

MP-Count Beads

Pour le comptage absolu des microparticules par cytométrie en flux

Flacon de 100 Tests

Réf. 7804



A usage de Recherche Uniquement

1 INTRODUCTION

Les microparticules biologiques ("MP") sont des vésicules d'origine cellulaire de taille hétérogène comprise entre 0,1 et 1 µm.

Afin d'en effectuer un comptage absolu par cytométrie en flux (CMF), l'utilisation de billes de comptage de petite taille est un pré-requis. Ainsi les MP-Count Beads sont les billes de choix pour cette application. Elles sont compatibles avec les réglages imposés par l'analyse des MP et leur petite taille (diamètre 3 µm) évite les problèmes de perte artéfactuelle et de sédimentation souvent rencontrés lors de l'utilisation de billes de taille supérieure (2,3).

2 PRINCIPE

Une fois l'échantillon (platelet free plasma / PFP ou MP purifiées) marqué, un volume de MP-Count Beads identique au volume d'échantillon est ajouté dans le tube d'analyse.

L'analyse des MP-Count Beads dont la concentration est connue va permettre de calculer la concentration absolue des MP (MP/µL) présentes dans l'échantillon d'origine grâce à la formule suivante :

$$\text{MP}/\mu\text{L} = \frac{\text{Nb MP comptées} \times [\text{MP-Count beads}]}{\text{Nb MP-Count Beads comptées}}$$

3 REACTIF FOURNI

1 flacon de 3 mL de billes.

MP-Count Beads est une suspension de billes fluorescentes en FL2 / PE de 3 µm de diamètre avec une concentration connue (voir l'étiquette du flacon indiquant la concentration des billes).

PRECAUTIONS

- Respecter les bonnes pratiques de laboratoire.
- Se conformer à la réglementation locale en vigueur pour l'élimination des déchets.
- Considérer les échantillons biologiques comme potentiellement infectieux.

4 MATERIELS AUXILIAIRES NECESSAIRES NON FOURNIS

- Cytomètre avec laser bleu (488 nm) ou jaune (561 nm).
- Agitateur de type Vortex.
- Agitateur rotatif.
- Tubes de cytométrie (identiques à ceux recommandés pour l'analyse des MP : polypropylène, empoussièrément et adsorption limités).
- Pipettes ajustables à embout jetable.
- Megamix (réf. 7801), Megamix-Plus FSC (réf. 7802) ou Megamix-Plus SSC (réf. 7803) pour le réglage préliminaire du cytomètre.
- Réactifs pour le marquage des MP (par ex. AcM-PE et/ou autres fluorochromes, Annexine V-FITC, tampon calcique).

5 RECONSTITUTION ET CONSERVATION DU REACTIF

Conservé à 2-8 °C sous son état d'origine, le réactif est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon. Ne pas congeler.

Le réactif est prêt à l'emploi.

Sortir le réactif au moins 30 minutes avant utilisation.

Il est possible de le placer sous agitation rotative douce ou de le vortexer 10 secondes avant utilisation.

Stabilité après ouverture : 6 mois à 2-8 °C, en dehors de toute contamination.

6 MODE OPERATOIRE

Le réactif doit être à température ambiante.

6.1 Préparation de l'échantillon

Note : il est recommandé d'utiliser la même pipette pour ajouter l'échantillon et les billes MP-Count Beads, une éventuelle erreur de volume étant ainsi neutralisée par la formule de calcul.

L'illustration d'application ci-dessous n'est donnée qu'à titre d'exemple, les protocoles d'analyse de MP en CMF pouvant être très variés.

Pour un comptage de PMP PS⁺/CD41⁺ en CMF sur Gallios (Beckman-Coulter), à partir d'un échantillon de PFP, le protocole suivant peut être appliqué.

Sur un portoir, pour chaque PFP, disposer un tube de cytométrie.

- Pipeter 10 µL de CD41-PE (réf. 5112-PE100T) puis 10 µL d'Annexine V-FITC
- Ajouter 30 µL de PFP
- Homogénéiser pendant 1 à 2 secondes à l'aide d'un agitateur de type Vortex
- Incuber pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- Ajouter 500 µL de tampon de fixation d'Annexine V (tampon calcique)
- Ajouter 30 µL de MP-Count Beads préalablement homogénéisées.

Le flacon MP-Count Beads peut être laissé à température ambiante pendant 2 heures maximum puis doit être remplacé à 2-8 °C.

L'échantillon ainsi préparé peut être conservé à 2-8°C pendant 2 heures maximum avant l'analyse cytométrique.

6.2 Analyse cytométrique

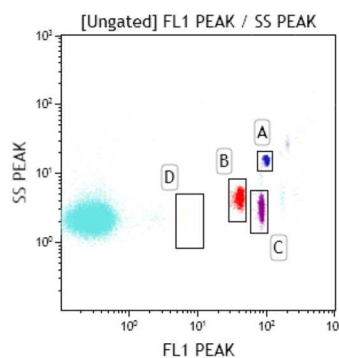
Pour effectuer l'analyse CMF, se rapporter au protocole d'utilisation de l'appareil fourni par le fabricant et aux références citées.

Juste avant l'analyse, homogénéiser le tube à l'aide d'un agitateur de type Vortex.

- Analyser un tube de Megamix avant chaque série de MP (cf. notice des produits 7801, 7802 ou 7803) afin de pré-régler le cytomètre.

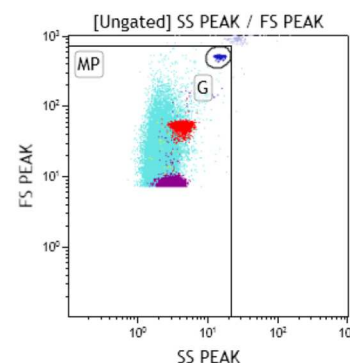
Dans l'exemple ci-dessous, il s'agit du Megamix-Plus FSC analysé sur Gallios (Figs 1a et 1b).

Fig.1a : Distribution des billes du Megamix-Plus FSC (seuil FS)



Région A : billes de 0,9 µm
Région B : billes de 0,5 µm
Région C : billes de 0,3 µm
Région D : billes de 0,1 µm

Fig.1b : Positionnement de la région MP



- Analyser ensuite l'échantillon marqué **dans les mêmes réglages que ceux du Megamix-Plus FSC** (Fig.2).

Dans l'exemple ci-dessous il s'agit d'un marquage de PMP (CD41-PE/Ann. V-FITC) avec des compensations optimales.

- Relever le nombre de MP détectées dans la région I2. Dans cet exemple, n = 9235 évènements.

Le compte de MP peut être impacté par un problème de flux. Il est donc conseillé de suivre sa stabilité au cours de l'acquisition. En cas de problème de flux, il est recommandé de procéder à une nouvelle analyse de l'échantillon. Si cela n'est pas possible, une exclusion de la période perturbée peut cependant être envisagée par « gating out » d'une fenêtre ménagée sur l'histogramme Time x Count.

La concentration de MP dans cet échantillon est calculée de la façon suivante :

$$MP/\mu L = \frac{\text{Nb MP comptées} \times [\text{MP-Count Beads}]}{\text{Nb MP-Count Beads comptées}}$$

$MP/\mu L = (9235 \times 2200)/1024 = 19\ 841 \text{ PMP} / \mu L$
(2200 étant la concentration du lot de MP-Count Beads utilisée ici).

Note : l'ajout éventuel de fixateur (type paraformaldéhyde, PFA) dans le tube cytométrique des MP peut engendrer une chute de la fluorescence FL2/PE des MP-Count Beads.

REFERENCES

- 1) Robert S et al, Artheroscler Thromb Vasc Biol, 2012; 32: 1054-58.
- 2) Poncelet P et al, Transfus Apher Sci. 2015; 53(2):110-26.
- 3) Poncelet P et al, Cytometry A. 2016; 89(2):148-58.

- Créer un cytogramme FL2 Log x SS Log (Fig. 3a).
- Régler les PMT FL2 et SS de façon à faire apparaître les MP-Count Beads en milieu de 4èmes décades en SS et FL2.
- Positionner une région « MP-Count » autour du nuage dense de billes en évitant les doublets.
- Créer un histogramme FL2 LOG x Count conditionné sur la région « MP-Count » (Fig. 3b).
- Positionner un curseur K et relever le nombre de MP-Count Beads détectées (Fig.3b). Dans cet exemple, n = 1 024.

Analyser en **vitesse lente** (env. 10-15 $\mu L/mn$ position « low ») pendant une durée correspondant à un **minimum de 500 MP-Count Beads** comptées (**1 minute** minimum est recommandée).

Il est recommandé de suivre la stabilité du flux au cours de l'analyse en créant un histogramme Time x Count (Fig.3 c).

Fig.3a : Positionnement et gating des MP-Count Beads

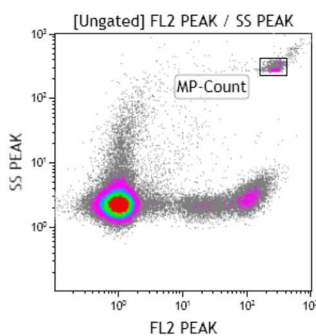


Fig.3b : Distribution des MP-Count Beads en FL2

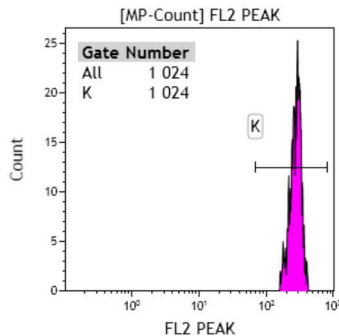
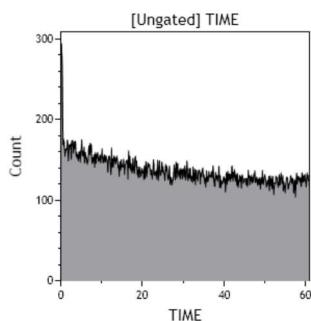


Fig.3c : Événements totaux analysés en fonction du temps



BIOCYTEX
140 ch. DE L'ARMEE D'AFRIQUE
13010 MARSEILLE
FRANCE
TEL : +33 (0) 4 96 12 20 40
FAX : +33 (0) 4 91 47 24 71