

exbio

T-cell BlastoFlowEx Kit 100 testů | Kat. č. ED7642

RUO

Nepoužívat pro diagnostické a terapeutické procedury.

Technický list (CS)

Verze: ED7642_TDS_v8_CS

Datum vydání: 20-12-2024

Symbole použité k označení produktu

RUO	Pouze pro výzkumné účely		Chránit před vlhkem
	Výrobce		Pozor
	Čtěte návod k použití	CONC 10x	Koncentrovaný roztok (10x)
	Obsah postačuje pro <n> testů	CONTENTS	Obsah
REF	Katalogové číslo		
LOT	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.

Souprava T-cell BlandoFlowEx Kit je určena k měření proliferační odpovědi T-lymfocytů v aktivovaných vzorcích lidské krve.

K detekci proliferaujících lymfocytů využívá souprava směsi protilátek (anti-CD3 a anti-Ki-67).

Poskytované materiály

Obsah

Produkt T-cell BlandoFlowEx Kit vystačí na provedení 100 testů a je dodáván ve formátu:

Fix and Lysing Solution ED7642-1 (1 láhev) obsahující 25 ml koncentrovaného (10X) fixujícího lyzujícího roztoku.

Permeabilizing Solution ED7642-2 (1 láhev) obsahující 10 ml koncentrovaného (10X) permeabilizujícího roztoku.

EDTA ED7642-3 (1 lahvička) obsahující 2,5 ml roztoku připraveného k použití obsahující pufovaný roztok dvojmocné chelatační soli.

CD3 APC/Ki-67 PE ED7642-4 (2 lahvičky) obsahující 2,5 ml roztoku směsi fluorescenčně značených monoklonálních protilátek, naředěných na optimální koncentrace ve stabilizačním fosfátovém pufru (PBS) s obsahem 15mM azidu sodného.

Specifikace protilátek

Tabulka 1 Popis protilátkových konjugátů v T-cell BlandoFlowEx Kit

Antigen	Fluorochrom	Klon	Isotyp
CD3	APC	MEM-57	IgG2a
Ki-67	PE	Ki-67	IgG1

Nutné, ale neposkytované materiály

Testovací zkušavky s kulatým dnem (12 x 75 mm)

Deionizovaná voda

Fosfátový pufr (1x PBS), pH 7,2 – 7,4

Nutná zařízení

Automatická pipeta s jednorázovými špičkami (25 µl – 2 ml) pro pipetování vzorků a činidel

Lahvičky a kádinky pro ředění roztoků / komponent soupravy

Vortex mixer

Centrifuga

Odpadní nádoba s dezinfekcí na sběr supernatantů po centrifugaci

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]
PE	488	576
APC	630 – 640	660

Skladování a manipulace

Skladujte při teplotě 2-8 °C.

Chraňte před přímým slunečním světlem.

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 reagentů).

Výstrahy, opatření a omezení

GHS klasifikace nebezpečnosti

VÝSTRAHA: Fix and Lysing Solution (ED7642-1) 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	H302: Zdraví škodlivý při požití. 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.
P-věty	P201: Před použitím si obstarejte 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.

VÝSTRAHA: Permeabilizing Solution (ED7642-2) 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	H302: Zdraví škodlivý při požití. 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.
P-věty	P201: Před použitím si obstarejte 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.
--	---

VÝSTRAHA: EDTA (ED7642-3) obsahuje kyselina ethylendiamintetraoctová-Na₂-sůl-2H₂O (č. 6381-92-6) v koncentracích klasifikovaných jako nebezpečné.

Prvky označení	Signální slovo
	Varování
H-věty	H373: Může způsobit poškození orgánů při prodloužené nebo opakované expozici.
P-věty	P260: Nevdechujte páry.

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, Permeabilizing Solution and EDTA je čirá kapalina. Nepoužívejte, pokud pozorujete jakoukoli změnu vzhledu, např. zákal nebo známky precipitace.

Omezení použití

Nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti uvedené na štítcích výrobku.

Vzorek

Použijte periferní krev odebranou do zkumavky klasifikované jako zdravotnický prostředek s antikoagulantem heparin. Antikoagulant EDTA a citrát negativně ovlivní stimulační odpověď.

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

Postup

Měření úrovně proliferativní odpovědi T-lymfocytů.

Stimulace plné krve ve zkumavkách

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 (PHA), ED7635 (PWM), ED7636 (Con A), ED7637 (Stimulation Negative Control), ED7673 (CD3/CD28).

1. Umístěte zkumavky s mitogenem do laminárního boxu. (Pokud používáte zkumavky EXBIO, odvíčkujte je, ale ponechte je uvnitř laminárního boxu).
2. Přidejte 0,5 ml kultivačního media do zkumavky.
3. Přidejte 50 µl plné krve (s antikoagulantem heparin).
4. Zavičkujte zkumavky a promíchejte obsah na vortexu.
5. Ujistěte se, že víčka jsou nasazená do pozice umožňující ventilaci, a umístěte zkumavky do inkubátoru (37 °C, 5% CO₂) na dobu alespoň 3 dnů.

Příprava reagensí

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.

Připravte si pro každou reakci alespoň **2 ml** naředěného roztoku.

Permeabilization Solution

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

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

Detekce T-lymfocytů exprimujících Ki-67

1. Vyjměte zkumavky z inkubátoru. Odvíčkujte (víčko vyhodte 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 400× g 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 400× g 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 400× g 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 400× g po dobu 5 minut. Slijte supernatant.
10. Resuspendujte buňky v 0,1 - 0,3 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.

Analýza průtokovým cytometrem

Průtokový cytometr vybraný k použití s produktem T-cell BlastoFlowEx 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 je možné použít software vyvinutý výrobcem cytometru nebo software určený pro offline analýzu cytometrických dat (např. FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Nastavte napětí na detektorech rozptylu světla, přední rozptyl světla (FSC; forward light scatter) a boční rozptyl světla (SSC; side (perpendicular) light scatter) tak, aby požadované události byly ve škále (stimulované a nestimulované vzorky se v FSC a SSC signálu liší).

Nastavte práh detekce (threshold) na přední rozptyl světla (FSC) tak, aby byly zaznamenány pouze požadované události. **Nenastavujte** threshold na fluorescence v APC detektoru: dle zkušeností to může způsobit zkreslení dosažených výsledků z důvodu zpracování fluorescenčního pozadí při analýze cytometrem.

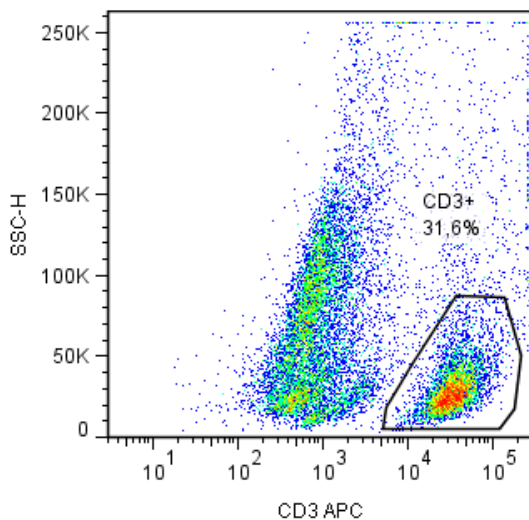
Nastavte napětí na detektorech fluorescence tak, že všechny požadované události jsou ve škále.

Nastavte škálování na detektoru předního rozptylu světla (FSC) pro přístroje BD pro dosažení lepší diskriminace mezi singletovými a doubletovými událostmi. Při správném nastavení škálování je plocha píku signálu (FSC-A) srovnatelná s výškou signálu (FSC-H) a singletové události vytvářejí diagonálu (45° a prochází nulou) v dot-plot FSC-A vs. FSC-H.

Analýza dat

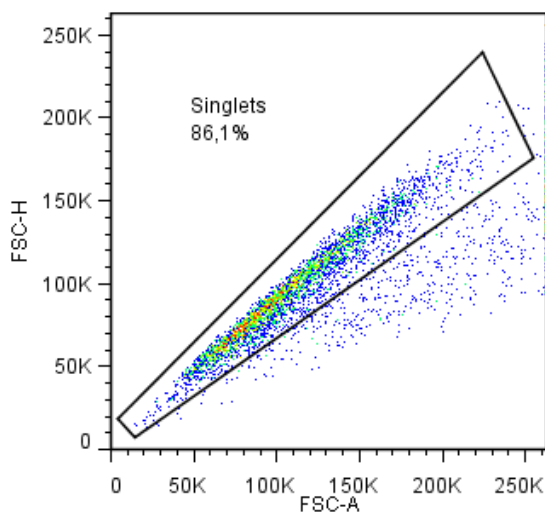
Vyneste všechny události jako SSC vs. CD3 APC fluorescence. Ohraničte CD3+ události (Obrázek 1). Zaznamenejte alespoň 3,000 CD3+ lymfocytů na vzorek.

Obrázek 1 Ohraničení CD3+ buněk (PHA stimulace).



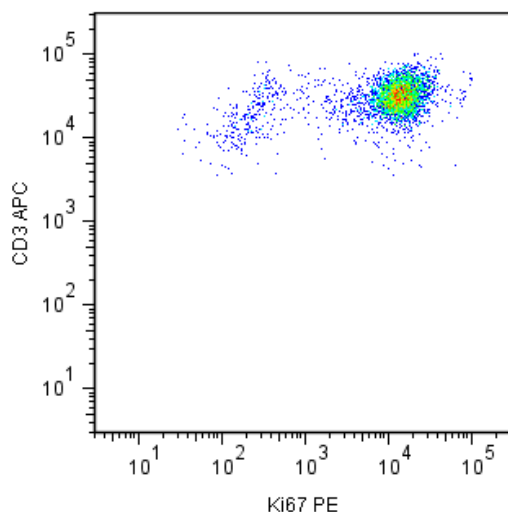
Ohraničte singletové CD3+ události v diagonále dot-plotu FSC-A vs. FSC-H (Obrázek 2).

Obrázek 2 Ohraničení singletových událostí (PHA stimulace).



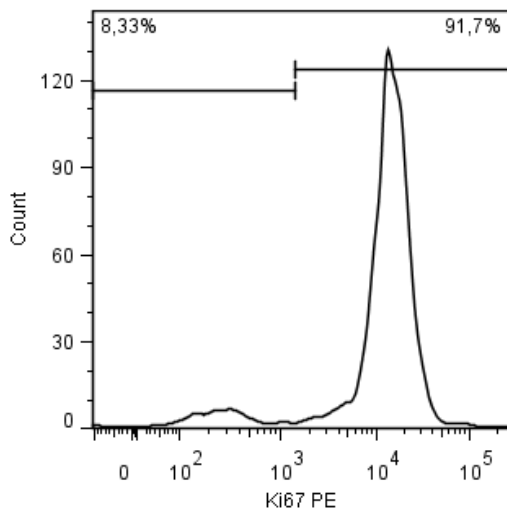
Zkontrolujte rozložení signálu Ki-67 v PE zobrazením CD3+ singletů v dot-plotu CD3 APC signálu na ose Y proti Ki-67 PE signálu na ose X. Nastavte nejvhodnější diskriminaci mezi negativní a pozitivní populací (přerušovaná čára) (Obrázek 3).

Obrázek 3 Ki-67 fluorescence (PHA stimulace).



Zobrazte CD3+ singletové události v histogramu fluorescence v PE detektoru. Rozdělte separátorem negativní (vlevo) a pozitivní (vpravo) pík. Strategii ohraničení buněk aplikujte na všechny zkumavky a vyhodnoťte procentuální zastoupení singletů CD3+Ki-67+ (Obrázek 4).

Obrázek 4 Vyhodnocení procentuálního zastoupení (PHA stimulace).



Odkazy

N/A

Použití ochranných známek třetích stran

FlowJo™ je registrovaná ochranná známka 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 8, ED7642_TDS_v8

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 výrobcí a místnímu příslušnému úřadu.