EXCELLYSE Live 100 ml

10× concentrated lysing solution

REF ED7068

EXCELLYSE Live 30 ml

10× concentrated lysing solution

REF ED7071

ENGLISH

1. Intended use

The EXCELLYSE Live lysing solution is intended for red blood cell lysis following antibody staining of leukocytes in human peripheral whole blood. This solution is appropriate for use when viable leukocytes are required after red blood cell lysis.

The lysing solution is optimized for use with EXBIO single colour monoclonal antibodies and KOMBITEST™ reagents and may be used in both lyse/wash and lyse/no wash protocol.

2. Introduction

Leukocyte analysis and detection in peripheral blood requires elimination of interfering cells, mainly erythrocytes. So far, the Ficoll density gradient method was used to separate leukocytes from whole blood. This method is rather time consuming and may lead to a loss of certain cell subsets. Direct blood sample staining followed by red blood cell lysis therefore takes place in clinical laboratories as a fast and easy method for whole blood flow cytometry analysis.
The EXCELLYSE Live lysing solution allows for red blood cell lysis and is free of fixation component keeping leukocyte membrane intact and the cells viable.

3. Reagent provided

The content of the vial (100 or 30 ml) is sufficient for 500 or 150 tests, respectively. The lysing solution is a 10× concentrated and **must be diluted 10× with deionized water prior to use (1 volume of concentrated solution with 9 volumes of deionized water)**. Always prepare a fresh 1× solution before lysis.

4. Storage

Store the 10× concentrated EXCELLYSE Live at 2-8 °C. Freshly prepared solution (1× concentrated) is stable for 1 day when stored at room temperature.

5. Precautions

- For research use only.
- Do not use after expiration date stated on vial label.
- Do not use if any discoloration or precipitation occurs.
- Do not freeze.
- Avoid contamination of the reagent.
- Any non-performance of lysing protocol may produce false results.
- Blood samples are considered as potentially infectious and must be handled with caution. Avoid any contact of the sample with the skin, eyes and mucosa.

Warning: The reagent contains ammonium chloride which may produce a characteristic non-pleasant odor of ammonia when opened after a long-term storage.

6. Necessary material not supplied

Material necessary for collection of peripheral blood, test tubes for blood sample staining (e.g. 12 × 75 mm), automatic pipettes with disposable tips, vortex mixer, centrifuge, phosphate buffered saline (PBS), deionized water, appropriate fluorescent-dye-labeled primary/secondary antibody, flow cytometer.

7. Lyse/no wash blood lysing protocol

1. Collect peripheral blood in a sterile tube with an anticoagulant (e.g. Heparin, EDTA).
2. Follow instructions for the whole blood antibody staining.
3. **Add 2.0 ml** of the **diluted** lysing solution **per 100 µl** of whole blood. Mix the tube with a vortex mixer.
4. Incubate for 5-10 minutes, until the blurry blood sample solution becomes clear.
5. Analyze the sample immediately using flow cytometer or store the sample at 2-8°C in the dark and analyze within 24 hours. See figures 1 and 2 for example data.

8. Lyse/wash blood lysing protocol

1. Collect peripheral blood in a sterile tube with an anticoagulant (e.g. Heparin, EDTA).
2. Follow manufacturer's instructions for the whole blood antibody staining.
3. **Add 2.0 ml** of the **diluted** lysing solution **per 100 µl** of whole blood. Mix the tube with a vortex mixer.
4. Incubate for 5-10 minutes, until the blurry blood sample solution becomes clear.
5. Centrifuge the tube for 5 minutes at 300×g.
6. Remove supernatant and resuspend the pellet with 0.2 – 0.5 ml of PBS.
7. Analyze the sample immediately using flow cytometer or store the sample at 2-8 °C in the dark and analyze within 2 hours.
8. Fix the cells if samples are required to be stored for more than 2 hours. Non-fixed cells may change their size. Note that cells lose their viability after fixation. See figures 3 and 4 for example data.

9. Limitations

- Red blood cells from some patients may be resistant to lysis using lysing solutions.
- Flow cytometer may produce false results if the device has not been aligned, calibrated and maintained appropriately.
- Data may be incorrectly interpreted if fluorescent signals were compensated wrongly or if gates were positioned inaccurately.
- Blood samples from some patients may exhibit abnormal values of positive cells.

ČESKY

1. Použití

Lyzační roztok EXCELLYSE Live umožňuje lyzi červených krvinek po značení leukocytů v lidské periferní krvi. Tento lyzační roztok je vhodný pro použití, kdy je vyžadováno zachování životnosti leukocytů po lyzi krve.

Tento lyzační roztok je optimalizován pro použití se značenými protilátkami EXBIO včetně reagencií produktové řady KOMBITEST™. Lyzační činidlo může být použito v protokolu s promytím (lyse/wash) anebo protokolu bez promytí buněk (lyse/no wash).

2. Úvod

Analýza a detekce leukocytů v lidské periferní krvi pomocí průtokové cytometrie vyžaduje odstranění červených krvinek – erytrocytů. Alternativně používaná metoda Ficollového dělení na základě hustoty, umožňující separaci leukocytů z plné krve, je časově náročná a dochází při ní ke ztrátám určitých buněčných populací. V klinických laboratořích nahrazuje tuto metodu přímé značení plné krve protilátkami, následované lyzí červených krvinek, které přináší rychlé a přesné výsledky.
Lyzační roztok EXCELLYSE Live umožňuje lyzi červených krvinek, neobsahuje fixační činidlo, ponechává membránu leukocytů neporušenou a zachovává vysokou životnost buněk.

3. Popis reagencie

Obsah balení (100 nebo 30 ml) postačuje na provedení přibližně 500 respektive 150 testů. Lyzační roztok je dodáván 10× koncentrovaný a **musí být před použitím 10× naředěn deionizovanou vodou (1 díl reagencie do 9 dílů vody)**. Pro lýzu se vždy používá čerstvě naředěný roztok.

4. Skladování

10× koncentrovaný roztok EXCELLYSE Live skladujte při teplotě 2-8 C°. Naředěný lyzační roztok skladujte za laboratorní teploty po dobu maximálně 1 dne.

5. Upozornění

- Lyzační roztok je určen pouze pro výzkumné účely.
- Nepoužívejte reagencii po uplynutí doby použitelnosti vyznačené na štítku lahvičky.
- Nepoužívejte reagencii v případě, že změní barvu nebo se v jejím obsahu objeví precipitát.
- Obsah lahvičky nesmí zmrznout.
- Chraňte obsah lahvičky před kontaminací.
- Nedodržení postupu měření může ovlivnit výsledky testu.
- Krevní vzorky jsou považovány za potenciálně infekční materiál, a proto s nimi musí být náležitě nakládáno. Vyvarujte se kontaktu vzorků s pokožkou, očima a sliznicemi.

Varování: Reagencie obsahuje chlorid amonný, který může po otevření produkovat charakteristický a nepříjemný zápach amoniaku po dlouhodobém skladování.

6. Potřebné vybavení a materiál, který není dodáván

Nezbytný materiál pro odběr periferní krve, vhodné zkumavky pro barvení buněk (např. 12 × 75 mm), sada pipet s jednorázovými špičkami, centrifuga, vortex, pufr PBS, deionizovaná voda, vhodné protilátky, průtokový cytometr.

7. Lyzační protokol Lyse/no wash

1. Odeberte periferní krev do sterilní odběrové zkumavky obsahující antikoagulant (např. Heparin, EDTA).
2. Proveďte značení plné krve protilátkou podle doporučení výrobce protilátky.
3. Přidejte **2,0 ml naředěného lyzačního roztoku na 100 µl plné krve** a zkumavku promíchejte na vortexu.
4. Inkubujte vzorek 5-10 minut při laboratorní teplotě, dokud se vzorek nevyčeří.
5. Analyzujte vzorek ihned po obarvení pomocí průtokového cytometru nebo uložte vzorek při teplotě 2-8 ° C v temnu a analyzujte do 24 hodin. Vzorová data jsou zobrazena na obrázcích 1 a 2.

8. Lyzační protokol Lyse/wash

1. Odeberte periferní krev do sterilní odběrové zkumavky obsahující antikoagulant (např. Heparin, EDTA).
2. Proveďte značení plné krve protilátkou podle doporučení výrobce protilátky.
3. Přidejte **2,0 ml naředěného lyzačního roztoku na 100 µl plné krve** a zkumavku promíchejte na vortexu.
4. Inkubujte vzorek 5-10 minut při laboratorní teplotě, dokud se vzorek nevyčeří.
5. Centrifugujte zkumavku 5 minut při 300×g.
6. Odstraňte supernatant a resuspendujte sediment pomocí 0,2-0,5 ml PBS.
7. Analyzujte vzorek ihned pomocí průtokového cytometru, nebo vzorek uložte při 2-8°C v temnu a analyzujte nejpozději do 2 hodin.
8. Fixujte buňky v případě, že vzorek musí být uchováván po dobu delší než 2 hodiny, protože nefixované buňky v čase mění svůj tvar. Po fixaci ztrácejí buňky životnost. Vzorová data jsou zobrazena na obrázcích 3 a 4.

9. Omezení metody

- Červené krvinky některých pacientů mohou být rezistentní k lyzi pomocí lyzačních roztoků.
- Průtokový cytometr může poskytovat špatné hodnoty, pokud není dobře seřízen a udržován.
- Data mohou být špatně interpretována, pokud jsou fluorescenční signály špatně kompenzované, případně pokud jsou regiony buněk špatně umístěné.
- Krevní vzorky od některých pacientů mohou vykazovat abnormální hodnoty procent pozitivních buněk.

SLOVENSKY

1. Použitie

EXCELLYSE Live lyzačný roztok umožňuje lýzu červených krviniek po označení leukocytov protilátkou v ľudskej periférnej krvi. Tento lyzačný roztok bol je vhodný pre použitie, keď je vyžadované zachovanie životnosti leukocytov po lýzi krvi.

Tento lyzačný roztok je optimalizovaný pre použitie s EXBIO označenými monoklonovými protilátkami vrátane produktovej rady KOMBITEST™ reagencií. Lyzačné činidlo môže byť použité v protokole s premytím (lyse/wash) alebo v protokole bez premytia buniek (lyse/no wash).

2. Úvod

Analýza a detekcia leukocytov v ľudskej periférnej krvi si vyžaduje odstránenie neanalyzovaných buniek - erytrocytov. Alternatívne používaná metóda Ficollového oddeľovania na základe hustoty, umožňujúca separáciu leukocytov z plnej krvi, je časovo náročná a dochádza pri nej ku stratám určitých populácií buniek. V klinických laboratóriách nahrádza túto metódu priame značenie krvi protilátkou, nasledované lýzou červených krviniek a analýzou na prietokovom cytometri, ktorá je rýchla a presná.
Lyzačný roztok EXCELLYSE Live umožňuje lýzu červených krviniek, neobsahuje fixačné činidlo, ponecháva membránu leukocytov neporušenú a zachováva vysokú životnosť buniek.

3. Popis reagencie

Obsah balenia (100 nebo 30 ml) postačuje približne pre 500 respektíve 150 testov. Lyzačný roztok sa dodáva ako 10× koncentrovaný a **musí byť pred použitím 10x nariedený deionizovanou vodou (1 diel koncentrovanej reagencie do 9 dielov vody)**. Pre lýzu sa používa vždy čerstvo nariedený roztok.

4. Skladovanie

10× koncentrovaný EXCELLYSE Live skladujte pri teplote 2-8 °C. Nariedený lyzačný roztok skladujte pri laboratórnej teplote po dobu maximálne 1 dňa.

5. Upozornenie

- Určené pre výskumné účely.
- Nepoužívajte po uplynutí doby použiteľnosti vyznačenej na štítku fľaštičky.
- Roztok nepoužívajte v prípade, že zmení farbu alebo sa v jeho obsahu objaví precipitát.
- Obsah fľaštičky nesmie zmrznúť
- Zabráňte kontaminácii roztoku.
- Nedodržanie postupu merania môže ovplyvniť výsledky testu.
- Krvné vzorky sú považované za potenciálne infekčný materiál a preto sa s nimi musí zaobchádzať opatrne. Vyvarujte sa kontaktu vzoriek s pokožkou, očami a sliznicami.

Varovanie: Reagencia obsahuje chlorid amónny, ktorý môže po otvorení po dlhodobom skladovaní produkovať charakteristický nepríjemný zápach amoniaku.

6. Potrebné vybavenie a materiál, ktorý nie je dodávaný

Materiál potrebný na odber periférnej krvi, vhodné skúmavky pre značenie buniek (napr. 12 × 75 mm), sada pipiet s jednorázovými špičkami, centrifúga, vortex, PBS tlmivý roztok, deionizovaná voda, vhodné protilátky, prietokový cytometer.

7. Lyse/no wash lyzačný protokol

1. Odoberte periférnu krv do sterilnej odberovej skúmavky obsahujúcej antikoagulant (napr. Heparín, EDTA).
2. Pokračujte značením plnej krvi protilátkou podľa návodu od výrobcu protilátky.
3. Pridajte **2,0 ml nariedeného lyzačného roztoku k 100 µl plnej krvi** a skúmavku premiešajte na vortexe.
4. Inkubujte vzorku 5-10 minút pri laboratórnej teplote, kým sa krvná zmes nevyčíri.
5. Vzorku analyzujte ihneď po označení pomocou prietokového cytometra alebo vzorku uložte pri teplote 2-8 ° C v temne a analyzujte do 24 hodín. Vzorové dáta sú zobrazené na obrázkoch 1 a 2..

8. Lyse/wash lyzačný protokol

1. Odoberte periférnu krv do sterilnej odberovej skúmavky obsahujúcej antikoagulant (napr. Heparín, EDTA).
2. Pokračujte značením plnej krvi protilátkou podľa návodu od výrobcu protilátky.
3. Pridajte **2,0 ml nariedeného lyzačného roztoku k 100 µl plnej krvi** a skúmavku premiešajte na vortexe.
4. Inkubujte vzorku 5-10 minút pri laboratórnej teplote, kým sa krvná zmes nevyčíri.
5. Centrifugujte skúmavku 5 minút pri 300×g.
6. Odstráňte supernatant a resuspendujte sediment pomocou 0,2-0,5 ml PBS.
7. Analyzujte vzorku ihneď pomocou prietokového cytometru alebo vzorku uložte pri 2-8°C v temne a analyzujte najneskôr do 2 hodín.
8. Fixujte bunky v prípade, že vzorka musí byť uchovávaná po dobu viac ako 2 hodín, pretože nefixované bunky v čase menia svoj tvar. Po fixácii strácajú bunky životnosť. Vzorové dáta sú zobrazené na obrázkoch 3 a 4.

9. Obmedzenia metódy

- Červené krvinky niektorých pacientov môžu byť rezistentné voči lýze pomocou lyzačných roztokov.
- Prietokový cytometer môže poskytovať nepresné výsledky, ak nie je dobre nastavený a udržiavaný.
- Dáta môžu byť zle interpretované, ak sú fluorescenčné signály nedostatočne kompenzované alebo ak sú regióny buniek zle umiestnené.
- Krvné vzorky od niektorých pacientov môžu vykazovať abnormálne percentuálne hodnoty pozitívnych buniek.

ENGLISH / ČESKY / SLOVENSKY

10. Explanation of symbols / Vysvětlení symbolů / Vysvetlenie symbolov

REF	Catalog number Katalogové číslo Katalógové číslo
	Manufacturer identification Výrobce Výrobca
	Consult the manual before use Viz návod k použití Viď návod na použitie
2°C 8°C	Store within temperature limits Rozmezí skladovacích teplot Rozmedzie skladovacích teplôt
LOT	Batch code Číslo šarže
	Use by Použitelné do Použiteľné do

11. Manufacturer / Výrobce / Výrobca

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
252 42 Vestec, Czech Republic
Tel: +420 261 090 666
Fax: +420 261 090 660
E-mail: orders@exbio.cz
http://www.exbio.cz

12. Example data / Vzorová data / Vzorové dáta

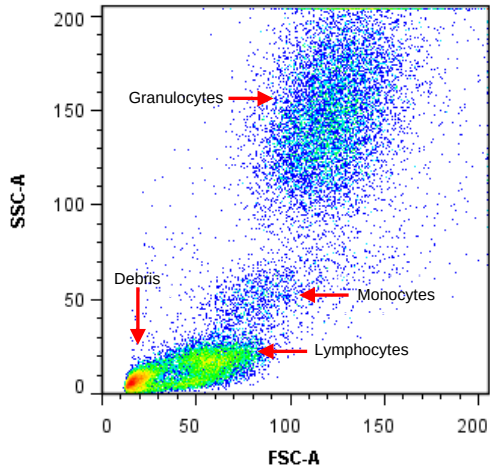

Fig. 1: Peripheral blood leukocytes dot-plot from **lysed/non-washed** whole blood, analyzed on BC Navios™ cytometer.
Obr. 1: Vyobrazení leukocytů periferní krve ve FSC vs. SSC dot-plotu lyzované pomocí protokolu **Lyse/no wash**. Analyzováno pomocí průtokového cytometru BC Navios™.
Obr. 1: Vyobrazenie leukocytov periférnej krvi lyzovanej pomocou protokolu **Lyse/no wash** do FSC vs. SSC dot-plotu. Analýza na prietokovom cytometri BC Navios™.

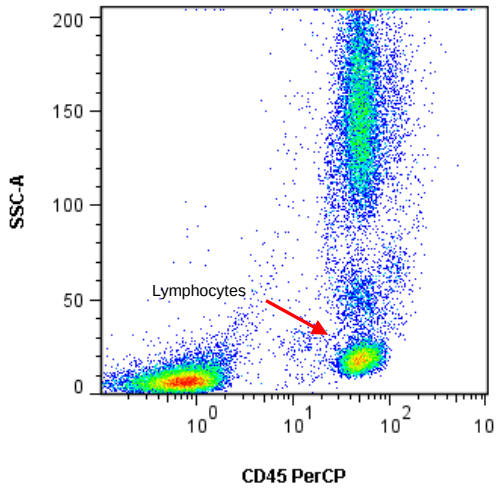

Fig. 2: Identification of CD45+ lymphocyte population in **lysed/non-washed** whole blood stained with anti-CD45 antibody, analyzed on BC Navios™ cytometer.
Obr. 2: Identifikace lymfocytů v krvi značené protilátkou proti CD45, lyzované pomocí protokolu **Lyse/no wash**. Analyzováno pomocí průtokového cytometru BC Navios™.
Obr. 2: Identifikácia lymfocytov v krvi značenej protilátkou proti CD45, lýza pomocou protokolu **Lyse/no wash**. Analýza na prietokovom cytometri BC Navios™.

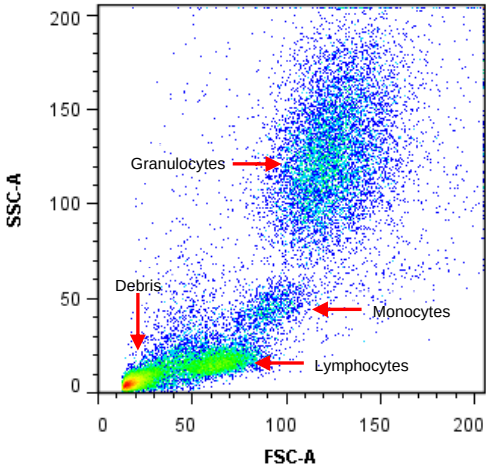

Fig. 3: Peripheral blood leukocytes dot-plot from **lysed/washed** whole blood, analyzed on BC Navios™ cytometer.
Obr. 3: Vyobrazení leukocytů periferní krve ve FSC vs. SSC dot-plotu lyzované pomocí protokolu **Lyse/wash**. Analyzováno pomocí průtokového cytometru BC Navios™.
Obr. 3: Vyobrazenie leukocytov periférnej krvi lyzovanej pomocou protokolu **Lyse/wash** do FSC vs. SSC dot-plotu. Analýza na prietokovom cytometri BC Navios™.

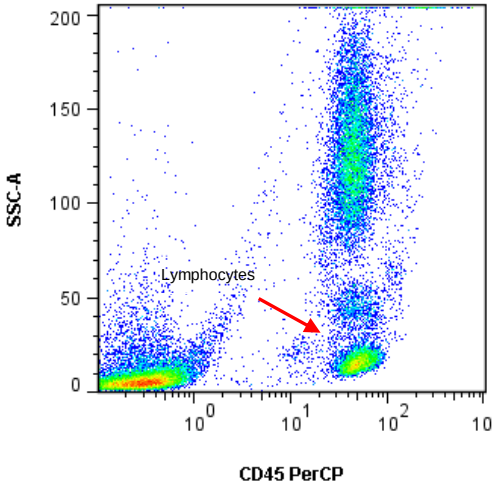

Fig. 4: Identification of CD45+ lymphocyte population in **lysed/washed** whole blood stained with anti-CD45 antibody, analyzed on BC Navios™ cytometer.
Obr. 4: Identifikace lymfocytů v krvi značené protilátkou proti CD45, lyzované pomocí protokolu **Lyse/wash**. Analyzováno pomocí průtokového cytometru BC Navios™.
Obr. 4: Identifikácia lymfocytov v krvi značenej protilátkou proti CD45, lýza pomocou protokolu **Lyse/wash**. Analýza na prietokovom cytometri BC Navios™.