

Monoclonal Mouse Anti-Human CD45, Leucocyte Common Antigen, Clone T29/33

Code No./ Code/ Code-Nr. **C 7230 APC-Conjugated**
 Code No./ Code/ Code-Nr. **F 0861 FITC-Conjugated**
 Code No./ Code/ Code-Nr. **R 7087 RPE-Conjugated**
 Code No./ Code/ Code-Nr. **C 7099 RPE-Cy5-Conjugated**

ENGLISH

Intended use For in vitro diagnostic use.
 C 7230, F 0861, R 7087 and C 7099 are intended for use in flow cytometry. CD45 is one of the most abundant leucocyte cell surface glycoproteins and is expressed exclusively on cells of the haematopoietic system and their progenitors (1). In flow cytometry, anti-CD45, together with a panel of other antibodies, is considered essential for the initial evaluation of chronic lymphoproliferative disorders and acute leukaemias (2). Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Introduction CD45 is a single-chain type I transmembrane protein typically expressed at high levels on all nucleated cells of haematopoietic origin (3). Thus, CD45 is present on T and B-lymphocytes, granulocytes, monocytes and macrophages, with the exception of maturing erythrocytes and megakaryocytes (1). There are five different isoforms of CD45, based on differential splicing of exons 4, 5 and 6, named ABC, AB, BC, B and 0. The Mr of the isoforms ranges from 220 000 for the ABC isoform to 180 000 for the 0 isoform. All the CD45 isoforms share the same intracellular segment which has been shown to have tyrosine phosphatase activity and which has a functional role in lymphocyte activation and differentiation (3).
 Antibodies that recognize all five isoforms are known as anti-CD45 (3).

Reagent provided The Anti-CD45 conjugates, C 7230 F 0861, R 7087 and C 7099, 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 NaN₃, pH 7.2. Each vial contains 100 tests (10 µL of conjugate for up to 10⁶ 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 0861	FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1)	X 0927
R 7087	RPE (R-Phycoerythrin)	X 0928
C 7099	RPE-Cy5 (R-Phycoerythrin-Cyanine 5)	X 0955
C 7230	APC (Allophycocyanin)	X 0968

Specificity Anti-CD45, T29/33, was included in the Third and Fourth International Workshops and Conferences on Human Leucocyte Differentiation Antigens. At the Third Workshop, the antibody was clustered as a CD45 antibody reacting with all the known isotypes of the CD45 family, also called the leucocyte common antigen family (4). At the Fourth Workshop, the expression of CD45 in a range of haematopoietic cell lines, and the lack of CD45 in non-haematopoietic cell lines, were demonstrated. Notably, CD45 was expressed at a very low level in myeloma cells and in the U-266 plasmacytoid cell line (5).

Precautions

- For professional users.
- This product contains sodium azide (NaN₃), 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.

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 µL cell suspension with 10 µL of the fluorochrome-conjugated Anti-CD45.
- 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.

(104339-001) C 7230/F 0861/R 7087/C 7099/EFG/KIM/01.07.02 p. 1/4

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.
 Les anticorps C 7230, F 0861, R 7087 et C 7099 sont destinés pour un usage en cytométrie en flux. CD45 est l'une des plus abondantes des glycoprotéines de surface cellulaire leucocytaire et qui est exprimée exclusivement sur les cellules du système hématopoïétique et leurs progéniteurs (1). En cytométrie en flux, l'anticorps anti-CD45, associé à un panel d'autres anticorps, constitue un élément essentiel pour l'évaluation initiale des troubles lymphoprolifératifs chroniques et des leucémies aiguës (2). 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.

Introduction Le CD45 est une protéine transmembranaire de type I, à chaîne unique, exprimée à des niveaux élevés sur toutes les cellules nucléées d'origine hématopoïétique (3). Par conséquent, le CD45 est présent sur les lymphocytes T et B, les granulocytes, les monocytes et les macrophages, à l'exception des érythrocytes en cours de maturation et des mégacaryocytes (1). Il existe cinq isoformes différentes du CD45, basées sur l'épissage différentiel des exons 4, 5 et 6, appelées ABC, AB, BC, B et 0. Le MR des isoformes va de 200 000 pour l'isoforme ABC à 180 000 pour l'isoforme 0. Toutes les isoformes du CD45 partagent le même segment intracellulaire au niveau duquel a été montré une activité tyrosine phosphatase et qui joue un rôle fonctionnel dans l'activation et la différenciation des lymphocytes (3).
 Les anticorps qui reconnaissent les cinq isoformes sont appelés anti-CD45 (3).

Réactif fourni Les conjugués anti-CD45, C 7230, F 0861, R 7087 et C 7099, 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 NaN₃, à 7,2 de pH. Chaque flacon contient 100 tests (10 µL de conjugué pouvant traiter jusqu'à 10⁶ de leucocytes provenant de sang périphérique normal humain)

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

Numéro du code de l'anticorps	Fluorochrome	Numéro du code du contrôle négatif
F 0861	FITC (Isomère 1 d'isothiocyanate de fluorescéine)	X 0927
R 7087	RPE (R-Phycoérythrine)	X 0928
C 7099	RPE-Cy5 (R-Phycoérythrine-Cyanine 5)	X 0955
C 7230	APC (Allophycocyanine)	X 0968

Spécificité Anti-CD45, T29/33, a été inclus dans les Third and Fourth International Workshops and Conferences on Human Leucocyte Differentiation Antigens. Au cours du Troisième Colloque, l'anticorps a été déterminé comme un anticorps CD45 montrant une réaction à tous les isotypes connus de la famille de CD45, également appelée famille de l'antigène leucocytaire commun (4). Au cours du Quatrième Colloque, on a démontré l'expression du CD45 dans une variété de lignées cellulaires hématopoïétiques ainsi que l'absence de CD45 dans les lignées cellulaires non hématopoïétiques. Le CD45 a été exprimé notamment à un très faible niveau dans les cellules de myélome et dans la lignée cellulaire plasmacytoïde U-266(5).

Précautions d'emploi

- Pour utilisateurs professionnels.
- Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN₃), 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.

Stockage Conserver à l'obscurité entre 2° et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption mentionnée sur le flacon. Si les réactifs ont été conservés dans d'autres conditions que celles spécifiées, ces 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

- Prélever le sang veineux dans un tube à essais contenant un anticoagulant.
- Isoler les cellules mononucléaires par centrifugation dans un milieu de séparation. Sinon, lyser les globules rouges après l'étape 6.
- Laver les cellules mononucléaires deux fois avec du RPMI 1640 ou du PBS, à 7,2-7,4 de pH.
- Mélanger 100 µL de la suspension de cellules avec 10 µL de conjugué fluorochrome Anti-CD45.
- Utiliser un anticorps monoclonal non-réactif du même isotype, conjugué au même fluorochrome, en tant que contrôle négatif (voir tableau).
- Laisser incubé à l'obscurité, à 4 °C, pendant 30 minutes.

(104339-001) C 7230/F 0861/R 7087/C 7099/EFG/KIM/01.07.02 p. 2/4

- Laver deux fois avec du PBS contenant 2% de BSA. Remettre les cellules en suspension dans un liquide adapté à la cytométrie en flux, par exemple 0,3 ml de paraformaldéhyde (fixateur) dans du PBS 0,01 mol/L, à pH 7,4.
- Analyser sur un cytomètre en flux.

Il est recommandé d'inclure un échantillon de contrôle positif et négatif appropriés à chacune des exécutions pour le contrôle du réactif et de la préparation. Remarque que les conjugués fluorochromes sont photosensibles, les échantillons doivent donc être protégés de la lumière pendant la procédure d'immunomarquage 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 (6).

DEUTSCH

Zweckbestimmung Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.

C 7230, F 0861, R 7087 und C 7099 sind für den durchflusszytometrischen Gebrauch bestimmt. CD45 ist eines der am weitesten verbreiteten Glykoproteine auf der Leukozytenoberfläche und wird ausschließlich auf den Zellen des hämatopoetischen Systems und deren Vorläufern exprimiert (1). In der Flowzytometrie wird Anti-CD45, zusammen mit einer Gruppe weiterer Antikörper, als ausschlaggebend für die initiale Beurteilung chronischer lymphoproliferativer Erkrankungen und akuter Leukämien angesehen (2). Die Befunde müssen unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren von einem erfahrenen Pathologen interpretiert werden.

Introduction CD45 ist ein Transmembranprotein vom Typ I, bestehend aus einer einzigen Kette, und wird von allen kernhaltigen Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert (3). Als solches ist CD45 auf T- und B-Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten und Makrophagen zu finden, nicht jedoch bei heranreifenden Erythrozyten und Megakaryozyten (1). Es sind fünf verschiedene Isoformen des CD45 bekannt, basierend auf unterschiedlichem Spleißen der Exone 4, 5 und 6, und ihre Bezeichnung lautet ABC, AB, BC, B und 0. Die relative Molekülmasse (M_r) der Isoformen liegt zwischen 220000 für die ABC-Isoform und 180000 für die 0-Isoform. Allen CD45-Isoformen ist das gleiche intrazelluläre Segment mit nachgewiesener Tyrosinphosphatase-Aktivität gemeinsam. Diesem Segment kommt eine funktionale Rolle bei der Aktivierung und Differenzierung der Lymphozyten zu (3).

Antikörper, welche alle fünf Isoformen erkennen, werden Anti-CD45 genannt (3).

Delivered Reagent Die Anti-CD45-Konjugate C7230, F 0861, R 7087 und C 7099 stammen von einem gereinigten monoklonalen Maus-Antikörper. Die Konjugate werden in einer gepufferten Lösung mit 1% bovinem Serumalbumin (BSA) und 15 mmol/L NaN_3 , pH 7,2, geliefert. Jedes Fläschchen ist ausreichend für 100 Tests (10 μL des Konjugats sind für bis 10^6 Leukozyten aus normalem, menschlichem peripheren Blut ausreichend).

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

Antikörper Code-Nr.	Fluorochrom	Negativkontrolle Code-Nr.
F 0861	FITC (Fluoresceinisothiocyanat-Isomer 1)	X 0927
R 7087	RPE (R-Phycoerythrin)	X 0928
C 7099	RPE-Cy5 (R-Phycoerythrin-Zyanin 5)	X 0955
C 7230	APC (Allophycocyanin)	X 0968

Spezifität Anti-CD45, T29/33, wurde im Kontext der Third and Fourth International Workshops and Conferences on Human Leucocyte Differentiation Antigens aufgenommen. Im Dritten Workshop wurde der Antikörper als ein CD45-Antikörper gruppiert, der mit **allen** bekannten Isotypen der CD45-Familie, auch als die leucocyte common antigen -Familie bezeichnet, reagiert (4). Beim Vierten Workshop wurde die Expression von CD45 in einer Reihe hämatopoetischer Zelllinien und sein Fehlen in nicht hämatopoetischen Zellreihen aufgezeigt. Insbesondere zeigte sich die CD45-Expression in Myelomzellen und in der U-266 plasmazytoiden Zelllinie auf einem sehr niedrigen Niveau (5).

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Für geschultes Fachpersonal.
- Dieses Produkt enthält Natriumazid (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-Anreicherungen 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. Sollten die Reagenzien unter anderen Bedingungen als den beschriebenen aufbewahrt worden sein, 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 Anfärbung 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

- Venöses Blut in ein Antikoagulans enthaltendes Probenröhrchen gewinnen.
- Mononukleäre Zellen durch Zentrifugieren in einem Abtrennungsmidium isolieren Alternativ hierzu können die Erythrozyten im Anschluss an Schritt 6 aufgelöst werden.
- Mononukleäre Zellen zweimal mit RPMI 1640 oder mit PBS, pH 7,2 – 7,4 waschen.

- 100 μl der Zellsuspension mit 10 μl des fluorochromkonjugierten Anti-CD45 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 Fluoreszenzkonjugate lichtempfindlich sind und dass die Proben während des Färbeprozesses 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 AS-Y, Cooper K, Leong FJW-M. Manual of diagnostic antibodies for immunohistology. London: Oxford University Press; 1999. p. 95-8.
- Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH. Optimal number of reagents required to evaluate hematology neoplasias: results of an international consensus meeting. Cytometry 2001;46:23-7.
- Sewell WA, Cooley MA, Hegen M. NL6. CD45 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. 499-502.
- Cobbold S, Hale G, Waldmann H. Non-lineage, LFA-1, and leucocyte common 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 Sep 21-26; Oxford, England. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1987. p. 788-803.
- Schwinger R. N7. Cluster report: CD45/CD45R. 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. 628-34.
- 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.

Explanation of symbols/ Légende des symboles/ Erläuterung der Symbole

 Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	 Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	 Use by Utiliser jusque Verwendbar bis
 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	 Batch code Code du Lot Chargenbezeichnung	