученные результаты обобщены в следующих таблицах:

Цитометр №1:

Отрицательные целевые IgG1 ⁻ лимфоциты	Число	СИФ	SD	CV (%)
IgG1 ⁻ лимфоциты	12	0,140	0,00	1,3
IgG1 ⁻ Моноциты	12	0,610	0,02	3,0
IgG1 ⁻ Гранулоциты	12	0,860	0,01	1,4

Цитометр №2:

Отрицательные целевые IgG1 ⁻ лимфоциты	Число	СИФ	SD	CV (%)
IgG1 ⁻ лимфоциты	12	0,240	0,00	1,2
IgG1 ⁻ Моноциты	12	0,750	0,01	1,4
IgG1 ⁻ Гранулоциты	12	0,890	0,01	0,8

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

1. Проточная цитометрия может дать ложные результаты, если цитометр идеально не юстирован, рассеивание флуоресценции правильно не скомпенсировано, а области тщательно не установлены.
2. Предпочтительно использовать метод лизиса эритроцитов с отмыжкой, поскольку данный реактив не оптимизирован для методов лизиса без отмыжки.
3. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. Конъюгированное антитело в составе данного реактива откалибровано таким образом, чтобы обеспечить наилучшее отношение специфического сигнала к неспецифическому. Поэтому важно, чтобы соотношение объемов реактива и образца при каждом определении было одним и тем же.
5. В случае лейкоцитоза кровь следует разводить ФСБ приблизительно до концентрации 5×10^9 лейкоцитов в 1 л.
6. При таких заболеваниях, как тяжелая почечная недостаточность или гемоглобинопатия, лизис эритроцитов может идти медленно и быть неполным или даже невозможным. В этом случае рекомендуется выделять мононуклеарные клетки с использованием градиента плотности (например, Ficoll), а затем окрашивать их.

РАЗНОЕ

Примеры (Examples) и ссылки (References) смотрите в Приложении (Appendix).

ТОРГОВЫЕ МАРКИ

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

BD FACScan – зарегистрированная торговая марка компании BD Biosciences and Company.

ИЗГОТОВИТЕЛЬ:

IMMUNOTECH SAS
 a Beckman Coulter Company
 130 avenue de Latre de Tassigny
 B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
 Франция
 Отдел обслуживания клиентов: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

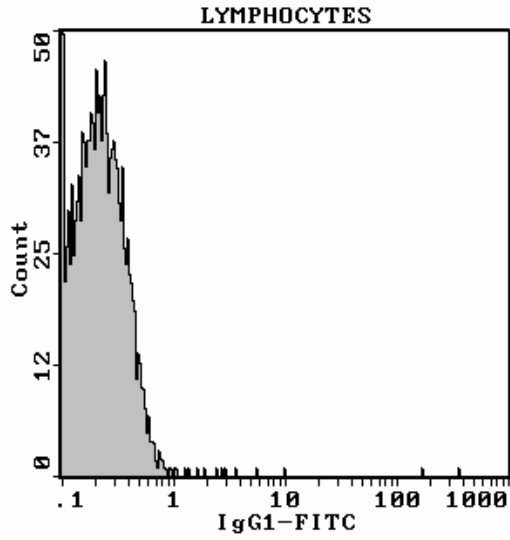


APPENDIX TO REF A07795

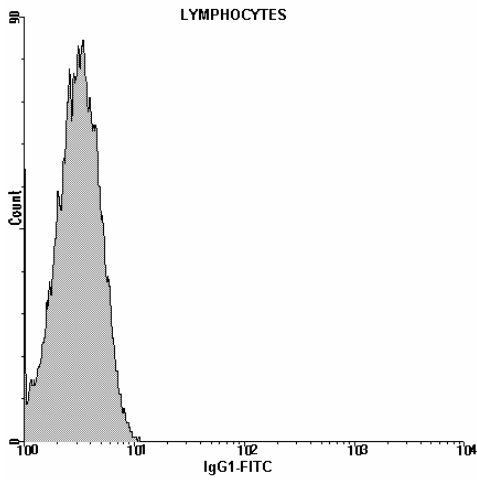
EXAMPLES

The graphs below are monoparametric representations (Count vs. Fluorescence Intensity) of lysed normal whole blood sample. Staining is with IOTest IgG1-FITC Isotypic Control (Ref. A07795). Gate is on lymphocytes.

Acquisition and analysis are performed with a COULTER® EPICS® XL™ flow cytometer equipped with System II™ software.



Acquisition is performed with a Becton Dickinson FACScan™ flow cytometer.



REFERENCES

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.