

PLATELET Calibrator

Trousse de quantification d'antigènes plaquettaires par cytométrie de flux

Pour 5 gammes de calibration et 50 tests

Réf. 7011



Uniquement à usage de Recherche.

1 METHODE

Trousse de calibration pour la mesure du niveau d'expression de glycoprotéines et autres molécules de surface des plaquettes humaines.

Les plaquettes sont marquées par immunofluorescence indirecte sans lavage avec des anticorps monoclonaux (AcMx) spécifiques et analysées par cytométrie de flux quantitative.

Le niveau d'expression de l'antigène mesuré est déterminé à l'aide des billes de calibration.

Ce protocole s'applique pour des AcMx de souris purifiés d'isotypes IgG1, IgG2a et IgG2b.

2 REACTIFS

- **Réactif 1:** 1 flacon de 35 mL de diluant, 10 fois concentré.
- **Réactif 2a:** 1 flacon de 500 µL, contrôle négatif isotypique IgG1.
- **Réactif 2b:** 1 flacon de 500 µL, contrôle négatif isotypique IgG2a.
- **Réactif 2c:** 1 flacon de 500 µL, contrôle négatif isotypique IgG2b.
- **Réactif 3:** 1 flacon de 200 µL de billes de calibration, recouvertes de quantités croissantes et définies d'IgG. Le nombre de déterminants portés par chaque population de bille est indiqué sur le papillon inséré dans chaque trousse.
- **Réactif 4:** 1 flacon de 1,25 mL de réactif de révélation, anticorps polyclonal anti-IgG de souris couplé au FITC.

Cette trousse contient suffisamment de réactif pour réaliser :

- 5 gammes de calibration
- 2 déterminations de concentration saturante
- 50 tests anticorps (AcM à tester et contrôle négatif isotypique associé)

3 RECONSTITUTION ET CONSERVATION DES REACTIFS

Conservés à 2-8 °C sous leur état d'origine, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret.*

● Réactif 1 **

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

Avant utilisation, diluer le réactif 1 au 1/10 en eau distillée.

Préparer le volume nécessaire pour la série à tester.

Stabilité après dilution: 15 jours à 2-8 °C.

● Réactifs 2a, 2b, 2c et 4

Prêts à l'emploi.

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

● Réactif 3

Après agitation par vortex pendant 5 secondes, le réactif est prêt à l'emploi.

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

Remarques :* Ne pas congeler la trousse.

** La présence d'une cristallisation n'altère en rien la qualité du réactif. Incuber préalablement, si nécessaire, à 37 °C jusqu'à totale dissolution des cristaux.

4 RECUEIL ET TRAITEMENT DE L'ECHANTILLON

● Prélèvement:

- Utiliser des tubes à prélèvement en plastique non-mouillables.
- Les plaquettes devant conserver toute leur intégrité, il est impératif d'éviter tout risque d'activation durant le prélèvement.
- Anticoagulant: citrate de sodium 0,109 M / 0,129 M (1 volume de citrate pour 9 volumes de sang) ou CTAD / Diatube[®]H (Becton-Dickinson).

● Traitement de l'échantillon

- Il est recommandé de traiter l'échantillon dans les **8 heures** qui suivent le prélèvement.
- Le sang doit être conservé à température ambiante (18-25 °C).
- Le test peut être réalisé sur sang total ou sur plasma riche en plaquettes (PRP).

5 PROCEDURE

Note: Une gamme de calibration est nécessaire par série d'échantillons.

5.1 Choix des anticorps

5.1.1 Détermination de la concentration saturante des anticorps spécifiques

L'anticorps spécifique doit être utilisé à **10 µg/mL** dans le protocole de la trousse à condition que l'anticorps spécifique soit **saturant à une concentration ≤ 5 µg/mL**. Vérifier, si nécessaire, la concentration saturante de l'anticorps (cf feuille annexe : « Détermination de la concentration saturante d'un anticorps monoclonal pour utilisation dans la trousse PLATELET Calibrator »).

5.1.2 Détermination de l'isotype des anticorps spécifiques

- Se reporter à la documentation du fournisseur de l'anticorps.

5.1.3 Choix du contrôle négatif isotypique

- Trois contrôles négatifs isotypiques IgG1, IgG2a et IgG2b sont fournis dans la trousse et sont prêts à l'emploi.

- Le contrôle négatif isotypique à utiliser doit être de même isotype que l'anticorps spécifique.

- Le contrôle négatif isotypique doit être réalisé pour chaque échantillon sanguin.

5.2 Exemples de protocole

Note : Pour chacun des réactifs, le volume utilisé étant très faible, il est impératif de délivrer celui-ci au fond des tubes.

Tous les réactifs doivent être à température ambiante pour la réalisation du protocole.

5.2.1 Exemple de protocole pour la quantification des 3 antigènes à l'aide de 3 AcMx (AcM1 à AcM3) d'isotypes différents

A/ Préparation des tubes anticorps, calibrant et échantillon

● Préparation des tubes anticorps

Sur un portoir, par échantillon, préparer la série suivante :

AcM1/IgG1	AcM2/IgG2a	AcM3/IgG2b	Ctl IgG1	Ctl IgG2a	Ctl IgG2b
T1	T2	T3	T4	T5	T6

- Dans le tube T1 : pipeter **20 µL** de l'AcM1 à **10 µg/mL**.

- Dans le tube T2 : pipeter **20 µL** de l'AcM2 à **10 µg/mL**.

- Dans le tube T3 : pipeter **20 µL** de l'AcM3 à **10 µg/mL**.

- Dans le tube T4 : pipeter **20 µL** de contrôle négatif isotypique correspondant (dans l'exemple Réactif 2a, IgG1).

- Dans le tube T5 : pipeter **20 µL** de contrôle négatif isotypique correspondant (dans l'exemple Réactif 2b, IgG2a).

- Dans le tube T6 : pipeter **20 µL** de contrôle négatif isotypique correspondant (dans l'exemple Réactif 2c, IgG2b).

● Préparation du tube calibrant

Une gamme de calibration est nécessaire par série d'échantillons.

Dans un tube numéroté T7 : pipeter **40 µL** de réactif 3 **après remise en suspension par vortex pendant 5 secondes**.

● Préparation des tubes échantillon

Pour chaque échantillon, dans un tube identifié :

- Pipeter **50 µL** de sang total. (Alternativement, pipeter 25 µL de PRP et 25 µL de réactif 1 dilué).

- Ajouter **150 µL** de réactif 1 dilué. Homogénéiser pendant 1 à 2 secondes à l'aide d'un agitateur de type Vortex.

B/ Immuno-marquage

Pour chaque échantillon, dans les tubes T1 à T6 :

- Distribuer **20 µL** de l'échantillon dilué.

- Homogénéiser les 6 tubes pendant 1 à 2 secondes à l'aide d'un agitateur de type Vortex.

- Incuber pendant **10 minutes** à température ambiante.

C/ Révélation

Pour chaque échantillon, dans chacun des tubes T1 à T7:

- Distribuer **20 µL** de réactif 4.
- Homogénéiser pendant 1 à 2 secondes à l'aide d'un agitateur de type Vortex.
- Incuber pendant **10 minutes** à température ambiante.
- Ajouter **2 mL** de réactif 1 dilué.
- Homogénéiser pendant 1 à 2 secondes à l'aide d'un agitateur de type Vortex.

Les échantillons ainsi préparés peuvent être conservés à 2-8 °C pendant **2 heures** avant l'analyse cytométrique.

5.2.2 Exemple de protocole pour la quantification de 3 antigènes à l'aide de 3 AcMx d'isotype identique

Pour chaque échantillon, préparer la série suivante:

AcM1 / IgG2a	AcM2 / IgG2a	AcM3 / IgG2a	Ctl IgG2a
T1	T2	T3	T4

Suivre le protocole décrit au paragraphe 5.2.1. en l'adaptant au nombre de tubes.

5.2.3 Exemple de protocole pour la quantification de 5 antigènes à l'aide d'AcMx dont 2 sont d'isotype IgG1, 2 IgG2a et 1 IgG2b

Pour chaque échantillon, préparer la série suivante:

AcM1 IgG1	AcM2 IgG1	AcM3 IgG2a	AcM4 IgG2a	AcM5 IgG2b	Ctl IgG1	Ctl IgG2a	Ctl IgG2b
T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8

Suivre le protocole décrit au paragraphe 5.2.1. en l'adaptant au nombre de tubes.

6 ANALYSE CYTOMETRIQUE

Pour effectuer la lecture cytométrique, se reporter au protocole d'utilisation de l'appareil fourni par le fabricant.

La moyenne géométrique (Mn (x) ou GeoMean selon le cytomètre) est le paramètre statistique à relever pour la mesure de la fluorescence. Avant l'analyse, homogénéiser les tubes à l'aide d'un agitateur de type vortex.

• Analyse de la gamme de calibration (Figs 1)

Construire un cytogramme FS LOG x SS LOG. Positionner un seuil discriminant en FS Log pour éliminer les éventuels contaminants (bruit de fond de l'appareil). Dessiner une fenêtre d'analyse "CAL" autour de la population de singlets de billes (Fig. 1a).

Créer un histogramme FL1 LOG conditionné par la fenêtre d'analyse "CAL". Relever la MFI pour chacun des 3 pics de fluorescence (Fig. 1b : curseurs A, B et C) correspondant aux 3 populations de billes de calibration.

Pour des conditions d'analyses optimales, le pic de la 3ème bille (C) doit être positionné en FL1, au début de la 4ème décade. Pour y parvenir, ajuster le voltage du photomultiplicateur (PMT) FL1.

Le curseur A doit prendre en compte le premier canal.

Analyser au moins 8 000 billes dans la fenêtre "CAL".

Fig.1a : Cytogramme des billes de calibration

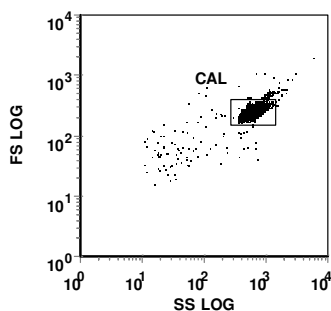
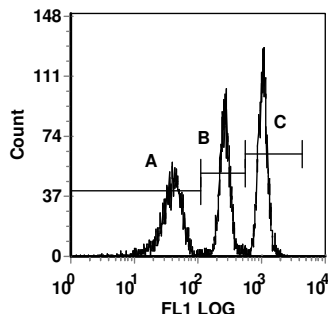


Fig.1b : Positionnement des curseurs



• Analyse des échantillons (Figs 2)

Ne pas modifier le réglage de PMT FL1.

Sur le cytogramme FS LOG x SS LOG, isoler la population plaquettaire des autres cellules sanguines par une fenêtre d'analyse "PLT" (fig. 2a).

Vérifier que le seuil de détection choisi précédemment laisse apparaître la totalité du nuage de plaquettes.

Sur l'histogramme FL1 LOG conditionné par la fenêtre "PLT", relever la moyenne de fluorescence du pic positif pour chaque échantillon analysé (fig. 2b).

Analyser au moins 3 000 évènements dans la fenêtre "PLT".

Fig.2a : Positionnement de la fenêtre

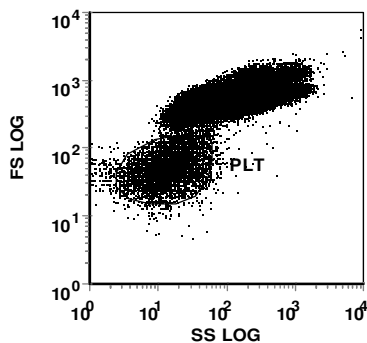
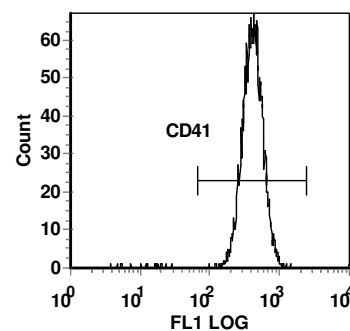


Fig.2b : Exemple d'immunomarquage CD41



7 RESULTATS

Traitement informatique ou graphique

7.1 Traitement informatique

Le traitement des résultats est facilement réalisable grâce à une trame de calcul informatique disponible sur simple demande auprès de BioCytex

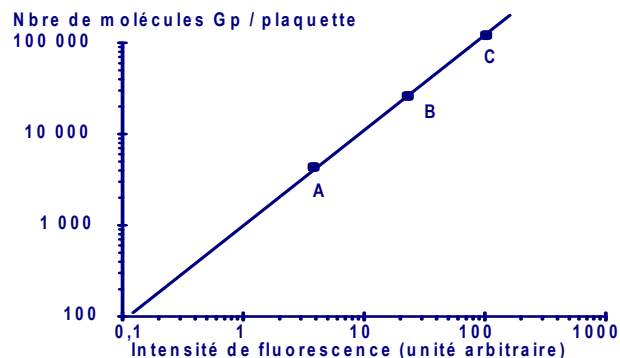
7.2 Traitement graphique

Porter en abscisse le LOG₁₀ des MFI des 3 billes de calibration et en ordonnée le LOG₁₀ du nombre de molécules correspondant, valeur indiquée sur le papillon de calibration. Tracer la droite de calibration optimale, du type LOG₁₀(ABC) = a x LOG₁₀(MFI) + b.

Reporter le LOG₁₀ des MFI des tubes échantillon sur la droite de calibration et en déduire le nombre de molécules correspondantes (ABC : Antibody Binding Capacity).

Les valeurs quantitatives spécifiques (sABC : specific Antibody Binding Capacity) des anticorps sont obtenues après soustraction de la valeur ABC obtenue pour le contrôle isotypique négatif.

Exemple de droite d'étalonnage:



8 PERFORMANCES

Répétabilité : exemple : un échantillon traité 5 fois avec la même trousse :

Anticorps	Moyenne sABC	Ecart type	CV %
CD63 (CLB Gran/12)	309	20	6,6
CD41 (P2)	48 795	402	0,8

BIBLIOGRAPHIE

- 1- Schmitz G. *et al. Thromb.Haemost*, 1998; 79:885-896.
- 2- Poncelet P. *et al.* (eds) Wiley-Liss 2000, 105-132.
- 3- Dupont P. *et al. Blood*, 2003, 101:5, 1833-1840.
- 4- Best D. *et al. Blood* 2003, 102:8, 2811-2818.
- 5- HUGHAN *et al. Blood* 2005, 105:11, 4369-4376.
- 6- Fontana P. *et al. Thromb Haemost* 2006; 96:356-60.
- 7- Senis Y. *et al. Blood* 2009, 113:20, 4942-54.
- 8- Protti M.B. *et al. Biochem. J.* 2009, 417, 391-400
- 9- Mangin P.H. *et al. J Pharmacol Exp Ther.* 2012, 341:1,156-63.

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