



SIGMA-ALDRICH®

LYMFOCYTICKÉ ENZYMY

(Postup č. 181)

POUŽITÍ

Kity lymfocytické enzymy Sigma-Aldrich jsou určeny k použití v prokazování kyselých fosfatáz (Kit č. 181-A), α -naftyl butyrát esteráz (Kit č. 181-B) nebo β -glukuronidáz (Kit č. 181-C) v krevních filmech, filmech kostní dřeně a otiskových tkáňových preparátů. Reagencie lymfocytické enzymy jsou určena k použití v "diagnostice in vitro."

Rozbor zrání normálních T-buněk na jednotlivá stádia pomocí cytochemie enzymů a monoklonálních protilátek prokázal, že T-buněčné malignity odrážejí stejnou ontogenetickou diverzitu.¹⁻¹⁴ Tyto nálezy ve většině případů podporují závěr, že T-buněčné neoplazie reflektují zastavení zrání během normálního vývoje.

Série OKT[®] monoklonálních protilátek rozpoznávajících T-buněčné povrchové antigeny vykreslují prothymocyty / thymocyty ze zralých T-buněk. Podobně, většina T-buněk periferní krve a lymfatické tkáně, jsou-li barveny enzymy, například kyselou fosfatázou (AcP), β -glukuronidázou (BG) a α -naftyl butyrát esterázou (α -NB), zobrazuje charakteristické, stáří odpovídající, cytochemické profily. AcP je získávána pomocí raných fetálních thymocytů a je zadržována T-buněčnou diferenciací.¹⁵⁻¹⁶ BG, objevující se v pozdějším vývoji, se nachází v postthymocytických thymocytech, zralých cirkulujících T-buněk¹⁷ a může být skutečný Pan T-enzym.¹⁸⁻²⁰ Epitop α -NB, reagující při pH rozsahu (5,7-6,0), je exprimován zralými T-buněkami a medulárními thymocyty.¹⁹⁻²⁰ Z těchto výsledků, Basso a kol.,¹⁶ navrhli schéma zrání, přičemž diferenciace T-buněk se vyvíjí z AcP+, BG-, α -NB- na AcP+, BG+, α -NB- a nakonec AcP+, BG+, α -NB+.

Většina zralých T-buněk, definováno buňkami červených krvinek ovce, zobrazují zřetelný fokální (tečkovaný) vzor při barvení AcP, BG a α -NB.^{21,22} a exprimují povrchové receptory pro IgM (T_M, T, Fc γ).²³ Jsou charakterizovány pomocí difúzního / granulárního barvíva a exprimují receptory pro IgG (Tg, gFc γ).²³ Existují záznamy, že subtypy T_M/T_G mohou překrývat subtypy OKT-4/OKT-8 (pomocný supresor). Bylo hlášeno¹⁷⁻²⁰ neshodných údajů ohledně této příbuznosti.^{9,23,24} Momentálně to vypadá, že fenotypy enzymu napomáhají zejména při určování stádia zastavení zrání v T-buněčných malignitách a umožňují rozlišení mezi T-, B- a ne-T/ne-B lymfoproliferativními chorobami.

Popsaný postup umožňuje rozbor rozdělení T-buněk do tří samostatných fází vývoje. Tyto techniky nevylučují použití monoklonálních protilátek pro fenotypové analýzy, jsou-li ve shodě mohou přispět k dalším informacím ohledně povahy T-buněčných lymfoproliferativních chorob.

Reakce v seznamu níže, α -naftyl butyrát esteráza prokazuje rovněž aktivitu nespecifické esterázy v monocytech a makrofázích. Tomuto účelu je k dispozici několik různých metod. Metoda popsaná níže není specifická pro monocyty a makrofágy, protože pH inkubačního média bylo upraveno k prokázání fokálního (tečkovaného) barvicího vzoru v některých lymfocytech. α -naftyl butyrát esteráza je méně citlivá než postup α -naftyl acetyl esterázy. Sigma nabízí postupy více citlivé na monocyty dva kity esterázy, katalogová č. 90-A1 a 91-A. Tyto kity obsahují i návod k prokázání α -naftyl acetyl esterázy s inhibiční fluoridem.

Podle postupů Sigma-Aldrich, jsou cytocentrifugované preparáty nebo filmy fixovány v roztoku citrát-aceton-formaldehydu. Kyselá fosfatáza, α -naftyl butyrát esteráza a β -glukuronidáza jsou potom vizualizovány pomocí následujících principů současného zachycování.

Kyselá fosfatáza:

Naftol AS-BI fosfát $\xrightarrow[\text{GBC}]{\text{AcP}}$ Nerozpuštěný chromogenní Komplex Naftol AS-BI-GBC (červenofialový)

α -Naftyl butyrát esteráza:

α -Naftyl butyrát $\xrightarrow[\text{Komplex pararosanilinu}]{\alpha\text{-NB}}$ Nerozpuštěný chromogenní α -Naftyl-HPR (červenohnědý)

β -Glukuronidáza:

α -Naftol AS-BI β -D-glukuronid $\xrightarrow[\text{Komplex pararosanilinu}]{\text{BG}}$ Nerozpuštěný chromogenní Naftol AS-BI-HPR (červený)

REAGENCIE

α -NAFTYL BUTYRÁT, ROZTOK katalogové č. 180-1
 α -Naftyl butyrát, 2,4 g/mL, v roztoku methanolu se stabilizátory.

ROZTOK NAFTOLU AS-BI A KYSELINY FOSFOREČNÉ, katalogové č. 180-2
Kyselina fosforečná a naftol AS-BI, 4 g/l, v roztoku methanolu se stabilizátory.

ROZTOK NAFTOL AS-BI, KYSELINA β -D-GLUKURONICKÁ, katalogové č. 180-3
Kyselina β -D-glukuronická a naftol AS-BI, 2,5 g/l, v roztoku methanolu se stabilizátory.

ROZTOK PARAROSANILINU, katalogové č. 180-4
Pararosanilin, 40 g/l, ve 2 mol/l kyseliny chlorovodíkové.

ROZTOK FAST GARNET GBC BASE, katalogové č. 387-2
Fast garnet GBC base, 7,0 mg/mL, v kyselině chlorovodíkové, 0,4 mol/l, se stabilizátorem.

ROZTOK NITRIDU SODNÉHO, katalogové č. 91-4
Nitrid sodný, 0,1 mol/l.

TABLETY NITRIDU SODNÉHO, katalogové č. 180-9
Nitrid sodný 250 mg v jedné tabletě.

CITRÁTOVÝ ROZTOK, katalogové č. 91-5
Kyselina citrónová, 18 mmol/l, citrát sodný, 9 mmol/l, chlorid sodný, 12 mmol/l s detergentem. pH musí být 3,6 + 0,1.

ROZTOK ACETÁTU, katalogové č. 386-3
Acetátový pufr, 2,5 mol/l, pH 5,2.

FOSFÁTOVÝ PUFR, katalogové č. 180-5
Fosforečnan sodný a draselný.

ROZTOK METHYLENOVÉ MODŘE, katalogové č. 180-8
Methylenová modř, 1,4 % (w/v) v 95 % ethanolu.

ULOŽENÍ A STABILITA:

Uchovávejte roztoky α -naftyl butyrát, naftol AS-BI kyselina fosforečná a naftol AS-BI kyselina β -D-Glukuronická v mrazničce pod 0 °C. Před použitím zahřejte roztoky na teplotu 37 °C a dobře promíchejte. Zlikvidujte reagencie, jestliže dostanou žlutou barvu nebo se v nich utvoří sraženiny.

Uchovávejte pararosanilinový roztok, fosfátový pufr, tablety nitridu sodného a roztok methylenové modře při pokojové teplotě (18-26 °C), chráněné před světlem.

Skládejte roztoky Fast Garnet GBC Base, nitridu sodného, acétátu a fosfátového pufru v lednici (2-8 °C). Štítek reagencie uvádí datum použitelnosti.

Roztok nitridu sodného a citrátového pufru je vhodný pro použití bez viditelného mikrobiálního růstu.

ZHORŠENÍ:

Zlikvidujte roztoky α -naftyl butyrát, naftol AS-BI kyseliny fosforečné a naftol AS-BI kyseliny β -D-Glukuronické, jestliže reagencie zežloutnou nebo se v nich utvoří sraženiny.

Zlikvidujte pararosanilinový roztok, jestliže se po přidání roztoku nitridu sodného nezbaví do žluta.

Roztoky nitridu sodného a fosfátového pufru je třeba zlikvidovat, jakmile se zakalí.

PŘÍPRAVA:

Zahřejte roztoky α -naftyl butyrát, naftol AS-BI kyselina fosforečná a naftol AS-BI kyselina β -D-Glukuronická na 37 °C.

Roztok z tablet nitridu sodného, 4 g/dl se připraví rozpouštěním 1 tablety v 6,25 mL deionizované vody. Uchovávejte roztok pevně uzavřen při 2-8 °C. Před použitím zahřejte na pokojovou teplotu. Zlikvidovat, když se objeví zakalení.

Roztok fosfátového pufru se připraví rozpouštěním obsahu fosfátového pufru, katalogové č. 180-5, v 500 mL deionizované vody. Pufr má koncentraci 0,067 mol/l, pH 7,7 při 25 °C. Skládejte v lednici (2-8 °C). Zlikvidujte, je-li mikrobiálně znečištěno.

POZNÁMKA: Mikrobiální růst lze odstranit přefiltrováním přes filtračnou jednotku 0,22 mikronu.

Kontrastní barvivo methylenová modř se připraví přidáním 5 mL roztoku methylenové modře, katalogové č. 180-8, do 45 mL deionizované vody. Dobře promíchat. Připravovat denně čerstvý.

FIXATIVUM - CITRÁT-ACETONOVÝ FORMALDEHYD: K 25 mL citrátového roztoku, katalogové č. 91-5, přidejte 65 mL acetonu a 8 mL 37 % formaldehydu. Umístěte do skleněné láhve a pevně uzavřete. Skládejte v lednici (2-8 °C). Před použitím zahřejte na 23-26 °C. Pokud je skladován pevně uzavřen a v lednici, je stabilní

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ:

Je třeba dodržovat běžná bezpečnostní opatření při manipulaci s laboratorními reagenciemi. Odpad likvidujte v souladu se všemi místními, státními a oblastními předpisy. Viz Bezpečnostní list k materiálu, který uvádí aktuální informace o riziku, nebezpečí a bezpečnosti.

US prohlášení o rizicích a bezpečnosti

Roztok α -naftyl butyrát je HOŘLAVÝ a TOXICKÝ. Toxický při vdechování, při styku s kůží a při požití. Toxický: možné riziko velmi vážných ireverzibilních vlivů vdechutím, v kontaktu s pokožkou a požitím. Dráždí oči a pokožku. Chraňte před zdrojem zapálení - zákaz kouření. Nádobu uchovávejte těsně uzavřenou. Chraňte před zdrojem zapálení - zákaz kouření. Přijměte příslušná bezpečnostní opatření proti výbojům statické elektřiny. Zamezte kontaktu s kůží. Používejte vhodné ochranné oblečení a rukavice. V případě

nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek).

Roztok naftolu AS-BI kyseliny fosforečné je HOŘLAVÝ a TOXICKÝ. Toxický při vdechování, při styku s kůží a při požití. Toxický: možné riziko velmi vážných ireverzibilních vlivů vdechutím, v kontaktu s pokožkou a požitím. Dráždí oči a pokožku. Chraňte před zdrojem zapálení - zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oblečení a rukavice. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek).

Roztok naftolu AS-BI kyseliny β -D-Glukuronické je HOŘLAVÝ a TOXICKÝ. Škodlivý při vdechování a spolknutí. Dráždí oči a pokožku. Udržujte mimo zdrojů zapálení - zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oblečení a rukavice. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek).

Roztok pararosanilinu je TOXICKÝ. Při vdechnutí jedovatý. Způsobuje popáleniny. Může způsobit rakovinu. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oblečení, rukavice a ochranu obličeje / očí. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek). Zasažené orgány: Játra a štítná žláza. California Prop 65 karcinogen.

Zamezte kontaktu a vdechnutí fosfátového pufru.

Roztok methylenové modře je HOŘLAVÝ a DRÁŽDIVÝ. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. Nádobu uchovávejte těsně uzavřenou. Chraňte před zdrojem zapálení - zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oblečení.

Tablety nitridu sodného jsou TOXICKÉ, OXIDAČNÍ a nebezpečně pro životní prostředí. Kontakt se zápalným materiálem může způsobit požár. Toxický při požití. Velmi toxický pro vodní organizmy. Uchovávejte mimo dosah zápalného materiálu. Používejte vhodné ochranné oblečení, rukavice a ochranu obličeje / očí. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek). Zabraňte úniku do životního prostředí. Viz speciální instrukce / bezpečnostní listy.

Sůl Fast Garnet GBC Base je TOXICKÁ. Škodlivé při požití. Při vdechnutí jedovatý. Způsobuje popáleniny. Může způsobit rakovinu. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oblečení, rukavice a ochranu obličeje / očí. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek). Zasažené orgány: Játra a ledviny.

Acetátový roztok - upozornění: Látka ještě nebyla zcela otestována.

Aceton je HOŘLAVÝ a DRÁŽDIVÝ. Dráždí oči. Opakovaná expozice může způsobit vysušení a praskání pokožky. Výpary mohou způsobit otupělost a závratě. Udržujte nádobu na dobře větraném místě. Chraňte před zdrojem zapálení - zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Zasažené orgány: Játra a ledviny.

Roztok formaldehydu je TOXICKÝ. Toxický při vdechování, při styku s kůží a při požití. Způsobuje popáleniny. Omezené důkazy o karcinogenním vlivu. Může způsobit přecitlivělost kontaktem s pokožkou. Může způsobit dědičné genetické poškození. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oblečení, rukavice a ochranu obličeje / očí. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek). Používejte pouze v dobře větraných prostorách.

EU Prohlášení o rizicích a bezpečnosti (Upozornění: Látka ještě nebyla zcela otestována)

Roztok α -naftyl butyrát je TOXICKÝ. Toxický při vdechování, při styku s kůží a při požití. Toxický: možné riziko velmi vážných ireverzibilních vlivů vdechutím, v kontaktu s pokožkou a požitím. Používejte vhodné ochranné oblečení a rukavice. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek).

Roztok naftolu AS-BI kyselina fosforečná je TOXICKÝ. Hořlavý. Toxický při vdechování, v kontaktu s kůží a při požití. Toxický: možné riziko velmi vážných ireverzibilních vlivů vdechutím, v kontaktu s pokožkou a požitím. Dráždí oči a pokožku. Chraňte před zdrojem zapálení - zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oblečení a rukavice. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek).

Roztok naftol AS-BI kyselina β -D-Glukuronická je TOXICKÝ. Hořlavý. Škodlivý při vdechnutí, v kontaktu s kůží a při požití. Dráždí oči a pokožku. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličej / očí. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek).

Roztok pararosanilinu je DRÁŽDIVÝ. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oblečení a rukavice.

Fosfátový pufr Upozornění: Látka ještě nebyla zcela otestovaná.

Roztok methylenové modře je VYSOCE HOŘLAVÝ. Vysoce hořlavý. Nádoby uchovávejte těsně uzavřenou. Chraňte před zdrojem zapálení - zákaz kouření.

Tablety nitridu sodného jsou TOXICKÉ, OXIDAČNÍ a nebezpečné pro životní prostředí. Kontakt se zápalným materiálem může způsobit požár. Toxický při požití. Velmi toxický pro vodní organismy. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek). Zabráňte úniku do životního prostředí. Viz speciální instrukce / bezpečnostní listy.

Sůl Fast Garnet GBC Base je TOXICKÁ. Škodlivé při požití. Může způsobit rakovinu. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek).

Acetátový roztok - upozornění: Látka ještě nebyla zcela otestovaná.

Aceton je VYSOCE HOŘLAVÝ a DRÁŽDIVÝ. Vysoce hořlavý. Dráždí oči. Opakovaná expozice může způsobit vysušení a praskání pokožky. Výpary mohou způsobit otupělost a závratě. Udržujte nádoby na dobře větraném místě. Chraňte před zdrojem zapálení - zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc.

Roztok formaldehydu je TOXICKÝ. Toxický při vdechování, při styku s kůží a při požití. Způsobuje popáleniny. Omezené důkazy o karcinogenním vlivu. Může způsobit precitlivělost kontaktem s pokožkou. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličej / očí. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek). Používejte pouze v dobře větraných prostorách.

POSTUP

ODBĚR VZORKŮ:

Doporučuje se provádět odběr vzorků v souladu s dokumentem M29-A2 směrnice NCCLS. Žádná známá zkušební metoda nemůže nabídnout úplné zajištění, že krevní vzorky nebo tkáň nebudou přenášet infekci. Proto všechny krevní deriváty nebo tkáňové vzorky by měly být považovány za potenciálně infekční.

Krev se může shromažďovat v heparinu nebo EDTA. Po fixaci sklíček lze skladovat při pokojové teplotě po dobu nejméně 2 týdnů. Mají-li se izolovat mononukleární buňky pomocí HISTOPAQUE[®]-1077, separaci je třeba provést během 4 hodin, ačkoliv průměrná regenerace byla zaznamenána i po 24 hodinách.²⁵ Krevní filmy, zejména z leukopenických jedinců, se pro tyto procedury nedoporučují, protože hodnocení tohoto materiálu je časově náročné. Cytocentrifugované nebo buffy coat preparáty jsou doporučované. Filmy kostní dřeně a otiskové tkáňové preparáty nepředstavují žádný problém, jsou-li hodnoceny pod mikroskopem.

POTŘEBNÉ SPECIÁLNÍ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY:

Aceton, ACS reagentie
Formaldehyd
Formaldehyd, 37 %

Vodní lázeň schopná udržovat teplotu 37 °C, chráněná před světlem

POZNÁMKY:

Ke každému testu je třeba připojit buňky zdravých dárců. Buňky izolované na gradienty polysacharózy-diatrizoatu sodného lze pro kontrolní účely uchovávat v tekutém nitrogeneru (LN₂). K provedení je třeba 1 x 10⁷ - 10⁸ buněk zmrazit při 1 ± 0,3 °C po dobu jedné minuty v médiu s obsahem 50 % fetálního teleocho séra, 40 % RPMI-1640 (nebo jiné tekutině tkáňové kultury) a 10 % dimethylsulfoxidu (DMSO). Lze je skladovat v tekuté nebo plynné formě LN₂.

Sklíčka je třeba vyhodnocovat při zvětšení 1000X. Filtry dydidium mohou vylepšit výrazně barvu difúzního zabarvení α -NB.

Údaje získané z tohoto postupu slouží pouze jako diagnostická pomůcka a měly by se prověřit ve spojení s jinými klinickými diagnostickými testy nebo informacemi.

POSTUP:

POSTUP KYSELÉ FOSFATÁZY:

Reagencie

Roztok naftol AS-BI kyselina fosforečná, katalogové č. 180-2
ROZTOK FAST GARNET GBC BASE , katalogové č. 387-2
ROZTOK NITRIDU SODNÉHO, katalogové č. 91-4
CITRÁTOVÝ ROZTOK, katalogové č. 91-5
Roztok acetátu, katalogové č. 386-3

ROZTOK METHYLENOVÉ MODŘE, katalogové č. 180-8

1. Předem zahřejte dostatečné množství denní spotřeby deionizované vody na 37 °C.
2. Těsně před fixací přidejte 1 mL roztoku nitridu sodného, katalogové č. 91-4, do 1 mL roztoku Fast Garnet GBC Base, katalogové č. 387-2. Protřepáním opatrně promíchejte a nechte usát nejméně 2-5 minuty.
3. Přidejte roztok z kroku 2 do 38 mL deionizované přehřáté vody.
4. Přidejte roztok acetátu, katalogové č. 386-3.
5. Přidejte 5 mL roztoku naftol AS-BI kyselina fosforečná, katalogové č. 180-2. Dobře promíchejte a nalijte do nádoby Coplin. Roztok dostane žlutou barvu. Tvorba sraženin v roztoku znamená zhoršení kvality roztoku.
6. Fixujte sklíčka na 30 sekund ve fixačním roztoku citrát-aceton-formaldehyd při pokojové teplotě (23-26 °C). Opatrně propláchněte v deionizované vodě na 45-60 sekund. Nenechte sklíčka vyschnout.
7. Ihned po omytí umístěte sklíčka do roztoku z kroku 5 a inkubujte 1 hodinu při 37 °C.
8. Po 1 hodině vyjměte sklíčka z nádoby Coplin a propláchněte nejméně 2 minuty ve vodovodní vodě. Barvicí roztok zlikvidujte.
9. Před kontrastním barvením nechte sklíčka uschnout po dobu nejméně 15 minut.
10. Proveďte kontrastní barvení po dobu 2 minut v kontrastním barvivu methylenová modř.
11. Opláchněte v deionizované vodě

POSTUP α -NAFTYL BUTYRÁT ESTERÁZA:

Reagencie

α -NAFTYL BUTYRÁT, ROZTOK katalogové č. 180-1
ROZTOK PARAROSANILINU, katalogové č. 180-4
ROZTOK NITRIDU SODNÉHO, katalogové č. 180-9
FOSFÁTOVÝ PUFŘ, katalogové č. 180-5
ROZTOK METHYLENOVÉ MODŘE, katalogové č. 180-8
CITRÁTOVÝ ROZTOK, katalogové č. 91-5

1. Zahřejte roztok fosfátového pufru na 37 °C.
2. Těsně před fixací přidejte 1,5 mL roztoku z tablet nitridu sodného do 1,5 mL roztoku pararosanilinu, katalogové č. 180-4. Opatrně promíchejte protřepáním a nechte usát nejméně 5 minut, potom přidejte do 40 mL přehřátého roztoku fosfátového pufru.
3. Přidejte 5 mL roztoku α -naftyl butyrát katalogové č. 180-1
4. Opatrně promíchejte a vlijte do nádoby Coplin. Roztok dostane žlutou barvu. Tvorba sraženin v roztoku znamená zhoršení kvality roztoku.
5. Fixujte sklíčka na 10 sekund ve fixačním roztoku citrát-aceton-formaldehyd při pokojové teplotě (23-26 °C). Opatrně propláchněte v deionizované vodě na 45 sekund. Nenechte sklíčka vyschnout.
6. Ihned po omytí umístěte sklíčka do roztoku z kroku 4 a inkubujte 1 hodinu při 37 °C.
7. Po 1 hodině vyjměte sklíčka z nádoby Coplin a propláchněte nejméně 2-3 minuty ve vodovodní vodě. Barvicí roztok zlikvidujte.
8. Před kontrastním barvením nechte sklíčka uschnout po dobu nejméně 15 minut.
9. Proveďte kontrastní barvení po dobu 5 minut v kontrastním barvivu methylenová modř.
10. Opláchněte v deionizované vodě

POSTUP β -GLUKURONIDÁZA:

Reagencie

Naftol AS-BI kyselina β -D-Glukuronická, katalogové č. 180-3
ROZTOK PARAROSANILINU, katalogové č. 180-4
ROZTOK NITRIDU SODNÉHO, katalogové č. 180-9
Roztok acetátu, katalogové č. 386-3
ROZTOK METHYLENOVÉ MODŘE, katalogové č. 180-8
CITRÁTOVÝ ROZTOK, katalogové č. 91-5

1. Předem zahřejte dostatečné množství denní spotřeby deionizované vody na 37 °C.
2. Těsně před fixací přidejte 0,5 mL roztoku z tablet nitridu sodného do 0,5 mL roztoku pararosanilinu, katalogové č. 180-4. Opatrně promíchejte protřepáním a nechte usát nejméně 5 minut, potom přidejte do 38 mL přehřáté deionizované vody.
3. Přidejte 5 mL roztok acetátu, katalogové č. 386-3

4. Přidejte 5 mL roztoku naftol AS-BI kyselina β -D-Glukuronická, katalogové č. 180-3
5. Opatrně promíchejte a vlijte do nádoby Coplin. Roztok dostane žlutou barvu. Tvorba sraženin v roztoku znamená zhoršení kvality roztoku.
6. Fixujte sklíčka na 30 sekund ve fixačním roztoku citrát-aceton-formaldehyd při pokojové teplotě (23-26 °C). Opatrně propláchněte v deionizované vodě na 45 sekund. Nenechte sklíčka vyschnout.
7. Ihned po omytí umístěte sklíčka do roztoku z kroku 5 a inkubujte 90 minut při 37 °C, chraňte před světlem. POZNÁMKA: Jestliže sklíčka nevložíte po fixaci do inkubačního roztoku, je třeba je nechat uschnout na vzduchu na nejméně 45 minut.
8. Po 90 minutách vyjměte sklíčka z nádoby Coplin a propláchněte nejméně 2-3 minuty ve vodovodní vodě. Barvicí roztok zlikvidujte.
9. Před kontrastním barvením nechte sklíčka uschnout po dobu nejméně 15 minut.
10. Proveďte kontrastní barvení po dobu 3 minut v kontrastním barvivu methylenová modř.
11. Opláchněte v deionizované vodě

CHARAKTERISTIKY ÚČINNOSTI

KYSELÁ FOASFATÁZA: Fokální (tečkované) zabarvení lymfocytů naznačuje thymické linie (T-buněčné).

α -NAFTYL BUTYRÁT ESTERÁZA: Fokální (tečkovaný) barvicí vzor pozorovaný v některých lymfocytech je spojován se zralými T-buňkami nesoucími receptory Fc pro IgM. Tento subset do jisté míry překrývá populaci T-pomocných buněk, ale není zcela správnou mírou pomocné funkce. Difúzní nebo granulózní zabarvení lymfocytů souvisí s částí Fc IgG a do jisté míry překrývá T supresor buněčné populace.

β -GLUKURONIDÁZA: Pozitivní zbarvení se zobrazuje v souvislosti se zralými thymocyty, cirkulujícími T-buňkami a subpopulací nezralých B-buněk. Fokální (tečkovaný) a difúzní granulózní vzor se svým způsobem podobá α -naftyl butyrát esteráze. Monocyty a granulocyty jsou obvykle negativní.

Pokud se zjistěné výsledky liší od očekávaných, kontaktujte prosím technické služby společnosti Sigma-Aldrich za účelem konzultace.

REFERENCE



1. Nadler LM, Ritz J, Reinherz EL, Scholzman SF: Cellular Origins of Human Leukemias and Lymphomas. IN Leukemia Markers, W Knapp, Editor, Academic Press, London, 1981, p 3
2. Greaves MF: Monoclonal Antibodies as Probes for Leukaemic Heterogeneity and Haemopoietic Differentiation. Ibid., p 19
3. Janossy G: Differentiation of Human Bone Marrow Cells and Thymocytes. Ibid., p 45
4. Kersey JH, LeBien TW, Gail-Peczalska K, Nesbit M, et al: Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma: Cell Markers Define Phenotypic Heterogeneity. Ibid., p 453
5. Reinherz EL, Schlossman SF: The characterization and function of human immunoregulatory T lymphocyte subsets. Immunology Today, April 1981, p 69
6. Banker DS, Pahwa RN, Miller DR, Hilgartner MW et al: Immunoregulatory properties of childhood leukemias. J Clin Immunol 2:230, 1982
7. Reinherz EL, Schlossman SF: The differentiation and function of human T lymphocytes. Cell 19:821, 1980
8. Catovsky D, Enno A: Morphological and cytochemical identification of lymphoid cells. Lymphology 10:77, 1977
9. Bevan A, Burns GF, Gray L, Cawley JC: Cytochemistry of human T-cell subpopulations. Scand J Immunol 11:223, 1980
10. Yang K, Bearman RM, Pangalis GA, Zelman RJ, et al: Acid phosphatase and alpha-naphthyl acetate esterase in neoplastic and non-neoplastic lymphocytes. Am J Clin Pathol 78:141, 1982
11. Crockard A, Chalmers D, Matutes E, Catovsky D: Cytochemistry of acid hydrolysis in chronic B- and T-cell leukemias. Am J Clin Pathol 78:437, 1982
12. Ranki A: Nonspecific esterase activity in human lymphocytes. Clin Immunol Immunopathol 10:47, 1978
13. Zicca A, Lepirini A, Cadoni A, Franzì AT, et al: Ultrastructural localization of alpha-naphthyl acid esterase in human TM lymphocytes. Am J Pathol 105:40, 1981
14. Knowles DM II, Halper JP: Human T-cell malignancies: Correlative clinical, histopathologic, immunologic and cytochemical analysis of 23 cases. Am J Pathol 106:187, 1982
15. Stein H, Peterson N, Gaedick G, Lennert K, et al: Lymphoblastic lymphoma on convoluted or acid phosphatase type-A tumor of T precursor cells. Int J Cancer 17:292, 1976
16. Basso G, Cocito MG, Semenzato G, Pezzutto A, et al: Cytochemical study of thymocytes and T lymphocytes. Br. J. Haematol 44:577, 1980
17. Machin GA, Halper JP, Knowles DM II: Cytochemically demonstrable β -glucuronidase activity in normal and neoplastic human lymphoid cells. Blood 56:1111, 1980
18. Ranki A, Totterman TH, Hayry P: Identification of resting human T and B lymphocytes by acid α -naphthyl acetate esterase staining combined with rosette formation with Staphylococcus aureus strain Cowan 1. Scand J Immunol 5:129, 1976
19. Knowles DM II, Hoffman T, Ferrarini M, Kunkel HG: The demonstration of acid α -naphthyl acetate esterase activity in human lymphocytes: Usefulness as a T-cell marker. Cell Immunol 35:112, 1978

20. Knowles DM II, Halper JP: Human medullary and cortical thymocytes are distinguishable according to the presence or absence of cyto-chemically demonstrable acid α -naphthyl acetate esterase (ANAE) activity. J Immunol 125:2823, 1980
21. Armitage RJ, Linch DC, Worman CP, Cawley JC: The morphology and cytochemistry of human T-cell subpopulations defined by monoclonal antibodies and Fc receptors. Br J Haematol 51:605, 1982
22. DeWaele M, DeMey J, Moeremans M, Broodtaerts L, et al: Colloidal gold as a marker for the light microscope detection of leukocyte cell surface antigens with monoclonal antibodies. J Clin Immunol 2:24S, 1982 (Suppl)
23. Manconi PE, Marrosu MG, Paghi L, Correale G, et al: Alpha-naphthyl acetate esterase activity in human lymphocytes: Distribution in lymphocyte subpopulations and in mitogen-activated cells. Scand J Immunol 9:99, 1979
24. Reinherz EL, Moretta L, Roper M, Breard JM, et al: Human T lymphocyte subpopulations defined by Fc receptors and monoclonal antibodies: A comparison. J Exp Med 151:969, 1980
25. Zito DR, Johnson KL, Skipper ME, Normansell DE: Isolation of mononuclear cells from the whole blood: Comparison of two media. Lab Med 17:94, 1986

OKT je registrovanou ochrannou známkou společnosti Ortho Diagnostic Systems, Inc., Raritan, NJ

Sigma-Aldrich, Inc. garantuje, že její produkty se shodují s informacemi obsaženými v této a jiných publikacích Sigma-Aldrich. Kupující musí stanovit vhodnost produktu(ů) pro dané použití. Mohou platit dodatečné podmínky. Viz zadní strana faktury nebo útržek obalu, kde jsou uvedeny dodatky k prodejním podmínkám.

Postup č. 181
Předchozí revize: 2003-02
Revidováno: 2003-09

  AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse
Egham, TW20 9BD Egyesült Királyság

SIGMA-ALDRICH, INC.
3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA
314-771-5765
Technické služby: 800-325-0250
nebo volejte na 314-771-3122
nebo e-mailujte na clintech@sial.com
Objednávky: 800-325-3010
nebo volejte na 314-771-5750
www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
P.O. 1120, 89552 Steinheim, Germany
49-7329-970