

**Monoclonal Mouse Anti-Human CD3/APC**, Clone UCHT1  
**Monoclonal Mouse Anti-Human CD3/FITC**, Clone UCHT1  
**Monoclonal Mouse Anti-Human CD3/PerCP**, Clone UCHT1  
**Monoclonal Mouse Anti-Human CD3/RPE**, Clone UCHT1  
**Monoclonal Mouse Anti-Human CD3/RPE-Cy5**, Clone UCHT1

**Code C7225**  
**Code F0818**  
**Code PR702**  
**Code R0810**  
**Code C7067**

## ENGLISH

### Intended use

For in vitro diagnostic use.

C7225, F0818, PR702, R0810 and C7067 are intended for use in flow cytometry. CD3 is a pan-T-cell-lineage-restricted antigen, which is a valuable marker for normal and neoplastic T cells. Antibodies to CD3 are considered essential for the initial evaluation of acute and chronic lymphoproliferative disorders (1). Interpretation must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

### Summary and explanation

Human TCR/CD3 is a complex structure on the lymphocyte surface. It consists of the TCRαβ or TCRγδ heterodimer and the associated CD3 complex. The CD3 complex is composed of six polypeptides with usually four different transmembrane CD3 chains, γ (gamma), δ (delta), ε (epsilon), and ζ (zeta). Three different dimers, γε, δε, and ζζ, constitute the CD3 complex. The Mr of CD3ε is 20 000 (2).

The CD3 complex is crucial in transducing antigen-recognition signals into the cytoplasm of T cells and in regulating the cell surface expression of the TCR complex. Further it plays an important role in the differentiation of thymocytes (2).

CD3 is first detectable in early thymocytes and its appearance probably represents one of the earliest signs of commitment to the T cell lineage. In cortical thymocytes, during early stages of maturation, the CD3 antigen is predominantly present in the cell cytoplasm. In medullary thymocytes, the CD3 antigen is predominantly detected on the cell surface (3, 4).

The majority of T cell neoplasms also expresses CD3, but it is absent from non-T-cell lymphoid malignancies (5). Consistent with the pattern of synthesis of the antigen in normal thymocytes, the earliest site detectable within neoplastic cells is the cell cytoplasm (3).

### Reagent provided

The Anti-CD3 conjugates, C7225, F0818, PR702, R0810 and C7067, 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 µL of conjugate for up to 10<sup>6</sup> leucocytes from normal peripheral blood).

**Isotype:** IgG1, kappa. **Conjugate concentration mg/L:** see label on vial.

Antibody Code	Fluorochrome	Negative Control Code
F0818	FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1)	X0927
R0810	RPE (R-Phycoerythrin)	X0928
PR702	PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein)	X7909
C7067	RPE-Cy5 (R-Phycoerythrin-Cyanine 5)	X0955
C7225	APC (Allophycocyanin)	X0968

### Immunogen

Human infant thymocytes and lymphocytes from a patient with Sézary disease (6).

### Specificity

Anti-CD3, UCHT1, was included in the First and Third International Workshops and Conferences on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Paris 1982, Oxford 1986), and studies by a number of laboratories confirmed its reactivity with the CD3 antigen (7). Anti-CD3, UCHT1, reacts with the 20 kDa ε-chain of CD3 (8).

Anti-CD3 labels T cells in thymus, bone marrow, spleen, tonsil and blood (3-6). It also labels Purkinje cells in the cerebellum, which is the only other cell type known to bind antibodies to CD3 (9).

The antibody is able to induce in vitro proliferation of mature thymocytes and T cells in the presence of interleukin-2 (IL-2) (10).

### Precautions

- For professional users.
- 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.
- As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
- Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
- Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

### 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 Dako Technical Support.

### Staining procedure

- Transfer 100 µL of anticoagulated (EDTA) blood to a 12 mm x 75 mm polystyrene test tube.
- Add 10 µL of fluorochrome-conjugated anti-CD3 and mix gently by using a vortex mixer.
- Incubate the tube in the dark at 2-8 °C for 30 min utes or at room temperature (20-25 °C) for 15-30 mi nutes.
- Add 100 µL of Uti-Lyse™ Reagent A (Dako Code S3325) to the tube and mix gently by using a vortex mixer. Incubate the tube for 10 minutes at room temperature in the dark.
- Add 1 mL of Uti-Lyse™ Reagent B (Dako Code S3325) to the tube and mix gently by using a vortex mixer. Incubate the tube for 10 minutes at room temperature in the dark.
- Centrifuge the tube at 300 x g for 5 minutes. Gently aspirate the supernatant and discard it leaving approximately 50 µL of fluid in the tube.
- Add 2 mL of PBS to the tube and resuspend the cells by using a vortex mixer.
- Repeat step 6.
- Resuspend the cells in an appropriate fluid for flow cytometry, e.g. 0.3 mL PBS.
- Analyse the sample on a flow cytometer or store it in the dark at 2-8 °C until analysis. Samples shoul d be analysed within 24 hours after staining.

Note that fluorochrome conjugates are light sensitive. Reagents should be protected from light during storage and samples should be protected from light during staining procedure and until analysis.

(102361-003)

C7225/F0818/PR702/R0810/C7067/EFG/LHP/2008.09.30 p. 1/4

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

### Procedural notes

Step 1: It is optional to include a suitable positive and negative control sample with each run for reagent and preparation control.

Step 2: The volume of conjugate recommended is a guideline only. Optimal staining conditions may vary depending on specimen and preparation method and should be determined by each individual laboratory.

It is optional to include a control reagent test tube. The control reagent should match the isotype and fluorochrome of the conjugated antibody. Recommended control reagents are shown in the table above

Steps 4 and 5: If another cell-lysing reagent is used, please follow the recommendations for that reagent. Note that if the alternative lysing reagent does not contain fixative, such as Dako EasyLyse™, Code S2364, the PBS in step 9 should contain 1% paraformaldehyde unless the sample is analysed within the time frame recommended for the lysing reagent.

Step 10: Abnormal numbers of cells expressing the target antigen or cells showing aberrant expression levels of the antigen can be expected in some disease states. This may result in an altered pattern of staining. It is important to understand the normal expression pattern of an antigen and its relationship to the expression of other relevant antigens in order to perform appropriate analysis.

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 (11).

## FRANÇAIS

### Utilisation prévue

Pour diagnostic in vitro.

C7225, F0818, PR702, R0810 et C7067 sont destinés pour un usage en cytométrie en flux. CD3 est un antigène restreint à la lignée des lymphocytes-T, et représente un marqueur efficace pour les Lymphocytes-T normaux et néoplasiques. Les anticorps aux CD3 sont considérés comme essentiels lors de l'évaluation initiale des troubles lymphoprolifératifs chroniques et aigus (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.

### Résumé et explication

TCR/CD3 humain est une structure complexe localisée à la surface des lymphocytes. Il se compose des hétérodimères TCRαβ ou TCRγδ et des complexes CD3 associés. Le complexe CD3 se compose de six polypeptides qui ont en général quatre chaînes CD3 transmembranaires γ (gamma), δ (delta), ε (epsilon), et ζ (zeta). Trois dimères différents, γε, δε, et ζζ, constituent le complexe CD3. Le Mr du CD3ε est de 20000 (2).

Le complexe CD3 est essentiel pour la transduction les signaux de reconnaissance des antigènes dans le cytoplasme des lymphocytes-T et dans la régulation de l'expression du complexe TCR au niveau de la surface cellulaire. De plus, il joue un rôle important dans la différenciation des thymocytes (2).

CD3 est détectable en premier dans les thymocytes précoces et son apparence représente un des tous premiers signes de rattachement à la lignée des lymphocytes-T. Dans les thymocytes corticaux, au cours des stades précoces de la maturation, l'antigène CD3 est principalement présent dans le cytoplasme cellulaire. Dans les thymocytes médullaires, l'antigène CD3 est détecté, de façon prédominante, à la surface des cellules (3, 4).

La majorité des néoplasmes à cellules T expriment également le CD3, mais il est absent dans les cellules non T lymphoïdes malignes T (5). Cohérent avec le modèle de synthèse de l'antigène dans les thymocytes normaux, le cytoplasme cellulaire est le site le plus précocement détectable dans les cellules néoplasiques (3).

### Réactif fourni

Les conjugués anti-CD3, C7225, F0818, PR702, R0810 et C7067, ont été obtenus à partir d'un anticorps monoclonal purifié de souris. Les conjugués sont fournis à l'état liquide dans un tampon contenant 1% d'albumine sérique bovine (BSA) et 15 mmol/L de NaN<sub>3</sub>, à 7,2 de pH. Chaque flacon permet de réaliser 100 analyses (10 µl de conjugué pouvant traiter jusqu'à 10<sup>6</sup> de leucocytes provenant de sang périphérique normal).

**Isotype** : IgG1, kappa. **Concentration du conjugué mg/L** : Voir l'étiquette sur le flacon de l'échantillon.

Code de l'anticorps	Fluorochrome	Code du Contrôle négatif
F0818	FITC (Isomère 1 d'isothiocyanate de fluoescéine)	X0927
R0810	RPE (R-Phycoérythrine)	X0928
PR702	PerCP (protéine péridinine chlorophylle)	X7909
C7067	RPE-Cy5 (R-Phycoérythrine-Cyanine 5)	X0955
C7225	APC (Allophycocyanine)	X0968

### Immunogène

Thymocytes de nourrisson humain et lymphocytes provenant d'un patient atteint de la maladie de Sézary (6).

### Spécificité

L'UCHT1, anti-CD3, a été intégré au cours des First and Third International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Paris 1982, Oxford 1986), et les études réalisées par de nombreux laboratoires ont confirmé sa réactivité au CD3 (7). L'UCHT1, anti-CD3, montre une réaction à la chaîne ε de 20kDa du CD3 (8).

L'anti-CD3 marque les cellules T du thymus, de la moelle osseuse, des amygdales et du sang (3-6). Il marque également les cellules de Purkinje dans le cervelet, qui sont les seules autres cellules connues pour lier les anticorps au CD3 (9).

L'anticorps est capable d'induire la prolifération in vitro de thymocytes mûrs et de cellules T en présence d'interleukine-2 (IL-2) (10).

### 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 accumulation d'azides métallisés dans la tuyauterie.
- Comme pour tout dérivé biologique dangereux à manipuler, une précision s'impose.
- Porter un équipement de protection individuel approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.
- Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.

### Conservation

Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'y a aucun signe évident indiquant l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par un changement des procédures du laboratoire, et en cas de suspicion d'un problème lié à l'anticorps, contacter l'assistance technique de Dako.

### Procédure d'immunomarquage

- Transférer 100 µl de sang non coagulé (EDTA) dans un tube à essai en polystyrène de 12 mm x 75 mm.
- Ajouter 10 µl d'anticorps anti-CD3 conjugué à un fluorochrome et mélanger doucement à l'aide d'un mélangeur vortex.
- Incuber le tube dans l'obscurité entre 2 et 8 °C pen dant 30 minutes ou à température ambiante (20–25 °C) pendant 15 à 30 minutes.
- Ajouter 100 µL de Réactif A Uti-Lyse™ (réf. Dako S3325) au tube et mélanger doucement à l'aide d'un vortex. Incuber le tube dans l'obscurité pendant 10 minutes à température ambiante.

(102361-003)

C7225/F0818/PR702/R0810/C7067/EFG/LHP/2008.09.30 p. 2/4

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

- Ajouter 1 mL de Réactif B Uti-Lyse™ (réf. Dako S3325) au tube et mélanger doucement à l'aide d'un vortex. Incuber le tube dans l'obscurité pendant 10 minutes à température ambiante.
- Centrifuger le tube à 300 g pendant 5 minutes. Aspirer doucement le surnageant et l'éliminer en laissant environ 50 µL de liquide dans le tube.
- Ajouter 2 mL de PBS au tube et remettre les cellules en suspension à l'aide d'un vortex.
- Répéter l'étape 6.
- Remettre les cellules en suspension dans un liquide approprié pour la cytométrie en flux, ex. : 0,3 mL de PBS.
- Analyser l'échantillon sur un cytomètre en flux ou conserver à l'abri de la lumière entre 2 et 8 °C jusqu'à l'analyse. Analyser les échantillons dans les 24 heures qui suivent la coloration.

Remarquer que les conjugués fluorochromes sont photosensibles, les échantillons doivent donc être protégés de la lumière pendant la procédure de coloration et jusqu'à l'analyse.

**Remarques sur la procédure**

Étape 1 : facultatif : inclure un échantillon de contrôle positif et négatif approprié dans chaque cycle comme contrôle de réactif et de préparation.

Étape 2 : le volume de conjugué n'est donné qu'à titre indicatif. Les conditions de coloration optimales peuvent varier en fonction de l'échantillon et de la méthode de préparation, et doivent être déterminées par chaque laboratoire individuellement.

Un tube à essai de réactif de contrôle est facultatif. Le réactif de contrôle doit correspondre à l'isotope et au fluorochrome du conjugué d'anticorps. Les réactifs de contrôle recommandés sont indiqués dans le tableau ci-dessus.

Étapes 4 et 5 : si un autre réactif de lyse de cellule est utilisé, suivre les recommandations fournies avec ce réactif. Noter que si l'autre réactif de lyse ne contient pas de fixateur, comme le Dako EasyLyse™, réf. S2364, le PBS de l'étape 9 doit contenir 1 % de paraformaldéhyde sauf si l'échantillon est analysé dans les délais recommandés pour le réactif de lyse.

Étape 10 : pour certaines maladies, on peut s'attendre à obtenir des anomalies du nombre de cellules exprimant l'antigène cible ou des niveaux aberrants d'expression de l'antigène. Cela peut modifier le schéma de coloration. Afin d'effectuer des analyses appropriées, il est important de comprendre le profil d'expression normal de l'antigène et ses relations avec l'expression d'autres antigènes pertinents.

Il est recommandé d'inclure un échantillon de contrôle positif et négatif approprié dans chaque cycle comme contrôle de réactif et de préparation. Remarquer que les conjugués fluorochromes sont photosensibles, les échantillons doivent donc être protégés de la lumière pendant la procédure de marquage et jusqu'à l'analyse.

**Limitations spécifiques du produit**

Il a été observé que les conjugués RPE-Cy5 pouvaient se lier aux monocytes, ce qui se traduit par un marquage qui n'est pas spécifique (11).

<p>DEUTSCH</p>

**Verwendungszweck**

Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.

C7225, F0818, PR702, R0810 und C7067 sind für den durchflusszytometrischen Gebrauch bestimmt. CD3 ist ein Antigen, welches ausschließlich auf die Pan-T-Zellreihe beschränkt ist und als ein wertvoller Marker der normalen und neoplastischen T-Zellen dient. Antikörper gegen CD3 werden als ausschlaggebend für die initiale Beurteilung von akuten und chronischen lymphoproliferativen Entgleisungen angesehen (1). Die Befunde müssen unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren von einem zertifizierten Facharzt interpretiert werden.

**Zusammenfassung und Erklärung**

Humanes TCR/CD3 bildet eine komplexe Struktur auf der Oberfläche der Lymphozyten und besteht aus einem TCRαβ-oder TCRγδ-Heterodimer und dem assoziierten CD3-Komplex. Der CD3-Komplex besteht aus sechs Polypeptiden mit normalerweise vier unterschiedlichen transmembranischen CD3-Ketten: γ (Gamma), δ (Delta), ε (Epsilon) und ζ (Zeta). Drei verschiedene Dimere, γε, δε, und ζζ, bilden den CD3-Komplex. Die relative Molekülmasse (M<sub>r</sub>) von CD3ε beträgt 20 000 (2).

Der CD3-Komplex ist entscheidend für die Transduktion von Antigen-Erkennungssignalen in das Zytoplasma der T-Zellen und für die Regulierung der Expression des TCR-Komplexes auf der Zelloberfläche. Er spielt überdies eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der Thymozyten (2) .

CD3 ist bereits in den Frühstadien der Thymozyten nachweisbar und sein Erscheinen repräsentiert wahrscheinlich eines der ersten Zeichen des Commitment für die T-Zelllinie. In den frühen Reifungsstadien liegt das CD3-Antigen vornehmlich im Zytoplasma der kortikalen Thymozyten vor. In den medullären Thymozyten wird das CD3-Antigen vor allem an der Zelloberfläche nachgewiesen. (3, 4) .

Die Mehrzahl der T-Zell-Neoplasmen exprimiert CD3, es fehlt aber bei den nicht-T-Zell-Lymphomen (5). Im Einklang mit dem Synthesemuster dieses Antigens in den normalen Thymozyten ist das Zytoplasma der erste Ort des Nachweises in neoplastischen Zellen (3).

**Geliefertes Reagenz**

Die Anti-CD3-Konjugate C7225, F0818, PR702, R0810 und C7067 stammen von einem gereinigten monoklonalen Maus-Antikörper. Die Konjugate werden in einer gepufferten Lösung mit 1% bovinem Serumalbumin (BSA) und 15 mmol/L NaN<sub>3</sub>, pH 7,2, geliefert. Jedes Fläschchen ist für 100 Tests ausreichend (10 µL des Konjugats für bis zu 10<sup>6</sup> Leukozyten aus normalem peripherem Blut).

**Isotyp**: IgG1, Kappa. **Konjugat-Konzentration mg/L**: Siehe Produktetikett.

Antikörper Code	Fluorochrom	Negativkontrolle Code
F0818	FITC (Fluoresceinisothiocyanat-Isomer 1)	X0927
R0810	RPE (R-Phycoerythrin)	X0928
PR702	PerCP (Peridinin-Chlorophyll-Protein)	X7909
C7067	RPE-Cy5 (R-Phycoerythrin-Zyanin 5)	X0955
C7225	APC (Allophycocyainin)	X0968

**Immunogen**

Menschliche Säuglings-Thymozyten und Lymphozyten von Patienten mit Sézary-Syndrom (6) .

**Spezifität**

Anti-CD3, UCHT1 wurde im Kontext des First and Third International Workshops and Conferences on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Paris 1982, Oxford 1986) aufgenommen und Studien in einigen Laboratorien bestätigten seine Reaktivität mit dem CD3-Antigen (7). Anti-CD3, UCHT1 reagiert mit der 20 kDa ε-Kette des CD3 (8).

Anti-CD3 markiert T-Zellen im Thymus, im Knochenmark, in der Milz, in den Tonsillen und im Blut (3-6). Es markiert auch die Purkinje-Zellen im Kleinhirn - die einzige bekannte zusätzliche Zellart, welche Antikörper gegen CD3 bindet (9).

Der Antikörper ist befähigt, in vitro die Proliferation von reifen Thymozyten und T-Zellen in Anwesenheit von Interleukin-2 (IL-2) einzuleiten (10).

**Vorsichtsmaßnahmen**

- Für Fachpersonal.
- Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN<sub>3</sub>), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Natriumazid kann auch in als ungefährlich eingestufen Konzentrationen mit Blei- und Kupferrohren reagieren und hochemplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Metallazidansammlungen in den Leitungen vorzubeugen.
- Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.
- Geeignete Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
- Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.

**Lagerung**

Bei 2–8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Fläschchen aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien nicht entsprechend den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen die Bedingungen vom Anwender geprüft werden. Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für eine eventuelle

(102361-003)

C7225/F0818/PR702/R0810/C7067/EFG/LHP/2008.09.30 p. 3/4

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

Produktinstabilität. Positiv- und Negativkontrollen sollten daher zur gleichen Zeit wie die Patientenproben getestet werden. Falls eine unerwartete Färbung auftritt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Antikörper hindeutet, ist der technische Kundendienst von Dako zu verständigen.

**Färbeverfahren**

- 100 µL antikoaguliertes (EDTA) Blut in ein 12 mm x 75 mm Polystyrol-Teströhrchen geben.
- 10 µL Fluorochrom-konjugiertes Anti-CD3 dazugeben und mit einem Vortexer vorsichtig mischen.
- 30 Minuten im Dunkeln bei 2–8 °C oder 15–30 Minut en bei Raumtemperatur (20–25 °C) inkubieren.
- 100 µL Uti-Lyse™ Reagent A (Dako Code S3325) dazugeben und mit einem Vortexer vorsichtig mischen. Teströhrchen 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren.
- 1 µL Uti-Lyse™ Reagent B (Dako Code S3325) dazugeben und mit einem Vortexer vorsichtig mischen. Teströhrchen 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren.
- 5 Minuten bei 300 x g zentrifugieren. Den Überstand vorsichtig absaugen und entsorgen, dabei etwa 50 µL Flüssigkeit übriglassen.
- 2 mL PBS dazugeben und die Zellen mit einem Vortexer resuspendieren.
- Schritt 6 wiederholen.
- Zellen in einer geeigneten Flüssigkeit, z.B. 0,3 mL PBS, für die Durchflusszytometrie resuspendieren.
- Die Probe auf einem Durchflusszytometer analysieren oder bis zur Analyse bei 2–8 °C im Dunkeln aufbewa hren. Die Proben innerhalb von 24 Stunden nach dem Färben analysieren.

Es ist zu beachten, dass Fluorochrom-Konjugate lichtempfindlich sind. Während der Lagerung sollten die Reagenzien vor Licht geschützt aufbewahrt und während des Färbeverfahrens und bis zur Analyse sollten die Proben vor Licht geschützt werden.

**Hinweise**

Schritt 1: Als Kontrolle für das Reagenz und das Präparat kann bei jedem Durchlauf eine geeignete positive und negative Kontrollprobe mitlaufen.

Schritt 2: Die empfohlene Konjugatmenge gilt nur als Richtlinie. Optimale Färbungsbedingungen können je nach Probe und Vorbereitungsverfahren unterschiedlich sein und sollten vom jeweiligen Labor selbst bestimmt werden.

Es kann auch ein Teströhrchen mit einem Kontrollreagenz mitgefärbt werden. Das Kontrollreagenz sollte den Isotypen und Fluorochromen des konjugierten Antikörpers entsprechen. Empfohlene Kontrollreagenzien sind in der Tabelle oben angegeben.
















Schritte 4 und 5: Wird ein anderes Reagenz für die Zelllysierung verwendet, bitte die Empfehlungen für dieses Reagenz befolgen. Falls dieses alternative Lysierungsreagenz kein Fixiermittel wie Dako EasyLyse™, Code S2364 enthält, sollte die PBS in Schritt 9 1 % Paraformaldehyd enthalten, es sei denn, die Probe wird innerhalb des für das Lysereagenz empfohlenen Zeitrahmens analysiert.

Schritt 10: Bei einigen Krankheitsbildern sind bei den das Zielantigen exprimierenden Zellen anomale Mengen oder abweichende Antigen-Expressionsgrade zu erwarten. Dies kann zu einem veränderten Färbemuster führen. Um entsprechende Analysen durchführen zu können, ist es wichtig, das normale Expressionsmuster der Antigene und deren Verhältnis zur Expression anderer relevanter Antigene zu kennen.

Es wird empfohlen, eine geeignete Positiv- und Negativkontrolle für jede Durchführung der Reagenz- und Präparationsprüfung mitzuführen. Es ist zu beachten, dass Fluoreszenzkonjugate lichtempfindlich sind und dass die Proben während des Färbevorgangs 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 (11).

<p>References/ Références/ Literatur</p>												
<ol style="list-style-type: none"><li>Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH. Optimal number of reagents required to evaluate hematologyphoid neoplasias: results of an international consensus meeting. Cytometry 2001;46:23-7.</li> <li>Saito T, Yamazaki T. TC4. CD3 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editors. Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference; 1996 Nov 10-14; Kobe, Japan. New York, London: Garland Publishing Inc.; 1997. p. 44-48.</li> <li>Campana D, Thompson JS, Amlot P, Brown S, Janossy G. The cytoplasmic expression of CD3 antigens in normal and malignant cells of the T lymphoid lineage. J Immunol 1987;138:648-55.</li> <li>Swerdlow SH, Angermeier PA, Hartman AL. Intrathymic ontogeny of the human T cell receptor associated CD3 (T3) antigen. Lab Invest 1988;58:421-7.</li> <li>Erber WN, Mynheer LC, Mason DY. APAAP labelling of blood and bone-marrow samples for phenotyping leukaemia. Lancet 1986;i:761-5</li> <li>Beverley PC, Callard RE. Distinctive functional characteristics of human "T" lymphocytes defined by E rosetting or a monoclonal anti-T cell antibody. Eur J Immunol 1981;11:329-34.</li> <li>McMichael AJ, Gotch FM. T-cell antigens: new and previously defined clusters. In: McMichael AJ, Beverley PCL, Cobbold S, Crumpton MJ, Gilks W, Gotch FM, et al., editors. Leucocyte typing III. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 3rd International Workshop and Conference; 1986 Sept 21-26; Oxford, England. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1987. p.31-62.</li> <li>Tunnacliffe A, Olsson C, Traunecker A, Krissansen GW, Karjalainen K, de la Hera A. T3.2. The majority of CD3 epitopes are conferred by the epsilon chain. 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. 295-6.</li> <li>Garson JA, Beverley PC, Coakham HB, Harper EI. Monoclonal antibodies against human T lymphocytes label Purkinje neurones of many species. Nature 1982;298:375-7.</li> <li>Denning SM, Tuck DT, Singer KH, Haynes BF. T2.11. Activation of human thymocytes via CD3 and CD2 molecules. In: McMichael AJ, Beverley PCL, Cobbold S, Crumpton MJ, Gilks W, Gotch FM et al, editor. Leukocyte Typing III. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 3rd International Workshop and Conference. Oxford-New York-Tokyo: Oxford University Press; 1987. p. 144-7.</li> <li>van Vugt MJ, van den Herik-Oudijk IE, van de Winkel JGJ. Binding of PE-CY5 conjugates to the human high-affinity receptor for IgG (CD64). Blood 1996;88:2358-61.</li></ol>												
<p>Explanation of symbols/ Légende des symboles/ Erläuterung der Symbole</p>												
<table> <tbody><tr> <td><b>REF</b></td> <td>Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer</td> <td> <p>Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich</p></td> <td> <p>Use by Utiliser jusque Verwendbar bis</p></td></tr> <tr> <td><b>IVD</b></td> <td>In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-Vitro-Diagnostikum</td> <td> <p>Keep away from sunlight (consult storage section) Conservser à l'écart du soleil (se reporter à la section conservation) Lichtgeschützt lagern (siehe Abschnitt zur Lagerung)</p></td> <td> <p>Manufacturer Fabricant Hersteller</p></td></tr> <tr> <td></td> <td>Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten</td> <td><b>LOT</b></td> <td>Batch code Code du lot Chargenbezeichnung</td></tr> </tbody></table>	<b>REF</b>	Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	 <p>Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich</p>	 <p>Use by Utiliser jusque Verwendbar bis</p>	<b>IVD</b>	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-Vitro-Diagnostikum	 <p>Keep away from sunlight (consult storage section) Conservser à l'écart du soleil (se reporter à la section conservation) Lichtgeschützt lagern (siehe Abschnitt zur Lagerung)</p>	 <p>Manufacturer Fabricant Hersteller</p>		Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	<b>LOT</b>	Batch code Code du lot Chargenbezeichnung
<b>REF</b>	Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	 <p>Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich</p>	 <p>Use by Utiliser jusque Verwendbar bis</p>									
<b>IVD</b>	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-Vitro-Diagnostikum	 <p>Keep away from sunlight (consult storage section) Conservser à l'écart du soleil (se reporter à la section conservation) Lichtgeschützt lagern (siehe Abschnitt zur Lagerung)</p>	 <p>Manufacturer Fabricant Hersteller</p>									
	Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	<b>LOT</b>	Batch code Code du lot Chargenbezeichnung									

(102361-003)	C7225/F0818/PR702/R0810/C7067/EFG/LHP/2008.09.30 p. 4/4
Dako Denmark A/S   Produktionsvej 42   DK-2600 Glostrup   Denmark   Tel. +45 44 85 95 00   Fax +45 44 85 95 95   CVR No. 33 21 13 17	