
FOGLIO INFORMATIVO SUL PRODOTTO
IQ Starfiqs™ - Intracellular staining by flow cytometry

IQ Starfiqs™

Intracellular staining of cytokines
and other intracellular antigens

RUO

REF

IQP-200

▽ 50 tests

RUO

Ad esclusivo uso di ricerca



Description

Sommario

IQ Starfiqs™ è composto da due reagenti uno per la fissazione ed uno per la permeabilizzazione di leucociti preparati da sangue. IQ Starfiqs™ è fornito come prodotto pronto all'uso, per minimizzare il tempo di lavoro manuale e per una facile manipolazione dei campioni. IQ Starfiqs™ va inteso come ottimale per analizzare in citometria gli antigeni intracellulari. La fissazione e la permeabilizzazione con IQ Starfiqs™ permette la determinazione delle citochine intracellulari, degli antigeni intracellulari quali CyCD3, CyCD22, TdT e MPO, ed è anche stato utilizzato con successo per fissare e permeabilizzare le cellule nella metodica TUNEL per la determinazione dell'apoptosi. Inoltre, IQ Starfiqs™ permette la determinazione simultanea di antigeni di superficie cellulare.

Nota -Per un'ottimale immunocolorazione intracellulare e lisi degli eritrociti nel caso di protocolli per sangue intero, IQ Starfiqs™ dovrebbe essere utilizzato seguendo le procedure descritte. Il protocollo dipenderà dal tipo di antigene e se siano stati usati sangue intero o linfociti isolati. E' importante utilizzare entrambi i reagenti e non miscelarli con altri prodotti.

Applicazioni

Determinazione di antigeni intracellulari in sangue intero, insospensione di midollo osseo o su linfociti isolati.

Utilizzo

Questo foglietto illustrativo contiene protocolli per la determinazione di:

- A - Citochine intracellulari
 - 1 - metodica per sangue intero
 - 2 - leucociti isolati
- B - Altri antigeni intracellulari (quali CyCD3, CyCD22, TdT e MPO)
 - 3 - metodica per sangue intero
 - 4 - leucociti isolati

Entrambi I protocolli sono idonei per colorazioni di doppio colore; simultanea determinazione di antigeni intracellulari e di antigeni di superficie cellulare quali CD3, CD4 e CD8.

IQ Products
bright fluorescence

Protocollo per colorazione di immunofluorescenza di antigeni intracellulari

- A - Determinazione di citochine intracellulari

- 1 – protocollo per sangue intero

1. Diluizione di sangue intero
 - a. Raccogliere 1-3 ml di sangue venoso in una provetta sterile e trattata con eparina.
 - b. Diluire il campione di sangue 1:10 con RPMI 1640 e miscelare bene.
 - c. Trasferire 1 ml di sospensione cellulare in una piastra da coltura da 24 pozzetti.

Nota 5 ml di sospensione cellulare sono sufficienti per la determinazione intracellulare di 5 differenti citochine.
2. Stimolazione delle cellule, se richiesto, in accordo con i protocolli pubblicati (1).
 - a. Dopo stimolazione, raccogliere le cellule e trasferire la sospensione cellulare (5 ml) in una provetta per centrifuga.
 - b. Centrifugare a 200 g per 10 minuti e rimuovere il surnatante.
3. Fissazione delle cellule
 - a. Aggiungere 500 µl IQ Starfiqs™ reagente fissativo (Reagente F).
 - b. Incubare 10 minuti a temperatura ambiente.
 - c. Aggiungere 9 ml HBSS (tampone di soluzione salina Hanks).
 - d. Centrifugare a 200 g per 10 minuti e rimuovere il surnatante.
 - e. Risospendere le cellule in 1 ml HBSS.
 - f. Conservare le cellule tutta notte a 4 °C.
4. Colorazione degli antigeni di superficie cellulare
 - a. Dopo fissazione, aggiungere 5 ml di HBSS alla sospensione cellulare e centrifugare a 200 g per 10 minuti.
 - b. Rimuovere il surnatante e risospendere le cellule in 500 µl di HBSS. Questa sospensione cellulare è sufficiente per cinque esperimenti separati da 100 µl per esperimento.
 - c. Mettere 20 µl di anticorpo monoclonale coniugato con il fluorocromo (specifico per l'antigene di superficie) in una provetta da 5 ml.
 - d. Aggiungere 100 µl di sospensione cellulare nella provetta e miscelare bene con vortex, e incubare per 20 minuti al buio a temperatura ambiente.
 - e. Aggiungere 4 ml di HBSS. Centrifugare a 200g per 10 minuti. Rimuovere il surnatante.
5. Permeabilizzazione e colorazione intracellulare
 - a. Aggiungere 10 µl di anticorpo monoclonale direttamente coniugato contro gli antigeni intracellulari in una provetta.
 - b. Aggiungere 200 µl IQ Starfiqs™ soluzione permeabilizzante (Reagente P).
 - c. Incubare per 20 minuti a 4 °C al buio.
 - d. Aggiungere 4 ml HBSS.
 - e. Centrifugare a 1200 rpm per 10 minuti.
 - f. Rimuovere il surnatante e risospendere le cellule in 150 µl di PBS (tampone fosfato salino).
6. Analisi con il citofluorimetro
 - a. Appropriati controlli dovrebbero includere anticorpo monoclonale non marcato (bloccante) o controlli isotipici.

- 2 – Leucociti isolati

1. Isolamento dei PMN attraverso centrifugazione di densità di gradiente (Ficoll-Paque).
2. Risospendere le cellule fino a 1×10^6 cellule per ml.
3. Aggiungere 100 µl di sospensione cellulare al reagente in provetta.
4. Aggiungere 10 µl di anticorpo direttamente coniugato contro antigeni cellulari di superficie.
5. Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente al buio.
6. Aggiungere 4 ml di tampone fosfato salino pH 7.3 e centrifugare per 5 minuti a 300xg.
7. Rimuovere il surnatante.
8. Aggiungere 100 µl IQ Starfiqs™ reagente fissativo (Reagente F).
9. Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente.
10. Aggiungere 4 ml di tampone fosfato salino pH 7.3 e centrifugare per 5 minuti a 300 g.
11. Rimuovere il surnatante e aggiungere 10 µl di anticorpo coniugato IQ Products diretto contro un antigene cellulare.
12. Aggiungere 100 µl di IQ Starfiqs™ reagente permeabilizzante (Reagente P).
13. Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente.
14. Aggiungere 4 ml di tampone fosfato salino pH 7.3 e centrifugare per 5 minuti a 300 g.
15. Rimuovere il surnatante e risospendere il pellet di cellule in 200 µl di tampone fosfato salino.
16. Analizzare al citofluorimetro.

- B - Antigeni intracellulari quali CyCD3, CyCD22, TdT e MPO

- 1 – protocollo sangue intero

1. Aggiungere l'anticorpo coniugato in una provetta: 10 µl di anticorpo coniugato diretto contro un antigene di superficie cellulare.
2. Aggiungere 100 µl di sangue intero trattato con EDTA o eparina e miscelare bene.
3. Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente al buio.
4. Aggiungere 4 ml di tampone fosfato salino pH 7.3 e centrifugare per 5 minuti a 300 g.
5. Rimuovere il surnatante.
6. Aggiungere 100 µl IQ Starfiqs™ reagente fissativo (Reagente F).
7. Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente.
8. Aggiungere 4 ml di tampone fosfato salino pH 7.3 e centrifugare per 5 minuti a 300 g.
9. Rimuovere il surnatante e aggiungere 10 µl di anticorpo direttamente coniugato IQ Products contro un antigene cellulare.
10. Aggiungere 100 µl di IQ Starfiqs™ reagente permeabilizzante (Reagente P).
11. Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente.
12. Aggiungere 4 ml di tampone fosfato salino pH 7.3 e centrifugare per 5 minuti a 300 g.
13. Rimuovere il surnatante e risospendere il pellet cellulare in 200 µl di tampone fosfato salino.
14. Analizzare al citofluorimetro a flusso.

- 2 –leucociti isolati

1. Isolare PMN attraverso centrifugazione in densità di gradiente con Ficoll-Paque.
2. Risospendere le cellule fino a 1×10^6 cellule per ml.
3. Aggiungere 100 µl di sospensione cellulare alla provetta.
4. Aggiungere 10 µl di anticorpo direttamente coniugato contro un antigene di superficie cellulare.
5. Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente al buio.
6. Aggiungere 4 ml di tampone fosfato salino pH 7.3 e centrifugare per 5 minuti a 300 g.
7. Rimuovere il surnatante.
8. Aggiungere 100 µl IQ Starfiqs™ reagente di fissazione (Reagente F).
9. Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente.
10. Aggiungere 4 ml di tampone fosfato salino pH 7.3 e centrifugare per 5 minuti a 300 g.
11. Rimuovere il surnatante e aggiungere 10 µl di anticorpo direttamente coniugato IQ Products, contro un antigene intracellulare.
12. Aggiungere 100 µl di IQ Starfiqs™ reagente permeabilizzante (Reagente P).
13. Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente.
14. Aggiungere 4 ml di tampone fosfato salino pH 7.3 e centrifugare per 5 minuti a 300 g.
15. Rimuovere il surnatante e risospendere il pellet cellulare in 200 µl di tampone fosfato salino.
16. Analizzare al citofluorimetro a flusso.



Manipolazione e conservazione

Conservare le fiale a 2-8 °C. I reagenti sono stabili per il periodo indicato sull'etichetta della fiala, se conservati correttamente.

Garanzia La sola garanzia offerta è di conformità a quantità e contenuti indicati sull'etichetta al momento della fornitura al cliente. Non vengono concessi altri tipi di garanzia, espressi o impliciti, che esulino dalla descrizione riportata sull'etichetta del prodotto. IQ Products non sarà responsabile di danni alla proprietà, ferite personali o perdite economiche causate dal prodotto.

Caratterizzazione

Per garantire un livello qualitativo costantemente elevato, ciascun lotto di anticorpi monoclonali è testato circa la conformità con le caratteristiche di un reagente standard. Dati rappresentativi relativi alla citometria a flusso sono inclusi nella presente scheda.

Attenzione Tutti i prodotti contengono sodio azide, sostanza chimica velenosa e pericolosa. L'uso sarà consentito esclusivamente a operatori specializzati.

Riferimenti bibliografici

1. Jung et al., 1993. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. J.Immunol. Meth. 159. 197-207
-

Legenda dei simboli

	Consultare le Istruzioni per l'uso
	Numero di catalogo
	Sufficiente per
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Attenzione, consultare il documento allegato
	Conservare al riparo dalla luce (solare)
	Rischio biologico
	Limiti di temperatura (°C)
	Ad esclusivo uso di ricerca
	Codice del lotto
	Utilizzare entro aaaa-mm-gg
	Fabbricante
	Mandatario nella Comunità Europea
	Conformité Européenne (Conformità Europea)

		etichetta - tandem	Ex -max (nm)	Em -max (nm)
P	PURE	Materiale purificato	-	-
F	FITC	FITC	488	519
R	R-PE	PE	488, 532	578
C	CyQ	PE-Cy5.18	488, 532	667
A	APC		595, 633, 635, 647	660
PC	PerCP		488, 532	678
PCC	PerCP-Cy5.5		488, 532	695

 IQ Products BV
Rozenburglaan 13a
9727 DL Groningen, The Netherlands

 +31 (0)50 57 57 000
 +31 (0)50 57 57 002
 Technical marketing@iqproducts.nl
 Orders orders@iqproducts.nl
 www.iqproducts.nl