Окрашивание ретикулоцитов с помощью LumiCell® Reticulocyte Stain

Ретикулоциты представляют собой незрелые красные клетки крови, образующиеся в костном мозге и поступающие в периферическую кровь, где они созревают в эритроциты. Увеличение или уменьшение количества ретикулоцитов может указывать на активность эритропоэза или его недостаточность, в частности, на нарушения, связанные с анемиями и дисфункцией костного мозга.

У млекопитающих ретикулоциты, как и зрелые эритроциты, лишены клеточного ядра, но в них присутствуют остаточные органеллы (рибосомы и митохондрии) и содержащиеся в них РНК и ДНК. Этот признак отличает ретикулоциты от зрелых эритроцитов. Красители нуклеиновых кислот, такие как LumiCell® Reticulocyte Stain, выявляют сетчатую структуру рибосомной РНК (рРНК) в ретикулоцитах, и позволяют визуально их отличать от зрелых эритроцитов. Также окрашивание LumiCell® Reticulocyte Stain позволяет дифференцировать глазами стадию созревания ретикулоцитов — новые клетки содержат больше РНК, чем зрелые ретикулоциты, имеющие низкое содержание РНК.

Принцип метода

LumiCell® Reticulocyte Stain (также известен как BD Retic-Count® reagent) представляет собой готовый к использованию раствор для определения числа ретикулоцитов в периферической крови человека. Тиазоловый оранжевый связывается с рРНК и ДНК, образуя флуоресцентный комплекс с поглощением при 509 нм и испусканием при 532 нм. LumiCell® Reticulocyte Stain подходит как для микроскопии, так и для проточной цитометрии.

Биоматериал

Кровь должна быть собрана в вакуумные пробирки с ЭДТА. Для наилучшего результата окрашивание лучше производить в течение 24 часов после сбора биоматериала. Антикоагулированную кровь можно хранить при комнатной температуре (20-25°C) в течение 24 часов до окрашивания.

Дополнительные материалы, не поставляемые с реагентом:

- Натрий-фосфатный буфер 1× (PBS)

Процедура окрашивания

1. Подготовьте две пробирки: для контроля и непосредственно образца.
2. Добавьте в пробирку для контроля 2,5 мкл цельной крови-ЭДТА и 0,5 мл PBS, аккуратно перемешайте вортексированием.
3. Добавьте в пробирку для образца 0,5 мл красителя LumiCell Reticulocyte Stain и 2,5 мкл цельной крови-ЭДТА, аккуратно перемешайте вортексированием.
4. Инкубируйте пробирки в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте.

Lumiprobe Corporation
115 Airport Dr Suite 160
Westminster, Maryland 21157
USA
Phone: +1 888 973 6353
Fax: +1 888 973 6354
Email: order@lumiprobe.com

Lumiprobe GmbH
Feodor-Lynen-Strasse 23
30625 Hannover
Germany
Phone: +49 511 16596811
Fax: +49 511 16596815
Email: de@lumiprobe.com

Lumiprobe RUS Ltd
Kotsyubinsky street, 4
121351 Moscow
Russian Federation
Phone: +7 800 775 3271
Email: ru@lumiprobe.com

5. Окрашенный образец готов для микроскопии или проточной цитофлуориметрии.

Важно! Измерения должны быть проведены не позднее чем через 3 часа после инкубации Хранение образцов допустимо только в темноте. Непосредственно перед измерением содержимое пробирки необходимо аккуратно перемешать вортексированием.

Важно! При использовании проточного цитофлуориметра необходимо установить логарифмическую шкалу по FSC и SSC.

Примечание

- Согласно литературным данным процентное содержание ретикулоцитов в крови составляет 0,9-2,1 %. Новорожденные дети младше двух недель имеют более высокие показатели [1].
- У некоторых пациентов с очень высоким количеством ретикулоцитов маркеры, установленные с помощью неокрашенной пробирки, могут иметь более 0,3% положительных событий. В таких случаях маркер все равно должен быть установлен у основания неокрашенного пика.
- Реагент LumiCell Reticulocyte Stain не следует использовать с образцами гемолизированной крови.
- Пациенты с макротромбоцитами (гигантскими тромбоцитами) могут давать аномальные результаты при использовании LumiCell Reticulocyte Stain. Количество ретикулоцитов у пациентов с макротромбоцитами должно быть подтверждено альтернативным методом
- LumiCell Reticulocyte Stain реагент является нуклеотидным маркером. Он окрашивает включения в эритроцитах, содержащие ДНК или РНК. Примерами таких включений являются ядра нормобластов (NRBCs), Тельца Жолли (тельца Хауэлла-Жолли), кольца Кебота, малярийные паразиты и т. д. При слишком большом значении содержания ретикулоцитов следует использовать дополнительный референсный метод, например, анализ мазка периферической крови с окрашиванием по Райту-Гимзе.
- У пациентов с повышенным уровнем лейкоцитов (как это бывает при хроническом лимфолейкозе) лимфоциты будут детектироваться вместе с эритроцитами. Для пациентов с повышенным количеством лейкоцитов, количество ретикулоцитов должно быть подтверждено альтернативным методом.
- У пациентов, получающих лечение эритропоэтином, может повышаться процент ретикулоцитов. У некоторых пациентов также может наблюдаться повышенное количество нормобластов (NRBC) в периферической крови, что может мешать оценке ретикулоцитов. Наличие или отсутствие NRBCs можно подтвердить с помощью анализа мазка периферической крови, окрашенного по Райту-Гимзе.

---

[1] Williams W, Beutler E, Erslev A, Lichtman M. Hematology. 4th ed. New York: McGraw-Hill; 1990.

LumiCell® — зарегистрированная торговая марка Lumiprobe.

BD Retic-Count® — зарегистрированная торговая марка Becton, Dickinson and Company.

Lumiprobe Corporation
115 Airport Dr Suite 160
Westminster, Maryland 21157
USA
Phone: +1 888 973 6353
Fax: +1 888 973 6354
Email: order@lumiprobe.com

Lumiprobe GmbH
Feodor-Lynen-Strasse 23
30625 Hannover
Germany
Phone: +49 511 16596811
Fax: +49 511 16596815
Email: de@lumiprobe.com

Lumiprobe RUS Ltd
Kotsyubinsky street, 4
121351 Moscow
Russian Federation
Phone: +7 800 775 3271
Email: ru@lumiprobe.com