



Реактив для пермеабиллизации лейкоцитов



РУССКИЙ	Реактив 1	Реактив 2
	Фиксирующее вещество	Пермеабиллизующее вещество
<b>Форма выпуска</b>	Жидкость	Жидкость
<b>Активный ингредиент</b>	Формальдегид	Сапонин
<b>Объем</b>	5 мл	5 мл
<b>Число флаконов</b>	3 флакона	3 флакона
<b>Объем на одно определение</b>	100 мкл	100 мкл

## ПРИМЕНЕНИЕ

IntraPrep состоит из двух готовых к употреблению реактивов, которые увеличивают проницаемость плазматической мембраны лейкоцитов, что позволяет определять внутриклеточные антигенные детерминанты с помощью флуоресцирующих моноклональных антител. IntraPrep используют для приготовления биологических образцов к анализу методом проточной цитометрии. Реактив оптимизирован для минимизации неспецифического окрашивания при исследовании данного типа (1 – 4).

## ПРИНЦИП

На первом этапе клетки фиксируют реактивом 1. После отмывания лейкоциты пермеабиллизуют реактивом 2; при этом происходит лизис эритроцитов. На следующем этапе клетки подвергают воздействию конъюгированных моноклональных антител, специфичных к внутриклеточным антигенным детерминантам. Затем лейкоциты анализируют методами проточной цитометрии. Тем не менее, возможность визуализации поверхностных антигенных детерминант сохраняется. В этом случае конъюгаты специфических моноклональных антител инкубируют с клетками до фиксации.

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.

Флуоресценция ограниченной популяции клеток анализируется, чтобы отличить положительно окрашенные события от неокрашенных. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи гейтинга.

## ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

IntraPrep следует хранить при 18 – 25°C.

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. Минимизируйте воздействие света.
4. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
5. Реактив 1 содержит формальдегид. Формальдегид токсичен и вызывает аллергические реакции. Возможно, формальдегид является канцерогеном.

Запрещается набирать раствор в пипетку ртом. Следует избегать попадания образцов на кожу, слизистые оболочки, глаза и одежду.

6. Реактив 2 содержит азид натрия (NaN<sub>3</sub>). Он требует 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. 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 антикоагулянт (соль ЭДТА, цитрат-декстрозу или гепарин). 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 10, 20, 50, 100 и 500 мкл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Калибровочные микросферы: Флуоросферы Flow-Set™ Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Специфические моноклональные антитела (мАт).
- Изотипические контроли.
- Буфер (ФСБ: 0,01M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

## ПРОЦЕДУРЫ

### А - Внутрицитоплазматическое окрашивание

Число эритроцитов в образце не должно превышать 6 x 10<sup>6</sup>/мкл (6 x 10<sup>12</sup>/л). При необходимости образец разводят ФСБ.

Число лейкоцитов в образце не должно превышать 5 x 10<sup>3</sup>/мкл (5 x 10<sup>9</sup>/л). При необходимости образец разводят ФСБ.

Для каждого анализируемого образца помимо тест-пробирки необходимо иметь контрольную пробирку, в которой клетки образца смешивают с изотипическим контролем, соответствующим выбранному специфическому реактиву для окрашивания.

1. В тест-пробирку и контрольную пробирку вносят по 50 мкл исследуемого образца.
2. В тест-пробирку и контрольную пробирку добавляют по 100 мкл реактива 1. Сразу после каждого добавления пробирки энергично встряхивают на приборе Vortex.
3. Инкубируют в течение 15 минут при комнатной температуре (18 – 25°C).
4. В каждую пробирку добавляют по 4 мл ФСБ.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 300 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. В тест-пробирку и контрольную пробирку добавляют по 100 мкл реактива 2. ВСТРЯХИВАТЬ С ПОМОЩЬЮ VORTEX НЕ СЛЕДУЕТ; реактив 2 должен естественным образом диффундировать внутрь осадка клеток.
8. Инкубируют в течение 5 мин при комнатной температуре (18 – 25°C), НЕ ВСТРЯХИВАЯ.
9. Медленно покачивают пробирки руками в течение 2 – 3 секунд.
10. В тест-пробирку вносят 20 мкл мАТ (специфического к внутрицитоплазматической антигенной детерминанте).
11. В каждую контрольную пробирку вносят 20 мкл изотипического контроля.
12. Осторожно встряхивают пробирки по очереди на приборе Vortex.
13. Инкубируют в течение 15 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
14. В каждую пробирку добавляют по 4 мл ФСБ.
15. Центрифугируют в течение 5 минут при 300 g при комнатной температуре.
16. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток в 0,5 или 1 мл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) в рабочем разведении (1X). Фиксированные таким образом препараты можно хранить в темноте при температуре от 2 до 8°C в течение 24 часов.

## Б - Окрашивание внутрицитоплазматических и мембранных детерминант

Число эритроцитов в образце не должно превышать  $6 \times 10^6/\text{мкл}$  ( $6 \times 10^{12}/\text{л}$ ). При необходимости образец разводят ФСБ.

Число лейкоцитов в образце не должно превышать  $5 \times 10^3/\text{мкл}$  ( $5 \times 10^9/\text{л}$ ). При необходимости образец разводят ФСБ.

Для каждого анализируемого образца помимо тест-пробирки необходимо иметь контрольную пробирку, в которой клетки образца смешивают с изотипическим контролем, соответствующим выбранному специфическому реактиву для окрашивания.

1. В тест-пробирку и в контрольную пробирку вносят по 50 мкл исследуемого образца.
2. В тест-пробирку вносят 20 мкл МАт (специфического к мембранной антигенной детерминанте).
3. В каждую контрольную пробирку вносят по 20 мкл изотипического контроля.
4. Осторожно встряхивают пробирки по очереди на приборе Vortex.
5. Инкубируют в течение 15 мин при комнатной температуре ( $18 - 25^\circ\text{C}$ ) в защищенном от света месте.
6. В тест-пробирку и контрольную пробирку добавляют по 100 мкл реактива 1. Сразу после каждого добавления пробирки энергично встряхивают на приборе Vortex.
7. Инкубируют в течение 15 минут при комнатной температуре ( $18 - 25^\circ\text{C}$ ).
8. В каждую пробирку добавляют по 4 мл ФСБ.
9. Центрифугируют в течение 5 минут при 300 г при комнатной температуре.
10. Удаляют супернатант аспирацией.
11. В тест-пробирку и контрольную пробирку добавляют по 100 мкл реактива 2. **ВСТРЯХИВАТЬ С ПОМОЩЬЮ VORTEX НЕ СЛЕДУЕТ**; реактив 2 должен естественным образом диффундировать внутрь осадка клеток.
12. Инкубируют в течение 5 мин при комнатной температуре ( $18 - 25^\circ\text{C}$ ), **НЕ ВСТРЯХИВАЯ**.
13. Медленно покачивают пробирки руками в течение 2 – 3 секунд.
14. В тест-пробирку вносят 20 мкл МАт (специфического к внутрицитоплазматической антигенной детерминанте).
15. В каждую контрольную пробирку вносят по 20 мкл изотипического контроля.
16. Осторожно встряхивают пробирки по очереди на приборе Vortex.
17. Инкубируют в течение 15 мин при комнатной температуре ( $18 - 25^\circ\text{C}$ ) в защищенном от света месте.
18. В каждую пробирку добавляют по 4 мл ФСБ.
19. Центрифугируют в течение 5 минут при 300 г при комнатной температуре.

20. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток в 0,5 или 1 мл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) в рабочем разведении (1X). Фиксированные таким образом препараты можно хранить в темноте при температуре от 2 до  $8^\circ\text{C}$  в течение 24 часов.

## ПАРАМЕТРЫ ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

В течение одного и того же дня с использованием одного и того же цитометра было выполнено 12 измерений процентного содержания гранулоцитов относительно всех лейкоцитов в крови одного донора. Таким образом идентифицируют гранулоциты с одной стороны по светорассеянию (FS versus SS), а с другой стороны по экспрессии миелопероксидазы (МПО). Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевые клетки	Число	Средняя величина (%)	SD	CV (%)
Гранулоциты (FS vs SS)	12	52,4	1,38	2,6
Гранулоциты (МПО)	12	55,6	1,6	2,9

## МЕЖЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

В течение одного и того же дня силами двух лаборантов было выполнено 12 измерений содержания гранулоцитов в процентах к общему числу лейкоцитов в крови одного донора. Таким образом идентифицируют гранулоциты с одной стороны по светорассеянию (FS versus SS), а с другой стороны по экспрессии миелопероксидазы (МПО). Препараты анализировали на двух различных цитометрах. Полученные результаты обобщены в следующих таблицах:

Цитометр №1:

Целевые клетки	Число	Средняя величина (%)	SD	CV (%)
Гранулоциты (FS vs SS)	12	44,4	0,72	1,6
Гранулоциты (МПО)	12	47,2	0,62	1,3

Цитометр №2:

Целевые клетки	Число	Средняя величина (%)	SD	CV (%)
Гранулоциты (FS vs SS)	12	44,5	0,90	2,0
Гранулоциты (МПО)	12	46,2	0,76	1,7

## 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. Некоторые антигенные детерминанты могут быть чувствительны к формальдегиду или сапониу. Каждой лаборатории необходимо контролировать условия использования моноклональных антител.
3. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. Данный реактив оптимизирован таким образом, чтобы обеспечить наилучшее отношение специфического сигнала к неспецифическому. Поэтому важно, чтобы соотношение объема реактива и числа лейкоцитов при каждом определении было одним и тем же.
5. В случае цитоза образец следует разводить ФСБ таким образом, чтобы концентрация лейкоцитов стала меньше  $5 \times 10^9/\text{л}$ , а концентрация эритроцитов меньше  $6 \times 10^{12}/\text{л}$ .
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, Flow-Set, IOTest, System II и XL являются зарегистрированными торговыми марками компании Beckman Coulter Inc.

## ИЗГОТОВИТЕЛЬ:

IMMUNOTECH SAS  
a Beckman Coulter Company  
130 avenue de Lattre de Tassigny  
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9  
Франция

Отдел обслуживания клиентов: (33) 4 91 17 27 27

[www.beckmancoulter.com](http://www.beckmancoulter.com)

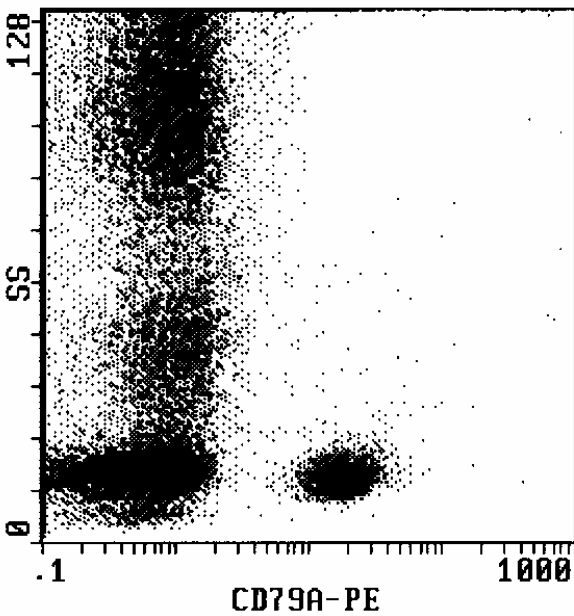
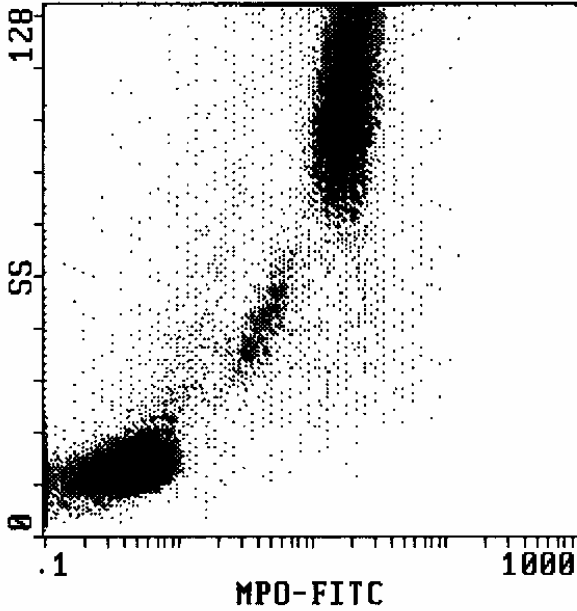


## APPENDIX TO REF A07803

### EXAMPLES

The graphs below are ungated biparametric representations (Side Scatter vs Fluorescence Intensity) of normal whole blood sample. Intracellular staining is with MPO FITC-conjugated monoclonal antibody and with CD79a PE-conjugated monoclonal antibodies.

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



### REFERENCES

1. Campana, D., Thompson, J.S., Amlot, P., Brown, S., Janossy, G., "The cytoplasmic expression of CD3 antigens in normal and malignant cells of the T lymphoid lineage", 1987, *J. Immunol.*, 138, (2), 648-655.
2. Koeffler, H.P., Ranyard, J., Pertcheck, M., "Myeloperoxidase: its structure and expression during myeloid differentiation", 1985, *Blood*, 65, (2), 484-491.
3. Picker, L.J., Singh, M.K., Zdraveski, Z., Treer, J.R., Waldrop, S.L., Bergstresser, P.R., Maino, V.C., "Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry", 1995, *Blood*, 86, (4), 1408-1419.
4. Lees, O., "Immunophénotypage des cellules sanguines : du prélèvement à la lecture au cytomètre : les différentes méthodes", 1996, *Revue Française des Laboratoires*, 287, 33-39.