

## IMMUNOPREP™

### Набор реагентов для лизиса эритроцитов цельной крови

КАТАЛОЖНЫЙ НОМЕР 7546946

КАТАЛОЖНЫЙ НОМЕР 7546999

PN 7507950-L



#### Для диагностики *in vitro*

#### НАЗНАЧЕНИЕ

Система реагентов IMMUNOPREP представляет собой набор реагентов для подготовки лейкоцитов цельной крови к проточному цитофлуориметрическому исследованию. Реагенты IMMUNOPREP (кат. № 7546946) предназначены для использования со станцией пробоподготовки COULTER® Q-PREP™<sup>1</sup>; реагенты IMMUNOPREP (кат. № 7546999) используются при работе со станциями COULTER MULTI-Q-PREP™, COULTER TQ-Prep™<sup>2,3</sup> и FP 1000.

#### КРАТКАЯ ИНФОРМАЦИЯ О НАБОРЕ

Возможность классифицировать лейкоциты человека на основании экспрессии поверхностных антигенов обеспечила исследователей ценной диагностической и прогностической информацией.<sup>4, 5</sup> Ранее для подготовки лейкоцитов к иммунофлуоресцентному анализу использовался лизис цельной крови и выделение в градиенте плотности.<sup>6</sup> Реагенты для этих процедур имеются в продаже. Эти методики требуют отмывки образцов для удаления несвязанных антител и остатков клеток. При перемешивании и центрифугировании злокачественные или "активированные" клетки могут быть повреждены. Кроме того, вследствие адгезии в контейнерах или неполного осаждения может происходить избирательная потеря клеток.<sup>7</sup> Большинство процедур требуют значительных затрат времени и сил, точного соблюдения методики и становятся утомительными при большом количестве образцов. Реагенты IMMUNOPREP были разработаны в 1987 году. Они предназначены для быстрой автоматизированной подготовки образцов цельной крови к иммунофенотипированию. В настоящее время данные реагенты широко используются в различных цитофлуориметрических лабораториях.<sup>8,9</sup>

#### ПРИНЦИПЫ ПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦОВ

Реагенты IMMUNOPREP позволяют выполнить быстрый, мягкий лизис эритроцитов без отмывки и сохранить целостность внутренней и поверхностной структуры лейкоцитов.<sup>8</sup> Устраняется потеря клеток вследствие отмывки и центрифугирования. Отсутствие этих этапов существенно снижает время подготовки проб. Также время подготовки уменьшается за счет автоматизации, что позволяет быстро получать результаты анализа в чрезвычайных ситуациях.

Набор IMMUNOPREP состоит из трех специально подобранных реагентов, которые используются только в работе со специфицированной станцией пробоподготовки. Набор состоит из следующих реагентов:

IMMUNOPREP A, реагент для лизиса эритроцитов;  
IMMUNOPREP B, реагент для стабилизации лейкоцитов;  
IMMUNOPREP C, реагент для фиксации мембран клеток.

#### РЕАГЕНТЫ

IMMUNOPREP Reagent System (кат. № 7546946) используется для работы со станцией пробоподготовки COULTER Q-PREP. IMMUNOPREP Reagent System (кат. № 7546999), используется для работы со станциями пробоподготовки COULTER MULTI-Q-PREP, COULTER TQ-Prep и FP 1000.

Упаковка реагентов соответствует станции пробоподготовки.

Объемы реагентов IMMUNOPREP:

Реагент	Q-PREP	TQ-Prep/ MULTI-Q-PREP/FP 1000
IMMUNOPREP A	70 мл	215 мл
IMMUNOPREP B	32 мл	95 мл
IMMUNOPREP C	14 мл	36 мл

#### СОСТАВ РЕАГЕНТА

IMMUNOPREP A	Муравьиная кислота.....	1.2 мл/л
IMMUNOPREP B	Карбонат натрия.....	6.0 г/л
	Хлорид натрия.....	14.5 г/дл
	Сульфат натрия.....	31.3 г/л
IMMUNOPREP C	Параформальдегид.....	10.0 г/л
	Буфер: Соль \ Концентрация (г/л)	
	.....NaCl	8,00
	.....KCl	0,20
	.....Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44
	.....KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24
	.....pH	7,4

#### ВНИМАНИЕ

1. Реагент IMMUNOPREP C содержит 1% формальдегид. Избегайте контакта с кожей и попадания в глаза, поскольку это может иметь необратимые последствия. Не вдыхайте испарения реагента. Используйте соответствующие средства защиты, такие как перчатки и защитные очки.
2. Обращайтесь с пробами, образцами и всеми контактирующими с ними материалами, как с потенциально инфекционными. Используйте надлежащие методы утилизации.
3. Никогда не отбирайте пробы и реагенты через пипетку ртом, не допускайте контакта с кожей и слизистыми оболочками.
4. Не используйте реагенты с истекшим сроком годности, указанным на этикетке флаконов или набора реагентов.
5. Реагенты IMMUNOPREP следует использовать в качестве единого набора, предназначенного для специфицированного прибора.
6. Изменение указанного времени инкубации или температуры может привести к появлению недостоверных результатов.
7. Контаминация микроорганизмами может вызвать появление недостоверных результатов.
8. При работе с данными реагентами соблюдайте требования GLP (Good Laboratory Practice).
9. При контакте с кожей могут вызвать сенсибилизацию.
10. При попадании реагента в глаза немедленно промойте их большим количеством воды и обратитесь к врачу.
11. При работе с реагентом используйте защитную одежду, перчатки, маску и очки.
12. При контакте с реагентом или если вы почувствовали недомогание, немедленно обратитесь за медицинской помощью (если возможно, покажите врачу этикетку реагента).

#### ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Подготовка не требуется. Используйте реагенты IMMUNOPREP непосредственно во флаконах; перед установкой флаконов в станцию пробоподготовки перемешайте реагенты, аккуратно переворачивая флаконы.

#### ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Храните при комнатной температуре (20 - 25°C). Нераспечатанные реагенты стабильны в течение

срока, указанного на этикетке набора. Распечатанные реагенты стабильны в течение 30 дней после установки в станцию пробоподготовки.

Реагенты не содержат азидов, разлагаются микроорганизмами и не чувствительны к свету. Если вы случайно заморозили реагенты, следует оставить их при комнатной температуре до полного оттаивания. Перед использованием перемешать, аккуратно переворачивая флаконы. Пустые флаконы следует немедленно утилизировать.

#### ПРИЗНАКИ НЕПРИГОДНОСТИ РЕАГЕНТА

В норме реагенты IMMUNOPREP представляют собой прозрачные жидкости. Изменение физического состояния реагентов, вариации значений контролей или невозможность провести лизис эритроцитов нормальной крови могут свидетельствовать о непригодности реагента. Такие реагенты использовать не рекомендуется.

#### ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

**ВНИМАНИЕ:** Стабильность образцов крови колеблется. Для оптимального лизиса следует выполнить анализ в течение 6 часов после венопункции. Неокрашенные образцы крови с антикоагулянтом до начала подготовки должны храниться при температуре 20 - 25°C. Не замораживайте образцы.

Отберите асептически образцы венозной крови с помощью венопункции в пробирки с антикоагулянтом (рекомендуется ЭДТА).<sup>10</sup> При использовании вакуумных пробирок для отбора, заполните их так, чтобы обеспечить необходимое соотношение антикоагулянта и крови (1.5 мг антикоагулянта на 1 мл крови). Для каждого исследования необходимо 100 мкл цельной крови. Отберите достаточное количество крови для выполнения исследований, анализа контроля и разведения образцов аутологичной плазмы, если требуется. Для каждого образца крови необходимо подсчитать количество лейкоцитов и их выживаемость, используя стандартную лабораторную процедуру. Рекомендованная выживаемость клеток 90%, однако в случае некоторых аномальных образцов это значение труднодостижимо.

#### ПОДГОТОВКА ЛЕЙКОЦИТОВ С ПОМОЩЬЮ РЕАГЕНТОВ IMMUNOPREP

##### ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Реагенты IMMUNOPREP (кат. № 7546946) для работы со станцией пробоподготовки COULTER® Q-PREP™<sup>1</sup>;  
Реагенты IMMUNOPREP (кат. № 7546999) для работы со станциями COULTER MULTI-Q-PREP™, COULTER TQ-Prep™<sup>2,3</sup> и FP 1000.

##### НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Станция пробоподготовки COULTER Q-PREP, COULTER MULTI-Q-PREP, COULTER TQ-Prep или FP 1000  
Моноклональные антитела CYTO-STAT®/COULTER CLONE® или эквивалентные  
Изотипический контроль CYTO-STAT/COULTER CLONE или эквивалентный  
Дилуэнт (если требуется) – аутологичная плазма  
Силиконовая жидкость для стеклянной посуды (Prosil®-28, PCR, Inc.)  
Пробирки для анализа 12 x 75 мм  
Пробирки для отбора цельной крови с антикоагулянтом (рекомендуется использовать ЭДТА)  
Пипетки без градуировки  
Микропипетки  
Проточный цитофлуориметр (COULTER EPICS® XL-MCL™, XL™, FC 500)  
Счетчик клеток (COULTER STKS™ или эквивалентный) или гемоцитометр

#### ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦОВ

1. Для каждого образца промаркируйте пробирки для анализа и изотипического контроля (12 x 75 мм). На вкладыше к упаковкам реагентов приводится полная информация

по работе, включающая настройку параметров подсчета и время инкубации.

2. На дно помеченной пробирки для анализа внесите 100 мкл цельной крови с антикоагулянтом. Убедитесь в том, что кровь не попала на стенки и верхнюю часть пробирки.

**ЗАМЕЧАНИЕ:** Если концентрация клеток не попадает в диапазон 3,000-10,000 клеток/мкл, может потребоваться корректировка концентрации. Для разведения рекомендуется использовать аутологичную плазму. Рекомендованная концентрация клеток приводится на вкладыше к упаковке моноклональных антител.

**ЭТО ВАЖНО:** Нелизированные эритроциты со стенок и верхней части пробирки могут попасть в подготовленный образец и вызвать появление недостоверных результатов. Для удаления капель крови со стенок пробирки используйте хлопковые палочки.

3. Добавьте 10 мкл изотипического контроля, 10 мкл моноклональных антител CYTO-STAT/COULTER CLONE или требующееся количество антител, указанное на вкладыше к упаковке. Перемешайте на вортексе.

4. Инкубируйте образцы с антителами около 10 минут при комнатной температуре (20 - 25°C). Инструкции по инкубации см. на вкладыше к упаковке антител.

5. Перед началом процедуры лизиса выполните включение станции пробоподготовки в соответствии с инструкциями производителя. См. соответствующее руководство для станции.<sup>1, 2, 3</sup> Если вы работаете со станцией Q-PREP, переходите к шагу 6, если вы работаете со станцией MULTI-Q-PREP – к шагу 7, если вы работаете со станцией TQ-Prep – к шагу 8, а если со станцией FP 1000 – к шагу 11.

## 6. ТОЛЬКО ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ СТАНЦИИ Q-PREP:

**ЗАМЕЧАНИЕ:** Перед анализом образцов на проточных цитометрах, измеряющих светорассеяние в прямом направлении под малыми углами (FALS), добавьте к подготовленным в станции пробоподготовки образцам 0.5 мл деионизированной или дистиллированной воды.

- a. Установите пробирки в прибор и нажмите кнопку запуска 35- или 90-секундного цикла подготовки в зависимости от используемого метода инкубации. Закройте дверцу прибора, чтобы начать цикл. Переходите к шагу 9.

## 7. ТОЛЬКО ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ СТАНЦИИ MULTI-Q-PREP:

**ЗАМЕЧАНИЕ:** Чтобы проанализировать образцы на проточных цитометрах, измеряющих светорассеяние в прямом направлении под малыми углами (FALS), переключатель станции пробоподготовки MULTI-Q-PREP должен быть в верхнем положении "ON" (Включено). В этом положении выполняется дозирование деионизированной или дистиллированной воды. Подробную информацию см. в руководстве к станции MULTI-Q-PREP.<sup>2</sup>

- a. Загрузите пробирки в карусель образцов по часовой стрелке. Установите карусель на основание карусели станции MULTI-Q-PREP. Закройте крышку карусели.
- b. Нажмите кнопку запуска автоматической подготовки образцов. Переходите к шагу 9.

## 8. ТОЛЬКО ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ СТАНЦИИ TQ-Prep:

**ЗАМЕЧАНИЕ:** Чтобы проанализировать образцы на проточных цитометрах, измеряющих светорассеяние в прямом направлении под малыми углами (FALS), станция пробоподготовки TQ-PREP должна находиться в режиме работы с четырьмя реагентами. Подробную информацию см. в руководстве к станции TQ-PREP.<sup>3</sup>

- a. Загрузите пробирки в карусель по часовой стрелке. Установите карусель на основание в станцию TQ-Prep. Закройте крышку карусели.

- b. Нажмите кнопку запуска автоматической подготовки образцов. Переходите к шагу 9.

9. Если цитофлуориметрический анализ проводится в течение 2 часов после подготовки образцов, образцы можно хранить при комнатной температуре (20 - 25°C). В противном случае закройте пробирки и храните образцы в темном месте при температуре 2 - 8°C. Проанализируйте образцы в течение 24 часов.

10. Проанализируйте подготовленные образцы с помощью проточного цитофлуориметра. См. руководства к прибору.

## 11. ТОЛЬКО ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ СТАНЦИИ FP 1000:

- a. Загрузите пробирки в карусель по часовой стрелке. Установите карусель в станцию FP 1000. Подробную информацию см. в руководстве к станции FP 1000.<sup>11</sup>

**ЭТО ВАЖНО:** Подробную информацию о подготовке реагентов см. в руководстве к станции FP 1000.

**ЗАМЕЧАНИЕ:** При работе с проточными цитометрами, измеряющими светорассеяние под малыми углами (FALS), возможно, потребуется отрегулировать пороговое значение, коэффициент усиления светорассеяния в прямом направлении и высокое напряжение при регистрации светорассеяния в боковом направлении для того, чтобы добиться отчетливого разделения лейкоцитов на три субпопуляции.

## КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

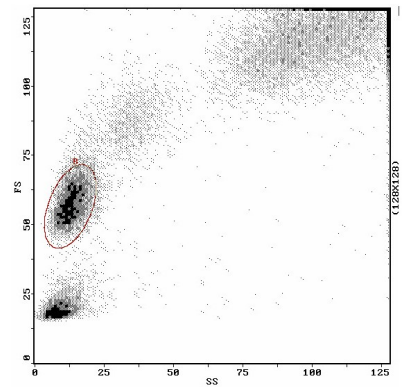
Все образцы после лизиса эритроцитов необходимо осмотреть, также необходимо оценить диаграммы светорассеяния. Нелизированные образцы мутные. При неполном лизисе на диаграммах светорассеяния заметны тяжелые или аномальные лейкоциты. В качестве контроля работы системы вместе с исследуемыми образцами следует подготовить и проанализировать образец с известными характеристиками.

Чтобы получить достоверные результаты убедитесь в том, что проточный цитофлуориметр EPICS XL-MCL (или эквивалентный) правильно настроен, светорассеяние и флуоресценция стандартизованы, а компенсация флуоресценции установлена верно. См. руководства к проточному цитофлуориметру.

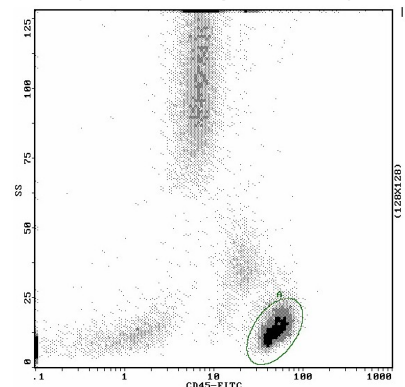
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Репрезентативные данные на рисунках 1 - 4 были получены с использованием образцов нормальной цельной крови с ЭДТА, моноклональных антител CYTO-STAT/tetraCHROME™ CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 и реагентов IMMUNOPREP. Образцы были проанализированы с помощью проточного цитофлуориметра EPICS XL-MCL с использованием обжимающей жидкости COULTER IsoFlow™.

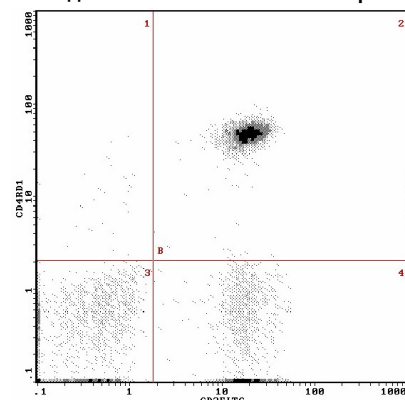
**Рисунок 1. Двупараметровая диаграмма SS – FS для идентификации лимфоцитов (логическое ограничение A).**



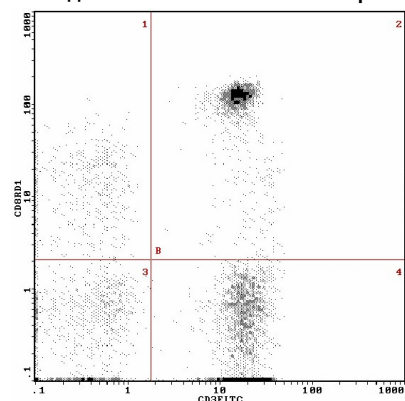
**Рисунок 2. Двупараметровая диаграмма CD45-FITC – SS для идентификации лимфоцитов (логическое ограничение A).**



**Рисунок 3. Двупараметровая диаграмма CD3-FITC – CD4-RD1, в качестве логического ограничения используется популяция лимфоцитов. Квадранты устанавливаются по данным исследования изотипического контроля.**



**Рисунок 4. Двупараметровая диаграмма CD3-FITC – CD8-RD1, в качестве логического ограничения используется популяция лимфоцитов. Квадранты устанавливаются по данным исследования изотипического контроля.**



## ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Реагенты необходимо использовать до истечения срока годности, указанного на этикетке набора.

2. Приведенные данные получены с использованием образцов нормальной цельной крови.
3. Мутность образцов является признаком неполного лизиса. Убедитесь в том, что станция дозирует правильные объемы реагентов и хорошо перемешивает образцы. Процедура гравиметрической калибровки приводится в руководствах к станциям Q-PREP, MULTI-Q-PREP, TQ-Prep и FP 1000.
4. Ядродержащие эритроциты (NRBC) могут лизироваться не полностью и на основании данных светорассеяния включаться в популяцию лейкоцитов.
5. Реальное количество образцов, которое можно подготовить с использованием одного набора реагентов, может зависеть от режима эксплуатации станции.

**ЗАМЕЧАНИЕ:** Далее приводятся возможные сценарии ежедневной работы для станции MULTI-Q-PREP.

- Сценарий А: Малая загрузка, 2 цикла в день (подготовка 5 образцов, затем еще 5 через 30 и более минут)
- Сценарий В: Малая загрузка, 1 цикл в день (10 образцов)
- Сценарий С: Большая загрузка, 1 набор реагентов в день (используется набор целиком или несколько наборов без пауз)

В таблице 1 приводится среднее количество образцов, заправок станции и общий расход реагентов при использовании набора IMMUNOPREP.

Таблица 1 Расход реагентов при различных режимах работы (сценарии А, В и С)

	А	В	С
КОЛИЧЕСТВО ОБРАЗЦОВ	269	289	321
КОЛИЧЕСТВО ЗАПРАВОК*	52	29	1
ВСЕГО	321	318	322

\*Отражает расход реагентов при включении и после 30 минутного периода простоя станции MULTI-Q-PREP. Полные инструкции по работе приводятся в руководстве к станции пробоподготовки MULTI-Q-PREP.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. COULTER Q-PREP Workstation Reference Manual, PN 4235825. Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA 92835.
2. COULTER MULTI-Q-PREP Workstation Reference Manual, COULTER PN 4237167, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA 92835.
3. COULTER TQ-Prep Workstation Reference Manual, PN 4237395, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA 92835.
4. Rose NR and Friedman H, eds. 1980. Manual of clinical immunology, 2d edition. American Society for Microbiology, Washington, DC.
5. Guidelines for prophylaxis against pneumocystis carinii pneumonia for persons infected with human immunodeficiency virus. Center for Disease Control Morbidity and Mortality Weekly Report 38 (S-5):1-9.
6. Mishell BB and Shiigi AM. 1980. Selected methods in cellular immunology. San Francisco: WH Freeman and Co.
7. Caldwell CW and Taylor HM. 1986. A rapid no-wash technique for immunophenotypic analysis by flow cytometry. Am J Clin Path 86(5):600.
8. Barker JW. 1988. An innovative lymphocyte preparation system for flow cytometry. Am Clin Lab 7(7):32.

9. Kotylo PK, Baenzinger JC, Yoder MC, Engle WA and Bolinger CD. 1990. Rapid analysis of lymphocyte subsets in cord blood. Am J Clin Path 93(2):263-266.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards; Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture; Approved Standard: 1991. NCCLS Document H3-A3.
11. FP 1000 Cell Preparation System Reference Manual, PN 623112, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA 92835.

#### ЗАКАЗ РЕАГЕНТОВ

IMMUNOPREP Reagent System (кат. № 7546946)  
IMMUNOPREP Reagent System (кат. № 7546999)

За дополнительной информацией, а также при получении поврежденного товара, обращайтесь в местное представительство компании Beckman Coulter. Телефон для лабораторий в США и Канаде 800-526-7694.

#### ТОРГОВЫЕ ЗНАКИ

COULTER, CYTO-STAT, COULTER CLONE, EPICS, IsoFlow, tetraCHROME, Q-PREP, MULTI-Q-PREP, IMMUNOPREP, XL, XL-MCL, логотип Beckman Coulter, STKS и TQ-Prep являются торговыми знаками компании Beckman Coulter Inc.

Prosil-28 является торговым знаком компании PCR, Inc.

Набор реагентов IMMUNOPREP Reagent System защищен патентом 5,030,554.



Beckman Coulter, Inc.  
4300 N. Harbor Blvd.  
Fullerton, CA 92835  
[www.beckmancoulter.com](http://www.beckmancoulter.com)



Beckman Coulter Ireland Inc.  
Mervue Business Park,  
Mervue, Galway,  
Ireland (353 91 774068)

Распечатано в России  
Изготовлено в США

© 2005 Beckman Coulter, Inc.  
Авторские права защищены.