

exbio

TregFlowEx Kit

50 testů | Kat. č. ED7417

RUO














Nepoužívat pro diagnostické a terapeutické procedury.

Technický list (CS)

Verze: ED7417_TDS_v3_CS

Datum vydání: 26-06-2024

Symbole použité k označení produktu

 RUO	Pouze pro výzkumné účely		Chránit před vlhkem
	Výrobce		Pozor
	Čtěte návod k použití		Koncentrovaný roztok (10x)
	Obsah postačuje pro <n> testů		Obsah
	Katalogové číslo		
	Kód dávky		
	Použití do data		
	Omezení teploty		
	Chránit před slunečním zářením		

Popis

Výrobek je určen pouze pro výzkumné účely. Diagnostické nebo terapeutické použití je přísně zakázáno.

TregFlowEx Kit je určen k detekci regulačních T-buněk (CD4+CD25+FOXP3+ buněk) v lidské periferní krvi nebo lidské pupečnickové krvi pomocí průtokové cytometrie.

Regulační T-buňky (Treg buňky) jsou podskupinou lymfocytů, která má imunosupresivní vlastnosti a hraje klíčovou roli při udržování autotolerance. Jejich tlumící účinky chrání tkáň před kolaterálním poškozením, které provází imunitní reakce proti mikrobům a alergenům, usnadňují mateřskou toleranci k alogennímu plodu během těhotenství a udržují homeostázu s komenzální mikrobiotou^[1].

Tregy jsou obvykle charakterizovány jako CD4+CD25^{high} CD127^{low} T-buňky exprimující transkripční faktor (FOXP3). Takový fenotyp se nachází v lidské periferní krvi u 5-12 % CD4+ T-buněk^[2]. Tregy lze dále rozlišovat na tzv. „přirozené“ Tregy pocházející z thymu (buňky tTreg) a periferně indukované Tregy (buňky pTreg)^[3]. Rozlišení mezi tTreg a pTreg buňkami je stále sporné, nicméně několik proteinů bylo navrženo jako tTreg markery: transkripční faktor Helios a Neutropilin-1, receptor pro proteiny z rodiny vaskulárních endoteliálních růstových faktorů^[4].

Poskytované materiály

Obsah

Produkt TregFlowEx Kit vystačí na provedení 50 testů a je dodáván ve formátu:

Fix and Lysing Solution ED7417-1 (1 láhev) obsahující 10 ml koncentrovaného (10×) roztoku s formaldehydem.

Permeabilizing Solution ED7417-2 (1 láhev) obsahující 25 ml roztoku připraveného k použití.

Blocking Buffer ED7417-3 (1 láhev) obsahující 2,5 ml roztoku připraveného k použití obsahující 15mM azid sodný.

CD4 FITC/CD25 PE ED7417-4 (1 lahvička) obsahující 0,5 ml roztoku směsi fluorescenčně značených monoklonálních protilátek, naředěných na optimální koncentrace ve stabilizačním fosfátovém pufru (PBS) s obsahem 15mM azidu sodného.

FOXP3 APC ED7417-5 (1 lahvička) obsahující 0,25 ml roztoku fluorescenčně značené monoklonální protilátky, naředěné na optimální koncentraci ve stabilizačním fosfátovém pufru (PBS) s obsahem 15mM azidu sodného.

Specifikace protilátek

Tabulka 1 Popis protilátkových konjugátů v TregFlowEx Kit

Antigen	Fluorochrom	Klon	Isotyp
CD3	FITC	MEM-241	IgG1
CD25	PE	MEM-181	IgG1
FOXP3	APC	3G3	IgG1

Nutné, ale neposkytované materiály

Testovací zkumavky s kulatým dnem (12 x 75 mm)

Deionizovaná voda

Fosfátový pufr (1× PBS), pH 7,2 – 7,4

1% formaldehydový roztok v PBS

Nutná zařízení

Automatická pipeta s jednorázovými špičkami (5 µl – 1 ml) pro pipetování vzorků a činidel

Dávkovač kapalin nebo pipeta s jednorázovými špičkami (1 - 2 ml) pro dávkování fosfátového pufru

Chlazená centrifuga

Chladnička (2-8 °C)

Vortex mixer

Průtokový cytometr se dvěma laserovými excitačními zdroji (488 nm a ~635 nm), detektory pro rozptýlené světlo, optickými filtry a emisními detektory vhodnými pro sběr signálů z fluorochromů uvedených v tabulce 2.

Tabulka 2 Spektrální charakteristika fluorochromů použitých v produktu

Fluorochrom	Excitace [nm]	Emise [nm]
FITC	488	525
PE	488	576
APC	630 – 640	660

Nádoba na tekutý odpad s vhodným dezinfekčním prostředkem

Pasteurovy pipety připojené ke zdroji vakua k odsávání supernatantu během promývání buněk (volitelné)

Skladování a manipulace

Skladujte při teplotě 2-8 °C.

Chraňte před přímým slunečním světlem.



Reagencie byly speciálně navrženy tak, aby fungovaly při nízkých teplotách. Během postupu je důležité dodržovat požadavky na nízkou teplotu, jinak se výrazně sníží fluorescenční signály, celkový počet buněk a počet identifikovaných cílových buněk.

Informace o stabilitě po prvním otevření a době použitelnosti po prvním otevření, spolu s podmínkami skladování a stabilitou pracovních roztoků (v případě potřeby) naleznete v části Postup (Příprava reagencí).

Výstrahy, opatření a omezení

GHS klasifikace nebezpečnosti

VÝSTRAHA: Fix and Lysing Solution (ED7417-1) obsahuje formaldehyd (č. 50-00-0), methanol (č. 67-56-1) a diethylenglykol (č. 111-46-6) v koncentracích klasifikovaných jako nebezpečné.

Prvky označení	Signální slovo
	Nebezpečí
	
H-věty	H315: Dráždí kůži. H317: Může vyvolat alergickou kožní reakci. H319: Způsobuje vážné podráždění očí. H335: Může způsobit podráždění dýchacích cest. H341: Podezření na genetické poškození. H350: Může vyvolat rakovinu. H371: Může způsobit poškození orgánů. H373: Může způsobit poškození ledvin při prodloužené nebo opakované expozici při požití. H302+H312+H332: Zdraví škodlivý při požití, při styku s kůží nebo při vdechování.
P-věty	P201: Před použitím si obzarejte speciální instrukce. P260: Nevdechujte páry. P264: Po manipulaci důkladně omyjte ruce a zasažené části těla. P280: Používejte ochranné rukavice/ochranné brýle/obličejový štít. P308+P313: PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. P314: Necítíte-li se dobře, vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

Úplné informace o rizicích, která představují chemické látky a směsi obsažené v tomto výrobku a o tom, jak s nimi zacházet a jak je likvidovat, naleznete v Bezpečnostním listu (SDS), který je k dispozici na www.exbio.cz.

Biologické riziko

Lidské biologické vzorky, krevní vzorky a jakékoliv materiály, které s nimi přicházejí do kontaktu, jsou vždy považovány za infekční.

Používejte osobní ochranné a bezpečnostní pomůcky, abyste zabránili kontaktu s kůží, očima a sliznicemi.

Dodržujte všechny platné zákony, předpisy a postupy pro manipulaci a likvidaci infekčních materiálů.

Projevy znehodnocení prostředku

Normální vzhled dodávaných reagensů Fix and Lysing Solution, Blocking Buffer, CD4 FITC / CD25 PE a FOXP3 APC je čirá kapalina. Nepoužívejte, pokud pozorujete jakoukoli změnu vzhledu, např. zákal nebo známky precipitace.

Normální vzhled permeabilizačního pufru je světle žlutá až žlutohnědá kapalina, obvykle se sraženinou, pokud je skladován při 2-8 °C. Sraženina se úplně rozpustí, pokud se roztok nechá zahřát na pokojovou teplotu (anebo zahřátím na 37 °C, pokud je to nutné).

Omezení použití

Nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti uvedené na štítcích výrobku.

Vzorek

Použijte periferní krev odebranou do zkumavky klasifikované jako zdravotnický prostředek s antikoagulantem EDTA nebo heparin.

Souprava není vhodná pro zpracování suspenzí purifikovaných buněk (PBMC).

Vzorek krve zpracujte nejpozději do 24 hodin po odběru. Vzorek skladujte při laboratorní teplotě (20-25 °C). Neuchovávejte vzorek v chladničce.

Postup

Příprava reagensů

Fix and Lysing solution

Činidlo je 10X koncentrované a musí být před použitím naředěno deionizovanou vodou (1 objem koncentrovaného roztoku a 9 objemů deionizované vody).

Po prvním otevření si činidlo zachovává své funkční charakteristiky až do data expirace, pokud je skladováno za uvedených podmínek v původním primárním obalu.

Zředěný lyzační roztok (1X) je stabilní po dobu 1 měsíce, pokud je skladován v dávkovači kapaliny nebo uzavřené nádobě při 2-8 °C.

Před použitím vychlaďte zředěné činidlo na 2-8 °C.

Permeabilization Solution

Činidlo obsahuje detergent dodecylsírán sodný (SDS), který se vysráží, pokud je roztok skladován při nízkých teplotách. V případě potřeby rozpustíte sraženinu SDS zahřátím lahvičky na 37 °C. Poté permeabilizační roztok skladujte při laboratorní teplotě (15-25 °C).

Po prvním otevření si reagentie zachovává své funkční charakteristiky až do data expirace, pokud je skladována za uvedených podmínek v původní primární nádobě.

Před použitím vytemperujte činidlo na laboratorní teplotu.

Blocking Buffer

Před použitím vychladte činidlo na 2-8 °C.

PBS

Připravte PBS podle níže uvedeného předpisu (mohou být použité i jiné předpisy).

Rozpusťte:

8,0 g chloridu sodného (NaCl)

0,2 g chloridu draselného (KCl)

2,0 g jednosytného fosforečnanu draselného (KH₂PO₄)

1,42 g dihydrátu hydrogenufosforečnanu sodného (Na₂HPO₄·2H₂O)

v 800 ml deionizované H₂O.

Upravte pH na 7,4 pomocí HCl.

Doplňte deionizovanou H₂O do 1 litru.

Sterilizujte autoklávováním po dobu 20 minut při 15 psi nebo sterilizujte filtrací.

Před použitím vychladte činidlo na 2-8 °C.

1% formaldehyd v PBS

Připravte 1% formaldehyd v PBS smícháním 1 dílu koncentrovaného 37% roztoku formaldehydu stabilizovaného methanolem od Sigma-Aldrich (kat. č. F1635) a 36 dílů PBS. Skladujte při 2-8 °C. Roztok je stabilní po dobu 1 měsíce.

Před použitím vychladte na 2-8 °C.

UPOZORNĚNÍ: Koncentrovaný roztok formaldehydu je klasifikován jako akutně toxická látka. Řiďte se bezpečnostními opatřeními poskytnutými vaším dodavatelem formaldehydu.

Postup povrchového značení

1. Označte každou testovací zkuševku 12 x 75 mm s kulatým dnem identifikačním údajem vzorku.
2. Pipetujte 10 μ l CD4 FITC/CD25 PE na dno testovací zkuševky 12 x 75 mm s kulatým dnem.
3. Pipetujte 100 μ l krevního vzorku na dno zkuševky.
4. Vortexujte a následně inkubujte testovací zkuševku po dobu 10 minut v chladničce ve tmě.
5. (volitelné promytí) Promyjte buňky přidáním 2 ml studeného PBS a centrifugujte při 300x g po dobu 5 minut při 4 °C.
6. Odsajte supernatant a pokračujte v intracelulárním značení.

Postup intracelulárního značení

1. Pipetujte 1 ml zředěného studeného Fix and Lysing Solution.
2. Vortexujte pro resuspendování buněčného sedimentu a následně inkubujte testovací zkuševku po dobu 10 minut v chladničce ve tmě.
3. Pipetujte 0,5 ml Permeabilizing Solution.
4. Vortexujte a následně inkubujte testovací zkuševku po dobu 10 minut v chladničce ve tmě.
5. Centrifugujte buňky při 400x g po dobu 5 minut při 4 °C.
6. Odstraňte (slijte) supernatant.
7. Pipetujte 50 μ l studeného Blocking Buffer na dno testovací zkuševky.
8. Pipetujte 50 μ l studeného PBS na dno testovací zkuševky.
9. Promíchejte a inkubujte 5 minut v chladničce ve tmě.
10. Pipetujte 5 μ l reagentie FOXP3 APC na dno testovací zkuševky.
11. Promíchejte a inkubujte 30 minut v chladničce ve tmě.
12. Promyjte dvakrát buňky: přidejte 2 ml studeného PBS, centrifugujte při 400x g po dobu 5 minut při 4 °C, odsajte supernatant.
13. Resuspendujte buňky v 300 μ l 1% formaldehydu v PBS.
14. Změřte obarvený vzorek pomocí průtokového cytometru. Pokud obarvený vzorek nebude změřen okamžitě, skladujte ho při 2-8 °C v temnu a analyzujte do 4 hodin.

Analýza průtokovým cytometrem

Průtokový cytometr vybraný k použití s produktem TregFlowEx Kit musí být rutinně kalibrován pomocí fluorescenčních mikrokuliček podle pokynů výrobce cytometru, aby byla zajištěna stabilní citlivost detektorů.

Při nesprávné údržbě může průtokový cytometr poskytovat falešné výsledky.

V sekci Nutná zařízení jsou uvedeny potřebné specifikace cytometru pro lasery a fluorescenční detektory podle excitačních a emisních charakteristik fluorochromů.

Před analýzou obarveného vzorku nastavte napětí na požadovaných fluorescenčních detektorech. Napětí na fotonásobiči by mělo být nastaveno dostatečně vysoko, aby minimum negativních událostí bylo zaznamenáno v nultém kanálu na ose fluorescence. Napětí na fotonásobiči by také nemělo překročit hodnoty, při kterých jsou pozitivní události natlačeny k pravé ose.

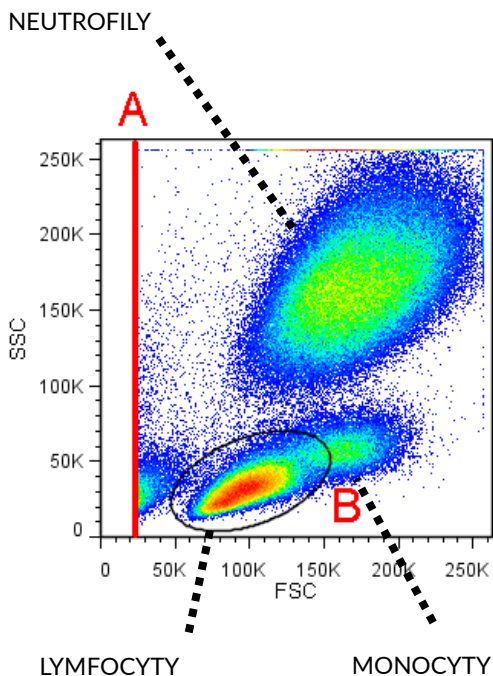
Kompenzujte fluorescenční signály mezi detektory před nebo po sběru dat. Pokud jsou fluorescenční signály nesprávně kompenzovány nebo pokud jsou regiony (gates) umístěny nepřesně, mohou být data nesprávně interpretována.

Pro analýzu naměřených dat (10 000 – 30 000 CD4+ lymfocytů z každého vzorku) je možné použít software vyvinutý výrobcem cytometru nebo software určený pro offline analýzu cytometrických dat (např. FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Analýza dat

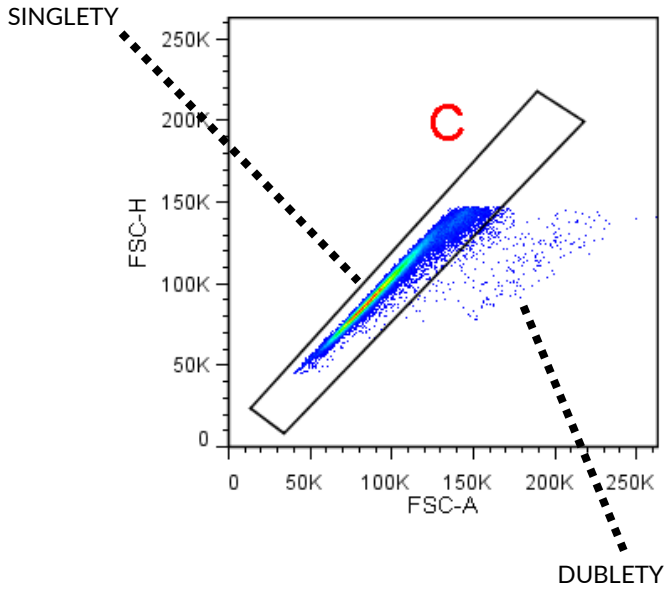
Zobrazte kompenzovaná data v grafu SSC vs. FSC. Nastavte region (gate) pro lymfocyty, jak je znázorněno na obrázku 1.

Obrázek 1 Dvourozměrný graf se zvýrazněním hustoty událostí ukazuje rozdělení leukocytů periferní krve zpracované soupravou TregFlowEx Kit a analyzovaného pomocí cytometru BD FACSCanto™ II: ohraničující práh (A) a region pro cílovou buněčnou populaci (B).



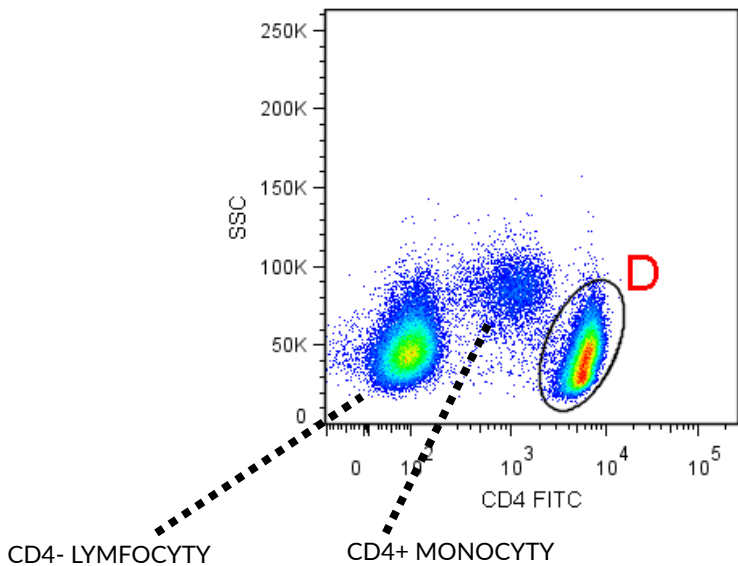
Vyneste ohraničené lymfocyty do grafu FSC-H vs. FSC-A. Oddělte singlety a dublety pomocí diagonálně umístěného regionu (C).

Obrázek 2 Oddělení singletů a dubletů



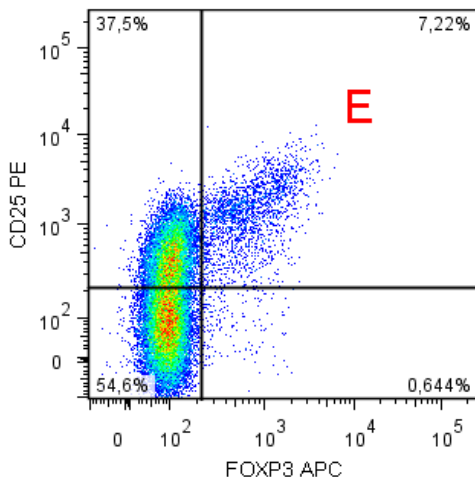
Vyneste ohraničené lymfocytární singlety v grafu bočního rozptylu (SSC) proti intenzitě fluorescence ve FITC detektoru (CD4 FITC). Vytvořte region kolem CD4+ lymfocytů (D).

Obrázek 3 Oddělení CD4+ lymfocytů (D) od CD4+ monocyty a CD4 negativních lymfocytů



Vyneste ohraničené CD4+ lymfocyty v grafu CD25 PE vs FOXP3 APC. Nastavte vhodné rozdělení regionů a vypočítejte procentuální zastoupení Treg buněk (CD4+CD25+FOXP3+; oblast E na obrázku 4). Pro správné umístění hranice mezi regiony použijte vhodné kontrolní reakce.

Obrázek 4 CD4+ lymfocyty zobrazené v bodovém grafu CD25 PE vs. FOXP3 APC. Treg buňky (CD4+CD25+FOXP3+) se nacházejí v pravém horním kvadrantu.



Odkazy

- 1) Sakaguchi S, Miyara M, Constantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. Nat Rev Immunol (2010) 10:490–500.
- 2) Churlaud G, Pitoiset F, Jebbawi F, Lorenzon R, Bellier B, Rosenzweig M, Klatzmann D. Human and Mouse CD8(+)/CD25(+)/FOXP3(+) Regulatory T Cells at Steady State and during Interleukin-2 Therapy. Front Immunol. 2015 Apr 15;6:171.
- 3) Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, Campbell DJ, Ghosh S, Hori S, Jiang S, Kuchroo VK, Mathis D, Roncarolo MG, Rudensky A, Sakaguchi S, Shevach EM, Vignali DA, Ziegler SF. Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. Nat Immunol. 2013 Apr;14(4):307-8.
- 4) Lin X, Chen M, Liu Y, Guo Z, He X, Brand D, Zheng SG. Advances in distinguishing natural from induced Foxp3(+) regulatory T cells. Int J Clin Exp Pathol. 2013;6(2):116-23.

Použití ochranných známek třetích stran

FlowJo™ a BD FACSCanto™ II jsou registrované ochranné známky firmy Becton, Dickinson a Company, VenturiOne® je registrovaná ochranná známka firmy Applied Cytometry, Infinicyt™ je registrovaná ochranná známka firmy Cytognos S.L..

Historie revizí

Verze 3, ED7417_TDS_v3

Uspořádání TDS bylo změněno.

Výrobce

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
25250 Vestec
Czech Republic

Kontaktní informace

info@exbio.cz
technical@exbio.cz
orders@exbio.cz
www.exbio.cz

POZNÁMKA: Jakákoli vážná událost, která se vyskytla v souvislosti s produktem, musí být oznámena výrobci a místnímu příslušnému úřadu.