

IOTest®

## IgG1-PE

Изотипический контроль

КАТАЛОЖНЫЙ НОМЕР A07796

100 тестов; 2 мл

20 мкл / тест



IOTest

Конъюгаты антител

ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ  
IN VITRO



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

### НАЗНАЧЕНИЕ

Изотипический контроль из группы реагентов IOTest, приготовленный на основе конъюгатов мышиного IgG1 с PE, используется при выполнении анализа образцов крови человека на проточных цитофлуориметрах. Он 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 кровяных клеток характеризуются экспрессией или отсутствием экспрессии поверхностных антигенов, которые идентифицируются с помощью специфических 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).

Изотипический контроль IOTest служит для определения неспецифического связывания моноклональных антител того же изотипа, конъюгированных с 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 (NaN<sub>3</sub>), требуют осторожного обращения. Не проглатывайте, избегайте любого контакта с кожей, слизистой оболочкой и глазами. В кислой среде азид натрия способен образовывать взрывоопасную азотисто-водородную 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 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. Изотипический контроль IgG1-PE (кат. № A07796) адаптирован для анализа с использованием антител IOTest, конъюгированных с PE.

1. В пробирки для анализа клинических образцов добавьте по 20 мкл конъюгатов антител IOTest, а в пробирки для анализа контролей - по 20 мкл изотипического контроля IgG1-PE.
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 679.1Mc7 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.

Популяция отрицательных лимфоцитов	Количество измерений	СИФ	SD	CV (%)
1 : 1	3	0.132	0.00	1.7
1 : 2	3	0.128	0.00	0.4
1 : 10	3	0.128	0.00	2.0

Популяция отрицательных моноцитов	Количество измерений	СИФ	SD	CV (%)
1 : 1	3	0.359	0.02	4.9
1 : 2	3	0.313	0.02	5.4
1 : 10	3	0.527	0.01	1.0

Популяция отрицательных гранулоцитов	Количество измерений	СИФ	SD	CV (%)
1 : 1	3	0.413	0.01	2.5
1 : 2	3	0.393	0.01	2.9
1 : 10	3	0.389	0.00	0.8

### ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Отрицательные клетки	Количество измерений	СИФ	SD	CV (%)
IgG1 <sup>-</sup> лимфоциты	12	0.28	0.00	1.1
IgG1 <sup>-</sup> моноциты	12	0.50	0.01	1.3
IgG1 <sup>-</sup> гранулоциты	12	0.78	0.01	0.8

### 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. Полученные результаты суммированы в следующих таблицах:

#### Цитометр # 1

Отрицательные клетки	Количество измерений	СИФ	SD	CV (%)
IgG1 <sup>-</sup> лимфоциты	12	0.28	0.00	1.1
IgG1 <sup>-</sup> моноциты	12	0.50	0.01	1.3
IgG1 <sup>-</sup> гранулоциты	12	0.78	0.01	0.8

#### Цитометр # 2

Отрицательные клетки	Количество измерений	СИФ	SD	CV (%)
IgG1 <sup>-</sup> лимфоциты	12	0.13	0.00	1.2
IgG1 <sup>-</sup> моноциты	12	0.23	0.00	1.8
IgG1 <sup>-</sup> гранулоциты	12	0.41	0.01	1.5

### 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 нормы 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 x 10<sup>9</sup>/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 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 является зарегистрированным торговым знаком 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

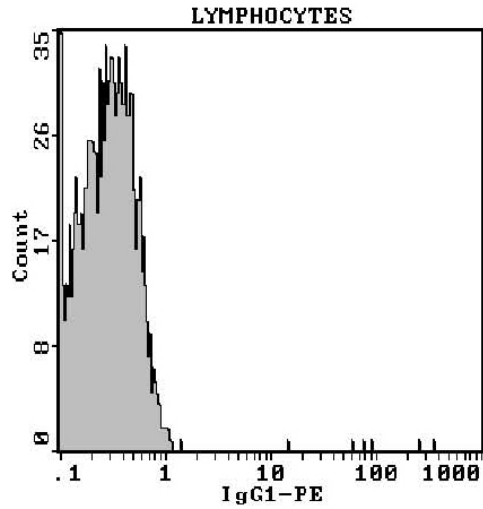
www.beckmancoulter.com



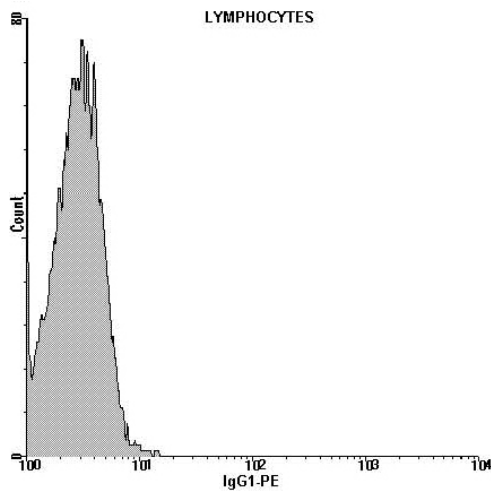
## ПРИЛОЖЕНИЕ К РУКОВОДСТВУ № A07796

Ниже показаны однопараметровые гистограммы (количество клеток – интенсивность флуоресценции), полученные при анализе лизированного образца нормальной цельной крови. Для окрашивания использовался изотипический контроль IOTest IgG1-PE Isotypic Control (кат. № A07796). Выполнялось выделение лимфоцитов программными средствами.

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



Гистограмма 2. Считывание данных выполнено с помощью проточного цитофлуориметра Becton Dickinson FACScan™.



## 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.