

Инструкция по применению «Клеточный биочип для параллельного исследования морфологии и иммунофенотипа лейкоцитов человека»

Назначение. Изделие предназначено для отдельного морфологического исследования лейкоцитов, положительных по линейноспецифическим антигенам лейкоцитарных маркеров дифференцировки (CD).

Описание целевых аналитов. Целевыми аналитами являются моноклеарная фракция лейкоцитов человека, выделенная из крови или костного мозга.

Характеристика изделия. Биочип представляет прозрачную пластиковую подложку 22×22×0,2 мм, на поверхности которой расположена матрица 6×7 круглых пятен диаметром 2 мм, в каждом из которых иммобилизовано одно из 42 антител к различным дифференцировочным антигенам.

Принцип метода.

Биочип представляет собой прозрачную пластиковую подложку, на которую иммобилизуются антитела, образуя матрицу областей, способных связывать определенные поверхностные антигены лейкоцитов. На биочип наносят антитела ко всем или части из следующего списка антигенов: CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD27, CD28, CD33, CD34, CD38, CD41, CD42, CD43, CD45, CD45RA, CD45R0, CD56, CD61, CD64, CD103, CD117, CD123, CD200, CD235, HLA-DR, IgM, κ и λ легкие цепи иммуноглобулинов, отрицательный контроль (смесь иммуноглобулинов).

Фракция моноклеарных клеток выделяется из периферической крови и инкубируется на чипе при 4 °С в течение 60 минут без перемешивания. При оседании на поверхность биочипа каждая клетка плотно связывается с ней лишь в том случае, если попадает в область иммобилизации антитела к антигену, присутствующему на ее поверхности. Поэтому после отмывки неспецифически связавшихся клеток на поверхности биочипа остаются заполненные клетками области, в каждой из которых локализованы лейкоциты, несущие на поверхности определенный дифференцировочный антиген. После этого препарат связавшихся с биочипом клеток высушивают на воздухе, фиксируют и окрашивают для дальнейшего морфологического или цитохимического исследования. Таким образом, лейкоциты оказываются рассортированы по поверхностным антигенам таким образом, что клетки, несущие различные антигены, оказываются в различных областях биочипа. Далее клетки высушиваются и окрашиваются для морфологического или цитохимического анализа. Разработанная процедура нанесения и высушивания клеток на биочипе позволяет добиться полной морфологической идентичности клеток на биочипе и в мазке.

Количество клеток, связавшихся с каждым из антител, пропорционально количеству в исходной суспензии клеток, несущих соответствующий антиген. Определение относительного количества клеток, несущих каждый из исследуемых антигенов, позволяет определить иммунофенотип всей исследуемой популяции.

Оборудование и материалы

Оборудование:

1. Световой микроскоп, увеличение 100–1000 раз.

2. Центрифуга с бакетными роторами до 900 g.
3. Центрифуга для сушки биочипов.
4. Дозаторы 1 мл

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

- Раствор фикоλλα, плотность 1,077 г/мл (рН 7,2–7,4)
- Бычий сывороточный альбумин
- Буфер фосфатный (рН 7,2–7,4)
- Фетальная телячья сыворотка
- Фиксатор по Май-Грюнвальду (ГОСТ 6995-77)
- Раствор Азур-Эозин по Романовскому (ТУ 9398-270-27428909-02)
- Буфер для разведения азура-эозина по Романовскому
- Чашки Петри, диаметр 35 мм;
- Пластиковые пробирки Falcon 15 мл
- Наконечники для дозаторов, 1 мл

Вид анализируемого материала: используются образцы цельной периферической крови с добавлением антикоагулянта (К3+ЭДТА), полученные путем пункции локтевой вены (в объеме 5 мл).

Подготовка к анализу

1. Вынуть биочипы из упаковки, положить в чистые чашки Петри, залить 1% раствором альбумина на фосфатном буфере, инкубировать в холодильнике 10 минут.
2. Переложить готовый к работе биочип в чистую сухую чашку Петри.
3. Выделить мононуклеарную фракцию из исследуемого образца крови с помощью центрифугирования в градиенте фикоλλα плотностью 1,077 г/мл в соответствии с инструкцией производителя.
4. Ресуспендировать выделенную фракцию клеток в 500 мкл чистой фетальной телячьей сыворотки. Инкубировать полученную суспензию в холодильнике в течение 10 минут.

Проведение анализа

1. Нанести суспензию клеток на готовый к работе биочип.
2. Инкубировать суспензию клеток на биочипе в холодильнике 60 минут.
3. Отмыть биочип в растворе 1% бычьего сывороточного альбумина в фосфатном буфере.
4. Залить биочип 100 мкл фетальной телячьей сыворотки.
5. Слить с биочипа избыток сыворотки, поместить биочип в держатель центрифуги для сушки биочипов, высушить в течение 30 сек при скорости 5000 об/мин.
6. Высушенный биочип окрасить по Паппенгейму в соответствии со стандартным протоколом.

Интерпретация результатов

Микроскопировать биочип с окрашенными клетками методом светлопольной микроскопии при увеличении $\times 100$ – $\times 1000$.