



Mouse IgG₁

Флуоресцентные контроли для использования
с клетками человека

Форма	Кат. №
FITC	345815
PE	345816
PerCP	345817
PerCP-Cy5.5	347221
PE-Cy7	348808
APC	345818
APC-Cy7	348812

1/2011

23-13708-02



BD, логотип BD и другие товарные знаки являются
собственностью компании Becton, Dickinson and
Company. © 2011 BD



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
San Jose, CA 95131
Тел.: 877-232-8995
Факс: 408-954-2347
ClinicalApplications@bd.com



BENEX Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ирландия
Тел.: 353-61-472920
Факс: 353-61-472907

BD Biosciences
Поддержка клиентов в Европе
Тел.: 322-400-9895
Факс: 322-401-7094
help.biosciences@europe.bd.com

bdbiosciences.com

НАЗНАЧЕНИЕ

Флуоресцентные контроли на основе
мышинного Mouse IgG₁ используются
для оценки неспецифического
связывания, а также связывания за
счет взаимодействия с рецепторами
Fc, с использованием проточного
цитометра BD FACSTM.

Проточный цитометр должен быть
оснащен детекторами светорассеяния
и соответствующей флуоресценции и
иметь соответствующее аналитическое
программное обеспечение (например,
BD CellQuest™ или BD LYSYSTM II)
для сбора и анализа данных.
См. инструкции в руководстве
по эксплуатации Вашего прибора.

Применение

Оценка неспецифического связывания
в проточной цитометрии при
исследовании образцов пациентов
с различными патологическими
состояниями.^{1—6}

СОСТАВ

γ₁ (IgG₁), клон X40, получают путем
гибридизации клеток миеломы мышей
Sp2/0-Ag 14 с клетками селезенки
мышей BALB/c, иммунизированных
гемоцианином фицсуреллы KLN.

γ₁ (IgG₁) состоит из тяжелых цепей
и легких каппа-цепей Mouse IgG₁.

Каждый из реагентов поставляется
в фосфатно-солевом буфере (PBS),
содержащем желатин и 0,1 % азида
натрия. Концентрации указаны
в таблице 1.

Табл. 1. Концентрации при поставке

FITC	100 мкг в 2,0 мл PBS	50 мкг/мл
PE	100 мкг в 2,0 мл PBS	50 мкг/мл
PerCP	100 мкг в 2,0 мл PBS	50 мкг/мл
PerCP-Cy5.5	50 мкг в 2,0 мл PBS	25 мкг/мл
PE-Cy7	100 мкг в 2,0 мл PBS	50 мкг/мл
APC	100 мкг в 1,0 мл PBS	100 мкг/мл
APC-Cy7	100 мкг в 1,0 мл PBS	100 мкг/мл

ОСТОРОЖНО! Азид натрия вреден при приеме внутрь (R22). Хранить в недоступном для детей месте (S2). Держать вдали от пищи, напитков и корма для животных (S13). Использовать подходящую защитную одежду (S36). При попадании внутрь немедленно обратитесь за медицинской помощью и покажите данную упаковку или этикетку (S46). При взаимодействии с кислотами выделяется высокотоксичный газ (R32). Азидные соединения при утилизации необходимо смывать большим количеством воды во избежание осаждения на свинцовых или медных трубах, где возможно образование взрывоопасных условий.

Чистота антител:

- FITC: < 5 % свободного флуорофора на момент упаковки по результатам измерения методом эксклюзионной хроматографии (SEC).
- PE, PerCP, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, APC, APC-Cy7: ≤ 20 % свободного флуорофора на момент упаковки по результатам измерения методом SEC.

ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ

Реагент стабилен до даты истечения срока годности, указанной на этикетке, при хранении при температуре от 2 до 8 °C. После истечения срока годности не использовать. Реагент не замораживать и не подвергать воздействию прямого солнечного

света при хранении или инкубации с клетками. Наружная поверхность пробирки с реагентом должна быть сухой.

Не использовать реагент, если наблюдаются какие-либо изменения внешнего вида. Осадок или обесцвечивание свидетельствуют о нестабильности или порче.

НЕОБХОДИМЫЕ РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ

1. Одноразовые полистироловые пробирки с крышками BD Falcon™ 12 x 75 мм (BD кат. № 352058) или эквивалентные.
2. Дозатор с наконечниками (электронная пипетка BD, BD кат. № 646539, или эквивалентная).
3. Вихревая мешалка «вортекс».
4. Лизирующий раствор BD FACS Lysing Solution (10-кратный) (BD кат. № 349202). Инструкции по разбавлению и предупреждения см. на вкладыше к продукту.
5. Центрифуга.
6. Раствор BD CellWASH™ (BD кат. № 349524) или промывочный фосфатно-солевой буфер (PBS) с 0,1 % азида натрия.
7. Раствор BD CellFIX™ (BD кат. № 340181) или 1 % раствор параформальдегида в PBS с 0,1 % азида натрия. Хранить при температуре от 2 до 8 °C в бутылки из желтого стекла не более 1 недели.

ОСТОРОЖНО! Формальдегид представляет опасность при вдыхании, контакте с кожей и при попадании внутрь (R20/21/22). Он

обладает раздражающим действием на глаза и кожу (R36/38). При продолжительном воздействии возможно развитие злокачественных новообразований. Возможный риск необратимых эффектов (R68). Может вызывать сенсibilизацию при контакте с кожей (R43). Хранить в закрытом, недоступном для детей месте (S1/2). Использовать надлежащую защитную одежду и перчатки (S36/37). При попадании внутрь немедленно обратиться за медицинской помощью и покажите упаковку или этикетку (S46). Утилизировать согласно федеральным, государственным и местным постановлениям.

8. Проточный цитометр BD FACS. Смотрите руководство по эксплуатации соответствующего прибора.

ОБРАЗЦЫ

Реагенты можно применять для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии с использованием образцов различного типа, включая периферическую кровь, аспираты и биоптаты костного мозга и другие жидкости и ткани тела. Различные типы образцов имеют разные требования к условиям хранения и ограничения, которые необходимо учесть перед забором и анализом.^{7, 8}

Образцы с большим количеством нежизнеспособных клеток могут давать ошибочные результаты из-за селективной гибели популяций и повышенного неспецифического связывания антител с нежизнеспособными клетками. Необходимо оценить жизнеспособность образцов и установить пороговое значение. Рекомендуется пороговое значение не менее 80 % жизнеспособных клеток.⁷

ОСТОРОЖНО! Все биологические образцы и контактирующие с ними материалы рассматриваются как биологически опасные. Они подлежат обращению как с потенциальным источником инфицирования^{9, 10} и требуют утилизации с соблюдением надлежащих мер предосторожности в соответствии с федеральными, региональными и местными нормативами. Не выполнять пипетирование ртом. Использовать надлежащую защитную одежду и перчатки. Насколько известно, фиксация инактивирует ВИЧ.¹¹

ПРОЦЕДУРА

1. Добавьте нужный объем связанного с флуорохромом моноклонального

антитела к 100 мкл цельной крови в пробирке 12 x 75 мм. См. объем на маркировке соответствующего флакона.

2. Аккуратно перемешайте на вортексе и инкубируйте от 15 до 30 минут в темноте при комнатной температуре (от 20 до 25 °C).
3. Добавьте 2 мл однократного BD FACS Lysing Solution.
4. Аккуратно перемешайте на вортексе и инкубируйте 10 минут в темноте при комнатной температуре.
5. Центрифугируйте при 300 x g в течение 5 минут. Удалите супернатант.
6. Добавьте от 2 до 3 мл раствора BD CellWASH (или промывочного буфера) и центрифугируйте при 200 x g в течение 5 минут. Удалите супернатант.
7. Добавьте 0,5 мл раствора BD CellFIX (или 1 % раствора параформальдегида) и тщательно перемешайте. Храните до анализа при температуре от 2 до 8 °C. Компания BD Biosciences рекомендует проводить анализ не позднее чем через 24 часа после окрашивания.

Результаты анализа

Это антитело не должно специфически связываться с клетками человека. Повышенная степень окрашивания данным реагентом должна быть учтена при интерпретации результатов окрашивания специфическим реагентом того же изотипа.

Проточная цитометрия

Прежде чем вводить клетки в проточный цитометр, тщательно перемешайте их на вортексе на малой скорости, чтобы уменьшить агрегацию.¹² Получите и проанализируйте данные с помощью соответствующего программного обеспечения. Прежде чем анализировать образцы, отрегулируйте порог для минимизации дебриса и убедитесь, что целевые популяции включены в анализ. На рис. 1 представлены репрезентативные данные, полученные для цельной крови с гейтированием по лимфоцитам. Длины волн возбуждающего лазера: 488 нм и 635 нм.

Внутренний контроль качества

Перед использованием прибора компания BD рекомендует настроить напряжения фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), установить компенсацию флуоресценции и проверить прибор на чувствительность, используя частицы BD CaliBRITE™ Beads и программное обеспечение BD FACSComp™. См. инструкцию-вкладыш упаковки *BD CaliBRITE Beads* и *Руководство пользователя программного обеспечения BD FACSComp*.

Компания BD рекомендует ежедневно выполнять анализ контрольного образца от здорового взрослого донора или коммерческого контрольного образца цельной крови для оптимизации настроек прибора и в целях контроля качества системы.¹³

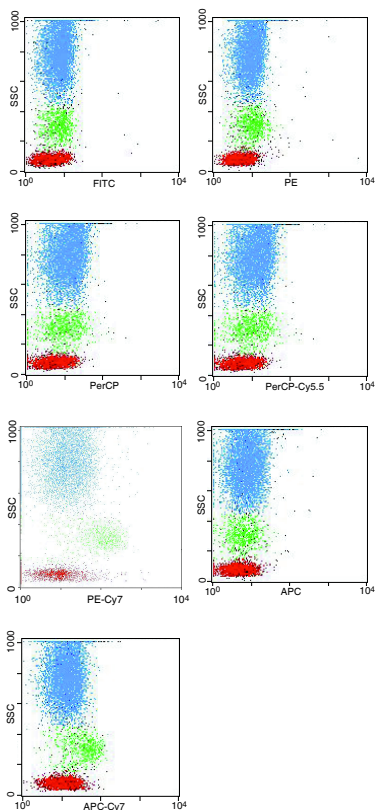


Рис. 1. Репрезентативные данные анализа с использованием проточного цитометра BD FACS

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Гемоцианин фиссуреллы (KLH) является антигеном, который не экспрессируется клетками линий, полученных у человека.

ОГРАНИЧЕНИЯ

Конъюгаты с более яркими флуорохромами (PE, APC) дают лучшее разделение, чем с другими красителями (FITC, PerCP). При перекрывании популяций расчет процентной доли маркер-положительных клеток может зависеть от выбора флуорохрома.

Применение моноклональных антител для лечения пациентов может влиять на распознавание целевых антигенов данным реагентом. Это следует учитывать при анализе образцов от пациентов, подвергающихся такому лечению. BD Biosciences не исследовала влияние наличия терапевтических антител на рабочие характеристики данного реагента.

При исследовании лейкоemий и лимфом одиночные реагенты могут дать лишь ограниченную информацию. Применение сочетаний реагентов позволяет получить более полную информацию, чем применение отдельных реагентов. Настоятельно рекомендуется многоцветный анализ с использованием подходящих комбинаций реагентов.⁸

Поскольку реагенты могут использоваться в различных комбинациях, лабораториям необходимо ознакомиться с характеристиками каждого из антител в сочетании с другими маркерами в нормальных и патологических образцах.

Рабочие характеристики реагентов определялись в основном с использованием крови, обработанной EDTA.

При применении других антикоагулянтов характеристики реагентов могут быть другими.

ГАРАНТИЯ

Для продаваемого согласно данным условиям продукта гарантируется только соблюдение количества и содержимого, указанных на этикетке на момент доставки заказчику. Не существует никаких гарантий, явных или подразумеваемых, выходящих за рамки описания на этикетке продукта. Вся ответственность компании BD ограничивается либо заменой продуктов, либо возмещением цены покупки. BD не несет ответственности за повреждение имущества, получение травм или экономический ущерб, вызванные продуктом.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение дебриса и лимфоцитов	Взаимодействие клеток с другими клетками и тромбоцитами	Подготовить и окрасить другой образец.
	Неаккуратное приготовление клеточного образца	Проверить жизнеспособность клеток; центрифугировать клетки на меньших оборотах.
	Неподходящие настройки прибора	Выполнить соответствующие процедуры настройки прибора; при необходимости оптимизировать настройки.
Слабое или тусклое окрашивание	Слишком высокая концентрация клеток на этапе окрашивания	Проверить и откорректировать концентрацию клеток или объем образца; окрасить свежий образец.
	Недостаточное количество реагента	Повторить окрашивание с большим количеством антител.
	Клетки анализировались позднее, чем через 24 часа после окрашивания	Повторить окрашивание на свежем образце; провести анализ без задержки.
	Неподходящий состав среды (нет азида)	Использовать аzyd в среде для окрашивания и на этапе промывки.
Клеток мало или нет вообще	Слишком низкая концентрация клеток	Приготовить новый образец с большей концентрацией; повторить окрашивание и анализ.
	Неисправный цитометр	Проверить и устранить неисправность прибора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maino VC, Suni MA, Ruitenberg JJ. Rapid Flow Cytometric Method for Measuring Lymphocyte Subset Activation. *Cytometry*. 1994;20:127-133.
2. Davis BH, Bigelow NC, Curnutte JT, Ornvold K. Neutrophil CD64 expression: potential diagnostic indicator of acute inflammation and therapeutic monitor of interferon- γ therapy. *Lab Hematol*. 1995;1:3-12.
3. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34⁺ cell determination by flow cytometry. *J Hematotherapy*. 1996;5:213-226.
4. Centers for Disease Control. 1997 Revised guidelines for performing CD4⁺ T-cell determinations in persons with human immunodeficiency virus (HIV). *MMWR*. 1997;46 (No. RR-2):1-29.
5. Gratama JW, Orfao A, Barnett D, et al. Flow cytometric enumeration of CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells. *Cytometry*. 1998;34:128-142.
6. Gutensohn K, Carrere I, Krueger W, et al. Semi-automated flow cytometric analysis of CD34-expressing hematopoietic cells in peripheral blood progenitor cell apheresis products. *Transfusion*. 1999;39:1220-1226.
7. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
8. Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy P, Jr., Lovett EJ, Schwartz A. US-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry*. 1997;30:214-230.
9. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections-Second Edition; Approved Guideline*. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2001. NCCLS document M29-A2.

10. Centers for Disease Control. Update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR*. 1988;37:377-388.
11. Nicholson JK, Browning SW, Orloff SL, McDougal JS. Inactivation of HIV-infected H9 cells in whole blood preparations by lysing/fixing reagents used in flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1993;160:215-218.
12. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
13. *Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Lymphocytes; Approved Guideline*. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1998. NCCLS document H42-A.