



T-cell BlastoFlowEx[®] Kit

(100 tests / testů / testov)

REF ED7642

ENGLISH

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.



EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
252 42 Vestec, Czech Republic
Tel: +420 261 090 666
Fax: +420 261 090 660
E-mail: orders@exbio.cz
www.exbio.cz

1. Recommended use

T-cell BlastoFlowEx[®] Kit is designed to measure the proliferative response of T-lymphocytes in activated samples of whole human blood. The kit uses anti-CD3 and anti-Ki67 antibody cocktail to detect the proliferating lymphocytes.

2. Components

T-cell BlastoFlowEx[®] Kit (ED7642) contains:

- ED7642-1: Fix and Lysing Solution, 10x concentrated, 1 x 25 ml,
- ED7642-2: Permeabilizing Solution, 10x concentrated, 1 x 10 ml,
- ED7642-3: EDTA solution, 1 x 2,5 ml,
- ED7642-4: CD3 APC/Ki-67 PE antibody cocktail, 2 x 2,5 ml.

Antibody cocktail specification

Content	2 x 2,5 ml	
Usage	50 µl per test	
Specificity	CD3	Ki-67
Clone	MEM-57	Ki-67
Isotype (mouse)	IgG2a	IgG1
Fluorochrome	APC	R-PE
λ excitation	633 nm	488 nm
Emission maximum	660 nm	575 nm

NOTE: The Fix and Lysing Solution and the Permeabilizing Solution must be diluted before use with deionized water (mix 1 volume of the concentrated solution with 9 volumes of deionized water).

The content of the kit is sufficient for 100 staining reactions.

3. Storage and shelf life after first opening

Reagents are stable until expiration date printed on the product label when stored at 2-8 °C.

Do not freeze the reagents.

Avoid prolonged exposure to light.

Shelf life after first opening is not different from shelf life printed on the product label.

Evidence of deterioration

If data obtained show any performance alteration, please contact manufacturer using the following e-mail address:

technical@exbio.cz

4. Warnings and precautions

Fix and Lysing Solution and **Permeabilizing Solution** contain 10% formaldehyde. The solutions are classified as hazardous according to the Regulation (EC) No 1272/2008. Wear protective gloves, protective clothing, eye protection and face protection when working with the reagents.

For detailed information about relevant H and P phrases please refer to the T-cell BlastoFlowEx[®] Kit Safety Data Sheet.

5. Principle of examination method

Anticoagulated blood samples are stimulated with mitogens for several days. At the end of incubation the sample contains a certain proportion of proliferating cells that show the so-called blastogenic transformation when viewed under a microscope. The kit uses measurements of intracellular Ki-67 protein expression, a proliferation specific marker, within CD3+ cells to detect the activated T-lymphocytes.

First the cells are incubated shortly in the presence of EDTA; the reagent stops intracellular signaling and proliferation by chelating calcium ions. Cells are then washed, fixed with formaldehyde, permeabilized with a non-ionic detergent containing buffer and stained with fluorescently labelled monoclonal antibodies. The proportion of Ki67 positive T-lymphocytes is analyzed with a flow cytometer.

6. Additional required materials and equipment

Materials required but not supplied

Deionized water

Phosphate buffered saline (PBS)

Automatic pipettes with disposable tips

Vortex mixer

Centrifuge with a rotor for 5ml test tubes (12 × 75 mm)

Waste container with disinfectant to collect the supernatants after cell centrifugations

Materials needed for blood stimulation

Cell culture medium X-VIVO™ (Lonza Cat. No. BE04-380Q)

Cell incubator (37 °C / 5% CO₂)

A laminar flow cabinet or laminar flow closet or tissue culture hood

Mitogens or antigens for stimulation

NOTE: The kit was optimized for use with whole blood cultures in 12 x 75 mm cytometry tubes. Single use cytometry tubes containing appropriate amounts of lyophilized mitogens are available from EXBIO under catalogue numbers:

ED7634 Phytohemagglutinin (PHA),

ED7635 Pokeweed mitogen (PWM),

ED7636 Concanavalin A (Con A),

ED7637 Stimulation Negative Control.

(please refer to EXBIO website for other consumables compatible with T-cell BlastoFlowEx® Kit)

Flow cytometer requirements

Flow cytometer equipped with a suitable excitation source and a set of detectors for light scatters and appropriate fluorescence (see antibody cocktail specification in section 2). The cytometer must be equipped with appropriate software for data acquisition and analysis. Laser alignment and regular cytometer calibration using fluorescent particles is highly advised.

7. Reagent preparation

- Specimen:

Blood samples should be collected into tubes containing **heparin anticoagulant** (Na-heparin or Li-heparin). Blood anticoagulated with EDTA or citrate is not suitable for stimulation.

It is recommended to use freshly withdrawn samples. Cell viability decreases in time after collection and may directly influence results.

WARNING: Human biological samples and blood specimens and any materials coming into contact with them are always considered as biohazard.

- Fix and Lysing Solution:

Prepare **2 ml** of the diluted solution for each staining reaction.

- Permeabilizing solution:

Prepare **0,5 ml** of the diluted solution for each staining reaction.

8. Procedure

Whole blood stimulation and cell culture

1. Place mitogen containing culture tubes inside a laminar flow cabinet.
(if using the EXBIO tubes, remove the caps, but keep them in the flow cabinet).
2. Add 500 µl of cell culture medium to each tube.
Add 50 µl of anticoagulated blood.
Close the tubes with caps and vortex gently to mix the content.
3. Ensure that all caps are in the ventilation position and place them in a cell incubator (37 °C with 5% CO₂) for at least 3 days.

Detection of Ki67 expressing T-lymphocytes

1. Remove the tubes from the incubator.
Remove and discard the caps.
Add **25 µl of EDTA** solution into each tube and mix.
2. Incubate for 10 minutes at 37 °C.
3. Add 2 ml of PBS, mix.
Centrifuge the cells for 5 minutes at 400g.
Decant supernatant.
4. Shake the tubes a little to disturb the pellet.
Add **2 ml of the diluted Fix and Lysing Solution**, mix.
Incubate for 10 minutes at room temperature.
5. Centrifuge the cells for 5 minutes at 400g.
Decant supernatant.
6. Add **0,5 ml of the diluted Permeabilizing Solution**, mix.
Incubate for 10 minutes at room temperature.
7. Add 2 ml of PBS.
Centrifuge the cells for 5 minutes at 400g.
Decant supernatant.
8. Add **50 µl of CD3/Ki-67** antibody cocktail, mix.
Incubate for at least 30 minutes at room temperature in the dark.
9. Add 2 ml of PBS.
Centrifuge the cells for 5 minutes at 400g.
Decant supernatant.
10. Resuspend the cells in 0,1-0,2 ml of 1% formaldehyde in PBS or Fix and Lysing solution diluted in PBS (mix 1 part of Fixation Buffer with 9 parts of PBS).
Store the processed samples at 2-8 °C in the dark until analysis.

9. Flow cytometry analysis

Please refer to "Instrument requirements" in section 6 for more information about flow cytometer requirements. Acquire data using software intended for sample analysis supplied with cytometer.

General cytometer setting recommendations:

- Set the threshold on forward light scatter so that only cells of interest are recorded and most of the debris excluded.
- Set the voltage on light scatter detectors, forward light scatter and side (perpendicular) light scatter so that the events of interest are on scale (consider that stimulated and unstimulated samples differ in their properties).
- Set voltage on fluorescence detectors so that all events of interest are on scale.
- Adjust the forward scatter area scaling factor (BD instruments) to enhance singlets vs doublets discrimination. When this factor is set properly the FSC peak area and the FSC peak height will have the same values and the singlet events will form a diagonal line (45 degrees, passing through zero).

Product specific notes:

- Acquire at least 3,000 of CD3+ lymphocytes per sample.
- Set the threshold on forward light scatter, do not set threshold on APC fluorescence detector. In our experience the threshold set on fluorescence caused distortion of results possibly due to the cytometer fluorescence signal/background processing algorithms.

Data analysis:

Look at the example analysis depicted at Figures 1 to 4 on page 8.

10. Trademarks

X-VIVO is a registered trademark of Lonza.

11. References

n/a

12. Explanation of symbols



Catalogue Number



Batch Code



Manufacturer



Consult instructions for use



Store within temperature limits



Use by



Sufficient for <n> tests



Keep away from sunlight

ČESKY

Reagencie je určena pouze pro výzkumné účely



EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
252 42 Vestec, Czech Republic
Tel: +420 261 090 666
Fax: +420 261 090 660
E-mail: orders@exbio.cz
www.exbio.cz

1. Doporučené užití soupravy

Souprava T-cell BlastoflowEx® Kit je určena k měření proliferační odpovědi T-lymfocytů v aktivovaných vzorcích lidské krve. K detekci proliferačních lymfocytů využívá souprava směsi protilátek (anti-CD3 a anti-Ki-67).

2. Obsah soupravy

Souprava T-cell BlastoflowEx® Kit (ED7642) obsahuje:
ED7642-1: Fix and Lysing Solution, 10x konc., 1 x 25 ml,
ED7642-2: Permeabilizing Solution, 10x konc., 1 x 10 ml,

ED7642-3: EDTA, roztok, 1 x 2,5 ml,

ED7642-4: CD3 APC / Ki-67 PE, směs protilátek, 2 x 2,5 ml.

Specifikace protilátkové směsi

obsah	2 x 2,5 ml	
použití	50 µl na test	
specifita	CD3	Ki-67
klon	MEM-57	Ki-67
isotyp (myši)	IgG2a	IgG1
fluorochrom	APC	R-PE
excitační maximum	633 nm	488 nm
emisní maximum	660 nm	575 nm

POZNÁMKA: Fix and Lysing Solution a Permeabilizing Solution musí být před použitím naředěny deionizovanou vodou (smíchejte 1 díl koncentrovaného roztoku a 9 dílů deionizované vody).

Obsah soupravy vystačí na provedení 100 značení.

3. Skladování a doba použitelnosti po otevření

Reagencie jsou stabilní do data expirace uvedeného na etiketě, pokud jsou skladovány při 2-8 °C.

Nezmrazujte.

Nevystavujte dlouhodobému působení světla.

Doba použitelnosti produktu po prvním otevření je shodná s dobou použitelnosti uvedené na etiketě.

Změny v kvalitě produktu

V případě, že naměřené výsledky vykazují zhoršení kvality produktu, kontaktujte prosím výrobce na e-mailovou adresu: technical@exbio.cz

4. Upozornění

Fix and Lysing Solution a Permeabilizing Solution obsahují 10% formaldehyd. Podle směrnice EC 1272/2008 jsou tyto roztoky klasifikovány jako nebezpečné. Při práci s nimi použijte ochranné rukavice, ochranný oděv a brýle.

Detailní informace o příslušných H-větech a P-větech naleznete v bezpečnostním listu soupravy T-cell BlastoflowEx® Kit.

5. Princip metody

Antikoagulovaná krev je inkubována několik dní v přítomnosti mitogenů. Ke konci inkubace obsahuje vzorek proliferační buňky, které v mikroskopu vykazují morfologické změny označované jako blastická transformace. Souprava měří relativní zastoupení takto aktivovaných T-lymfocytů (CD3+ buňky) podle intracelulární exprese proteinu Ki-67, specifického markeru pro proliferační buňky.

Nejprve jsou buňky vystaveny působení EDTA; ta přerušuje intracelulární signalizaci a proliferaci vyvázáním vápenatých iontů. Poté jsou buňky promyty, fixovány formaldehydem, permeabilizovány puřem s neionogenním tenzidem a obarveny fluorescenčně značenými monoklonálními protilátkami. Zastoupení Ki-67 pozitivních T-lymfocytů je změřeno pomocí průtokového cytometru.

6. Potřebné vybavení a materiál, který není dodáván

Potřebný, ale nedodávaný materiál

Deionizovaná voda

PBS (fyziologický roztok pufovaný fosfátem)

Automatické pipety s vyměnitelnými špičkami

Vortex

Centrifuga s rotorem pro 5ml zkumavky (12 × 75 mm)

Odpadní nádoba s dezinfekcí na sběr supernatantů po centrifugaci

Materiál potřebný pro stimulaci

X-VIVO™ medium pro tkáňové kultury (Lonza, kat č. BE04-380Q)

Inkubátor (37 °C / 5% CO₂)

Laminární box pro práci s tkáňovými kulturami

Mitogeny nebo antigeny pro stimulaci

POZNÁMKA: Souprava byla optimalizována pro detekci z plné krve stimulované přímo v cytometrických zkumavkách (12 x 75 mm). Jednorázové zkumavky obsahující lyofilizované mitogeny jsou dodávány firmou EXBIO pod níže uvedenými katalogovými čísly:

ED7634 Phytohemagglutinin (PHA),

ED7635 Pokeweed mitogen (PWM),

ED7636 Concanavalin A (Con A),

ED7637 Stimulation Negative Control.

(na webové stránce EXBIO najdete další informace o jednorázových spotřebních materiálech kompatibilních se soupravou T-cell BlastoflowEx® Kit)

Požadavky na průtokový cytometr

Průtokový cytometr vybavený modrým a červeným laserem (488 nm, 633 nm), příslušnými detektory pro analýzu signálu R-PE a APC, a softwarem pro získání a analýzu dat. Je doporučeno dbát na řádné seřízení a pravidelné kalibrace stroje.

7. Příprava reagensů

• Vzorek:

Krevní vzorky by měly být odebrány do zkumavek obsahujících heparin (Na-heparin nebo Li-heparin). Krev s citrátem anebo antikoagulantem EDTA není vhodná ke stimulaci.

Je doporučeno používat čerstvě odebranou krev. Životnost buněk s časem po odběru klesá a stav vzorku může výrazně ovlivnit výsledky.

UPOZORNĚNÍ Lidské biologické vzorky, tj. krevní vzorky a vše, co s nimi přišlo do přímého styku, jsou vždy považovány za potenciálně infekční materiál.

• Fix and Lysing Solution:

Připravte si pro každou reakci alespoň 2 ml naředěného roztoku.

• Permeabilizing Solution:

Připravte si pro každý vzorek alespoň 0,5 ml naředěného roztoku.

8. Postup

Stimulace plné krve a kultivace

1. Umístíte zkumavky s mitogenem do laminárního boxu. (Pokud používáte zkumavky EXBIO, odvíčkejte je, ale ponechte je uvnitř laminárního boxu).
2. Přidejte do každé zkumavky 500 µl kultivačního media. Přidejte 50 µl krve. Zavičkejte zkumavky a promíchejte obsah na vortexu.
3. Ujistěte se, že víčka jsou nasazená do pozice umožňující ventilaci, a umístíte zkumavky do inkubátoru (37 °C, 5% CO₂) na dobu alespoň 3 dnů.

Detekce T-lymfocytů exprimujících Ki-67

1. Vyjměte zkumavky z inkubátoru. Odvíčkejte (víčko vyhoďte do odpadu). Do každé zkumavky přidejte 25 µl roztoku EDTA a zamíchejte obsah.
2. Nechte inkubovat po dobu 10 minut při 37 °C.
3. Přidejte 2 ml PBS, promíchejte. Centrifugujte buňky při 400g po dobu 5 minut. Slijte supernatant.
4. Jemně protřepejte obsah, abyste uvolnili sediment ze dna zkumavek. Přidejte 2 ml naředěného Fix and Lysing Solution, promíchejte. Nechte inkubovat po dobu 10 minut při laboratorní teplotě.
5. Centrifugujte buňky při 400g po dobu 5 minut. Slijte supernatant.
6. Přidejte 0,5 ml naředěného Permeabilizing Solution, promíchejte. Nechte inkubovat po dobu 10 minut při laboratorní teplotě.
7. Přidejte 2 ml PBS. Centrifugujte buňky při 400g po dobu 5 minut. Slijte supernatant.
8. Přidejte 50 µl směsi protilátek CD3 APC/ Ki-67 PE, promíchejte. Inkubujte nejméně 30 minut v temnu při laboratorní teplotě.
9. Přidejte 2 ml PBS. Centrifugujte buňky při 400g po dobu 5 minut. Slijte supernatant.
10. Resuspendujte buňky v 0,1 - 0,2 ml pufru PBS s 1% formaldehydem anebo v Fix and Lysing Solution naředěném do PBS (smíchejte 1 díl Fix nad Lysing Solution a 9 dílů PBS). Obarvené vzorky skladujte v temnu při teplotě 2–8 °C až do analýzy v průtokovém cytometru.

9. Analýza v průtokovém cytometru

Požadavky na průtokový cytometr jsou uvedeny v sekci 6 (Potřebné vybavení a materiál, který není dodáván).

Obecná doporučení pro nastavení cytometru:

- Nastavte prahovou hodnotu v detektoru pro FSC, aby se zobrazovaly jen relevantní události a většina debris byla vyloučena z analýzy.
- Nastavte napětí na detektorech pro FSC a SSC, aby byly události v zobrazitelném rozsahu os (pamatujte, že stimulované a nestimulované buňky mají různé charakteristiky).
- Nastavte napětí na detektorech pro fluorescence, aby byly veškeré události v zobrazitelném rozsahu os.
- Na strojích BD nastavte "forward scatter area scaling factor" pro snazší rozlišení singletů a dubletů buněk. Pokud je tento faktor nastaven správně, budou mít singlety stejnou hodnotu v parametrech FSC-A a FSC-H, a tudíž se budou nacházet na úhlopříčce procházející nulou a svírající s osou X úhel 45°.

Doporučení specifická pro tuto soupravu:

- U každého vzorku nechte nahrát alespoň 3 000 CD3+ událostí (T-lymfocytů).
- Nastavte práh v detektoru pro FSC, nenastavujte práh v detektoru pro fluorescenci APC. Podle našich zkušeností nastavení prahu ve fluorescenčním detektoru způsobuje výrazné zkreslení dat, pravděpodobně v důsledku změny vstupních hodnot používaných cytometrem během akvizice pro výpočet fluorescenčního signálu/pozadí.

Analýza dat

Příkladný postup analýzy je uveden v obrázkové příloze na straně 8.









10. Ochranné známky

X-VIVO je registrovanou ochrannou známkou firmy Lonza.

11. Literatura

Dosud nepublikováno.

12. Vysvětlivky symbolů

	Katalogové číslo
	Číslo šarže
	Výrobce
	Pozorně přečtěte instrukce k použití
	Rozmezí skladovacích teplot
	Spotřebujte do
	Množství postačující pro provedení <n> testů
	Chraňte před slunečním světlem

Reagencia je určena len pre výskumné účely



EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
252 42 Vestec, Czech Republic
Tel: +420 261 090 666
Fax: +420 261 090 660
E-mail: orders@exbio.cz
www.exbio.cz

1. Doporučené použití soupravy

Súprava T-cell BlastoFlowEx® Kit je určená na meranie proliferlačnej odpovedi T-lymfocytov v aktivovaných vzorkách ľudskej krvi. K detekcii proliferujúcich lymfocytov súprava využíva zmesi protilátok (anti-CD3 a anti-Ki-67).

2. Obsah soupravy

Súprava T-cell BlastoFlowEx® Kit (ED7642) obsahuje:
ED7642-1: Fix and Lysing Solution, 10x konc., 1 x 25 ml,
ED7642-2: Permeabilizing Solution, 10x konc., 1 x 10 ml,
ED7642-3: EDTA, roztok, 1 x 2,5 ml,
ED7642-4: CD3 APC / Ki-67 PE, zmes protilátok, 2 x 2,5 ml.

Špecifikácia protilátkovej zmesi

obsah	2 x 2,5 ml	
použitie	50 µl na test	
špecifita	CD3	Ki-67
klon	MEM-57	Ki-67
izotyp (myši)	IgG2a	IgG1
fluorochróm	APC	R-PE
excitačné maximum	633 nm	488 nm
emisné maximum	660 nm	575 nm

POZNÁMKA: Fix and Lysing Solution a Permeabilizing Solution musia byť pred použitím nariadené deionizovanou vodou (zmiešajte 1 diel koncentrovaného roztoku a 9 dielov deionizovanej vody).

Obsah soupravy vystačí na vykonanie 100 značení.

3. Skladovanie a doba použiteľnosti po otvorení

Reagencie sú stabilné do dátumu expirácie uvedeného na etikete, pokiaľ sú skladované pri teplote 2-8 °C.

Nezmrazujte.

Nevystavujte dlhodobému pôsobeniu svetla.

Doba použiteľnosti produktu po prvom otvorení je zhodná s dobou použiteľnosti uvedenou na etikete.

Zmeny v kvalite produktu

V prípade, že namerané výsledky vykazujú zhoršenie kvality produktu, kontaktujte prosím výrobcu na e-mailovej adrese: technical@exbio.cz

4. Upozornenie

Fix and Lysing Solution a Permeabilizing Solution obsahujú 10% formaldehyd. Podľa smernice EC 1272/2008 sú tieto roztoky klasifikované ako nebezpečné. Pri práci s nimi používajte ochranné rukavice, ochranný odev a okuliare.

Detailné informácie o príslušných H-vetách a P-vetách nájdete v bezpečnostnom liste súpravy T-cell BlastoFlowEx® Kit.

5. Princíp metódy

Antikoagulovaná krv je inkubovaná niekoľko dní v prítomnosti mitogénov. Ku koncu inkubácie vzorka obsahuje proliferujúce bunky, ktoré v mikroskope vykazujú morfológické zmeny označované ako blastická transformácia. Súprava meria relatívne zastúpenie takto aktivovaných T-lymfocytov (CD3+ bunky) podľa intracelulárnej expresie proteínu Ki-67, špecifického markeru pre proliferujúce bunky.

Najskôr sú bunky vystavené pôsobeniu EDTA; tá preruší intracelulárnu signalizáciu a proliferáciu vyviazaním vápenatých iónov. Potom sú bunky premyté, fixované formaldehydom, permeabilizované pufrom s neionogenným tenzidom a zafarbené fluorescenčne značenými monoklonálnymi protilátkami. Zastúpenie Ki-67 pozitívnych T-lymfocytov je zmerané pomocou prietokového cytometru.

6. Potrebné vybavenie a materiál, ktorý nie je dodávaný

Potrebný, ale nedodávaný materiál

Deionizovaná voda

PBS (fyziologický roztok pufrovaný fosfátom)

Automatické pipety s vymeniteľnými špičkami

Vortex

Centrifúga s rotorom pre 5 ml skúmavky (12 × 75 mm)

Odpadná nádoba s dezinfekciou na zber supernatantov po centrifugácii

Materiál potrebný pre stimuláciu

X-VIVO™ médium pre tkanivové kultúry (Lonza, kat č. BE04-380Q)

Inkubátor (37 °C / 5 % CO₂)

Laminárny box pre prácu s tkanivovými kultúrami

Mitogény alebo antigény pre stimuláciu

POZNÁMKA: Súprava bola optimalizovaná pre detekciu z plnej krvi stimulovanej priamo v cytometrických skúmavkách (12 x 75 mm). Jednorázové skúmavky obsahujúce lyofilizované mitogény sú dodávané firmou EXBIO pod nižšie uvedenými katalógovými číslami:

ED7634 Phytohemagglutinin (PHA),

ED7635 Pokeweed mitogen (PWM),

ED7636 Concanavalin A (Con A),

ED7637 Stimulation Negative Control.

(na webovej stránke EXBIO nájdete ďalšie informácie o jednorázových spotrebných materiáloch kompatibilných so súpravou T-cell BlastoFlowEx® Kit)

Požiadavky na prietokový cytometer

Prietokový cytometer vybavený modrým a červeným laserom (488 nm, 633 nm), príslušnými detektormi pre analýzu signálu R-PE a APC, a softwarom pre získanie a analýzu dát. Je doporučené dbať na riadne nastavenie a pravidelné kalibrácie prístroja.

7. Príprava reagensii

- Vzorka:
Krvné vzorky by mali byť odobraté do skúmaviek obsahujúcich **heparin** (Na-heparin alebo Li-heparin). Krv s citrátom alebo antikoagulantom EDTA nie je vhodná k stimulácii.
Je doporučené používať čerstvo odobratú krv. Životnosť buniek s časom po odbere klesá a stav vzorky môže výrazne ovplyvniť výsledky.

UPOZORNENIE: Ľudské biologické vzorky, tj. krvné vzorky a všetko, čo s nimi prišlo do priameho styku, sú vždy považované za potenciálne infekčný materiál.

- Fix and Lysing Solution:
Pripravte si pre každú reakciu aspoň **2 ml** nariadeného roztoku.
- Permeabilizing Solution:
Pripravte si pre každú vzorku aspoň **0,5 ml** nariadeného roztoku.

8. Postup

Stimulácia plnej krvi a kultivácia

1. Umiestnite skúmavky s mitogénom do laminárneho boxu. (Pokiaľ používate skúmavky EXBIO, odvíčkujte ich, ale ponechajte ich vo vnútri laminárneho boxu).
2. Pridajte do každej skúmavky 500 µl kultivačného média. Pridajte 50 µl krvi. Zavičkujte skúmavky a premiešajte obsah na vortexu.
3. Uistite sa, že víčka sú nasadené do pozície umožňujúcej ventiláciu a umiestnite skúmavky do inkubátora (37 °C, 5% CO₂) na dobu aspoň 3 dní.

Detekcia T-lymfocytov exprimujúcich Ki-67

1. Vyberte skúmavky z inkubátora. Odvíčkujte (víčko vyhodte do odpadu).
Do každej skúmavky pridajte **25 µl roztoku EDTA** a zamiešajte obsah.
2. Nechajte inkubovať po dobu 10 minút pri 37 °C.
3. Pridajte 2 ml PBS, premiešajte. Centrifugujte bunky pri 400g po dobu 5 minút. Zlejte supernatant.
4. Jemne pretrepte obsah, aby ste uvoľnili sediment zo dna skúmaviek. Pridajte **2 ml nariadeného Fix and Lysing Solution**, premiešajte. Nechajte inkubovať po dobu 10 minút pri laboratórnej teplote.

5. Centrifugujte bunky pri 400g po dobu 5 minút. Zlejte supernatant.
6. Pridajte **0,5 ml nariedeného Permeabilizing Solution**, premiešajte. Nechajte inkubovať po dobu 10 minút pri laboratórnej teplote.
7. Pridajte 2 ml PBS. Centrifugujte bunky pri 400g po dobu 5 minút. Zlejte supernatant.
8. Pridajte **50 µl zmesi protilátok CD3 APC/ Ki-67 PE**, premiešajte. Inkubujte najmenej 30 minút v tme pri laboratórnej teplote.
9. Pridajte 2 ml PBS. Centrifugujte bunky pri 400g po dobu 5 minút. Zlejte supernatant.
10. Resuspendujte bunky v 0,1 - 0,2 ml pufrí PBS s 1% formaldehydom alebo v Fix and Lysing Solution nariedenom do PBS (zmiešajte 1 diel Fix nad Lysing Solution a 9 dielov PBS). Zafarbené vzorky skladujte v tme pri teplote 2-8 °C až do analýzy v prietokovom cytometri.

9. Analýza v prietokovom cytometri

Požiadavky na prietokový cytometer sú uvedené v časti 6 (Potrebné vybavenie a materiál, ktorý nie je dodávaný).

Všeobecné odporúčenia pre nastavenie cytometru:

- Nastavte prahovú hodnotu v detektore pre FSC, aby sa zobrazovali len relevantné udalosti a väčšina debris bola vylúčená z analýzy.
- Nastavte napätie na detektoroch pre FSC a SSC, aby boli udalosti v zobraziteľnom rozsahu os (pamätajte, že stimulované a nestimulované bunky majú rôzne charakteristiky).
- Nastavte napätie na detektoroch pre fluorescenciu, aby boli všetky udalosti v zobraziteľnom rozsahu os.
- Na zariadeniach BD nastavte "forward scatter area scaling factor" pre ľahšie rozlíšenie singletov a dubletov buniek. Pokiaľ je tento faktor nastavený správne, budú mať singlety rovnakú hodnotu v parametroch FSC-A a FSC-H a budú sa teda nachádzať na uhlopriečke prechádzajúcej nulou a zvierajúcej s osou X uhol 45°.

Doporučenia špecifické pre túto súpravu:

- Pre každú vzorku nechajte nahráť aspoň 3 000 CD3+ udalostí (T-lymfocytov).
- Nastavujte prah v detektore pre FSC, nenastavujte prah v detektore pre fluorescenciu APC. Podľa našich skúseností nastavenie prahu vo fluorescenčnom detektore spôsobuje výrazné skreslenie dát, pravdepodobne v dôsledku zmeny vstupných hodnôt používaných cytometrom počas akvizície pre výpočet fluorescenčného signálu / pozadia.

Analýza dát

Príkladný postup analýzy je uvedený v obrázkovej prílohe na strane 8.

10. Ochranné známky

X-VIVO je registrovanou ochrannou známkou firmy Lonza.

11. Literatúra

Doposiaľ nepublikované.

12. Vysvetlivky symbolov

	Katalógové číslo
	Číslo šarže
	Výrobca
	Pozorne si prečítajte inštrukcie na použitie
	Rozmedzie skladovacích teplôt
	Spotrebujte do
	Množstvo postačujúce na vykonanie <n> testov
	Chráňte pred slnečným svetlom

Example data

Whole blood from a healthy blood donor was mixed 1:10 with X-VIVO™ culture medium and stimulated with phytohemagglutinin at concentration 20 µg/ml for 3 days and controls were incubated with X-VIVO™ medium only.

Plot the ungated events with side scatter on the Y-axis vs CD3 APC fluorescence on the X-axis. Draw a gate around **CD3+ events (Figure 1)**. Plot the events from CD3+ gate as the light forward scatter signal peak height vs light forward scatter signal peak area. Draw a diagonal gate around **singlets (Figure 2)**. Check the distribution of Ki-67 signal by displaying the CD3+/singlets as a dot plot with CD3 APC signal on the Y-axis vs Ki-67 PE signal on the X-axis. Look for the best **discrimination value** between the negative and positive population (dashed line) (**Figure 3**). Display the CD3+/singlets in histogram of PE fluorescence. Draw the **discrimination line** between the negative and positive peaks. Apply to all tubes and evaluate the **Ki-67+ percentage** in the sample (**Figure 4**).

Příklad zpracování dat

Vzorek krve zdravého dárce byl smíchan v poměru 1:10 s kultivačním médiem X-VIVO™ a stimulován po dobu 3 dnů phytohemaglutininem v koncentraci 20 µg/ml. Kontrolní reakce obsahovala vzorek inkubovaný pouze s médiem X-VIVO™.

Zobrazte všechny nahrané události v grafu s parametry SSC-H na ose Y vs fluorescence CD3 APC na ose X. Ohraničte **CD3+ lymfocyty (Obrázek č. 1)**. Vyneste CD3+ lymfocyty do grafu s FSC-H (výška) na ose Y a FSC-A (plocha) na ose X. Ohraničte **singlety (Obrázek č. 2)**. Ověřte distribuci intenzity fluorescence Ki-67 vynesním CD3+ singletů do grafu s CD3 APC na ose Y a Ki-67 PE na ose X. Vyberte nejvhodnější hodnotu fluorescence PE pro **rozdělení mezi negativními a pozitivními událostmi** (přerušovaná čára) (**Obrázek č. 3**). Vyneste CD3+ singlety do histogramu fluorescence v detektoru pro PE. Nastavte hranici mezi distribuční vrcholy pro Ki-67+ a Ki67- událostí. Uplatněte toto rozdělení na všechny reakce a zaznamenejte relativní četnost (%) **proliferujících (Ki-67+) T-lymfocytů**.

Príklad spracovania dát

Vzorka krvi zdravého darcu bola zmiešaná v pomere 1:10 s kultivačným médiom X-VIVO™ a stimulovaná po dobu 3 dní phytohemaglutinínom v koncentrácii 20 µg/ml. Kontrolná reakcia obsahovala vzorku inkubovanú iba s médiom X-VIVO™.

Zobrazte všetky nahrané udalosti v grafe s parametrami SSC-H na osi Y vs fluorescencia CD3 APC na osi X. Ohraničte **CD3+ lymfocyty (Obrázok č. 1)**. Vyneste CD3+ lymfocyty do grafu s FSC-H (výška) na osi Y a FSC-A (plocha) na osi X. Ohraničte **singlety (Obrázok č. 2)**. Overt distribúciu intenzity fluorescence Ki-67 vynesním CD3+ singletov do grafu s CD3 APC na osi Y a Ki-67 PE na osi X. Vyberte najvhodnejšiu hodnotu fluorescence PE pre **rozdelenie medzi negatívnymi a pozitívnymi udalosťami** (prerušovaná čiara) (**Obrázok č. 3**). Vyneste CD3+ singlety do histogramu fluorescence v detektore pre PE. Nastavte hranicu medzi distribučné vrcholy pre Ki-67+ a Ki67- udalosti. Uplatnite toto rozdelenie na všetky reakcie a zaznamenajte relatívnu početnosť (%) **proliferujúcich (Ki-67+) T-lymfocytov**.

Figure 1. CD3+ cells
Obrázek 1. CD3+ lymfocyty
Obrázok 1. CD3+ lymfocyty

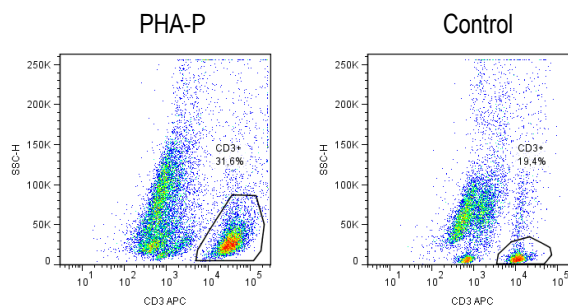


Figure 2. Singlets
Obrázek 2. Singlety
Obrázok 2. Singlety

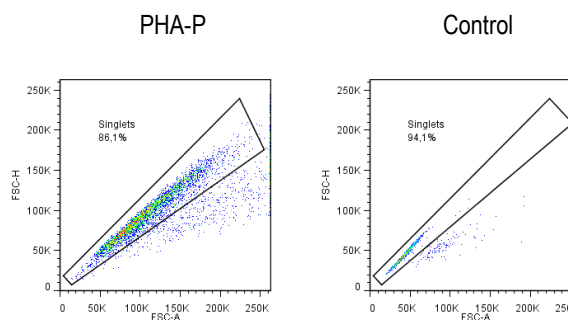


Figure 3. Ki-67 fluorescence
Obrázek 3. Fluorescence Ki-67
Obrázok 3. Fluorescencia Ki-67

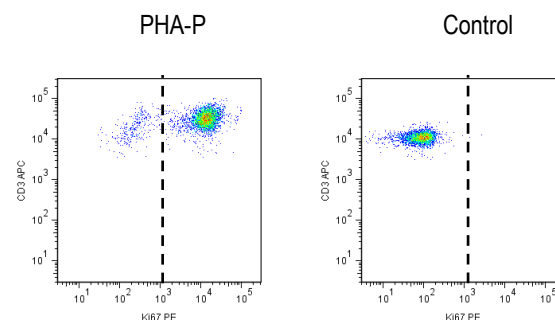


Figure 4. Quantitation
Obrázek 4. Četnost Ki-67 pozitivních CD3+ lymfocytů
Obrázok 4. Početnosť Ki-67 pozitivnych CD3+ lymfocytov

