

IOTest CD3-FITC/ HLA-DR-PE

REF A07737

50 определений; 1 мл
20 мкл / определение



IOTest
Конъюгированное антитело



РУССКИЙ	Спецификация компонента 1	Спецификация компонента 2
Специфичность	CD3	HLA-DR
Клон	UCHT1	Immu-357
Гибридома	NS1 x Balb/c	X63 x Balb/c
Иммуноген	T-клетки линии + IL2	Линия клеток, трансформированных вирусом Эпштейна-Барра
Иммуноглобулин	IgG1	
Вид	Мышь	
Источник	Асцитическая жидкость или супернатант гибридомных клеток, лтивированных in vitro	
Очистка	Аффинная хроматография	
Флуорохром	Флуоресцеин-изотиоцианат (FITC)	R-фикоэритрин (ФЭ)
Molarány	FITC / Ig: 3,5- 6,0	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm	
Пик эмиссии	525 nm	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN ₃	

ПРИМЕНЕНИЕ

Данные конъюгированные с флуорохромом антитела предназначены для идентификации и подсчета популяций клеток, экспрессирующих антигены CD3 и HLA-DR. Анализ выполняется в биологических образцах человека методом проточной цитометрии.

ПРИНЦИП

Данный тест основан на способности специфических моноклональных антител связываться с антигенными детерминантами, которые экспрессируются лейкоцитами. При инкубации образца с реагентом IOTest происходит специфическое окрашивание лейкоцитов. Затем выполняется лизис эритроцитов. Интактные лейкоциты анализируются на проточном цитофлуориметре. Проточный цитофлуориметр измеряет светорассеивание и флуоресценцию клеток. Он позволяет выделить (гейтировать) интересующую популяцию на диаграмме, отображающей светорассеивание в боковом направлении (Side Scatter или SS) и светорассеивание в прямом направлении под малыми углами (Forward Scatter или FS). Для гейтирования популяций можно использовать другие двухпараметровые диаграммы в зависимости от используемого приложения. Прибор выполняет анализ флуоресценции выбранной популяции, распознавая окрашенные и неокрашенные клетки. Результат представляется в виде процентного содержания положительных клеток от всех клеток выбранной популяции.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ПРИЛОЖЕНИЙ

Анализ процента активированных Т-лимфоцитов в периферической крови.

Антиген CD3 экспрессируется только на поверхности клеток Т-линии, к которым относятся зрелые Т-лимфоциты и субпопуляция тимоцитов. В периферической крови примерно 75% лимфоцитов составляют клетки фенотипа CD3+. У детей этот показатель ниже, с возрастом он меняется (1).

Антиген HLA-DR, в основном, экспрессируется на поверхности различных типов клеток периферической крови, в особенности на поверхности антигенпредставляющих клеток. Напротив, уровень его экспрессии на поверхности Т-клеток различен и отражает активацию Т-клеток (1).

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.

СОСТАВ РЕАГЕНТОВ

Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest реагент.

ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ

В случае серьезного повреждения упаковки, или в случае несоответствия полученных результатов аналитическим характеристикам обратитесь, пожалуйста, к нашим специалистам:

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

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 необходимо отбирать в стерильные пробирки, содержащие соль ЭДТА 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 МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ

- Пробирки и материалы для отбора проб.
- Автоматические пипетки с одноразовыми наконечниками объемом 20, 100 и 500 мкл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Калибровочные частицы: флуоросферы Flow-Set (каталожный номер 6607007).
- Реагент для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса, например, VersaLyse (каталожный номер A09777).
- Реагент для фиксации лейкоцитов, например, IOTest 3 Fixative Solution (каталожный номер A07800).
- Изотипический контроль: реагент IOTest. IgG1-FITC / IgG1-PE (каталожный номер A07794).
- Буфер (PBS: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Перемешивающее устройство (вортекс).
- Проточный цитофлуориметр.

ПРОЦЕДУРА

Замечание: Приведенная ниже процедура валидирована для работы со стандартными приложениями. При выполнении некоторых приложений Beckman Coulter может потребоваться другой объем образца и/или реагента VersaLyse. В этом случае следуйте указаниям руководства для конкретного приложения.

При исследовании каждого образца необходимо проанализировать дополнительную пробирку, содержащую смесь образца с изотипическим контролем (каталожный номер A07794).

1. В каждую из пробирок для анализа клинических образцов добавьте по 20 мкл конъюгатов антител IOTest, а в каждую из пробирок для анализа контролей — по 20 мкл изотипического контроля.
2. В обе пробирки 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 (каталожный номер 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 × 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, содержащем 0,1% формальдегид, если подготовленная проба будет храниться от 2 до 24 часов. (Данный раствор можно получить, если в 1 мл PBS развести 12,5 мкл реагента IOTest 3 Fixative Solution (каталожный номер A07800) в 10X концентрации.)
 - в 0,5 или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

ПРИМЕЧАНИЕ: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2-8°C в защищенном от света месте.

ПАРАМЕТРЫ

Данные о работе системы получены с применением описанной выше процедуры на образцах крови, собранных за 24 часа до исследования в стерильные пробирки, содержащие ЭДТА в качестве антикоагулянта. Анализ выполнен не позднее чем через 2 часа после иммунного окрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Моноклональные антитела UCST1 взаимодействуют с е целью комплекса CD3 (2).

На первой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (1st HLDA Workshop), проходившей в Париже, Франция, в 1982 г., было подтверждено, что моноклональные антитела UCST1 направлены против CD3 (WS Code: 3, Section T) (3).

Моноклональные антитела Immu-357 распознают эпитоп мономорфного белка HLA-DR с молекулярным весом 29-33 кДа.

ЛИНЕЙНОСТЬ

Для проверки линейности окрашивания данным реагентом были смешаны в различных пропорциях клетки положительной линии HPBALL (CD3+ HLA-DR-) и клетки отрицательной линии DAUDI (CD3-HLA-DR+). Общее количество клеток в образце оставалось постоянным. Соотношение клеток положительной и отрицательной линий изменялось от 0 до 100%.

Аликвоты были окрашены в соответствии с описанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Диапазон линейности (R2)
CD3	$Y = 0,98X + 1,19$	0,999
HLA-DR	$Y = 0,98X + 0,87$	0,999

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Каждая лаборатория должна определить собственные референсные интервалы на основании исследования образцов здоровых доноров местной популяции. При этом необходимо учитывать возраст, пол и этническую принадлежность доноров, а также другие возможные межрегиональные различия.

В наших лабораториях было проведено исследование образцов цельной крови 52 здоровых взрослых людей с использованием вышеописанного реагента. В следующей таблице представлены результаты подсчета положительных событий:

Лимфоциты	Кол-во образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD3 ⁺	52	73,0	11,2	15
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	52	21,0	13,1	62

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

В один день на одном цитофлуориметре определялось процентное содержание положительных клеток (лимфоцитов) целевой популяции. Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты представлены в следующей таблице:

Целевая популяция лимфоцитов	Кол-во измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD3 ⁺	12	69,9	0,8	1,1
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	12	9,2	0,5	5,6

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

1. При неправильной настройке цитофлуориметра, неверной компенсации флуоресценции и неправильном определении регионов могут быть получены недостоверные результаты.
2. Рекомендуется выполнять лизис эритроцитов с отмывкой, поскольку данный реагент не оптимизирован для процедуры лизирования без отмывки.

3. Для получения точных и воспроизводимых результатов необходимо соблюдать все приведенные инструкции и следовать нормативам надлежащей лабораторной практики (GLP).
4. Конъюгаты антител данного реагента откалиброваны для получения наилучшего соотношения специфического и неспецифического сигнала. Поэтому в каждом исследовании необходимо строго соблюдать соотношение между объемом реагента и объемом образца.
5. При гиперлейкоцитозе образец следует развести PBS до концентрации примерно 5×10^9 лейкоцитов/л.
6. При некоторых заболеваниях, таких как тяжелая почечная недостаточность или гемоглобинопатия, лизис эритроцитов может происходить медленно, не полностью или совсем не происходить. В этом случае перед окрашиванием рекомендуется выделить мононуклеарные клетки в градиенте плотности (например, фиколла).

РАЗНОЕ

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

ТОРГОВЫЕ МАРКИ

Логотип Beckman Coulter, COULTER, EPICS, Flow-Set, IOTest, System II и XL являются товарными знаками Beckman Coulter; логотип Beckman Coulter, IOTest и Versalysе зарегистрированы в USPTO и SIPO.

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

Made in France.

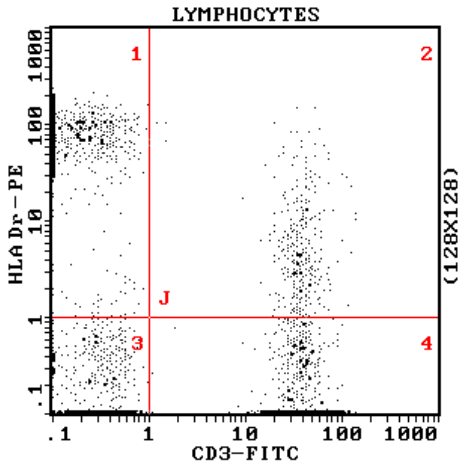
© 2012 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.



APPENDIX TO REF A07737

EXAMPLES

The graphs below are biparametric representations (Fluorescence Intensity vs. Fluorescence Intensity) of lysed normal whole blood sample. Staining is with IOTest CD3-FITC / HLA-DR-PE Conjugated Antibodies (Ref. A07737). Gate is on lymphocytes. The IOTest IgG1-FITC / IgG1-PE Isotypic Control (Ref. A07794) has been used to position the cursors (not shown).



REFERENCES

1. Hannet, I., Erkeller-Yuksel, F., Lydyard, P., Deneys, V., DeBruyère, M., "Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations", 1992, *Immunol. Today*, 13, 215-218.
2. Tunnacliffe, A., Olsson, C., Traunecker, A., Krissansen, G.W., Karjalainen, K., De la Hera, A., "The majority of CD3 epitopes are conferred by the ϵ chain", 1989, *Leucocyte Typing IV, White Cell Differentiation Antigens*. W. Knapp, et al., Eds., Oxford University Press, 295-296.
3. Bernard, A., Brottier, P., Georget, E., Lepage, V., Bousnell, L., "Joint report of the first international workshop on human leucocyte differentiation antigens by the investigators of the participating laboratories", 1984, *Leucocyte Typing I*, Bernard, A. et al., Springer Verlag, 9-135.