

Détermination de la concentration saturante d'un anticorps monoclonal pour utilisation dans la trousse PLATELET Calibrator

Procédure recommandée

Définition de la concentration saturante d'un AcM : concentration d'AcM capable de saturer tous les sites antigéniques accessibles à la surface des cellules d'intérêt.

A/ Préparation des dilutions de l'anticorps spécifique :

Pour un AcM spécifique, préparer 6 dilutions en cascade selon le tableau suivant :

Dilutions	Volume AcM spécifique	Volume R1 dilué	Concentration de l'AcM spécifique
D1	300 μ L		20 μ g/mL
D2	150 μ L de D1	+ 150 μ L	10 μ g/mL
D3	150 μ L de D2	+ 150 μ L	5 μ g/mL
D4	150 μ L de D3	+ 150 μ L	2,5 μ g/mL
D5	150 μ L de D4	+ 150 μ L	1,25 μ g/mL
D6	150 μ L de D5	+ 150 μ L	0,6 μ g/mL

B/ Préparation du réactif de révélation (R4)

Pour un AcM spécifique: mélanger **70 μ L** de **réactif 4** et **630 μ L** de réactif 1 dilué. Homogénéiser à l'aide d'un agitateur de type Vortex pendant 1 à 2 secondes.

C/ Protocole

Préparer 6 tubes sur un portoir, notés T1 à T6.
Préparer un plasma riche en plaquettes (PRP) à partir d'un échantillon de sang humain citraté, citrate de sodium 0,109 M / 0,129 M (1 volume de citrate pour 9 volumes de sang) ou prélevé sur CTAD / Diatube[®]H (Becton Dickinson).
Préparation du plasma : Centrifuger l'échantillon sanguin à **170g** pendant **15 minutes** à température ambiante. Dans un tube, prélever le PRP et l'homogénéiser doucement par retournement.

Dans chacun des tubes T1 à T6:

Pipeter **5 μ L** de PRP puis ajouter **100 μ L** des dilutions préparées selon le paragraphe A.
Homogénéiser les tubes à l'aide d'un agitateur de type Vortex pendant 1 à 2 secondes.
Incuber les tubes **15 minutes** à température ambiante (18-25 °C).

Effectuer 1 lavage :

- Ajouter dans les tubes T1 à T6, **3 mL** de réactif 1 dilué.
- Centrifuger les tubes **5 minutes** à **1900 g**.
- Eliminer le surnageant.

Ajouter **100 μ L** de réactif 4 dilué, préparé selon le paragraphe B.
Homogénéiser les tubes à l'aide d'un agitateur de type Vortex pendant 1 à 2 secondes.
Incuber les tubes **15 minutes** à température ambiante.
Réaliser 2 lavages comme décrit ci-dessus.
Ajouter **500 μ L** de réactif 1 dilué.

D/ Lecture cytométrique

Avant l'analyse, homogénéiser les tubes à l'aide d'un agitateur de type vortex.
Pour effectuer la lecture cytométrique, se reporter au protocole d'utilisation de l'appareil fourni par le fabricant.
Construire un cytogramme FS LOG x SS LOG.
Positionner un seuil discriminant pour éliminer les éventuels contaminants (bruit de fond de l'appareil).
Isoler la population plaquettaire par une fenêtre d'analyse "PLT" (fig.a).

Créer un histogramme FL1 LOG.

Conditionner cet histogramme par la fenêtre d'analyse "PLT".
Sur l'histogramme FL1 LOG conditionné par la fenêtre "PLT", relever la moyenne de fluorescence du pic positif pour chaque dilution de l'anticorps spécifique (fig. b).

Fig. a : Positionnement de la fenêtre d'analyse "PLT"

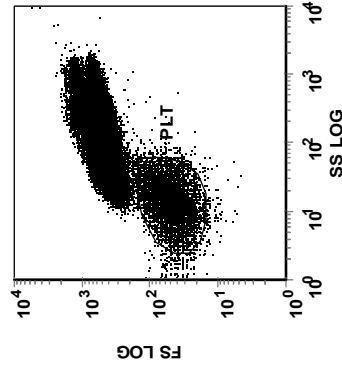
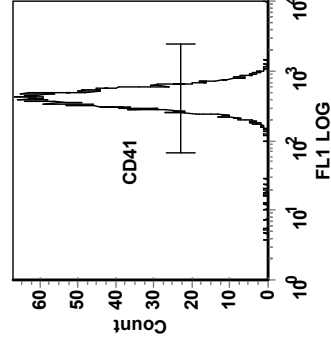


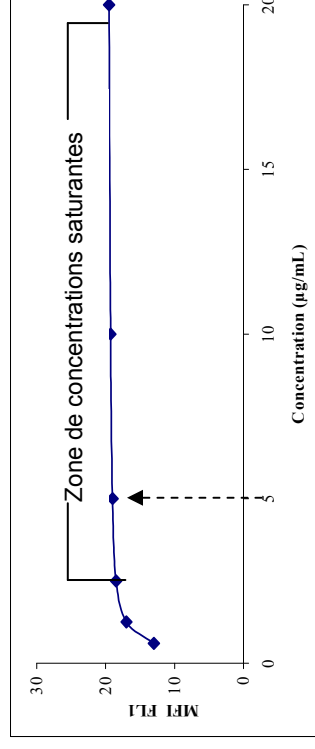
Fig. b : Exemple d'immunomarquage CD41



E/ Résultats

A l'aide d'un tableur, tracer la courbe de saturation reliant la moyenne de fluorescence (MFI) à la concentration de l'anticorps.

Pour cela, porter en abscisse les 6 concentrations d'anticorps testées et en ordonnée les moyennes de fluorescence obtenues.



La courbe de saturation comporte un plateau représentant la zone des concentrations saturantes de l'anticorps. Vérifier que la concentration de **5 μ g/mL** donne une MFI située sur le plateau de la courbe de saturation. Si cette condition est vérifiée, l'anticorps est utilisable dans la trousse PLATELET Calibrator à la concentration de **10 μ g/mL**.

Note : L'utilisation dans le protocole de la trousse d'un AcM spécifique non saturant à une concentration \leq 5 μ g/mL donnera des résultats erronés.