

## Monoclonal Mouse Anti-Human CD20, Clone B-Ly1

Code No./ Code/ Code-Nr. **F 0799** FITC-Conjugated  
 Code No./ Code/ Code-Nr. **R 7013** RPE-Conjugated  
 Code No./ Code/ Code-Nr. **C 7132** RPE-Cy5-Conjugated

### ENGLISH

**Intended use** For in vitro diagnostic use.  
 F 0799, R 7013 and C 7132 are intended for use in flow cytometry. CD20 can be considered a pan-B cell antigen, as it is expressed on the surface of all mature B-lymphocytes but not in secreting plasma cells (1). Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a certified professional.

**Synonyms for antigen** B1, Bq35 (2).

**Introduction** The CD20 antigen is a non-glycosylated 33-37 kDa membrane phosphoprotein (3). It contains three extensive hydrophobic regions which pass through the cell membrane four times. In addition, the long carboxyl and amino ends of the molecule are located intracellularly with only a minor portion of the molecule exposed outside the cell (4).  
 The CD20 molecule is involved in regulation of B cell activation, proliferation and differentiation (1). The CD20 antigen is expressed early during pre-B cell development, presumably just before the expression of cytoplasmic  $\mu$ -chains, and it persists until plasma cell differentiation (3). Weak expression of CD20 may be seen in a subpopulation of T cells but the antigen is not expressed in normal myeloid, erythroid, monocytic or mesenchymal cells (1).  
 The CD20 antigen is expressed in acute lymphoblastic leukaemia, B-cell chronic lymphocytic leukaemia, hairy cell leukaemia and Burkitt's lymphoma (5).

**Reagent provided** The Anti-CD20 conjugates, F 0799, R 7013 and C 7132, have been produced from a purified monoclonal mouse antibody. The conjugates are provided in liquid form in buffer containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 15 mmol/L NaN<sub>3</sub>, pH 7.2. Each vial contains 100 tests (10  $\mu$ L of conjugate for up to 10<sup>6</sup> leucocytes from normal human peripheral blood).  
 Isotype: IgG1, kappa. Conjugate concentration mg/L: See label on vial.

Antibody Code No.	Fluorochrome	Negative Control Code No.
F 0799	FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1)	X 0927
R 7013	RPE (R-Phycoerythrin)	X 0928
C 7132	RPE-Cy5 (R-Phycoerythrin + Cyanine 5)	X 0955

**Specificity** Anti-CD20, B-LY1, was included in the Fourth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens, and studies by a number of laboratories confirmed its reactivity with the CD20 antigen (3). Cross-blocking studies indicate that a majority of antibodies in the CD20 cluster studied at the above workshop, defines a single epitope (4).

**Precautions** 1. For professional users.  
 2. This product contains sodium azide (NaN<sub>3</sub>), 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.  
 3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.

**Storage** Store in the dark at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact our Technical Services.

**Staining procedure**

- Collect venous blood into a test tube containing an anticoagulant.
- Isolate mononuclear cells by centrifugation on a separation medium. Alternatively, lyse the red cells after step 6.
- Wash the mononuclear cells twice with RPMI 1640 or PBS, pH 7.2-7.4.
- Mix 100  $\mu$ L cell suspension with 10  $\mu$ L fluorochrome-conjugated Anti-CD20.
- Use a non-reactive monoclonal antibody of the same isotype, and conjugated with the same fluorochrome, as a negative control (see table).
- Incubate in the dark at 4 °C for 30 minutes.
- Wash twice with PBS containing 2% BSA. Resuspend the cells in an appropriate fluid for flow cytometry, e.g. 0.3 mL 1% paraformaldehyde (fixative) in 0.01 mol/L PBS, pH 7.4.
- Analyse on a flow cytometer.

It is recommended to include a suitable positive and negative control sample with each run for reagent and preparation control. Note that fluorochrome conjugates are light sensitive, and samples should be protected from light during the staining procedure and until the analysis.

**Product-specific limitations** It has been observed that RPE-Cy5-conjugates may bind to monocytes, resulting in background staining (6).

### FRANÇAIS

**Intérêt:** Pour diagnostic *in vitro*.  
 F 0799, R 7013 et C 7132 sont destinés pour un usage en cytométrie en flux. CD20 peut être considéré un antigène-plateau des cellules B, comme il est exprimé sur la surface de tous les lymphocytes B matures mais n'est pas exprimé dans les plasmocytes sécrétoires (1). L'interprétation des résultats doit être entreprise par un professionnel certifié dans le contexte de l'histoire clinique du patient et des autres examens diagnostics.

**Synonymes pour antigène:** B1, Bq35 (2).

**Introduction:** L'antigène CD20 est une membrane phosphoprotéide non glycosylée 33-37 kDa (3). Il contient trois zones considérablement hydrophobes qui passent à travers la membrane cellulaire à quatre reprises. En outre, les longues extrémités carboxyles et aminées de la molécule sont situées intracellulairement avec seulement une partie mineure de la molécule exposée en dehors de la cellule (4). La molécule CD20 est impliquée dans la régulation de l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules B (1). L'antigène CD20 est exprimé dans le développement préliminaire des cellules pré-B, probablement juste avant l'expression des chaînes  $\mu$  cytoplasmiques, et qui persiste jusqu'à la différenciation des plasmocytes (3). Une faible expression de CD20 peut être démontrée dans les sous-population des cellules T mais l'antigène n'est pas exprimé dans les cellules myéloïdes, érythroïdes, monocytiques ou mésenchymales normales (1).  
 L'antigène CD20 est exprimé dans la leucémie lymphoblastique aiguë, la leucémie lymphocytaire chronique des cellules B, la leucémie tricholeucocytaire et le lymphome de Burkitt (5).

**Réactif fourni:** Les conjugués anti-CD20, F 0799, R 7013 et C 7132, ont été produits à partir d'un anticorps monoclonal purifié de la souris. Les conjugués sont fournis à l'état liquide en tampon contenant 1% de sérum albumine bovine (SAB) et 15 mmol/l NaN<sub>3</sub>, pH 7,2. Chaque flacon de l'échantillon contient 100 tests (10  $\mu$ l de conjugué pour un maximum de 10<sup>6</sup> leucocytes du sang périphérique humain normal).  
 Isotype: IgG1, kappa. Concentration du conjugué mg/L: Voir l'étiquette sur le flacon de l'échantillon.

Anticorps Code No.	Fluorochrome	Contrôle négatif Code No.
F 0799	FITC (Isomère 1 de Fluorescéine Isothiocyanate)	X 0927
R 7013	RPE (R-Phycoérythrine)	X 0928
C 7132	RPE-Cy5 (R-Phycoérythrine + Cyanine 5)	X 0955

**Spécificité:** Anti-CD20, B-LY1, était programmé durant la Quatrième Conférence-Atelier Internationale des Antigènes de Différenciation des Leucocytes Humains et des études de plusieurs laboratoire ont montré sa réactivité avec l'antigène CD20 (3). Des essais sur l'inhibition croisée indique qu'une majorité d'anticorps dans les classes CD20 analysés à l'atelier cité ci-dessus définit un épitope simple (4).

**Précautions d'emploi**

- Pour utilisateurs professionnels
- Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>) un produit chimique hautement toxique à l'état pur. Aux concentrations du produit, bien qu'il ne soit pas classé comme étant nuisible, l'azide de sodium peut réagir avec la tuyauterie en plomb et en cuivre pour former des dépôts hautement explosifs d'azides métallisés. Lors de l'élimination du produit, laisser couler l'eau à flot pour éviter toute l'accumulation d'azide métallisé dans la tuyauterie.
- Comme pour tout dérivé biologique dangereux à manipuler, une précision s'impose.

**Stockage** Stocker à l'obscurité entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption mentionnée sur le flacon. Dans le cas où les réactifs sont conservés sous d'autres conditions que celles spécifiées, les conditions doivent être vérifiées par l'utilisateur. Il n'existe pas de signe particulier pour indiquer l'instabilité de ce produit. Par conséquent, les contrôles doivent être opérés simultanément avec les échantillons du patient. En cas de résultats imprévus qui ne peuvent pas être expliqués par des changements de procédures de laboratoire et qu'un problème avec le produit est suspecté, contactez nos Services Techniques.

**Procédure d'immunomarquage**

- Recueillir le sang veineux dans un tube à essai contenant un anticoagulant.
- Isoler les cellules mononucléaires par centrifugation sur un milieu de séparation. Alternativement, lyser les hématies après l'étape 6.
- Nettoyer les cellules mononucléaires à deux reprises avec RPMI 1640 ou PBS, pH 7,2-7,4.
- Mélanger 100  $\mu$ l de suspension cellulaire avec 10  $\mu$ l de conjugué au fluorochrome Anti-CD20.
- Utiliser un anticorps monoclonal non réactif d'un même isotype, et conjugué avec le même fluorochrome, comme témoin négatif (voir tableau).
- Incuber à l'obscurité à 4 °C pendant 30 minutes.
- Nettoyer à deux reprises avec PBS contenant 2% de SAB. Resuspendre les cellules dans une solution appropriée pour la cytométrie en flux, par ex. 0,3 mL 1% de paraformaldéhyde (fixateur) dans 0,01 mol/L PBS, pH 7,4.
- Analyser sur un cytomètre en flux.

Il est requis d'inclure un échantillon approprié de témoin positif et négatif avec chaque écoulement pour vérifier le réactif et la procédure de préparation. Noter que les conjugués de fluorochrome sont sensibles à la lumière, et les échantillons doivent être mis à l'abri de la lumière durant la procédure d'immunomarquage et jusqu'à l'analyse.

**Limites spécifiques du produit** Il a été observé que les conjugués RPE-Cy5 peuvent se lier aux monocytes, produisant un marquage d'arrière-plan (6).

## DEUTSCH

**Zweckbestimmung** Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.  
C 7099, F 0713 und R 7132 sind für den durchflusszytometrischen Gebrauch bestimmt. CD20 wird als ein pan-B-Lymphozytenantigen angesehen und in erheblichem Umfang auf allen reifen B-Lymphozyten, nicht jedoch von sekretierenden Plasmazellen exprimiert (5). Die Befunde müssen unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren von einem zertifizierten Facharzt interpretiert werden.

**Synonyme Bezeichnungen des Antigens** B1, Bq35 (2).

**Einleitung** Das CD20-Antigen ist ein nicht glykosyliertes 33 - 37 kDa schweres Membranphosphoprotein (3). Es enthält drei ausgedehnte hydrophobe Bereiche, welche vier Mal durch die Zellmembran passieren. Im Übrigen sind die langen Amino- und Karboxylendungen des Moleküls intrazellulär lokalisiert, während nur ein kleiner Teil des Moleküls außerhalb der Zelle exponiert ist (4).  
Das CD20-Molekül ist an der Regulierung der B-Zell-Aktivierung, -Proliferation und -Differenzierung beteiligt (1). Das CD20-Antigen wird in der Frühentwicklung der Prä-B-Zellen, vermutlich kurz vor der zytoplasmatischen Expression der  $\mu$ -Ketten, exprimiert und es wird bis zur Differenzierung zu Plasmazellen beibehalten (3). Schwache Expression von CD20 kommt in einer Subpopulation der T-Zellen vor, das Antigen wird aber nicht auf normalen Monozyten, myeloiden, erythroiden und Mesenchym-Zellen exprimiert (1).  
Das CD20-Antigen wird auf ALL-, B-Zell-CLL-, Haarzellenleukämie und Burkitt-Lymphom-Zellen exprimiert (5).

**Geliefertes Reagenz** Die Anti-CD20-Konjugate F 0799, F 0713 und C 7132 stammen von einem gereinigten monoklonalen Maus-Antikörper. Die Konjugate werden in einer gepufferten Lösung mit 1 % bovinem Serumalbumin (BSA) und 15 mmol/L Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, pH 7,2 geliefert. Jedes Fläschchen ist ausreichend für 100 Tests (10  $\mu$ L des Konjugats sind für bis 10<sup>6</sup> Leukozyten aus normalem, menschlichem peripheren Blut ausreichend).  
**Isotyp:** IgG1, Kappa. **Konjugat-Konzentration mg/L:** Siehe Produktetikett.

Antikörper Code-Nr.	Fluorochrom	Negativkontrolle Code- Nr.
F 0799	FITC (Fluoresceinisothiocyanat-Isomer 1)	X 0927
R 7013	RPE (R-Phycoerythrin)	X 0928
C 7132	RPE-Cy5 (R-Phycoerythrin + Zyanin 5)	X 0955

**Spezifität** Anti-CD20, B-LY1, wurde Kontext des Fourth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens aufgenommen und Studien in einigen Laboratorien bestätigten seine Reaktivität mit CD20 (3). Kreuzblockierungsstudien deuten darauf hin, dass die Mehrzahl der zur CD20-Gruppe gehörenden Antikörper, die während des genannten Workshops untersucht wurden, einen einzigen Epitop definieren (4).

**Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen**

- Für geschultes Fachpersonal.
- Dieses Produkt enthält Natrium-Azid (NaN<sub>3</sub>), 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.
- Wie bei allen aus biologischen Materialien gewonnenen Produkten müssen die ordnungsgemäßen Handhabungsverfahren eingehalten werden.

**Lagerung** Im Dunkeln bei 2 – 8 °C lagern. Nicht nach dem auf dem Produkt angegebenen Verfallsdatum verwenden. Falls die Reagenzien unter anderen Bedingungen als den beschriebenen aufbewahrt werden, so müssen diese vom Anwender verifiziert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anhaltspunkte für die mögliche Instabilität dieses Produktes. Es sollten daher die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientenproben mitgeführt werden. Wenn unerwartete Verfärbung beobachtet wird, welche durch Änderungen in den Labormethoden nicht erklärt werden kann und falls Verdacht auf ein Problem mit dem Antikörper besteht, ist bitte Kontakt mit unserem technischen Kundendienst aufzunehmen.

**Färbeprozedur**

- Venöse Blutprobe in ein Probenröhrchen mit gerinnungshemmendem Mittel gewinnen.
- Mononukleäre Zellen durch Zentrifugieren auf einem Abtrennungsmittel isolieren. Alternativ hierzu können die Erythrozyten im Anschluss an Schritt 6 aufgelöst werden.
- Die mononukleären Zellen zweimal mit RPMI 1640 oder mit PBS, pH 7,2-7,4 waschen.
- 100  $\mu$ L der Zellsuspension mit 10  $\mu$ L des fluorochromkonjugierten Anti-CD20 mischen.
- Als Negativkontrolle einen nicht reaktiven, monoklonalen Antikörper des gleichen Isotyps, konjugiert an dasselbe Fluorochrom, verwenden (s. Tabelle).
- Im Dunkeln bei 4 °C 30 Minuten lang inkubieren.
- Zweimal mit PBS waschen, das 2 % BSA enthält. Die Zellen in einer für Durchflusszytometrie geeigneten Flüssigkeit, z. B. 0,3 mL 1%igem Paraformaldehyd (Fixativ) in 0,01 mol/L PBS, pH 7,4 resuspendieren.
- Im Durchflusszytometer analysieren.






Es wird empfohlen, eine geeignete Positiv- und Negativkontrolle für jede Durchführung der Reagenz- und Präparationsprüfung mitzuführen. Es ist zu beachten, dass Fluorochromkonjugate lichtempfindlich sind und dass die Proben während der Färbeprozedur und bis zur Durchführung der Analyse vor Licht geschützt werden müssen.

**Produktspezifische Beschränkungen** Die Bindung von RPE-Cy5-Konjugaten an Monozyten wurde beschrieben, wodurch eine Hintergrundfärbung möglich ist (6).

### References/ Références/ Literatur

- Leong A.S-Y, Cooper K, Leong F.J.W-H. Manual of diagnostic antibodies for immunohistology; London: Oxford University Press; 2003. p. 89-91.
- Tedder TF. CD Guide. CD20. In: Mason D, André P, Bensussan A, Buckley C, Civin C, Clark E, et al., editors. Leucocyte typing VII. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 7th International Workshop and Conference; 2000 Jun 19-23; Harrogate, United Kingdom. New York: Oxford University Press Inc.; 2002. p. 766.
- Dörken B, Möller P, Pezzutto A, Schwartz-Albiez R, Moldenhauer G. B3. B-cell antigens: CD20. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, et al., editors. Leucocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference; 1989 Feb 21-25; Vienna, Austria. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1989. p 46-8.
- Tedder TF, Penta A. B3.1. Structure of the CD20 antigen and gene of human and mouse B-cells: use of transfected cell lines to examine the Workshop panel of antibodies. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, et al., editors. Leucocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference; 1989 Feb 21-25; Vienna, Austria. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1989. p 48-50.
- Pezzutto A, Behm F, Callard RE, Clark EA, Genetet N, Goodall AH, et al. B22.3. Flow cytometry analysis of the B-cell blind panel: joint report. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, et al., editors. Leucocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference; 1989 Feb 21-25; Vienna, Austria. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1989. p 165-74.
- van Vugt MJ, van den Herik-Oudijk IE, van de Winkle JGJ. Binding of PE-CY5 conjugates to human high-affinity receptor for IgG (CD64). Blood 1996;88(6):2358-61.

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

<b>REF</b>	Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	 2°C - 8°C Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	 Use by Utiliser jusque Verwendbar bis
<b>IVD</b>	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-Vitro-Diagnostikum	 Keep away from sunlight (consult storage section) Conserver à l'écart du soleil (se reporter à la section conservation) Lichtgeschützt lagern (siehe Abschnitt zur Lagerung)	 Manufacturer Fabricant Hersteller
	Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	<b>LOT</b> Batch code Code du Lot Chargenbezeichnung	