

FIX&PERM® Fixierungs- und Permeabilisierungskit

Zur Färbung und Analyse intrazellulärer Antigene mittels Durchflusszytometrie

Packungsinhalt – Kat. Nr.: GAS-002

Reagenz A (Fixierungsmedium)

4 x 5 ml

200 Tests

Reagenz B (Permeabilisierungsmedium)

4 x 5 ml

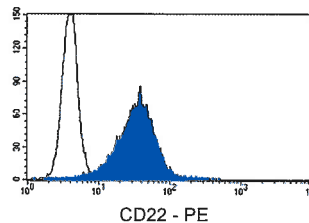
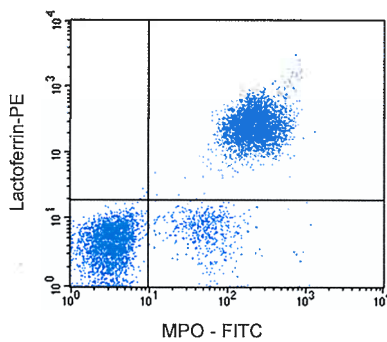
200 Tests



IVD

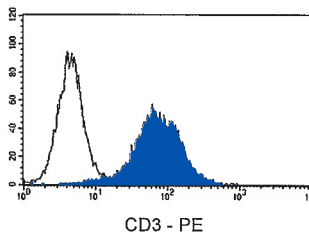
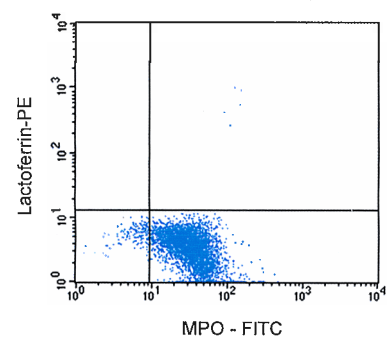
In-Vitro-Diagnostikum

Normales BM: Leukogate

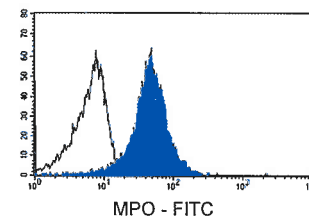


Zytoplasmatische Färbung undifferenzierter Leukämiezellen bei B-ALL mit Nordic-MUbio CD22-PE Konjugat.

Leukämie KM: Blastgate



Zytoplasmatische Färbung von surface-CD3 negativen, undifferenzierter Leukämiezellen bei T-ALL mit Nordic-MUbio CD3-PE Konjugat.



Zytoplasmatische Färbung undifferenzierter Leukämiezellen bei AML mit Nordic-MUbio MPO-FITC Konjugat.

Einleitung

Die durchflusszytometrische Analyse mit monoklonalen Antikörpern war bislang auf Oberflächenmoleküle beschränkt. Intrazelluläre Strukturen, wie zytoplasmatische oder nukleäre Enzyme, Onkoproteine, Zytokine oder Immunglobuline waren dadurch nicht erfassbar. Zudem konnte die zytoplasmatische Lokalisation von an sich membrangebundenen Molekülen, wie CD3 oder CD22, die in ihrer zytoplasmatischen Form als eine der verlässlichsten Marker bei undifferenzierten Leukämien gelten, nicht erfasst werden. Mit FIX&PERM® können erstmals intrazellulär Antigene einfach mittels Durchflusszytometrie analysiert werden. Die einzige Bedingung ist die Verfügbarkeit geeigneter Antikörper Konjugate. Die meisten erhältlichen monoklonalen Antikörper können mit FIX&PERM® verwendet werden. In einzelnen Fällen muss jedoch die optimale Fixierungsmethode und Fixierungszeit individuell getestet werden. Einige Beispiele von Färbungen mit Nordic-MUbio Antikörpern sind oben abgebildet.

Verwendungszweck

Dieser FIX&PERM® Fixierungs- und Permeabilisierungskit enthält 2 Reagenzien: Das Fixierungsmedium (Reagenz A) und das Permeabilisierungsmedium (Reagenz B). FIX&PERM® dient der Fixierung von Zellen mittels Reagens A und der anschließenden Permeabilisierung der Zellmembran mittels Reagens B. Dieser Vorgang ermöglicht Antikörpern den Zugang zu intrazellulären Strukturen bei gleichzeitiger Konservierung der morphologischen Zell-Charakteristika. Die spezielle Rezeptur von FIX&PERM® reduziert Hintergrundfärbungen und erlaubt die gleichzeitige Zugabe des Permeabilisierungsmediums (B) und Fluorochrom-markierter Antikörper. FIX&PERM® dient der Analyse von gesunden und malignen Leukozyten-Populationen aus verschiedenen biologischen Proben (wie z.B. Blut oder Knochenmark) mittels Durchflusszytometrie. Vor endgültiger Diagnosestellung müssen die hierbei gewonnenen Ergebnisse jedoch im Kontext mit weiteren diagnostischen Tests sowie der klinischen Situation eines Patienten gesehen und von einem qualifizierten Professionalisten beurteilt werden. Sollten unerwartete Ergebnisse erzielt werden, welche nicht auf modifizierte Arbeitsschritte zurück zu führen sind, kontaktieren Sie uns bitte umgehend!

Analyse mittels Durchflusszytometrie

FIX&PERM® Reagenzien sind für die Verwendung mit allen kommerziell erhältlichen Durchflusszytometern ausgerichtet. Die Einstellung und Kompensation soll anhand der Herstellerhinweise durchgeführt werden.

Proben

Biologische Proben müssen unter sterilen Bedingungen entnommen werden. Es wird die Antikoagulation mit EDTA oder Heparin empfohlen. Die Proben sollten bis zu ihrer Verwendung bei Raumtemperatur gelagert werden. Für optimale Resultate empfehlen wir, die Proben innerhalb von 24 Stunden zu bearbeiten und auszuwerten. Proben mit einer großen Zahl an nicht lebensfähigen Zellen können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Die Feststellung der Lebensfähigkeit der Zellen (mit z.B. Propidiumjodid) kann hierbei notwendig sein. Alle biologischen Proben müssen mit Vorsicht behandelt und gehandhabt werden – und immer als potentiell infektiös angesehen werden. Verwenden Sie entsprechende Vorsichtsmaßnahmen wie Handschuhe, Laborkleidung, etc.

Permeabilisierungs- und Färbungsprotokoll

- Für jede zu untersuchende Probe 50µl Vollblut, Knochenmark oder mononukleäre Zellsuspension in ein 5ml Röhrchen geben.
- 100µl Reagenz A (Fixierungs-Medium, Lagerung und Benützung bei Raumtemperatur) hinzufügen.
- 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- 5ml PBS (Phosphate Buffered Saline) zugeben, die Zellen 5 Minuten bei 300g zentrifugieren.
- Den Überstand entfernen, 100µl Reagenz B (Permeabilisierungs-Medium) und 20µl des monoklonalen Antikörper-Konjugates von Nordic-MUbio zugeben.
- Bei niedriger Geschwindigkeit 1-2 Sekunden vortexen.

- 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- Die Zellen wie oben beschrieben mit PBS (Phosphate Buffered Saline) waschen und zentrifugieren.
- Den Überstand entfernen und die Zellen für die anschließende Analyse in ‚sheath fluid‘ resuspendieren.
- Falls nicht sofort analysiert wird, Zellen in 0.5ml 1.0% Formaldehyd resuspendieren und bei 2-8°C lichtgeschützt lagern. Die fixierten Zellen innerhalb von 24 Stunden analysieren.

Anmerkung: In speziellen Fällen (verdünnte Knochenmarksproben, andere Proben mit schwach löslichem Protein) kann das Zufügen von Plasmakomponenten vor FIX&PERM® Behandlung von Vorteil sein, um ein Milieu zu schaffen, welches antikoaguliertem Blut ähnelt. Dazu empfehlen wir den Zusatz von IgG Präparationen (z.B. Beriglobin P, ZLB Behring, Endkonzentration 10mg/ml) und humanes Serumalbumin (z.B. humanes Albumin "Behring" 20% - Infusionslösung, Endkonzentration 40mg/ml)

Sensitivität

Die Qualität jedes FIX&PERM® Lots wird mittels Fixierung und Permeabilisierung mit anschließender Analyse des forward- bzw. side-scatter Verhaltens von Leukozyten repräsentativer Spender bestimmt. Das Fixierungs – und Permeabilisierungsverhalten von FIX&PERM® wurde unter Verwendung von EDTA antikoaguliertem peripherem Blut ermittelt.

Grenzen des Verfahrens

Sämtliche Arbeitsschritte und Tätigkeiten mit Durchflusszytometrie sollten ausschließlich von qualifiziertem Fachpersonal durchgeführt werden. Ungenaue und unsachgemäße Einstellungen des Durchflusszytometers, ungenaue Kompensation von Fluoreszenz, als auch die unkorrekte Positionierung von Gates können zu falschen Resultaten führen. Die ausreichende Lysierung roter Blutkörperchen kann aus verschiedenen Gründen nicht möglich sein. In solchen Fällen empfehlen wir vor dem Färben mononukleäre Zellen mittels Dichtegradienten zu isolieren. Die Resultate sind solange korrekt und reproduzierbar, als die angewendeten Prozeduren den technischen Empfehlungen und der befolgten guten Labor-Praxis entsprechen. FIX&PERM® Reagenzien liegen in einer Konzentration vor, die es ermöglicht humane hämatopoetische Zellen zu fixieren und zu permeabilisieren. Es wird daher sehr empfohlen, sich genau an das Arbeitsprotokoll bezüglich Konzentrationen und Mengenangaben zu halten.

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Nur für professionellen Gebrauch!

FIX&PERM® Reagens A enthält Formaldehyd und ist entsprechend mit "gesundheitsschädlich" gekennzeichnet. Formaldehyd ist toxisch, allergen und potentiell krebserregend. Pipettieren Sie niemals mit dem Mund und vermeiden Sie jeden Kontakt mit Augen, Haut und Kleidung. Es werden entsprechend angemessene Arbeitsverfahren empfohlen.

Personen unter 18 Jahren ist es grundsätzlich nicht gestattet, mit diesem Produkt zu arbeiten. Benützer müssen sorgfältig in die richtigen Arbeitsverfahren eingewiesen und über die gefährdenden Eigenschaften des Produktes und die notwendigen Sicherheitsvorschriften informiert werden. Weitere Angaben sind dem Sicherheitsdatenblatt (SDB) zu entnehmen.

Altbestände und Restmengen des Produktes sind entsprechend der anzuwendenden lokalen Vorschriften zu entsorgen.

Lagerung

FIX&PERM® Reagenzien sollen bei Raumtemperatur gelagert und verwendet werden.

Nicht einfrieren.

Die Haltbarkeit der Reagenzien entnehmen Sie bitte der Aufschrift auf der Verpackung. Von der Verwendung des Reagens nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums wird dringend abgeraten.

Verwenden Sie das Reagens nicht, falls sich eine Ablagerung bildet oder Verfärbungen eintreten.

Garantie

Eine Garantie für dieses Produkt besteht nur für die zum Zeitpunkt der Auslieferung an den Kunden auf dem Etikett angegebenen Mengen- und Inhaltsangaben. Eine über die Beschreibung auf dem Verpackungsetikett hinausgehende Garantie besteht nicht, weder ausdrücklich noch impliziert. Nordic-MUbio verpflichtet sich lediglich zum Ersatz des Produktes oder zur Refundierung des Kaufpreises. Nordic-MUbio haftet nicht für Sachschäden, Personenschäden oder wirtschaftliche Schäden bzw. Verluste, die durch dieses Produkt verursacht wurden.

Ausgewählte Referenzen

- Gerna, G., Percivalle, E., Lilleri, D., Lozza, L., Fornara, C., Hahn, G., Baldanti, F. & Revello, M. G. (2005) *J Gen Virol* **86**, 275-84.
- Groeneveld, K., te Marvelde, J. G., van den Beemd, M. W., Hooijkaas, H. & van Dongen, J. J. (1996) *Leukemia* **10**, 1383-9.
- Haranaga, S., Yamaguchi, H., Friedman, H., Izumi, S., & Yamamoto, Y. (2001) *Infect Immun* **69**, 7753-9
- Hegazy, A. N. & Klein, C. (2008) *Leukemia* **22**, 2070-9
- Kappelmayer, J., Gratama, J. W., Karaszi, E., Menendez, P., Ciudad, J., Rivas, R. & Orfao, A. (2000) *J Immunol Methods* **242**, 53-65.
- Kline, M. P., Rajkumar, S. V., Timm, M. M., Kimlinger, T. K., Haug, J. L., Lust, J. A., Greipp, P. R. & Kumar, S. (2007) *Leukemia* **21**, 1549-60
- Knapp, W., Majdic, O. & Strobl, H. (1993) *Recent Results Cancer Res* **131**, 31-40.
- Knapp, W., Strobl, H. & Majdic, O. (1994) *Cytometry* **18**, 187-98.
- Knapp, W., Strobl, H., Scheinecker, C., Bello-Fernandez, C. & Majdic, O. (1995) *Ann Hematol* **70**, 281-96.
- Konikova, E., Glasova, M., Kusenda, J. & Babusikova, O. (1998) *Neoplasma* **45**, 282-91.
- Lanza, F., Latorraca, A., Moretti, S., Castagnari, B., Ferrari, L. & Castoldi, G. (1997) *Cytometry* **30**, 134-44.
- Millard, I., Degraeve, E., Philippe, M. & Gala, J. L. (1998) *Clin Chem* **44**, 2320-30.
- Nakase, K., Sartor, M. & Bradstock (1998) *Cytometry* **34**, 198-202.
- Pascale, F., Contreras, V., Bonneau, M., Courbet, A., Chilmonczyk, S., Bevilacqua, C., Epardaud, M., Niborski, V., Riffault, S., Balazuc, A. M., Foulon, E., Guzylack-Pirou, L., Riteau, B., Hope, J., Bertho, N., Charley, B. & Schwartz-Cornil, I. (2008) *J Immunol* **180**, 5963-72
- Pickl, W. F., Majdic, O., Kohl, P., Stockl, J., Riedl, E., Scheinecker, C., Bello-Fernandez, C. & Knapp, W. (1996) *J Immunol* **157**, 3850-9.
- Riera-Sans, L., & Behrens, A. (2007) *J Immunol* **178**, 5690-700
- Roberts, J. L., Lengi, A., Brown, S. M., Chen, M., Zhou, Y. J., O'Shea, J. J. & Buckley, R. H. (2004) *Blood* **103**, 2009-18
- Sargent, R. L., Craig, F. E. & Swerdlow, S. H. (2009) *Int J Clin Exp Pathol* **2**, 574-82
- Scheinecker, C., Strobl, H., Fritsch, G., Csmarits, B., Krieger, O., Majdic, O. & Knapp, W. (1995) *Blood* **86**, 4115-23.
- Sedlmayr, P., Grosshaupt, B. & Muntean, W. (1996) *Cytometry* **23**, 284-9.
- Strobl, H. & Knapp, W. (2004) *J Biol Regul Homeost Agents* **18**, 335-9.
- Strobl, H., Scheinecker, C., Csmarits, B., Majdic, O. & Knapp, W. (1995) *Br J Haematol* **90**, 774-82.
- Strobl, H., Scheinecker, C., Riedl, E., Csmarits, B., Bello-Fernandez, C., Pickl, W. F., Majdic, O. & Knapp, W. (1998) *J Immunol* **161**, 740-8.
- Strobl, H., Takimoto, M., Majdic, O., Fritsch, G., Scheinecker, C., Hocker, P. & Knapp, W. (1993) *Blood* **82**, 2069-78.
- Wang, X., Chang, X., Facchinetti, V., Zhuang, Y. & Su, B. (2009) *J Immunol* **182**, 3597-608