

# Лизирующий раствор IOTest<sup>®</sup>3 10X концентрат

REF A07799

100 определений; 20 мл



## РУССКИЙ

| Спецификации                                                |                                                                              |
|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Лизирующий раствор IOTest 3 Lysing Solution, 10X концентрат |                                                                              |
| Форма выпуска                                               | Жидкость                                                                     |
| Активный ингредиент                                         | NH <sub>4</sub> Cl                                                           |
| Объем                                                       | 20 мл                                                                        |
| Число флаконов                                              | 1 флакон                                                                     |
| Объем на одно определение                                   | 2 мл рабочего раствора (маточный раствор, разведенный до 1/10 <sup>6</sup> ) |

## ПРИМЕНЕНИЕ

Лизирующий раствор IOTest 3 Lysing Solution предназначен для лизиса эритроцитов – процедуры, которая часто используется в приготовлении биологических образцов (в частности, цельной периферической крови человека) для анализа методом проточной цитометрии после окрашивания плазматической мембраны лейкоцитов флуоресцирующими антителами (1, 2).

## ПРИНЦИП

Иммунофенотипирование лейкоцитов с помощью проточной цитометрии как правило требует предварительного удаления эритроцитов. Этого можно добиться двумя способами: путем лизиса эритроцитов или выделения мононуклеарных клеток с помощью градиента плотности (3).

Процедуры лизиса осуществляются быстрее, чем выделение в градиенте плотности, и обычно вызывают лишь умеренные нарушения морфологии и антигенных характеристик лейкоцитов. Растворы на основе аммония хлорида, который является активным ингредиентом лизирующего раствора IOTest 3 Lysing Solution, используются для лизиса эритроцитов в течение многих лет (4).

Образцы необходимо хранить при температуре 2 – 8°C и быстро анализировать с помощью проточной цитометрии. Если анализ откладывается на несколько часов, препараты можно зафиксировать ФСБ, содержащим 0,8% формальдегида (например, можно использовать фиксирующий раствор IOTest 3 Fixative Solution – Ref. A07800 – в рабочем разведении 1X). В таких случаях необходимо на этапе фиксации предварительно отмыть клетки с применением больших объемов жидкости.

Проточный цитометр измеряет рассеивание света клетками и их флуоресценцию. Он позволяет локализовать клетки 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

Концентрат (10X) фиксирующего раствора IOTest 3 следует хранить при 2 – 8°C. В невскрытом флаконе реактив сохраняет стабильность до даты истечения срока годности, указанной на флаконе. Не замораживайте.

После вскрытия флакона реактив сохраняет стабильность в течение 90 дней.

Рабочий раствор (1X) необходимо готовить ежедневно, а остаток следует удалять в отходы по окончании рабочего дня.

## МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте.
3. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
4. Все образцы крови следует рассматривать как потенциально инфицированные и принимать соответствующие меры предосторожности (работать в защитных перчатках, халатах и очках).
5. 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 500 мкл, 1 мл и 2 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Калибровочные микросферы: Флуоросферы Flow-Set™ Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Конъюгаты специфических антител.
- Отрицательные контроли.
- Буфер (ФСБ: 0,01M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Градуированные тест-пробирки.
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

## ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА

Рабочее разведение (1X) лизирующего раствора IOTest 3 Lysing Solution необходимо готовить ежедневно.

Для этого добавляют 9 объемов деионизированной воды к одному объему маточного раствора (10X). Не замораживать.

Избыток рабочего раствора (1X) следует удалять в отходы в конце рабочего дня.

## ПРОЦЕДУРА

### A - Предварительная подготовка образца

Концентрация лейкоцитов в образце должна быть менее 10<sup>4</sup> клеток / мкл (10<sup>10</sup>/л). При необходимости образец разводят ФСБ, доводя концентрацию лейкоцитов до 5 x 10<sup>3</sup> клеток / мкл (5 x 10<sup>9</sup>/л).

### Б - Методика

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

1. В каждую тест-пробирку добавляют необходимое количество конъюгата специфического антитела, а в каждую контрольную пробирку – необходимое количество отрицательного контроля.
2. В тест-пробирку и контрольную пробирку вносят по 100 мкл образца.
- Осторожно встряхивают пробирки на приборе Vortex.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Добавляют 2 мл лизирующего раствора IOTest 3 Lysing Solution в его рабочем разведении (1X). Немедленно встряхивают на приборе Vortex, а затем инкубируют в течение 10 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.

**ВНИМАНИЕ:** Замечено, что при использовании данной процедуры с этапом отмывки могут образовываться дублеты клеток (называемые беглецами), что может приводить к получению ошибочных результатов из-за изменения светорассеивающих свойств дублетов и их выхода за пределы областей гейтинга (5). Распада дублетов можно добиться тщательным встряхиванием на приборе Vortex.

6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспенсируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспенсируют осадок клеток, используя для этого:

- 0,5 или 1 мл ФСБ, содержащего 0,8% формальдегида, или, например, фиксирующий раствор IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) в его рабочей концентрации (1X), если препараты предполагается хранить в течение 2 – 24 часов.

- 0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Во всех случаях препараты следует хранить при температуре от 2 до 8°C в защищенном от света месте.

**ПАРАМЕТРЫ  
ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ  
ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ**

В течение одного и того же дня с использованием одного и того же цитометра было выполнено 12 измерений процентного содержания лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов относительно всех накопленных событий – лейкоцитов и обломков клеток на гистограмме, соотносящей два вида рассеивания света, т.е. FS versus SS, – в образце крови одного донора.

С другой стороны, было проанализировано 12 измерений средней интенсивности флуоресценции (СИФ) моноцитов после окраски реактивом IOTest 3 reagent CD14-FITC / CD13-PE / CD45-ECD (Ref. A07722) с целью оценки воспроизводимости значений интенсивности флуоресценции. Накопление данных и анализ проводились с помощью проточного цитометра COULTER® EPICS® XL™, снабженного программным обеспечением System II™. Полученные результаты обобщены в следующих таблицах:

| Целевые клетки         | Число | Средняя величина (%) | SD  | CV (%) |
|------------------------|-------|----------------------|-----|--------|
| Лимфоциты (FS vs SS)   | 12    | 22,9                 | 0,4 | 1,9    |
| Моноциты (FS vs SS)    | 12    | 7,5                  | 0,3 | 3,6    |
| Гранулоциты (FS vs SS) | 12    | 51,6                 | 0,7 | 1,3    |

| Флуоресценция / Целевые клетки | Число | Средняя величина (СИФ) | SD  | CV (%) |
|--------------------------------|-------|------------------------|-----|--------|
| ФИТЦ / CD14+ Моноциты          | 12    | 35,4                   | 0,5 | 1,5    |
| ФЭ / CD13+ Моноциты            | 12    | 9,9                    | 0,2 | 2,3    |
| ECD / CD45+ Моноциты           | 12    | 54,6                   | 1,3 | 2,4    |

**МЕЖЛАБОРАТОРНАЯ  
ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ**

В течение одного и того же дня силами двух лаборантов было выполнено 12 измерений процентного содержания лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов относительно всех накопленных событий – лейкоцитов и обломков клеток на гистограмме FS versus SS – в образце крови одного донора.

С другой стороны, было выполнено 12 измерений СИФ моноцитов после окраски реактивом IOTest 3 reagent CD14-FITC / CD13-PE / CD45-ECD (Ref. A07722) с целью оценки воспроизводимости значений интенсивности флуоресценции. Накопление данных и анализ проведены с помощью двух проточных цитометров COULTER EPICS XL с программным обеспечением System II. Полученные результаты обобщены в следующих таблицах:

Цитометр №1:

| Целевые клетки         | Число | Средняя величина (%) | SD  | CV (%) |
|------------------------|-------|----------------------|-----|--------|
| Лимфоциты (FS vs SS)   | 12    | 22,9                 | 0,4 | 1,9    |
| Моноциты (FS vs SS)    | 12    | 7,5                  | 0,3 | 3,6    |
| Гранулоциты (FS vs SS) | 12    | 51,6                 | 0,7 | 1,3    |

| Флуоресценция / Целевые клетки | Число | Средняя величина (СИФ) | SD  | CV (%) |
|--------------------------------|-------|------------------------|-----|--------|
| ФИТЦ / CD14+ Моноциты          | 12    | 35,4                   | 0,5 | 1,5    |
| ФЭ / CD13+ Моноциты            | 12    | 9,9                    | 0,2 | 2,3    |
| ECD / CD45+ Моноциты           | 12    | 54,6                   | 1,3 | 2,4    |

Цитометр №2:

| Целевые клетки         | Число | Средняя величина (%) | SD  | CV (%) |
|------------------------|-------|----------------------|-----|--------|
| Лимфоциты (FS vs SS)   | 12    | 22,9                 | 1,3 | 5,9    |
| Моноциты (FS vs SS)    | 12    | 7,7                  | 0,2 | 2,1    |
| Гранулоциты (FS vs SS) | 12    | 50,0                 | 1,6 | 3,2    |

| Флуоресценция / Целевые клетки | Число | Средняя величина (СИФ) | SD  | CV (%) |
|--------------------------------|-------|------------------------|-----|--------|
| ФИТЦ / CD14+ Моноциты          | 12    | 35,4                   | 0,5 | 1,3    |
| ФЭ / CD13+ Моноциты            | 12    | 10,8                   | 0,3 | 3,0    |
| ECD / CD45+ Моноциты           | 12    | 56,6                   | 1,8 | 3,2    |

**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. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
3. В случае лейкоцитоза образец следует разводить ФСБ приблизительно до концентрации  $5 \times 10^9$  лейкоцитов в 1 л.
4. 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, ECD, EPICS, Flow-Set, IOTest, System II и XL являются зарегистрированными торговыми марками компании Beckman Coulter Inc.

BD FACSCalibur и BD CellQuest являются зарегистрированными торговыми марками компании BD Biosciences and Company.

**ИЗГОТОВИТЕЛЬ:**

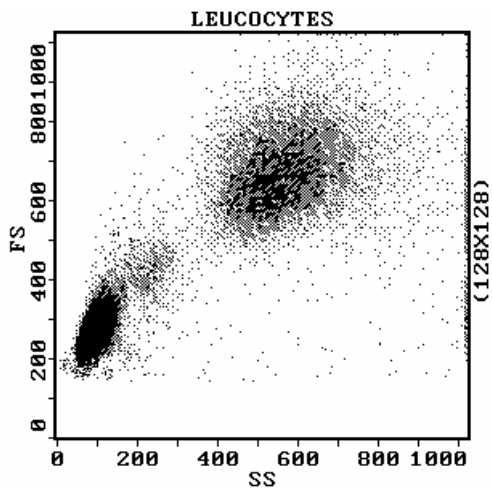
IMMUNOTECH SAS  
a Beckman Coulter Company  
130 avenue de Lattre de Tassigny  
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9  
Франция  
Отдел обслуживания клиентов: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

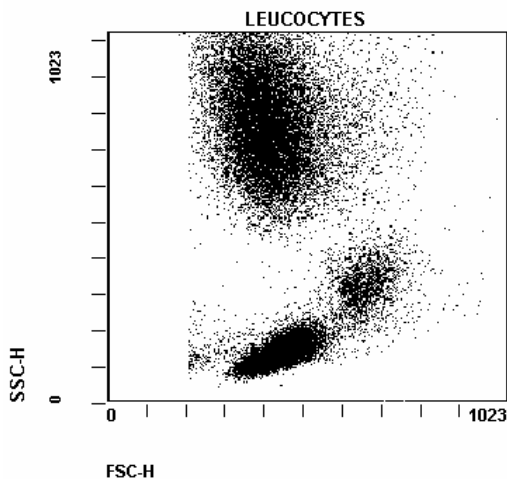


## EXAMPLES

The graphs below are ungated biparametric representations (Side Scatter vs Forward Scatter) of normal whole blood sample.



Graph 1: Acquisition and analysis are performed with a COULTER® EPICS® XL™ flow cytometer equipped with System II™ software.



Graph 2: Acquisition is with a BD Biosciences FACSCalibur™ flow cytometer equipped with CellQuest™ acquisition software. Analysis is with EXPO™ analysis Software.

## REFERENCES

1. Dressler, L.G., "Specimen handling, storage, and preparation", 1997, Curr. Protocols Cytometry, Chapter 5, 5.0.1-5.2.15.
2. 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.
3. Stelzer, G.T., Marti, G., Hurley, A., McCoy, P.Jr., Lovett, E.J., Schwartz, A., "U.S. Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures", 1997, Cytometry, 30, 214-230.
4. Wheeler, K.P., Whittam, R., "Structural and enzymic aspects of the hydrolysis of adenosine triphosphate by membranes of kidney cortex and erythrocytes", 1964, Biochem. J., 93, 349-363.
5. Lillevang, S.T., Sprogø-Jakobsen, U., Simonsen, B., Kristensen, T., "Three-colour flow cytometric immunophenotyping in HIV-patients; Comparison to dual-colour protocols", 1995, Scand. J. Immunol., 41, 114-120.