

Lyzační roztok

Návod k použití

**SHENZHEN MINDRAY BIO-MEDICAL ELECTRONICS CO.,
LTD.**

Lyzační roztok

【NÁZEV PRODUKTU】

Lyzační roztok

【SPECIFIKACE BALENÍ】

50mL×1

【SPECIFIKACE POUŽITÍ】

Lyzační roztok se používá pro lýzu červených krvinek ve vzorcích lidské periferní krve po imunofluorescenčním obarvení buněk.

【PRINCIP】

Klíčovou úlohu při imunofenotypizaci buněk pomocí průtokové cytometrie sehrává odstranění červených krvinek a zároveň minimální ztráta sledovaných leukocytů^[1-4]. Existují dva způsoby jak tohoto cíle dosáhnout: lýza erytrocytů a izolování mononukleárních buněk pomocí denzitního gradientu. Metoda lýzy už nahradila prostředky denzitního gradientu, z důvodu rychlejší implementace, lepší reprodukovatelnosti, minimální ztráty leukocytů a mírného narušení morfologické a antigenní charakteristiky leukocytů^[5-11]. Když jsou do vzorku plné krve přidány monoklonální protilátky konjugované s fluorochromem, dochází k jejich specifickému navázání na povrchové antigeny leukocytů. Při použití lyzačního roztoku po obarvení vzorků budou erytrocyty rychle lyzovány v hypotonických podmínkách, zaímco leukocyty budou uchovány a fixovány.

【AKTIVNÍ SLOŽKY】

Diethylen Glykol ≤ 40%

Formaldehyd ≤ 15%

【SKLADOVÁNÍ A STABILITA】

Prosím, skladujte lyzační roztok při teplotách 2°C-25°C. Doba použitelnosti neotevřené reagentie je 2 roky při teplotách 2°C-25°C a otevřená reagentie bude stabilní po dobu 6 měsíců při teplotách 2°C-25°C. Před použitím naředte 1:10 pouze deionizovanou vodou. Naředěná reagentie je stabilní po dobu 30 dní, když je skladována při teplotách 20°C-25°C.

【PŘÍSTROJ】

Aplikujte na Mindray BriCyte E6 průtokový cytometr, BD FACSCalibur průtokový cytometr a BD FACSCanto II průtokový cytometr.

【SBĚR VZORKŮ A JEJICH PŘÍPRAVA】

Krev odeberte sterilně z žíly pomocí EDTA-K₂/EDTA-K₃ antikoagulantu^[12,13]. Vzorek skladujte při teplotách 20°C-25°C.

【POSTUP】

REAGENCIE PRO TEST**Poskytované reagencie**

Lyzační roztok (10× koncentrovaný)

Potřebné reagencie a materiály, které nejsou poskytovány

- 12×75mm zkumavky.
- EDTA vakuované zkumavky pro odběr krve.
- Deionizovaná voda.
- 1×lyzační roztok, naředěný podle následujících instrukcí.
- Monoklonální protilátky pro metodu průtokové cytometrie.
- Vortex mixer.
- Mikropipetor se špičkami.
- Nízkorychlostní centrifuga.
- Fosfátový pufr: (PBS, vzorec: KCl: 0.2g, KH₂PO₄: 0.2g, NaCl: 8.0g, Na₂HPO₄: 1.15g, rozpuštěno v 1L deionizované vody pH7.4±0.2). Před použitím filtrujte PBS pomocí 0.2µm filtru a skladujte ho při teplotách 2°C-8°C.
- Formaldehydová fixace reagencie: přidejte 40% roztok formaldehydu do PBS (celková koncentrace formaldehydu: 1%) pro fixaci buněk.

Ředění

Naředte 10× koncentrovanou reagencii pomocí deionizované vody (poměr ředění je 1:10) při pokojové teplotě (20°C-25°C).

Lyzační /promývací protokol

1. Přidejte 2 mL 1× Lyzačního roztoku do každé zkumavky obsahující 100 µL EDTA antikoagulovaného vzorku plné krve a koktejl monoklonálních protilátek.
2. Jemně promíchejte každou zkumavku a inkubujte při pokojové teplotě bez přístupu světla po dobu 10 minut.
3. Odstředujte 5min při 300×g, odsajte supernatant;
4. Resuspendujte buněčnou peletu s použitím 2 mL PBS pufru;
5. Opakujte krok 3;
6. Resuspendujte buněčnou peletu ve vhodném pufru a pokračujte s dalšími aplikacemi.

Lyzační /nepromývací protocol

1. Přidejte 450 µL 1× Lyzačního roztoku do každé zkumavky obsahující 50 µL EDTA antikoagulovaného vzorku plné krve a koktejl monoklonálních protilátek.
2. Jemně každou zkumavku promíchejte a inkubujte při pokojové teplotě bez přístupu světla po dobu 15 minut.
3. Jemně zamíchejte, abyste zabránili agregaci a ihned přistupte k testu; pokud nebudete vzorek testovat hned, skladujte ho bez přístupu světla při pokojové teplotě a test dokončete ve lhůtě doporučené pro protilátku (před testem jemně promíchejte).

【VÝSLEDKY】

Lidská plná krev byla obarvena IgG2a-FITC/IgG1-PE izotopovou kontrolou a příslušnou HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE reagencí, poté byla upravena 1×Lyzačním roztokem podle Lyzačního/promývacího protokolu. Zpracovaný vzorek testujte na Mindray BriCyte E6 průtokovém cytometru. Figura 1. a Figura 2. ukazují výsledky izotopové kontroly a příslušné reagencie.

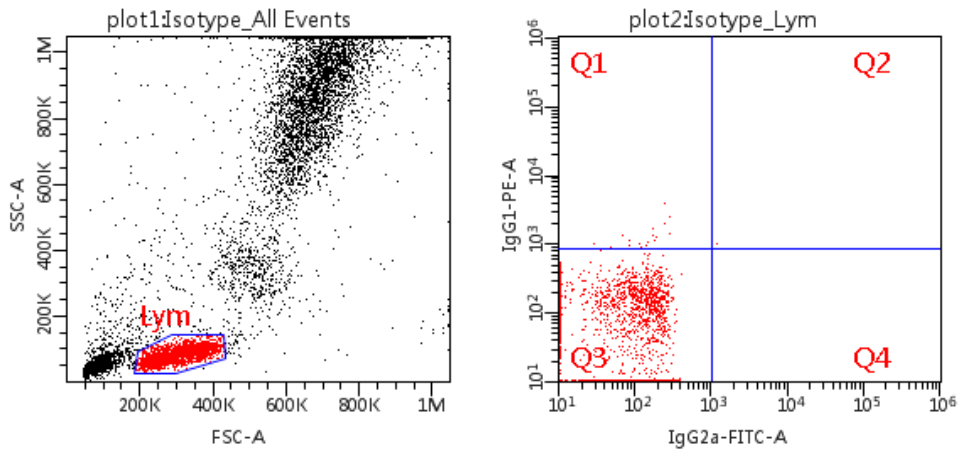


Figura 1. Izotop: FSC vs SSC dot plot pro identifikaci lymfocytů (vlevo); Izotop IgG2a vs IgG1 dot plot (vpravo)

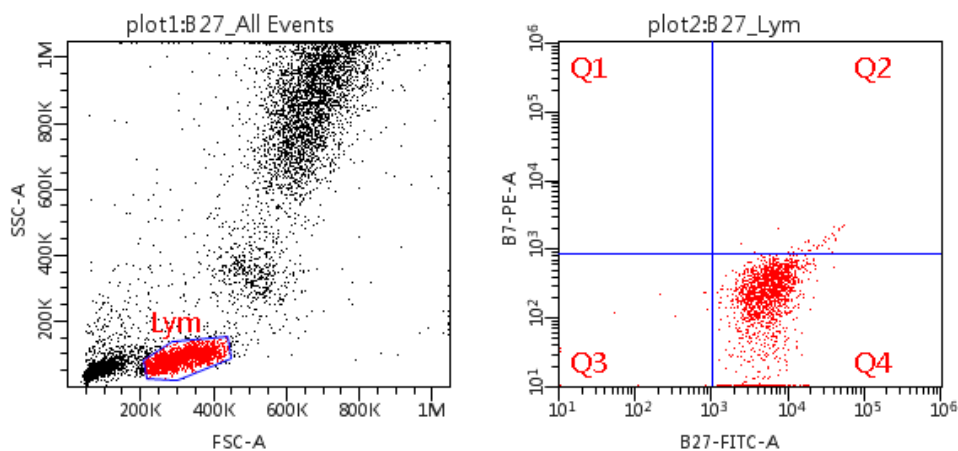


Figura 2. Vzorek: FSC vs SSC dot plot pro identifikaci lymfocytů (vlevo); test vzorku FITC vs PE dot plot (vpravo)

Lidská plná krev byla obarvena pomocí CD3-FITC/CD8-PE/CD45-PerCP/CD4-APC reagensí a pak upravena 1×Lyzačním roztokem podle Lyzačního /nepromývacího protokolu. Upravený vzorek testujte na Mindray BriCyte E6 průtokovém cytometru. Figura 3. ukazuje CD45 vs SSC dot plot a Figura 4. ukazuje CD3 vs CD4 a CD3 vs CD8 dot plot.

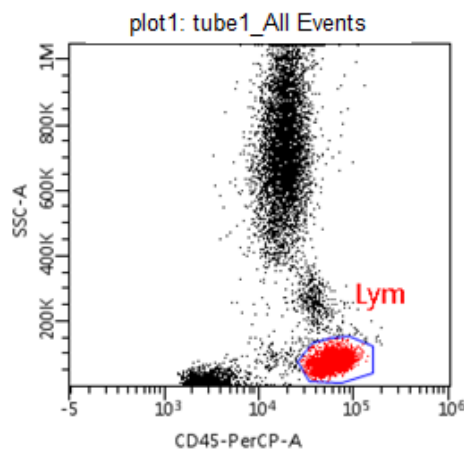


Figura 3. CD45 vs SSC bodový graf pro identifikaci lymfocytů

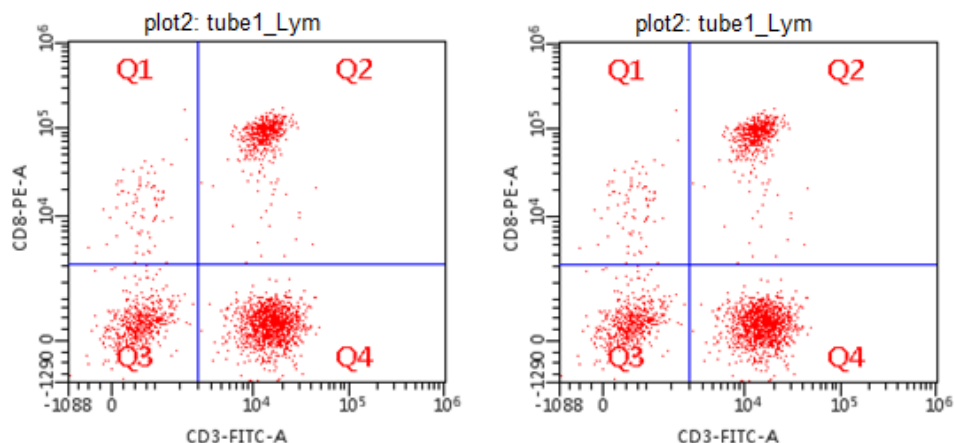


Figura 4. CD3 vs CD4 dot plot pro identifikaci T-lymfocytů (CD3⁺) a pomocných/indukovaných T-lymfocytů (CD3⁺CD4⁺) (vlevo); CD3 vs CD8 dot plot pro identifikaci T-lymfocytů (CD3⁺) a supresorových/cytotoxických T-lymfocytů (CD3⁺CD8⁺) (vpravo)

【OMEZENÍ】

1. Pro antikoagulaci vzorků v testech se používal EDTA antikoagulant, zatímco jiné antikoagulanty (jako je heparin) nejsou testovány.
2. Vzorek se odebere do EDTA vakuové zkumavky a před lýzou a barvením se skladuje při teplotách 20-25°C. Pro lepší lýzu analyzujte vzorek do 6 hodin od jeho odebrání.
3. Vzorek s jadernými červenými krvinkami může ukazovat nekompletní lýzu červených krvinek, protože lyzační roztok nemůže lyzovat jaderné erythrocyty. Nekompletní lýza se také může objevit u následujících vzorků: myelofibróza, srpkovitá anémie, talasémie a sférická buněčná anémie, atd. [7,8,14]

【CHARAKTERISTIKY ÚČINNOSTI】

Přesnost

Reprodukovatelnost metody pro reagenii CD3-FITC/CD8-PE/CD45-PerCP/CD4-APC (Mindray) byla stanovena vyšetřením vzorků v jedné klinické laboratoři. Hodnoty byly stanoveny na krevních vzorcích od jednoho normálního pacienta a jednoho nemocného pacienta (nízká úroveň CD4⁺ buněk). Bylo připraveno 10 alikvot ze stejného krevního vzorku, každá alikvota byla obarvena pomocí CD3-FITC/CD8-PE/CD45-PerCP/CD4-APC reagenie, lyzována podle Lyzačního/nepromývacího protokolu a testována na stejném Mindray BriCyte E6 průtokovém cytometru, viz Tabulka 1.

Tabulka 1. Přesnost

Vzorek	podtřída	N	Průměr(%)	CV(%)
Normalní	CD3 ⁺	10	71.07	0.76
	CD3 ⁺ CD4 ⁺	10	38.74	1.93
	CD3 ⁺ CD8 ⁺	10	27.71	1.65
Abnormalní (nízká úroveň CD4+ buněk)	CD3 ⁺	10	79.92	1.07
	CD3 ⁺ CD4 ⁺	10	17.52	5.18
	CD3 ⁺ CD8 ⁺	10	50.40	1.96

WBC Výtěžnost

Vezměte 5 EDTA antikoagulovaných čerstvých krevních vzorků a zpracujte Lyzačním/promývacím protokolem pomocí lyzačního roztoku. Testujte zpracovaný vzorek na Mindray BC-5800 automatickém hematologickém analyzátoru a získejte součet bílých krvinek před a po lyzi. Součet bílých krvinek po lyzi by měl být výsledek testu vynásobený poměrem ředění. Získejte WBC výtěžností tím, že vzájemně sečtete počet WBC před lyzí a počet WBC po lyzi. Výsledky jsou v Tabulce 2.

Tabulka 2. Výsledky testů míry využití leukocytů

Vzorek	Vzorek WBC($10^9/L$)	Výtěžnost leukocytů(%)
1	2.21	99.77
2	2.10	98.48
3	2.36	99.03
4	3.95	99.06
5	7.11	99.02

RBC usazenina

Vezměte 5 EDTA antikoagulovaných čerstvých krevních vzorků a zpracujte Lyzačním/promývacím protokolem pomocí lyzačního roztoku. Testujte zpracovaný vzorek na Mindray BC-5800 automatickém hematologickém analyzátoru a získejte počet červených krvinek po lyzi. Množství RBC usazeniny by měl být výsledek testu vynásobený poměrem ředění vzorku. Výsledky jsou v Tabulce 3.

Tabulka 3. Výsledky testu RBC usazeniny

Vzorek	Vzorek RBC($10^{12}/L$)	RBC usazenina($10^{12}/L$)
1	4.68	0.00
2	5.88	0.01
3	4.28	0.00
4	4.60	0.00
5	4.41	0.00

【VAROVÁNÍ】

- Tato reagensie obsahuje diethylen glykol a formaldehyd. Formaldehyd je zdraví škodlivý při vdechování, kontaktu s pokožkou a při požití. Dráždí pokožku i oči. Vystavení se formaldehydu může způsobit rakovinu. Možný risk nezvratných změn. Kontaktem s pokožkou může způsobit senzibilizaci. Uchovávejte mimo dosah dětí. Uchovávejte mimo dosah potravin, nápojů a krmení pro zvířata. Při práci s formaldehydem noste vhodné ochranné oblečení a rukavice. Pouze malé množství diethylen glykolu může být smrtelné. Při požití okamžitě vyhledejte lékařskou pomoc a ukažte balení nebo jeho etiketu. Likvidace materiálu musí probíhat podle státních i místních předpisů.
- Všechny biologické vzorky a materiály, které přichází do kontaktu s reagensií musí být považovány za biohazardní. Zacházení s těmito materiály musí probíhat se vši opatrností a jeho likvidace musí probíhat správně a v souladu s místními předpisy. Nevdechujte produkt z pipety. Noste ochranné oblečení a rukavice a zabraňte kontaktu vzorku s pokožkou nebo sliznicemi. ^{15,16]}

【POZNÁMKA】

- Pouze pro In-Vitro diagnostiku.
- Po přidání lyzačního roztoku vzorek dobře promíchejte pomocí vortexu, abyste zabránili nekompletní lýze erytrocytů.

【REFERENCE】

1. de Paoli P, Reitano M, Battistin S, Castiglia C, Santini G. Enumeration of human lymphocyte subsets by monoclonal antibodies and flow cytometry: a comparative study using whole blood or mononuclear cells separated by density gradient centrifugation. *J Immunol Methods*. 1984;72:349-353.
2. Ashmore LM, Shopp GM, Edwards BS. Lymphocyte subset analysis by flow cytometry. Comparison of three different staining techniques and effects of blood storage. *J Immunol Methods*. 1989;118:209-215.
3. Renzi P, Ginns LC. Analysis of T cell subsets in normal adults: comparison of whole blood lysis technique to Ficoll-Hypaque separation by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1987;98:53-56.
4. Romeu MA, Mestre M, González L, et al. Lymphocyte immunophenotyping by flow cytometry in normal adults: comparison of fresh whole blood lysis technique, Ficoll-Paque separation and cryopreservation. *J Immunol Methods*. 1992;154:7-10.
5. Jackson A. Basic phenotyping of lymphocytes: selection and testing of reagents and interpretation of data. *Clin Immunol Newslett*. 1990;10(4):49-55.
6. Kidd PG, Vogt RF, Jr. Report of the workshop on the evaluation of T-cell subsets during HIV infection and AIDS. *Clin Immunol Immunopathol*. 1989;52:3-9.
7. Landay AL, Muirhead KA. Procedural guidelines for performing immunophenotyping by flow cytometry. *Clin Immunol Immunopath*. 1989;52:48-60.
8. Yu Jing, Nie Liping, Gui Yaoting, Peng Liming. A Study on Erythrocyte Lysate of Flow Cytometer Whole Blood. *Medical Study Journal*. 2007;36(7):74-77.
9. Wang Jianzhong. A Study on Methodology of Blood Lymphocyte Phenotype Analysis Using Flow Cytometry *Chinese Journal of Laboratory Medicine*. 2000;23(4):203-206.
10. Xavier Bossuyt, Gerald E. Marti, and Thomas A. Fleisher. Comparative Analysis of Whole Blood Lysis Methods for Flow Cytometry. *Cytometry*. 1997;30:124-133.
11. P. Mene'ndez, O. Redondo, A. Rodriguez, M.C., et al. Comparison Between a Lyse-and-Then-Wash Method and a Lyse-Non-Wash Technique for the Enumeration of CD341 Hematopoietic Progenitor Cells. *Cytometry*. 1998;34:264-271.
12. *Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Peripheral Blood Lymphocytes; Tentative Guideline*. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1992. NCCLS document H42-T.
13. *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture: Approved Standard*. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1991. NCCLS document H3-A3.
14. Du Xiumin, Sun Xiaoming, Yin Geping, Qi Falian. Factors Influencing the Clinical Application of Flow Cytometry. *Clinical Laboratory Journal*. 2002;20(6):365-366.
15. Centers for Disease Control. Update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in healthcare settings. *MMWR*. 1988; 37:377-388.
16. *Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue: Tentative Guideline*. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1991. NCCLS

【PROHLÁŠENÍ O DUŠEVNÍM VLASTNICTVÍ】

SHENZHEN MINDRAY BIO-MEDICAL ELECTRONICS CO., LTD. (dále jen Mindray) vlastní práva na duševní vlastnictví těchto Mindray produktů a tohoto návodu k použití. Tento návod může zmiňovat informace chráněné copyright nebo patentem a nezprostředkovává žádnou licenci na základě patentního práva nebo copyright Mindray nebo jiných firem. Mindray má v úmyslu zachovat informace obsažené v tomto manuálu jako důvěrné. Jakékoliv prozrazení informací z tohoto manuálu jakýmkoliv způsobem bez písemného souhlasu od Mindray je striktně zakázáno. Zveřejnění, změna, reprodukování, distribuce, pronájem, přizpůsobování, překládání nebo jakékoliv jiné práce odvozené od této příručky jsou přísně zakázány bez písemného souhlasu od Mindray.

【KONTAKTY】

Výrobce: Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd.

Adresa: Mindray Building, Keji 12th Road South, High-tech industrial park, Nanshan, Shenzhen 518057, P.R.China

Web: www.mindray.com

E-mail: service@mindray.com

Tel: +86 755 81888998

Fax: +86 755 26582680

EC-Zástupce: Shanghai International Holding Corp. GmbH(Europe)

Adresa: Eiffestraße 80, 20537 Hamburg, Germany

Tel: 0049-40-2513175

Fax: 0049-40-255726

【Datum schválení návodu k použití】

07- 2014



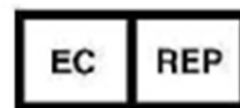
In Vitro diagnostic
medical device



Batch code



European
Conformity



Authorized representative in
the European Community



Use-by
date



Consult Instructions
for use



Temperature
limit



Manufacturer



Catalogue
number