

**FluoroSpheres**

Code K0110

5th edition/ 5ème édition/ 5. Ausgabe

Calibration beads for daily monitoring of the flow cytometer.

The kit contains reagents for 40 calibrations.

Perles de Calibration pour la maintenance quotidienne du cytomètre de flux.

Ce kit contient des réactifs pour 40 tests.

Kalibrierungskügelchen für die tägliche Überwachung des Flowzytometers.

Das Kit enthält Reagenzien für 40 Kalibrierungen.

## Contents/ Table des matières/ Inhalt

Page/ Page/ Seite

### **ENGLISH**

Intended Use .....	4
Summary and Explanation.....	4
Principle of the Assay .....	4
Reagents.....	5
A. Materials provided .....	5
B. Materials required but not provided.....	5
Precautions .....	5
Storage.....	5
Assay Procedure and Data Acquisition.....	5
Data Analysis, Calibration Curve .....	6
A. Definitions.....	7
B. Manual calibration. For instruments expressing MFI in linear values .....	7
C. Manual calibration. For instruments expressing MFI in channel numbers.....	8
Explanation of symbols.....	22

### **FRANÇAIS**

Utilisation.....	10
Résumé et explications.....	10
Principe du dosage.....	10
Réactifs.....	11
A. Matériels fournis .....	11
B. Matériels requis mais non fournis .....	11
Stockage .....	11
Procédure de dosage et acquisition de données .....	11
Analyse des données, courbe d'étalonnage .....	12
A. Définitions.....	13
B. Etalonnage manuel. Pour les instruments exprimant MFI en valeurs linéaires.....	13
C. Etalonnage manuel. Pour les instruments exprimant MFI en numéros du canal.....	14
Légende des symboles.....	22

## **DEUTSCH**

Zweckbestimmung.....	16
Zusammenfassung und Erläuterung.....	16
Prinzip des Assays .....	16
Reagenzien .....	17
A. Packungsinhalt .....	17
B. Zusätzlich benötigte Reagenzien und Zubehör (außerhalb des Lieferumfangs).....	17
Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen.....	17
Lagerung .....	17
Assayverfahren und Datenerfassung.....	17
Datenanalyse, Kalibrierungskurve .....	18
A. Definitionen.....	19
B. Manuelle Kalibrierung. Für Instrumente, die MFI in linearen Werten ausdrücken .....	19
C. Manuelle Kalibrierung. Für Instrumente, die MFI in Kanalzahlen ausdrücken.....	20
Erläuterung der Symbole.....	22

## **ENGLISH**

### **Intended Use**

For In vitro diagnostic use.

FluoroSpheres are intended for monitoring of flow cytometer performance.

### **Summary and Explanation**

The kit provides Blank Beads and Calibration Beads with a size of 3.2 µm. The Calibration Beads are a mixture of 5 bead populations having different fluorescence intensities, and one non-fluorescent bead population. Entrapped in the fluorescent beads is a combination of unique fluorochromes that enables excitation by light of any wavelength from 365 to 650 nm. Since the bead fluorochromes are different from the fluorochromes normally used in flow cytometry, the spectral properties are different. Therefore the beads cannot be used for setting up fluorescence compensation. With assigned molecules of equivalent fluorochrome (MEF) values for the fluorescent bead populations, the use of FluoroSpheres enables the transformation of arbitrary units of mean fluorescence intensity (MFI) into absolute units for quality assurance and reporting of flow cytometry data.

### **Principle of the Assay**

1. Firstly, Blank Beads are analysed to establish optimal instrument settings for all channels of interest.
2. Secondly, Calibration Beads are analysed. The data are used for the construction of the calibration curve, where MFI is plotted against MEF.

The calibration curve and associated statistical parameters are used to evaluate the linearity of the instrument. Furthermore, the detection threshold and dynamic range of the instrument can also be determined from the calibration curve.

Calibration with FluoroSpheres can be performed in two ways:

- Constant instrument setting.  
When using this method all instrument settings remain unchanged over time. The MFI for the different peaks are monitored and the results are displayed as date of calibration versus MFI.
- Constant instrument response.  
By this method the PMT voltage is adjusted so the MFI of one of the high fluorescent peaks appear in exactly the same channel every time. The results are then displayed as date of calibration versus PMT voltage.

## Reagents

### A. Materials provided

**Vial 1**            **BLANK BEADS**  
1.7 mL  
In 0.02% sodium azide, 0.01% NP40

**Vial 2**            **CALIBRATION BEADS**  
1.7 mL  
Contains Blank Beads and 5 bead populations bearing different quantities of fluorochromes expressed in MEF values for FITC, RPE, RPE-TxRed, RPE-Cy5 and APC, respectively. For lot-specific MEF values, please see the enclosed Analytical Value Sheet. In 0.02% sodium azide, 0.01% NP40.

### B. Materials required but not provided

General laboratory equipment for flow cytometry procedures.

Semi-logarithmic and double logarithmic 5-cycle graph paper.

Calculator.

Software programs for flow cytometry data analysis.

Spreadsheet programs like Microsoft Excel. These programs are optional.

## Precautions

1. For professional users.
2. This product contains sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.

## Storage

Store kit at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vials. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. If unexpected results are observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the kit is suspected, contact Dako Technical Services.

## Assay Procedure and Data Acquisition

1. Mix the beads vigorously with either a vortex mixer or by shaking.
2. Add 0.5 mL of a suitable dilution buffer, for example phosphate-buffered saline, pH 7.2, to each of two test tubes. Add one drop from Vial 1, Blank Beads, to the first tube and one drop from Vial 2, Calibration Beads, to the second tube. Mix with a vortex mixer to ensure that the beads are in suspension.
3. Prior to data acquisition, logarithmic amplification for the fluorescence detectors of interest is selected, and the fluorescence compensation for all parameters is set to zero.
4. Apply the tube with the Blank Beads on the flow cytometer.
5. Adjust PMT voltages to allow the peak of the Blank Beads to appear in the first decade in the histogram.

6. Using forward scatter versus side scatter, set a live gate on bead singlets (see Figure 1).
7. Acquire a minimum of 5 000 gated events of the Blank Beads.
8. Apply the tube with Calibration Beads on the flow cytometer and acquire data for a minimum of 5 000 gated events.
9. Six different fluorescence intensity peaks should be visible in the fluorescence channel of interest (See Figure 2).

## Data Analysis, Calibration Curve

Analysis of results is confined to gated bead singlets clear of debris, as defined on a forward scatter versus side scatter dot plot (see Figure 1).

Individual markers or regions are used to define each of the 6 bead populations of the Calibration Beads (see Figure 2). The regions are used to determine the MFI of each bead population.

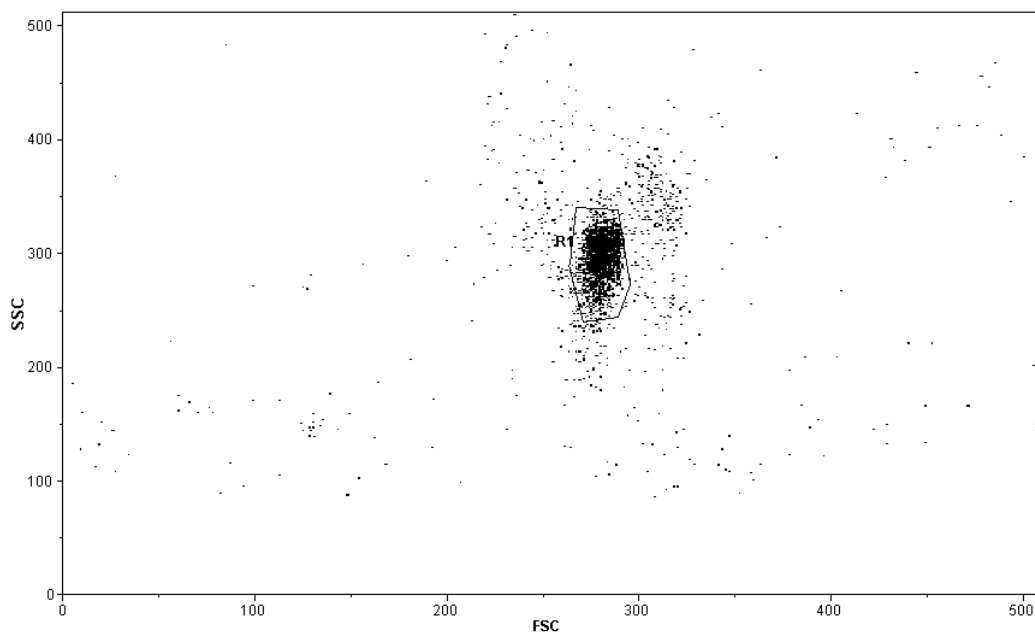


Figure 1. Forward scatter versus side scatter of Blank Beads. The gate has been set to collect bead singlets.

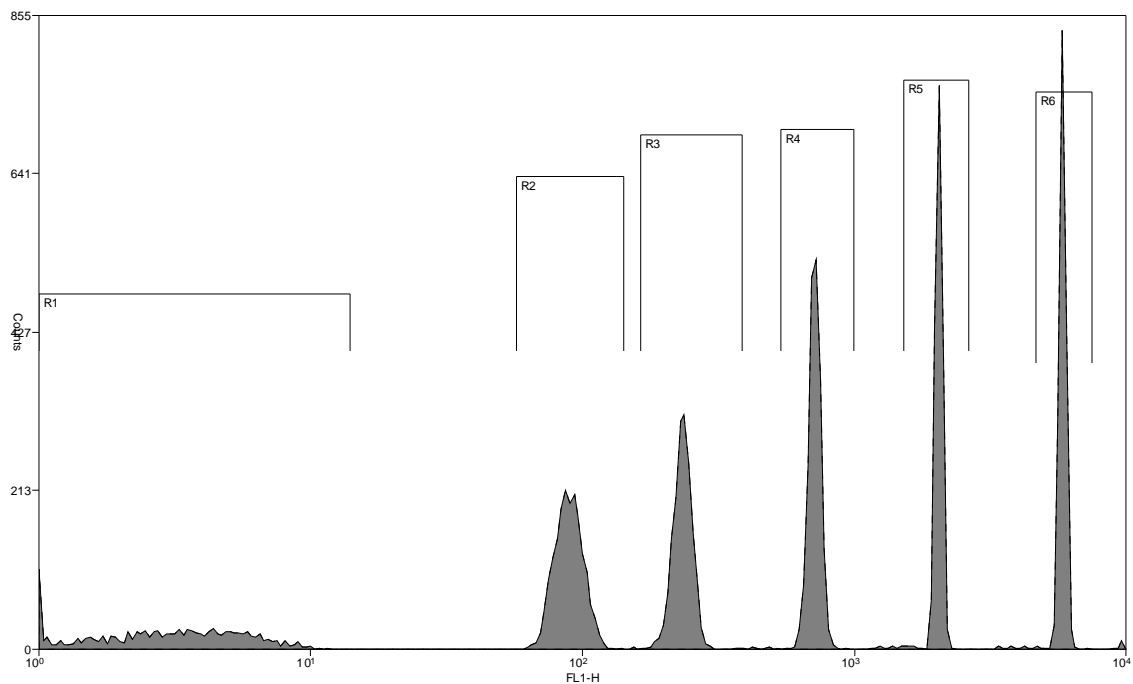


Figure 2. Histogram of FluoroSpheres Bead populations.

## A. Definitions

### Log offset

Log offset represents the fluorescence value in channel 0. Channel 0 is usually represented in manufacturers' software by arbitrary values, e.g. 1 for most Becton Dickinson software, and 0.1 for most Coulter software.

### AvgRes%

The average residual percent (AvgRes%) is a non-weighted measure of the instrument linearity of response. It is calculated by determining the average absolute percentage the regression line varies from the actual points.

### $r^2$

Coefficient of determination ( $r^2$ ) is a weighted measure of linearity. It is most useful when analysing log data.

### Detection threshold

Even though Blank Beads are without entrapped fluorochromes, they can give rise to a signal. This signal represents the background noise, and, thus, the detection level of the instrument.

### MEF

Molecules of equivalent fluorochrome is the amount of fluorochrome per bead.

### Log decade

Log decade is the calibrated full-scale range, or dynamic range, of the fluorescence parameter that is being calibrated. Flow cytometers are, generally, provided with amplifiers having a dynamic range of 3.5 or 4 log decades, depending on manufacturer. Decreased performance of the flow cytometer will affect the log decade.

## B. Manual calibration. For instruments expressing MFI in linear values

Construction of the calibration curve:

1. Determine the MFI for each of the 6 populations of the FluoroSpheres Calibration Beads.
2. Plot log MFI against the corresponding log MEF for the different peaks. Calculate the "best-fit" straight line according to the following formula:

$$\log(\text{MEF}) = a \times \log(\text{MFI}) + b$$

where a is the slope and b is the y-axis intercept, also called “log offset” or “zero channel value”.

3. Calculate the associated statistical parameters AvgRes% and  $r^2$  of the calibration curve.
4. The dynamic range of the amplifier is expressed in log decades. Log decades can be calculated from the regression line by subtraction of  $\log(\text{MEF}_{\min})$  from  $\log(\text{MEF}_{\max})$ .  $\log(\text{MEF}_{\min})$  and  $\log(\text{MEF}_{\max})$  are derived from the lowest and highest MFI values, respectively. In the present case MFI for  $\text{MEF}_{\min}$  and  $\text{MEF}_{\max}$  are  $10^0$  and  $10^4$ , respectively.

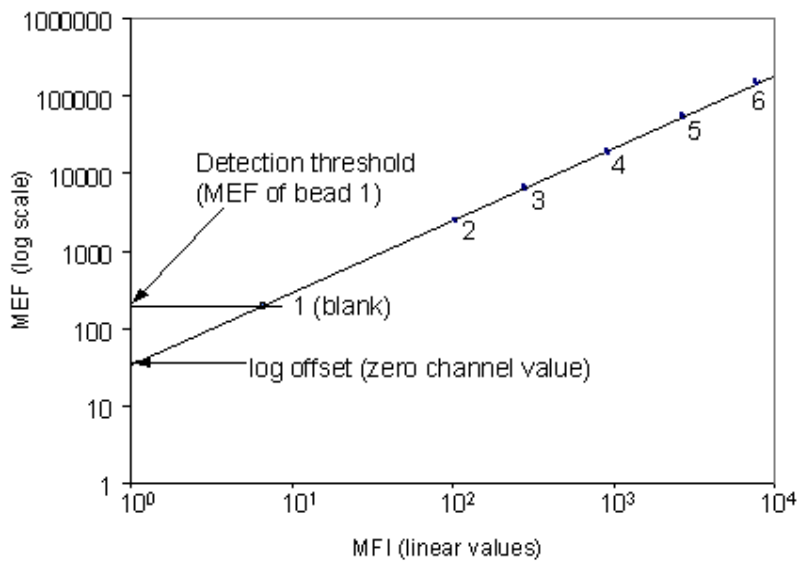


Figure 3. Calibration curve (regression line) based on FluoroSpheres.

Example of calculation:

$$\begin{aligned} \log \text{ decades} &= \log(\text{MEF}_{\max}) - \log(\text{MEF}_{\min}) \\ \log \text{ decades} &= \log(188\,735) - \log(30.8) \\ \log \text{ decades} &= 5.28 - 1.49 \\ \log \text{ decades} &= 3.79 \end{aligned}$$

Channels per decade:

$$\begin{aligned} \text{Since the number of channels are 1024, the number of channels per decade are:} \\ 1024/3.79 = 270 \end{aligned}$$

### C. Manual calibration. For instruments expressing MFI in channel numbers

Construction of the calibration curve:

1. Determine the MFI for each of the 6 populations of the FluoroSpheres Calibration Beads.
2. Plot MFI against  $\log(\text{MEF})$  and calculate the “best-fit” straight line according to the following formula:  

$$\log(\text{MEF}) = a \times \text{MFI} + b$$
 where a is the slope and b is the y-axis intercept.
3. Calculate the associated statistical parameters AvgRes% and  $r^2$  of the calibration curve.
4. The dynamic range of the amplifier is expressed in log decades. Log decades can be calculated from the regression line by subtraction of  $\log(\text{MEF}_{\min})$  from  $\log(\text{MEF}_{\max})$ . Log



( $MEF_{min}$ ) and  $\log(MEF_{max})$  are derived from the lowest and highest MFI values, respectively. In the present case MFI for  $MEF_{min}$  and  $MEF_{max}$  are 0 and 1023, respectively.

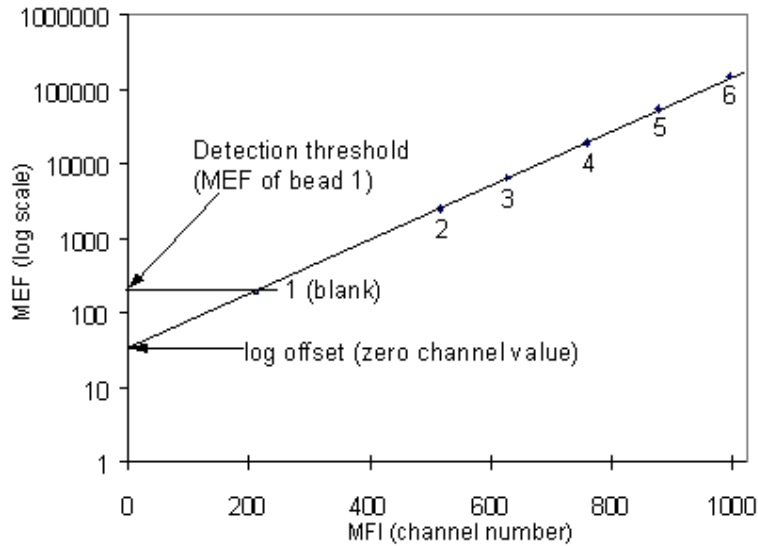


Figure 4. Calibration curve (regression line) based on FluoroSpheres.

Example of calculation:

$$\begin{aligned} \log \text{ decades} &= \log(MEF_{max}) - \log(MEF_{min}) \\ \log \text{ decades} &= \log(188735) - \log(30.8) \\ \log \text{ decades} &= 5.28 - 1.49 \\ \log \text{ decades} &= 3.79 \end{aligned}$$

Channels per decade:

Since the number of channels are 1024, the number of channels per decade are:  
 $1024/3.79 = 270$

## **FRANÇAIS**

### **Utilisation**

Pour diagnostic *in vitro*.

Les FluoroSphères sont destinées au contrôle des performances du cytomètre de flux.

### **Résumé et explications**

Le kit contient des perles témoin et des perles d'étalonnage de 3,2 µm. Les perles d'étalonnage sont un mélange de 5 types de perles ayant des intensités de fluorescence différentes, et un type de perles non-fluorescentes. On trouve dans les perles fluorescentes une combinaison de fluorochromes uniques qui rendent possible l'excitation par une lumière de n'importe quelle longueur d'onde comprise entre 365 et 650 nm. Puisque les perles fluorochromes sont différentes des fluorochromes utilisés normalement en cytométrie de flux, les propriétés spectrales sont différentes. En conséquence, les perles ne peuvent être pas utilisées pour régler la compensation de fluorescence. Avec des molécules assignées de valeurs équivalentes en fluorochrome (MEF) pour les populations de perles fluorescentes, l'utilisation de FluoroSphères rend possible la transformation d'unités arbitraires d'intensité de fluorescence moyenne (IFM) en des unités absolues pour l'assurance qualité et le report des données de cytométrie de flux.

### **Principe du dosage**

1. Premièrement, les perles témoins sont analysées afin d'établir le réglage optimal de l'instrument pour tous les canaux d'intérêt.
2. Deuxièmement, les perles d'étalonnage sont analysées. Les données sont utilisées pour l'établissement d'une courbe d'étalonnage dans laquelle IFM est tracé par rapport à MEF.

La courbe d'étalonnage et les paramètres statistiques associés sont utilisés pour évaluer la linéarité de l'instrument. De plus, le seuil de détection et l'étendue dynamique de l'instrument peuvent aussi être déterminés à partir de la courbe d'étalonnage.

L'étalonnage avec les FluoroSphères peut être effectué de deux façons:

- Réglage constant de l'instrument.  
Lorsque cette méthode est utilisée, tous les réglages de l'instrument restent constants. Les IFM pour les différents pics sont contrôlés et les résultats sont affichés comme la date d'étalonnage versus IFM.
- Réponse constante de l'instrument  
Avec cette méthode, la tension PMT est réglée pour que l'IFM de l'un des pics de haute fluorescence apparaisse exactement sur le même canal à chaque fois. Les résultats sont affichés comme la date d'étalonnage versus la tension PMT.

## Réactifs.

### A. Matériels fournis

#### Flacon 1

**BLANK BEADS**

1,7 mL

Dans de l'azoture de solution à 0,02 %, et du NP40 à 0,01 %.

#### Flacon 2

**CALIBRATION BEADS**

1,7 mL

Contient des perles témoin et 5 types de perles portent des quantités différentes de fluorochromes exprimées en valeur MEF pour FITC, RPE, RPE-TxRed, RPE-Cy5 et APC, respectivement. Pour les valeurs MEF spécifiques du lot, cf. la Fiche de Valeur Analytique incluse. Dans de l'azoture de sodium à 0,02 %, et du NP40 à 0,01 %.

### B. Matériels requis mais non fournis

Equipement général de laboratoire pour les procédures de cytométrie de flux.

Papier millimétré 5 cycles semi-logarithmique et double logarithmique.

Calculateur.

Logiciel pour l'analyse des données de cytométrie de flux.

Tableurs tels que Microsoft Excel. Ces programmes sont facultatifs.

## Précautions d'emploi

1. Pour utilisateurs professionnels.

2. Ce produit contient de l'azoture de sodium ( $\text{NaN}_3$ ), produit chimique hautement toxique à l'état pur. Aux concentrations du produit, bien qu'il ne soit pas classé comme dangereux, l'azoture de sodium peut réagir avec la tuyauterie en plomb et en cuivre pour former des dépôts d'azotures métallisées hautement explosifs. Lors de l'élimination du produit, laisser couler l'eau à flot pour éviter toute accumulation d'azotures métallisées dans la tuyauterie.

## Stockage

Stocker entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption inscrite sur le flacon. Si les réactifs ont été conservés dans d'autres conditions que celles spécifiées, ces conditions doivent être vérifiées par l'utilisateur. En cas de résultats imprévus qui ne peuvent pas être expliqués par des changements de procédures de laboratoire et qu'un problème avec le kit est suspecté, contactez les Services Techniques de Dako.

## Procédure de dosage et acquisition de données

1. Mélangez vigoureusement les perles dans un agitateur-mélangeur à Vortex ou en agitant.
2. Ajoutez 0,5 ml d'un tampon de dilution approprié, par exemple une solution physiologique tamponnée par les phosphates, pH 7,2, à chacun des tubes à essai. Ajoutez une goutte du flacon 1, perles témoin, au premier tube et une goutte du flacon 2, perles d'étalonnage, au second tube. Mélangez soigneusement à l'aide d'un agitateur-mélangeur à Vortex afin de s'assurer que les perles sont en suspension.

3. Avant l'acquisition des données, l'amplification logarithmique pour les détecteurs de fluorescence présentant un intérêt est sélectionnée, et la compensation de fluorescence pour tous les paramètres est réglée à zéro.
4. Appliquez le tube contenant les perles témoin dans le cytomètre de flux.
5. Réglez la tension PMT pour permettre au pic des perles témoin d'apparaître dans le premier dixième de l'histogramme.
6. À l'aide d'une dispersion avant et de côté, établir un passage sur les singulets de perles (cf. Figure 1).
7. Relevez un minimum de 5 000 événements de passage des perles témoin.
8. Appliquez le tube avec les perles d'étalonnage sur le cytomètre de flux et relevez les données pour un minimum de 5 000 événements de passage.
9. Six pics d'intensité différente de fluorescence doivent être visibles dans le canal de fluorescence d'intérêt (cf. Figure 2).

### Analyse des données, courbe d'étalonnage

L'analyse des résultats est confinée au singulets de perles sur le passage et qui ne contiennent aucun débris, comme défini sur la région pointillée de dispersion avant versus dispersion de côté (cf. Figure 1).

Les marqueurs ou les régions individuels sont utilisés pour définir chacune des 6 populations de perles des perles d'étalonnage (cf. Figure 2). Ces régions sont utilisées pour déterminer l'IFM de chaque population de perles.

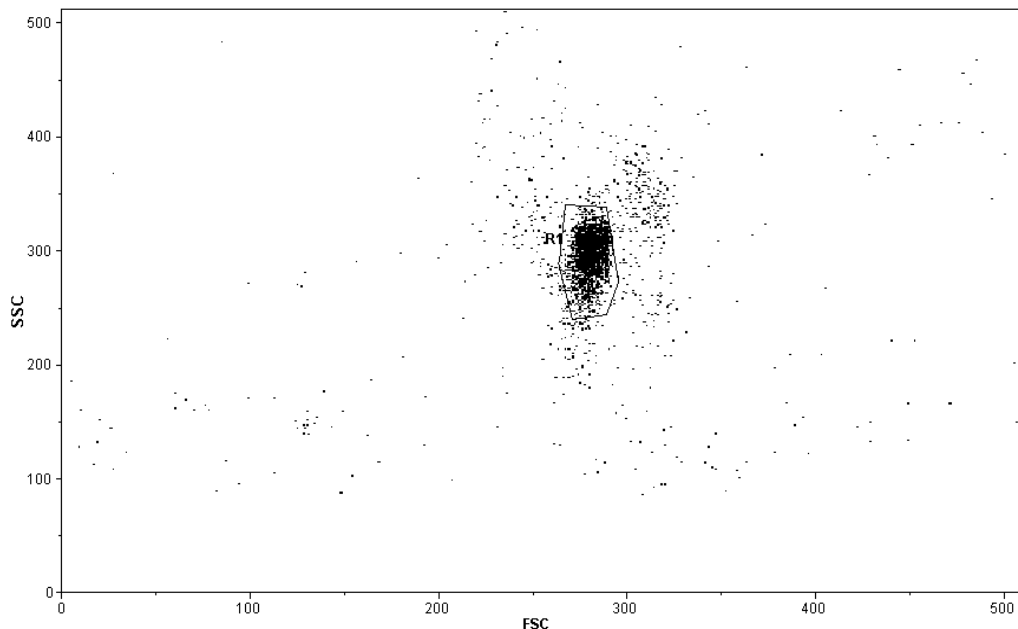


Figure 1. Dispersion avant versus dispersion de côté des perles témoin. Le passage est réglé pour prélever les singulets de perles.

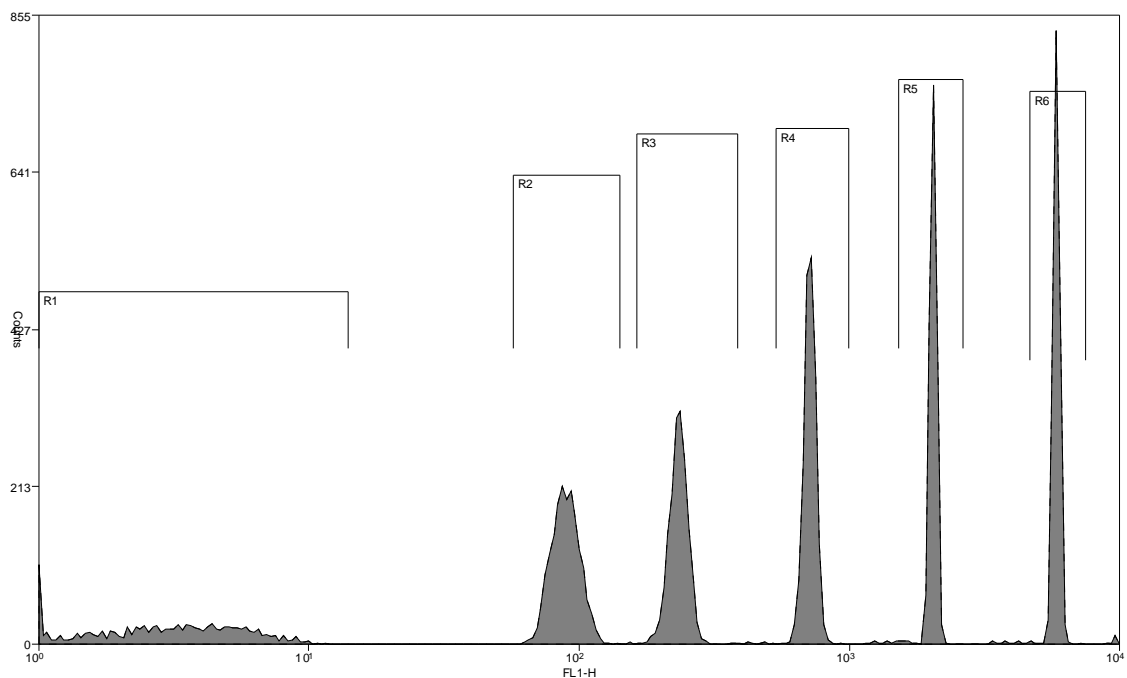


Figure 2. Histogramme des populations de perles FluoroSphères.

## A. Définitions

### Log excentré

Le Log excentré représente la valeur de fluorescence dans le canal 0. Le Canal 0 est en général représenté dans le logiciel du fabricant par des valeurs arbitraires, par ex. 1 pour la plupart des logiciels Becton Dickinson, et 0,1 pour la plupart des logiciels Coulter.

### %MoyRes

Le pourcentage moyen résiduel (%MoyRes) est une mesure non-pondérale de la linéarité de réponse des instruments. Elle est calculée en déterminant les variations de la ligne de régression du pourcentage absolu moyen par rapport aux points réels.

### $r^2$

Le coefficient de détermination ( $r^2$ ) est une mesure pondérale de linéarité. Ce qui est très utile pour l'analyse des logs de données.

### Seuil de détection

Bien que les perles témoin soient exemptes de fluorochromes, elles peuvent faire apparaître un signal. Ce signal représente le bruit de fond, et par conséquent le niveau de détection de l'instrument.

### MEF

Les molécules de fluorochrome équivalent représentent la quantité de fluorochrome par perle.

### Dixième de Log

Le dixième de Log est l'étendue de fin d'échelle ou l'étendue dynamique étalonnées, du paramètre de fluorescence étalonné. En général, les cytomètres de flux sont fournis avec des amplificateurs dont l'étendue dynamique est de 3,5 ou 4 dixièmes de log, en fonction du fabricant. Une moindre performance du cytomètre de flux affecte le dixième de log.

## B. Etalonnage manuel. Pour les instruments exprimant MFI en valeurs linéaires.

Elaboration de la courbe d'étalonnage :

1. Déterminez l'IFM pour chacune des 6 populations de perles d'étalonnage FluoroSphères.

- Placez le log IFM contre le log MEF correspondant pour les différents pics. Calculez la meilleure ligne "directe" selon la formule suivante :  

$$\log(\text{MEF}) = a \times \log(\text{IFM}) + b$$
où a est la pente et b l'ordonnée à l'origine, aussi appelé "log excentré" ou "valeur zéro du canal".
- Calculez les paramètres statistiques associés %ResMoy et  $r^2$  de la courbe d'étalonnage.
- L'étendue dynamique de l'amplificateur est exprimée dans les dixièmes de log. Les dixièmes de Log peuvent être calculés à partir de la ligne de régression en soustrayant  $\log(\text{MEF}_{\min})$  de  $\log(\text{MEF}_{\max})$ .  $\log(\text{MEF}_{\min})$  et  $\log(\text{MEF}_{\max})$  sont respectivement dérivés des valeurs IFM les plus basses et les plus élevées. Dans le cas suivant, IFM pour  $\text{MEF}_{\min}$  et  $\text{MEF}_{\max}$  sont respectivement  $10^0$  et  $10^4$ .

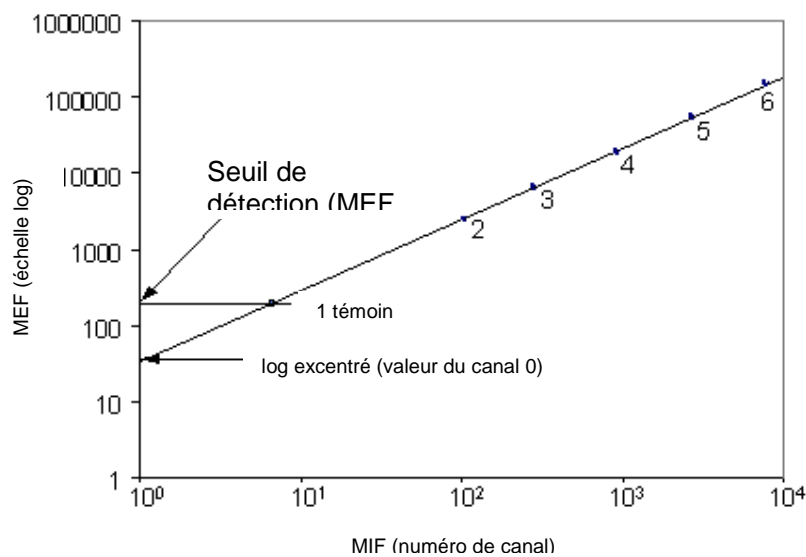


Figure 3. Courbe d'étalonnage (ligne de régression) basée sur les FluoroSphères.

Exemple de calcul :

$$\begin{aligned} \text{dixième de log} &= \log(\text{MEF}_{\max}) - \log(\text{MEF}_{\min}) \\ \text{dixième de log} &= \log(188\,735) - \log(30,8) \\ \text{dixième de log} &= 5,28 - 1,49 \\ \text{dixième de log} &= 3,79 \end{aligned}$$

Canaux par dixième :

Puisque le nombre de canaux est 1024, le nombre de canaux par dixième est :  
 $1024/3,79 = 270$

### C. Etalonnage manuel. Pour les instruments exprimant MFI en numéros du canal.

Elaboration de la courbe d'étalonnage :

- Déterminez l'IFM pour chacune des 6 populations de perles d'étalonnage FluoroSphères.
- Placez IFM contre le log (MEF) et calculez la meilleure ligne "directe" selon la formule suivante :  

$$\log(\text{MEF}) = a \times \log(\text{IFM}) + b$$
où a est la pente et b l'ordonnée à l'origine.
- Calculez les paramètres statistiques associés %ResMoy et  $r^2$  de la courbe d'étalonnage.

4. L'étendue dynamique de l'amplificateur est exprimée dans les dixièmes de log. Les dixièmes de Log peuvent être calculés à partir de la ligne de régression en soustrayant  $\log(MEF_{\min})$  de  $\log(MEF_{\max})$ .  $\log(MEF_{\min})$  et  $\log(MEF_{\max})$  sont respectivement dérivés des valeurs IFM les plus basses et les plus élevées. Dans le cas suivant, IFM pour  $MEF_{\min}$  et  $MEF_{\max}$  sont respectivement 0 et 1023.

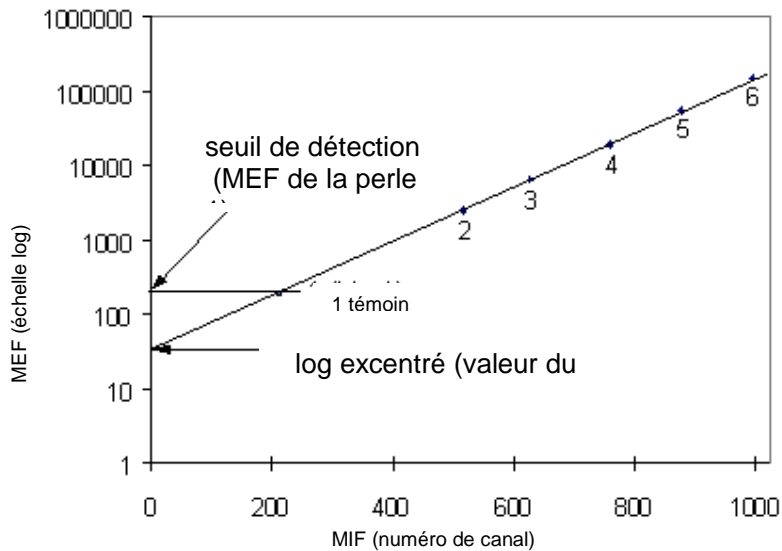


Figure 4. Courbe d'étalonnage (ligne de régression) basée sur les FluoroSphères.

Exemple de calcul :

$$\text{dixième de log} = \log(MEF_{\max}) - \log(MEF_{\min})$$

$$\text{dixième de log} = \log(188\,735) - \log(30,8)$$

$$\text{dixième de log} = 5,28 - 1,49$$

$$\text{dixième de log} = 3,79$$

Canaux par dixième :

Puisque le nombre de canaux est 1024, le nombre de canaux par dixième est :

$$1024/3,79 = 270$$

## **DEUTSCH**

### **Zweckbestimmung**

Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.

FluoroSpheres sind für die Überwachung der Flowzytometerleistung bestimmt.

### **Zusammenfassung und Erläuterung**

Das Kit umfasst Leerkügelchen und Kalibrierungskügelchen mit einer Größe von 3,2 µm. Die Kalibrierungskügelchen sind eine Mischung aus 5 Kügelchenpopulationen mit unterschiedlicher Fluoreszenzintensität und eine nicht fluoreszente Kügelchenpopulation. In die fluoreszenten Kügelchen ist eine Kombination aus einzigartigen Fluorochromen eingeschlossen, die die Lichterregung von allen Wellenlängen von 365 bis 650 nm ermöglicht. Da die Kügelchenfluorochrome sich von den normalerweise in der Flowzytometrie verwendeten Fluorochromen unterscheiden, sind die Spektraleigenschaften anders. Daher können die Kügelchen nicht für die Erstellung des Fluoreszenzausgleichs verwendet werden. Mit zugewiesenen Molekülen von äquivalenten Fluorochromwerten (MEF) für die fluoreszierenden Kügelchenpopulationen, ermöglicht die Verwendung von FluoroSpheres die Transformation von beliebigen Einheiten mit mittlerer Fluoreszenzintensität (MFI) in absolute Einheiten für die Qualitätskontrolle und die Erstellung flowzytometrischer Daten.

### **Prinzip des Assays**

1. Zuerst werden Leerkügelchen analysiert, um die optimalen Einstellungen der Instrumente für alle in Frage kommenden Kanäle zu errichten.
2. Zweitens werden Kalibrierungskügelchen analysiert. Die Daten werden für die Erstellung der Kalibrierungskurve verwendet, wo MFI gegen MEF aufgezeichnet ist.

Die Kalibrierungskurve und der damit verbundene statistische Parameter werden für die Auswertung der Linearität des Instruments verwendet. Überdies können Nachweisschwelle und dynamischer Bereich des Instruments auch anhand der Kalibrierungskurve bestimmt werden.

Kalibrierung mit FluoroSpheres kann auf zwei Arten durchgeführt werden:

- **Konstante Instrumenteneinstellung.**  
Bei Verwendung dieser Methode bleiben die Instrumenteneinstellungen im Lauf der Zeit unverändert. Das MFI für die verschiedenen Höchstwerte wird überwacht und die Resultate werden als Kalibrierungsdatum vs. MFI angezeigt.
- **Konstante Instrumentenreaktion.**  
Mit dieser Methode wird die PMT-Spannung geregelt, sodass das MFI einer der hohen fluoreszenten Höchstwerte jedesmal in genau dem gleichen Kanal erscheint. Die Resultate werden dann als Kalibrierungsdatum vs. PMT-Spannung angezeigt.



## Reagenzien

### A. Packungsinhalt

#### Fläschchen 1

**BLANK BEADS**

1,7 mL

In 0,02% Natriumazid, 0,01% NP40

#### Fläschchen 2

**CALIBRATION BEADS**

1,7 mL

Enthält Leerkügelchen und 5 Kügelchenpopulationen, die jeweils verschiedene Mengen an in MEF-Werten für FITC, RPE, RPE-TxRed, RPE-Cy5 und APC exprimierten Fluorochromen tragen. Für chargenspezifische MEF-Werte siehe bitte die beigegefügte Tabelle mit Analysewerten. In 0,02% Natriumazid, 0,01% NP40

### B. Zusätzlich benötigte Reagenzien und Zubehör (außerhalb des Lieferumfangs)

Allgemeine Laborgeräte für flowzytometrische Verfahren.

Semilogarithmik- und Doppellogarithmik-5-Zyklus-Millimeterpapier.

Taschenrechner.

Softwareprogramme für die Analyse durchflusszytometrischer Daten.

Elektronische Arbeitsblattprogramme wie Microsoft Excel. Diese Programme sind Wahlzubehör.

## Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

1. Für geschultes Fachpersonal.

2. Dieses Produkt enthält Natrium-Azid ( $\text{NaN}_3$ ), eine in reiner Form hochtoxische chemische Verbindung. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann Natrium-Azid, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Wasserleitungen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metall-Azid-Anreicherungen führen. Nach der Entsorgung muss mit reichlich Wasser nachgespült werden, um Metall-Azid-Anreicherung zu vermeiden.

## Lagerung

Bei 2 – 8 °C lagern. Nicht nach dem auf dem Fläschchen angegebenen Verfallsdatum verwenden. Falls die Reagenzien unter anderen Bedingungen als den beschriebenen aufbewahrt werden, so müssen diese vom Anwender verifiziert werden. Wenn unerwartete Resultate beobachtet werden, welche durch Änderungen in den Labormethoden nicht erklärt werden können und falls Verdacht auf ein Problem mit dem Antikörper besteht, ist bitte Kontakt mit unserem technischen Kundendienst aufzunehmen.

## Assayverfahren und Datenerfassung

1. Die Kügelchen mit einem Vortexmischer oder durch Schütteln kräftig mischen.
2. 0,5 mL eines geeigneten Verdünnungspuffers, wie z.B. phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,2, in jedes der zwei Teströhrchen geben. Einen Tropfen aus Fläschchen 1, Leerkügelchen, in das erste Röhrchen geben und einen Tropfen aus Fläschchen 2, Kalibrierungskügelchen, in das zweite Röhrchen. Mit einem Vortexmischer mischen, um zu gewährleisten, dass die Kügelchen suspendiert sind.

3. Vor der Datenerfassung wird logarithmische Amplifikation für die in Frage kommenden Fluoreszenzdetektoren gewählt und die Fluoreszenzkomensation für alle Parameter auf Null gestellt.
4. Das Röhrchen mit den Leerkügelchen auf das Flowzytometer einsetzen.
5. PMT-Spannungen regulieren, sodass der Höchstwert der Leerkügelchen in der ersten Zehnergruppe im Histogramm erscheint.
6. Mit Vorwärtsstreuung vs. Seitenstreuung ein aktives Gatter auf Kügelchen-Singletts einrichten (siehe Abb. 1).
7. Mindestens 5000 gemessene Ereignisse auf den Leerkügelchen erfassen.
8. Das Röhrchen mit Kalibrierungskügelchen auf das Flowzytometer einsetzen und Daten für mindestens 5000 gemessene Ereignisse erfassen.
9. Sechs verschiedene Fluoreszenzintensitäts-Spitzenwerte sollten auf dem in Frage kommenden Fluoreszenzkanal erkennbar sein (siehe Abb. 2).

## Datenanalyse, Kalibrierungskurve

Die Analyse der Ergebnisse beschränkt sich auf rückständigefreie gemessene Kügelchen-Singletts, wie diese auf einem Vorwärtsstreuung- vs. Seitwärtsstreuung-Punktediagramm definiert sind (siehe Abb. 1).

Einzelne Marker oder Regionen werden verwendet, um jede der 6 Kügelchenpopulationen der Kalibrierungskügelchen zu definieren (siehe Abb. 2). Die Regionen werden verwendet, um das MFI für jede Kügelchenpopulation zu bestimmen.

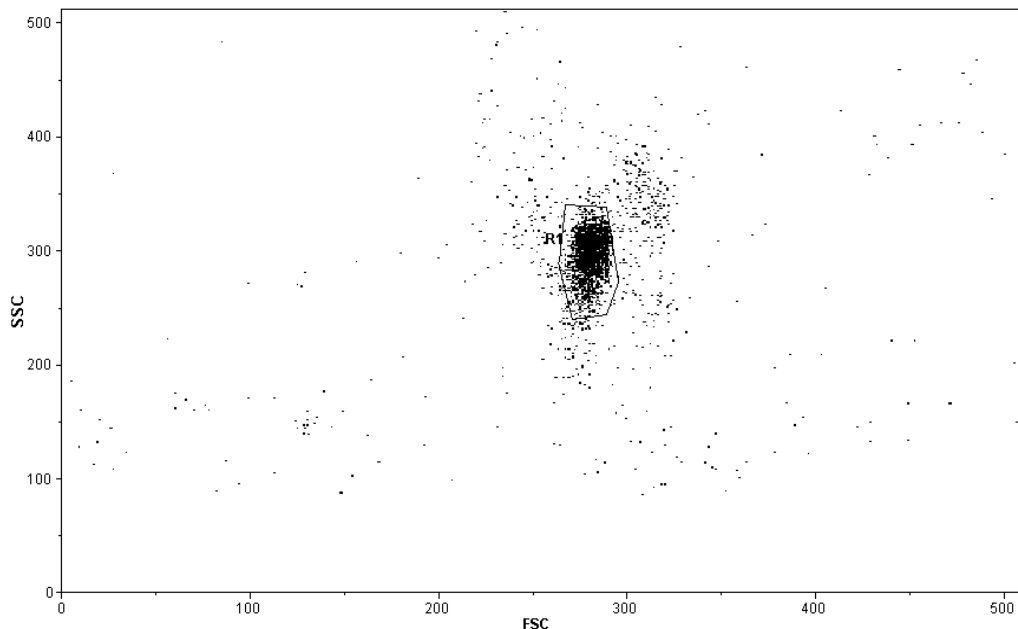


Abb. 1. Vorwärtsstreuung vs. Seitwärtsstreuung von Leerkügelchen. Das Gatter wurde für die Gewinnung von Kügelchen-Singletts errichtet.

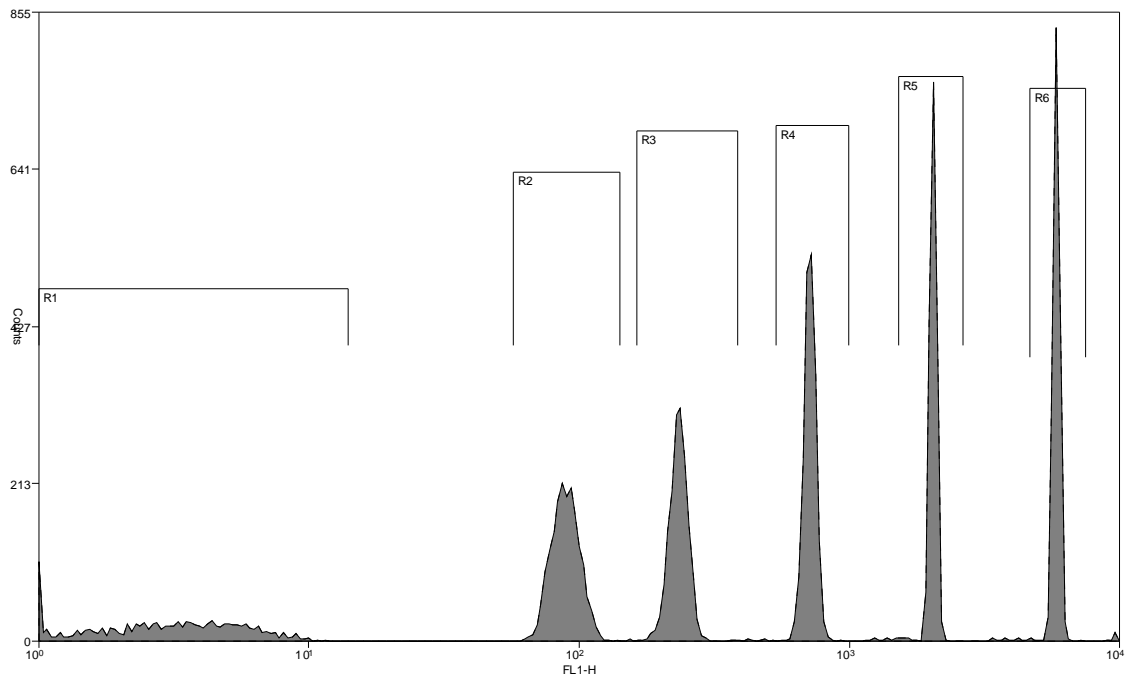


Abb. 2. Histogramm von FluoroSpheres Kügelchenpopulationen.

## A. Definitionen

### Log offset

Log offset stellt den Fluoreszenzwert in Kanal 0 dar. Kanal 0 wird normalerweise in der Software des Herstellers durch beliebige Werte dargestellt, z.B. 1 in fast jeder Becton Dickinson Software und 0,1 in fast jeder Coulter Software.

### AvgRes%

Der durchschnittliche Restprozentwert (AvgRes%) ist ein nicht gewichtetes Maß für die Reaktionslinearität des Instruments. Er errechnet sich anhand der Bestimmung des durchschnittlichen absoluten Prozentwerts, mit dem die Regressionslinie von den tatsächlichen Punkten abweicht.

### $r^2$

Bestimmungskoeffizient ( $r^2$ ) ist ein gewichtetes Maß für Linearität. Dieser ist bei der Analyse von Logdaten überaus nützlich.

### Nachweisschwelle

Auch wenn Leerkügelchen ohne eingeschlossene Fluorochrome sind, können sie zur Auslösung eines Signals führen. Dieses Signal repräsentiert das Hintergrundgeräusch und daher das Nachweissniveau des Instruments.

### MEF

Moleküle äquivalenten Fluorochroms sind die Fluorochrommenge pro Kügelchen.

### Log decade

Log decade ist der kalibrierte vollständige Bereich, bzw. dynamische Bereich, des Fluoreszenzparameters, der gerade kalibriert wird. Flowzytometer werden generell mit Verstärkern mit einem dynamischen Bereich von 3,4 oder 4 Log decades (je nach Hersteller) geliefert. Eine verringerte Leistung des Flowzytometers beeinträchtigt die Log decade.

## B. Manuelle Kalibrierung. Für Instrumente, die MFI in linearen Werten ausdrücken

Errichtung der Kalibrierungskurve:

1. Das MFI für jede der 6 Populationen der FluoroSpheres Kalibrierungskügelchen bestimmen.

- MFI-Log gegen das entsprechende MEF-Log für die verschiedenen Spitzenwerte aufzeichnen. Die "passendste" Gerade gemäß der folgenden Formel berechnen:  

$$\text{Log (MEF)} = a \times \text{Log (MFI)} + b$$
wobei a, die Steigung, und b, die Y-Achsenverschiebung ist, auch als „Log Offset“ oder „Nullkanalwert“ bezeichnet.
- Die zugehörigen statistischen Parameter AvgRes% und  $r^2$  der Kalibrierungskurve berechnen.
- Der dynamische Bereich des Verstärkers wird in Log decades ausgedrückt. Log decades können von der Regressionslinie durch Subtraktion von  $\text{Log (MEF}_{\min})$  von  $\text{Log (MEF}_{\max})$  berechnet werden.  $\text{Log (MEF}_{\min})$  und  $\text{Log (MEF}_{\max})$  werden von jeweils den niedrigsten und höchsten MFI-Werten abgeleitet. Im vorliegenden Fall sind MFI für  $\text{MEF}_{\min}$  und  $\text{MEF}_{\max}$   $10^0$  bzw.  $10^4$ .

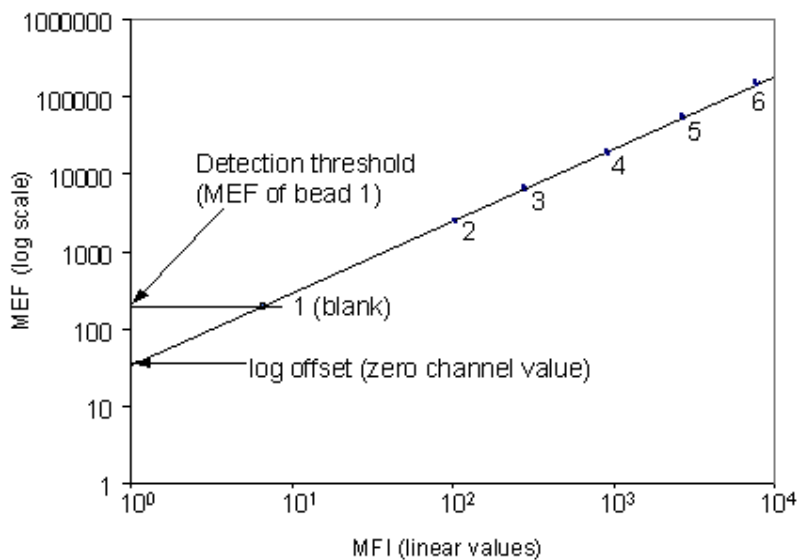


Abb. 3. Kalibrierungskurve (Regressionslinie) basierend auf FluoroSpheres.

Rechenbeispiel:

$$\begin{aligned} \text{Log decades} &= \text{Log (MEF}_{\max}) - \text{Log (MEF}_{\min}) \\ \text{Log decades} &= \text{Log (188735)} - \text{Log (30,8)} \\ \text{Log decades} &= 5,28 - 1,49 \\ \text{Log decades} &= 3,79 \end{aligned}$$

Kanäle pro Zehnergruppe:

Da die Anzahl der Kanäle 1024 beträgt, ist die Anzahl der Kanäle pro Zehnergruppe:  
 $1024/3.79 = 270$

### C. Manuelle Kalibrierung. Für Instrumente, die MFI in Kanalzahlen ausdrücken.

Errichtung der Kalibrierungskurve:

- Das MFI für jede der 6 Populationen der FluoroSpheres Kalibrierungskügelchen bestimmen.
- MFI gegen  $\text{Log (MEF)}$  aufzeichnen und die "passendste" Gerade gemäß der folgenden Formel berechnen:

$$\text{Log (MEF)} = a \times \text{Log (MFI)} + b$$

wobei a die Steigung und b die Y-Achsenverschiebung ist.

3. Die zugehörigen statistischen Parameter AvgRes% und  $r^2$  der Kalibrierungskurve berechnen.
4. Der dynamische Bereich des Verstärkers wird in Log decades ausgedrückt. Log decades können von der Regressionslinie durch Subtraktion von  $\text{Log}(\text{MEF}_{\min})$  von  $\text{Log}(\text{MEF}_{\max})$  berechnet werden.  $\text{Log}(\text{MEF}_{\min})$  und  $\text{Log}(\text{MEF}_{\max})$  werden von jeweils den niedrigsten und höchsten MFI-Werten abgeleitet. Im vorliegenden Fall sind MFI für  $\text{MEF}_{\min}$  und  $\text{MEF}_{\max}$  0 bzw. 1023.

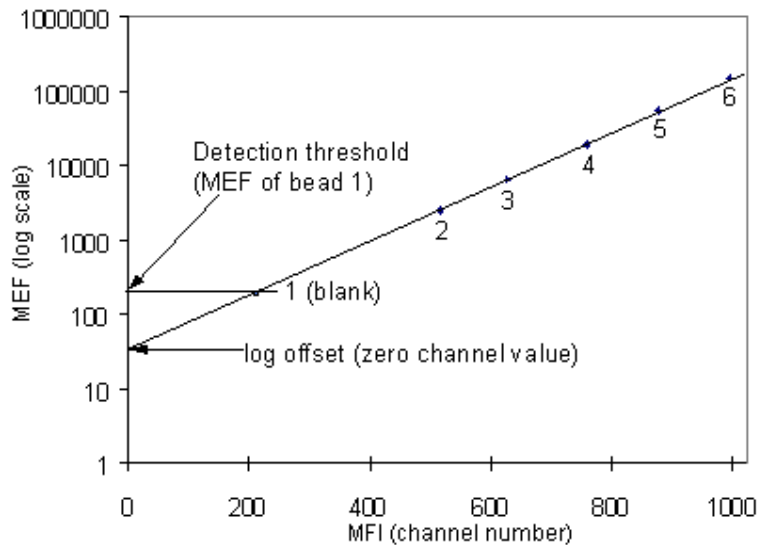


Abb. 4. Kalibrierungskurve (Regressionslinie) basierend auf FluoroSpheres.

Rechenbeispiel:

$$\text{Log decades} = \text{Log}(\text{MEF}_{\max}) - \text{Log}(\text{MEF}_{\min})$$

$$\text{Log decades} = \text{Log}(188\,735) - \text{Log}(30,8)$$

$$\text{Log decades} = 5,28 - 1,49$$









$$\text{Log decades} = 3,79$$

Kanäle pro Zehnergruppe:

Da die Anzahl der Kanäle 1024 beträgt, ist die Anzahl der Kanäle pro Zehnergruppe:

$$1024/3,79 = 270$$

**Explanation of symbols/ Légende des symboles/ Erläuterung der Symbole**

 <p>Catalogue number Numéro de code Bestellnummer</p>	 <p>Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich</p>	 <p>Use by Utiliser avant Verwendbar bis</p>
 <p>In vitro diagnostic medical device Appareil de diagnostic médical in vitro In-Vitro-Diagnostikum</p>	 <p>Contains sufficient for &lt;n&gt; tests Contenu suffisant pour &lt;n&gt; tests Inhalt ausreichend für &lt;n&gt; Ansätze</p>	 <p>Manufacturer Fabricant Hersteller</p>
 <p>Consult instructions for use Consulter les consignes d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten</p>	 <p>Batch code Code du Lot Chargenbezeichnung</p>	

Produced by/ Produit par/ Hergestellt von:  
 Dako Denmark A/S  
 Produktionsvej 42  
 DK-2600 Glostrup  
 Denmark/ Danemark/ Dänemark  
 Tel. +45 44 85 95 00  
 Fax +45 44 85 95 95