

IM3632 2006-08-24_RU



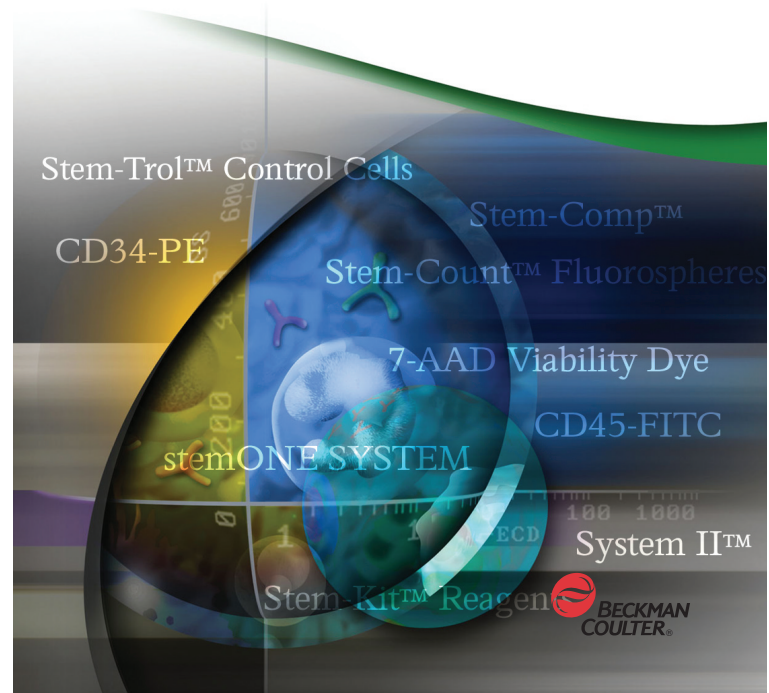
Для диагностического исследования *in vitro*

Stem-Trol™ Control Cells

REF IM3632



10 исследований -
0.2 mL



Manufactured by
Immunotech, a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny B.P. 177
13276 Marseille Cedex 9, France
Tel: (33) 4 91 17 27 00 - Fax: (33) 4 91 41 43 58
www.beckmancoulter.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. РЕЗЮМЕ И ПОЯСНЕНИЯ	2
3. ПРИНЦИП ИССЛЕДОВАНИЯ	2
4. СОСТАВ РЕАКТИВОВ	2
5. ОСОБЫЕ УКАЗАНИЯ	2
6. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ	3
6.1 Признаки непригодности	3
6.2 Приготовление реактивов	3
7. МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ, НО ОТСУТСТВУЮЩИЕ В КОМПЛЕКТЕ	3
8. ПРОЦЕДУРА	4
8.1 Краткое описание схемы приготовления образцов	5
9. МЕТОД ГЕЙТИНГА И АНАЛИЗА ВРУЧНУЮ	5
9.1 Установки протокола анализа	5
9.2 Построение гистограмм	6
9.3 Создание областей	6
9.4 Создание гейтов	7
9.5 Установки проточного цитометра	7
9.6 Пример анализа	7
9.7 Вычисление количества клеток CD34 ⁺ Stem-Trol Control Cells	7
ПРИЛОЖЕНИЕ (APPENDIX, только на английском языке)	9 - 11
Пример	9
Литература	11

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Клетки Stem-Trol™ Control Cells являются средством контроля качества иммунофенотипирования с помощью моноклональных антител CD45 и/или CD34 методом проточной цитометрии. Реактив является положительным клеточным контролем, который обрабатывают так же, как образец крови, после добавления Stem-Trol Control Cells к образцу цельной периферической крови. Это позволяет проверить работу реактива и методы окрашивания целевой клеточной популяции (т.е. CD34⁺ гематопозитических клеток-предшественников (GKП)), лизиса эритроцитов и анализа образцов методом проточной цитометрии.

При использовании ручного метода обращайтесь к инструкции-вкладышу Stem-Kit Reagents (Док. IM3630) за полной информацией. При использовании автоматического анализа за полными инструкциями обращайтесь к документу stemONE™ System Guide или stemCXP System Guide, соответственно прилагаемому к программному обеспечению stemONE System Software (Док. 6915452) или stemCXP System Software (Док. 628843).

2. РЕЗЮМЕ И ПОЯСНЕНИЯ

Иммунофенотипический анализ с помощью проточной цитометрии применяется для идентификации и подсчета определенных популяций клеток в биологических образцах. До проточной цитометрии исследуемые образцы окрашивают моноклональными антителами, а эритроциты разрушают. Положительный клеточный контроль нужен для проверки работы реактивов, методов подготовки образцов и процедур окрашивания (1). Положительный клеточный контроль имитирует репрезентативную целевую клеточную популяцию по степени связывания с антителами, лизису эритроцитов и цитометрическому анализу.

Реактив Stem-Trol Control Cells является жидким препаратом стабилизированных клеток-производных KG-1a, имеющих параметры экспрессии антигенов, а также окрашивания CD45 и CD34, сходные с CD34⁺ ГКП.

3. ПРИНЦИП ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактив Stem-Trol Control Cells содержит консервированные клетки KG-1a, модифицированные и стабилизированные с целью экспрессии класса III зигитов CD34 (2) и общего лейкоцитарного антигена с плотностями, приблизительно равными аналогичным характеристикам гематопозитических клеток человека. Смесь клеток Stem-Trol Control Cells со свежей цельной кровью здорового донора сначала окрашивают реактивами моноклональных антител и красителем 7-AAD Viability Dye, а затем выполняют лизис для удаления эритроцитов. Флуоросферы Stem-Count™ Fluorospheres или Flow-Count™ Fluorospheres добавляют для непосредственного определения абсолютного числа клеток. Проточная цитометрия окрашенного и лизированного препарата определяет абсолютное число клеток целевой популяции. Результаты определяют при помощи реактивов Stem-Kit Reagents на валидированной и стандартизированной системе проточной цитометрии COULTER® EPICS® XL™/XL-MCL™, с установленным программным обеспечением System II™ Software (Версия 3.0) или системе проточной цитометрии FC500, с установленным программным обеспечением CXP System Software (Версия 2.0), а также равноценных проточных цитометров, имеющих четыре детектора для регистрации флуоресценции для анализа образцов.

4. СОСТАВ РЕАКТИВОВ

Клетки Stem-Trol Control Cells суспендированы в изотоническом растворе, содержащем стабилизаторы и BSA. Рабочую концентрацию клеток (кЛ/мкл) определяют многократным анализом с помощью референсного метода. Это значение указывается на этикетке каждого флакона.

5. ОСОБЫЕ УКАЗАНИЯ

1. При работе с образцами и пробами, а также любыми контактирующими с ними материалами, следует выполнять правила и соблюдать меры предосторожности, установленные для потенциально инфицированных материалов.
2. Запрещается набирать раствор в пипетку ртом. Следует избегать попадания образцов или реактивов на кожу и слизистые оболочки.
3. Не применяйте реактивы после даты истечения срока годности, указанной на этикетке флакона.

4. Не замораживайте реактивы.
5. При хранении и инкубации реактивов избегайте воздействия тепла.
6. Во избежание испарения или утечки реактива плотно закрывайте его после использования; несоблюдение этого требования может привести к ошибке измерений.
7. Клетки Stem-Trol Control Cells осаждаются при длительном хранении. Обязательно полностью ресуспендируйте клетки перед применением. Избегайте энергичного перемешивания во избежание образования пузырьков воздуха. Не набирайте воздушные пузырьки в пипетку: это может быть причиной ошибок измерений.
8. Используйте калиброванные пипетки с положительным вытеснением или репитеры при работе с образцами и Stem-Trol Control Cells во избежание ошибок измерений.
9. При работе с пипетками выполняйте рекомендации их изготовителей по точному и воспроизводимому отбору образцов и клеток Stem-Trol Control Cells во избежание ошибок измерений.
10. В каждой серии Stem-Trol Control Cells содержится определенная концентрация клеток. Обязательно используйте правильную рабочую концентрацию при определении абсолютного числа клеток.
11. Если время инкубации или перемешивания, а также температура, не соответствуют спецификациям, могут быть получены ошибочные результаты.
12. Причиной ошибочных результатов может также стать неправильная настройка цитометра, неправильная стандартизация флуоресценции или неправильный гейтинг популяций клеток.
13. Результаты, полученные с применением проточных цитометров, систем для проведения лизиса или антител, отличающихся от тех, которые применялись для получения контрольных результатов, могут не попасть в границы ожидаемых интервалов.
14. При работе с этим реактивом выполняйте правила добросовестной лабораторной практики.

6. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- **Стабильность реактива:** до вскрытия флакона данный реактив стабилен в течение срока годности, обозначенного на этикетке, при условии хранения при 2 - 8°C. Не используйте реактив после истечения срока годности. После вскрытия флакона реактив стабилен в течение 30 дней.
- Вскрытые флаконы следует после использования плотно закрыть и хранить при температуре 2 - 8°C. Не замораживать.
- Перед использованием Stem-Trol Control Cells следует выдержать при комнатной температуре (18 - 25°C).

ВАЖНО:

В случае утечки реактива Stem-Trol Control Cells возможна ошибка измерений. После вскрытия флаконы Stem-Trol Control Cells следует хранить в вертикальном положении во избежание утечки. При наличии признаков утечки реактив использовать не следует.

6.1 Признаки непригодности

Невозможность получения ожидаемых результатов, а также сдвиг светорассеяния или спектра флуоресценции, может указывать на непригодность реактива. Следует также проверить калибровку прибора, технику приготовления проб и работу антител. Любое изменение внешнего вида Stem-Trol Control Cells (в норме прозрачная жидкость) или значительное (более 15% от абсолютного числа) отклонение результатов многократных измерений методом проточной цитометрии может свидетельствовать о непригодности реактива к дальнейшему использованию.

6.2 Приготовление реактивов

Клетки Stem-Trol Control Cells выпускаются в суспензии, готовой к применению. Надлежащее перемешивание (10 - 12 с на вортексе) следует выполнять каждый раз перед первым отбором реактива пипеткой из флакона. Избегайте энергичного перемешивания во избежание образования пузырьков воздуха. Не набирайте воздушные пузырьки в пипетку.

7. МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ, НО ОТСУТСТВУЮЩИЕ В КОМПЛЕКТЕ

1. Деионизированная вода.
2. Stem-Kit Reagents (Док. IM3630), в том числе краситель 7-AAD Viability Dye.
3. Вместо Stem-Count Fluorospheres возможно использование Flow-Count Fluorospheres (Док. 7547053)
4. Ледяная водяная баня.

- 5. Пластиковые пробирки (12 x 75 мм).
- 6. Калиброванные пипетки с положительным вытеснением (20 мкл, 100 мкл, 2 мл) с наконечниками или калиброванные пипетки-репигеры (20 мкл, 100 мкл, 2 мл) с наконечниками.
- 7. Калиброванные стандартные пипетки (20 мкл, 100 мкл, 2 мл) с наконечниками
- 8. Мешалка типа Вортекс (вихревой смеситель).
- 9. Таймер.
- 10. Проточный цитометр.
- 11. Программное обеспечение stemONE System Software (Док. 6915452), ТОЛЬКО для автоматического анализа Stem-Trol Control Cells в проточных цитометрах COULTER EPICS XL/ XL-MCL с программным обеспечением System II™ Software (Версия 3.0)
- 12. Программное обеспечение stemCXP System Software (Док. 628843), ТОЛЬКО для автоматического анализа Stem-Trol Control Cells в проточных цитометрах FC500 с программным обеспечением CXP Software.

8. ПРОЦЕДУРА

За полными инструкциями по автоматическому анализу обращайтесь к документу stemONE System Guide, прилагаемому к программному обеспечению stemONE Software, и инструкции, прилагаемой к набору Stem-Kit Reagents. За полными инструкциями обращайтесь к документу stemCXP System Guide, прилагаемому к программному обеспечению stemCXP System Software. За инструкциями по ручному анализу обращайтесь к инструкции, прилагаемой к набору Stem-Kit Reagents, и данному ниже описанию.

ПРИМЕЧАНИЕ:

Для стандартизации анализа следует после получения новой партии реактива Stem-Kit Reagents, а затем ежедневно выполнять контроль процесса окрашивания клеток Stem-Trol Control Cells с образцом периферической крови здорового донора. Более того, реактив Stem-Trol Control Cells содержит стабилизированные (нежизнеспособные) клетки, которые можно использовать для визуального контроля реактива 7-AAD Viability Dye (см. раздел "Построение гистограмм").

Следует обеспечить правильную регулировку проточного цитометра и стандартизацию измерения интенсивности флуоресценции в соответствии с указаниями производителя и правилами данной лаборатории. Обеспечьте правильную установку компенсации флуоресценции в соответствии с указаниями производителя и правилами данной лаборатории. Выдержите контрольный реактив и антитела при комнатной температуре. Для каждого эксперимента одна пробирка маркируется как: TROL 45/34/7-AAD.

- 1. Переносят пипеткой по 20 мкл реактива CD45-FITC / CD34-PE в пробирку.
- 2. Добавляют в пробирку пипеткой 20 мкл красителя 7-AAD Viability Dye.

ВАЖНО:

В верхней части или на наружных стенках пробирки возможен неполный лизис клеток крови. Следует работать пипеткой с осторожностью, чтобы клетки крови не попадали на верхнюю часть или наружные стенки пробирки. При необходимости следует протереть пробирку ватным тампоном для удаления следов крови с ее верхней части или наружных стенок.

- 3. С помощью калиброванной пипетки с положительным вытеснением или репигера на дно пробирки осторожно добавляют 100 мкл хорошо перемешанного образца цельной крови здорового донора.
- 4. Готовят и добавляют Stem-Trol:
 - Перемешивают Stem-Trol Control Cells на вортексе в течение 5 с.
 - Осторожно переносят пипеткой 20 мкл Stem-Trol Control Cells в пробирку.
 - Перемешивают пробирки на вортексе в течение 5 с.
- 5. Инкубируют при комнатной температуре (18 - 25°С) в течение 20 мин, в защищенном от света месте.
- 6. Добавляют в каждую пробирку по 2 мл приготовленного 1X раствора NH₄Cl Lysing Solution и немедленно перемешивают на вортексе в течение 5 с. Лизирующий раствор готовят в соответствии с требованиями инструкции-вкладыша Stem-Kit Reagents.
- 7. Инкубируют при комнатной температуре в течение 10 мин, в защищенном от света месте.
- 8. Пробирки хранят в штативе на льду (2 - 8°С) в защищенном от света месте.

ВАЖНО:

Если в пипетку попадут пузырьки воздуха, результат может быть ошибочным. Слишком активное перемешивание флуоросфер Stem-Count Fluorospheres или Flow-Count Fluorospheres может привести к образованию пузырьков воздуха. Избегайте слишком активного перемешивания флуоросфер Stem-Count Fluorospheres или Flow-Count Fluorospheres и не переносите пузырьки воздуха пипеткой в пробирки.

- 9. Перед применением флуоросфер Stem-Count Fluorospheres или Flow-Count Fluorospheres их осторожно перемешивают путем переворачивания флакона 3 - 5 раз. Избегайте энергичного перемешивания во избежание образования пузырьков воздуха.
- 10. Перед анализом 100 мкл флуоросфер Stem-Count Fluorospheres или Flow-Count Fluorospheres переносят пипеткой в пробирку.
- 11. Сразу после каждого добавления перемешивают на вортексе в течение 5 с. Хранят при 2 - 8°С. Обработку на вортексе следует повторить непосредственно перед анализом образца на проточном цитометре.

ВАЖНО:

Исследование образцов, хранившихся более 1 часа после добавления флуоросфер Stem-Count or Flow-Count, может дать ошибочный результат. Приготовленные образцы необходимо исследовать в течение 1 часа после добавления флуоросфер Stem-Count или Flow-Count.

8.1 Краткое описание схемы приготовления образцов (маркировка пробирки: TROL45/34/7-AAD)

Реактивы / образцы	Объем
CD45-FITC / CD34-PE	20 мкл
7-AAD Viability Dye	20 мкл
Цельная кровь	100 мкл
Контрольные клетки Stem-Trol Control Cells	20 мкл
Перемешать на вортексе и инкубировать при комнатной температуре 20 минут. Предохранять от воздействия света.	
Лизирующий раствор 1X NH ₄ CL	2 мкл
Перемешать на вортексе и инкубировать при комнатной температуре 10 минут. Предохранять от воздействия света.	
Stem-Count Fluorospheres	100 мкл

9. МЕТОД ГЕЙТИНГА И АНАЛИЗА ВРУЧНУЮ

9.1 Установки протокола анализа

Проточный цитометр должен быть оборудован для измерения прямого и бокового светорассеяния, а также четырьмя флуоресцентными каналами. Для канала FL3 (для анализа Stem-Count или Flow-Count Fluorospheres) используют фильтр с полосой пропускания 620 нм. Для канала FL4 (для анализа 7-AAD Viability Dye) используют фильтр с полосой пропускания 675 нм.

ПРИМЕЧАНИЕ:

- В следующем далее описании метода исследования даны инструкции по применению проточных цитометров COULTER EPICS XL / XL-MCL; их можно соответствующим образом адаптировать к системе проточной цитометрии FC500 или аналогичного.
- Для анализа клеток Stem-Trol Control Cells следует использовать ту же схему гейтинга и серию из 8 гистограмм, что и при анализе образцов. Клетки Stem-Trol Control Cells имеют размеры, сходные с размерами нормальных незрелых гематопозитических клеток, и экспрессируют CD45 и CD34 со сходными плотностями; поэтому нет необходимости изменять границы областей по каналам прямого светорассеяния, а

также флуоресценции 1 и 2. Однако, поскольку клетки Stem-Trol Control Cells обладают уникальными характеристиками бокового светорассеяния, может потребоваться уточнение границ областей по боковому светорассеянию. Области А, В, С и D (определение области см. в разделе "Создание области") следует адаптировать, чтобы включить характерный кластер клеток Stem-Trol Control Cells.

9.2 Построение гистограмм

Гистограммы строят следующим образом:

1. Создают гистограмму 1: FL1 CD45-FITC / боковое рассеяние.
2. Создают гистограмму 2: FL2 CD34-PE / боковое рассеяние.
3. Создают гистограмму 3: FL1 CD45-FITC / боковое рассеяние.
4. Создают гистограмму 4: прямое рассеяние / боковое рассеяние.
5. Создают гистограмму 5: FL1 CD45-FITC / FL2 CD34-PE.
6. Создают гистограмму 6: прямое рассеяние / боковое рассеяние.
7. Создают гистограмму 7: время / FL3 флуоресфоры Stem-Count или Flow-Count.
8. Создают гистограмму 8: FL4 7-AAD / боковое рассеяние.

Гистограммы 1 - 4 предназначены для локализации CD34⁺ ГКП; этот процесс может быть отложен до стадии анализа. Эти первые четыре гистограммы формируются в соответствии с рекомендациями ISHAGE по определению CD34⁺ клеток методом проточной цитометрии (2, 3). Гистограммы 5 - 7 предназначены для отслеживания параметров, важных на этапе регистрации. К ним относятся дискриминатор прямого рассеяния, число необходимых событий CD45⁺, и правильная аккумуляция флуоресфорных синглетов. Гистограмма 8 предназначена для дискриминации и анализа событий, связанных с жизнеспособными и нежизнеспособными клетками, когда это необходимо.

9.3 Создание областей

Области создают следующим образом:

1. Гистограмма 1: Выделяют прямоугольную область А, содержащую CD45⁺ лейкоциты и исключающую тромбоциты, разрушенные эритроциты и агрегаты.
2. Гистограмма 1: Выделяют аморфную область Е, содержащую лимфоциты (сильная флуоресценция CD45, слабое боковое рассеяние).
3. Гистограмма 2: На гистограмме 2 выделяют прямоугольную область В, содержащую все события CD34⁺ с низким или средним уровнем бокового светорассеяния. Для гистограммы 2 устанавливают предельное число событий (CD45⁺ событий) 75 000.
4. Гистограмма 3: На гистограмме 3 выделяют аморфную область С, содержащую все события кластера CD45^{dim}.
5. Гистограмма 4: На гистограмме 4 выделяют аморфную область D, содержащую все включенные в кластеры события со средним боковым рассеянием и средневисоким прямым рассеянием.
6. Гистограмма 5: На гистограмме 5 выделяют область QuadStat для проверки нижнего предела экспрессии CD34⁺ в событиях CD34⁺.
7. Гистограмма 5: На гистограмме 5 выделяют аморфную область Н, окружающую все флуоресфоры Stem-Count или Flow-Count Fluorospheres, в том числе дублиеты. Область Н должна располагаться в правом верхнем углу гистограммы 5.

ПРИМЕЧАНИЕ: Область Н обязательно должна быть АМОРФНОЙ.

8. Гистограмма 5 - Только на проточных цитометрах COULTER EPICS XL/XL-MCL с установленным программным обеспечением System II Software (версия 3.0): На гистограмме 5 выделяют прямоугольную область К (называемую "ligstate - "). Установите границы области К на первой логарифмической декаде или двойной негативной области гистограммы двух параметров. Эта область К позволяет устранить во время регистрации разрушенные клетки с целью анализа 75 000 релевантных CD45⁺ событий.
9. Гистограмма 6: Копируют область D из гистограммы 4 в гистограмму 6 как область F.
10. Гистограмма 7: На гистограмме 7 выделяют прямоугольную область G, включающую только синглеты флуоресфор Stem-Count или Flow-Count. Область G можно поместить " CAL " для обеспечения автоматического вычисления абсолютного числа CD34⁺ ГКП (подробно описано в руководстве по эксплуатации прибора).
11. Гистограмма 8: На гистограмме 8 выделяют прямоугольную область J для отделения жизнеспособных лейкоцитов (7-AAD Viability Dye-отрицательные события) от нежизнеспособных клеток (в основном Stem-Trol Control Cells, окрашенные 7-AAD).

9.4 Создание гейтов

Гейты создают следующим образом:

1. Гистограмма 1: На гистограмме 1 обозначают " - Н " для демонстрации всех событий за исключением всех флуоресфор Stem-Count или Flow-Count. Дополнительные инструкции по созданию "без гейтирования" ("not gates") содержатся в руководстве по эксплуатации прибора.
2. Гистограмма 2 - На гистограмме 2 обозначают "А" для демонстрации всех CD45⁺ событий.
3. Гистограмма 3 - На гистограмме 3 обозначают "А" и "В" (АВ) для демонстрации всех CD45⁺ CD34⁺ событий.
4. Гистограмма 4 - На гистограмме 4 обозначают "А" и "В" и "С" (АВС) для демонстрации всех CD45⁺ CD34⁺ событий в кластерах с низким или средним уровнем бокового рассеяния и низкой экспрессией окрашивания CD45. События области ABCD относятся к реальным CD34⁺ ГКП.
5. Гистограмма 5: Без гейтинга для демонстрации всех событий.
6. Гистограмма 6: Обозначают "Е" для демонстрации лимфоцитов с целью визуального контроля дискриминатора.
7. Гистограмма 7: На гистограмме 7 обозначают "Н" для демонстрации всех флуоресфор Stem-Count или Flow-Count, в том числе дублиетов.
8. Гистограмма 8 - На гистограмме 8 обозначают " А " для демонстрации CD45⁺ событий.

9.5 Установки проточного цитометра

1. Следует обеспечить правильную регулировку проточного цитометра, а также стандартизацию измерения светорассеяния и интенсивности флуоресценции, в соответствии с указаниями производителя и правилами данной лаборатории. Следует также убедиться, что компенсация цвета установлена в стандартный режим. Дополнительные инструкции содержатся в руководстве по эксплуатации прибора.
2. Перемешивают пробирки на вортке в течение 5 с.
3. Регистрируют данные на проточном цитометре. Следует анализировать не менее 75 000 CD45⁺ событий.
4. Уточните параметры дискриминатора и областей при анализе пробирки TROL 45/34/7-AAD.

9.6 Пример анализа

Гистограммы, показанные в ПРИЛОЖЕНИИ (APPENDIX) на с. 66, приведены в порядке возрастания номеров, как указано в протоколе.

9.7 Вычисление количества клеток CD34⁺ Stem-Trol Control Cells

По результатам проточной цитометрии (с автоматической коррекцией) флуоресфор Stem-Count или Flow-Count Fluorospheres с применением System II Software (Версия 3.0) в проточном цитометре COULTER EPICS XL/XL-MCL.

Для автоматического вычисления абсолютного количества клеток в проточном цитометре COULTER EPICS XL / XL-MCL до регистрации образца следует ввести правильную рабочую концентрацию флуоресфор Stem-Count или Flow-Count Fluorospheres.

Введите "CAL" как имя области G флуоресфор Stem-Count или Flow-Count Fluorospheres и введите значение, например, 1000, в поле CAL FACTOR диалогового окна STATISTICS протокола SET-UP SCREEN PROTOCOL.

• Ввод коэффициента CAL для флуоресфор Stem-Count или Flow-Count Fluorospheres:

1. На экране Acquisition Run выберите Setup Screen >> Protocol.
2. Выберите Statistics >> CAL FACTOR.
3. Введите значение коэффициента CAL (рабочая концентрация), обозначенное на флаконе флуоресфор Stem-Count или Flow-Count Fluorospheres.
4. Нажмите ENTER.
5. Выберите OKAY.
6. По подсказке введите Y (Да).

После подсчета не менее 1000 синглетов флуоресфор в абсолютное число CD34⁺ Stem-Trol Control Cells вводится автоматическая коррекция и это значение можно непосредственно получить из распечатки статистики области D.

Таблица (см. ниже):

Образец статистики результатов исследования пробирки TROL 45/34/7-AAD с помощью System II Software и функции CAL FACTOR, где:

- 1024 - рабочая концентрация флуоросфер Stem-Count Fluorospheres.
 - 5248 - общее число флуоросфер, накопленных в области CAL за все время анализа.
- В данном примере все величины скорректированы следующим образом: 1024/5248.

Статистика: Не нормализованная лист	Листейтинг: Отключен	Обозначение области	Число после коррекции (кл/мл)
1	A	LEUKS	9798
2	B	CD34 POS	279
3	C	CD45 DIM	264
4	D	Клетки Stem-Trol Control Cells	248
7	G	CAL 1024	1024
5	H	Все флуоросферы Stem-Count	1046

1. Записывают скорректированные абсолютные числа (кл/мл) в областях D пробирок TROL 45/34/7-AAD.

Пример:

Пробирка TROL 45/34/7-AAD: клетки Stem-Trol Control Cells = 248 кл/мл.

2. Умножают это точное количество на коэффициент нормализации (N) = 5.

ПРИМЕЧАНИЕ:

Необходимо нормализовать абсолютное количество клеток Stem-Trol Control Cells с учетом объемов, добавленных во время исследования: N определяют путем деления объема стандартного образца счёта (синглеты Stem-Count Fluorospheres) на объем клеток Stem-Trol Control Cells, добавленных в пробирку.

Пример:

100 мкл флуоросфер Stem-Count добавлено к 20 мкл клеток Stem-Trol Control Cells:

$$N = 100 \div 20 = 5$$

Нормализованное абсолютное число клеток Stem-Trol Control Cells = $248 \times 5 = 1240$ кл/мл.

3. Абсолютное число Stem-Trol Control Cells проверяют сравнением с рабочей концентрацией (кл/мл) Stem-Trol Control Cells, обозначенной на этикетке флакона. Абсолютное число Stem-Trol Control Cells не должно отклоняться более чем на $\pm 15\%$ от рабочей концентрации Stem-Trol Control Cells. Теперь проверяют достоверность методов окрашивания и лизиса.

Пример:

Рабочая концентрация клеток Stem-Trol Control Cells = 1380 кл/мл.

Диапазон допустимых значений: 1173 - 1587 (1380 $\pm$ 207) кл/мл

Нормализованное абсолютное число = 1240 кл/мл находится в допустимых пределах.

ВАЖНО:

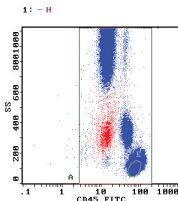
Если абсолютное число клеток Stem-Trol Control Cells выходит за допустимые пределы, следует проверить правильность дозирования реактивов пипетками, особенно флуоросфер Stem-Count или Flow-Count и клеток Stem-Trol Control Cells. Проанализируйте результаты полученные на проточном цитометре, а также качество окрашивания и лизиса, в пробирках с образцами. Проверьте правильность определения границ областей.

При необходимости повторите весь процесс пробоподготовки с новыми пробирками. Выполните процессы регистрации и анализа как новых, так и предыдущих серий пробирок. Сравните два результата. В случае расхождения результатов обратитесь к местному представителю компании Beckman Coulter.

Приложение (Appendix, только на английском языке) стр. 9 - 11

**Example:**

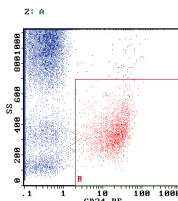
The following eight histograms correspond to the analysis of the Stem-Trol Control Cells stained with Stem-Kit Reagents. Below are histograms obtained on a COULTER EPICS XL/XL-MCL flow cytometer equipped with System II Software (Version 3.0).



Histogram 1: displays all events minus all Stem-Count Fluorospheres (i.e. "H" see Histogram 5).

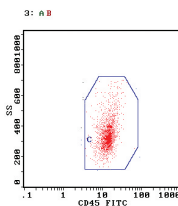
Notes:

- Position Region A to include all CD45⁺ events (leukocytes) while excluding CD45⁻ debris. Position Region E to include only lymphocytes (bright CD45, low Side Scatter). Region A is intended to serve as an appropriate denominator (total WBC) in the calculation of the percentage of CD34⁺ HPC.



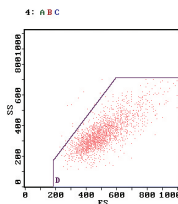
Histogram 2: displays events from region A.

- Adjust Region B to surround CD34⁺ Stem-Trol Control Cells, including CD34^{dim} events. Upper limit along the y-axis may be set to include CD34⁺ events with intermediate Side Scatter for CD34⁺ Stem-Trol Control Cells



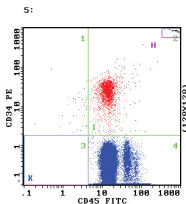
Histogram 3: displays events from A and B.

- Adjust Region C to include cells forming a cluster with characteristic CD34⁺ Stem-Trol Control Cells (i.e. intermediate Side Scatter and low to intermediate CD45 staining). It is the cluster of events that determines where Region C is centered. Brightly FITC stained events (platelet aggregates and mature monomyeloid cells) must be excluded in the setting of this region.



Histogram 4: displays events from regions A and B and C.

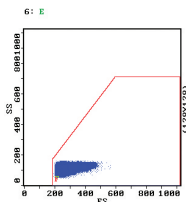
- Region D must include events characteristic of Stem-Trol Control Cells. Once the analysis is done, the absolute count of total CD34⁺ Stem-Trol is given on the statistic printout related to the CD34⁺ Stem-Trol (Region D).



Histogram 5: displays all events.

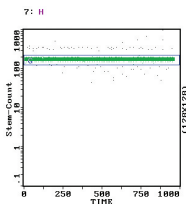
Important: This histogram is useful to visualize the lower limit of CD45 expression within the CD34⁺ events.

- Set Quadstat Region I2 to enclose all CD45⁺CD34⁺ events. Set the left boundary of Quadstat Region I2 to include all CD34⁺CD45^{dim} events. Verify on Histogram 1 that the lower limit of Region A includes all CD34⁺ events (use Histogram 5 as a guide).
- Amorphous Region H is drawn to include all Stem-Count Fluorospheres. Region H should be located at the top right corner of the Histogram including the last channel of the FL1 Log (on the right) and FL2 Log scales (on the top).
- Set Region K (named "listgate -") to exclude most of the double negative events from the acquisition.



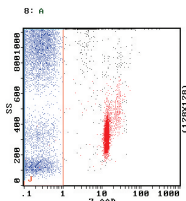
Histogram 6: displays events from region E.

- Verify whether the Forward and Side Scatter gain parameters of the flow cytometer are optimally set for the processed sample. If necessary, adjust the Forward Scatter voltage/gain so that the smallest lymphocytes scatter in the middle-left part of the histogram. Adjust the Forward Scatter to ensure that even the smallest lymphocytes scatter above the discriminator.



Histogram 7: displays events from region H.

- Region G encloses the fluorosphere singlet population only. Check that the fluorosphere singlets accumulate homogeneously and constantly over time.
- Label Region G as "CAL" to allow automatic calculation of absolute numbers of CD34⁺ Stem-Trol Control Cells. Type the correct assayed concentration of the current batch of Stem-Count Fluorospheres (refer to section 9.7 of this document or to the instrument manual for further details).



Histogram 8: displays events from region A.

- For Stem-Trol Control Cells analysis in the presence of 7-AAD Viability Dye, Histogram 8 allows you to visually check the 7-AAD Viability Dye positive staining. Region J is not used for Histograms 1, 2, 3, and 4.

References

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Lymphocytes; Approved Guideline, NCCLS Document H42-A, [ISBN 1-56238-364-7]. Vol. 18, N° 21. January 1999 Edition.
2. Roth, P., Maples, J., Hall, J., Dailey, T., "Use of control cells to standardize enumeration of CD34⁺ stem cells", 1996, Ann. NY Acad. Sci., 770, 370-372.
3. Gratama, J.W., Keeney, M., and Sutherland, D.R., «Enumeration of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells», Current Protocols in Cytometry, 1999, 6.4.1-6.4.22.

For additional information in the USA, call 800-526-7694. Outside the USA contact your local Beckman Coulter Representative.

TRADEMARKS

BECKMAN COULTER logo, COULTER, COULTER COUNTER, CXP, CYTO-COMP, EPICS, Flow-Count, Stem-Count, stemCXP, Stem-Kit, stemONE, Stem-Trol, System II, XL and XL-MCL are trademarks of Beckman Coulter, Inc.

Manufactured by:

Immunotech, a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny, B.P. 177
13276 Marseille Cedex 9, France
www.beckmancoulter.com

Copyright© Beckman Coulter, Inc. 2006
All Rights Reserved.