

Polyclonal Rabbit Anti-Human Lambda Light Chains/FITC, Rabbit F(ab')₂
Polyclonal Rabbit Anti-Human Lambda Light Chains/RPE, Rabbit F(ab')₂

Code F0435
Code R0437

ENGLISH

Intended use

For in vitro diagnostic use.

F0435 and R0437 are intended for use in flow cytometry. In flow cytometry, antibodies to lambda light chains are useful for the demonstration of cell surface lambda light chains, and, thus, for the identification of monoclonality (clonal excess) in B-cell lymphoproliferative disorders together with a panel of other antibodies (1-4). Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a certified professional.

Introduction

Most B cells, with the exception of pre-B progenitors and pre-B cells, and mature plasma cells, express immunoglobulin on their surface. Each cell expresses only one light chain type. In normal peripheral blood and lymph nodes, there is a mixture of kappa-positive and lambda-positive cells, with two-thirds of the cells expressing kappa and one-third expressing lambda (5). Since lymphoid neoplasms are usually clonal expansions of a single cell, malignant cells uniformly express the same light chain isotype. Neoplastic B-cell chronic lymphoproliferative disorders can frequently be suspected on the basis of the demonstration of a marked predominance of cells expressing a single light chain type (4). Rare cases of kappa-negative or lambda-negative B-cell non-Hodgkin's lymphoma have been described (4, 6).

Reagent provided

The Anti-Lambda Light Chains conjugates, F0435 and R0437, have been produced from a F(ab')₂ fragment of affinity-isolated polyclonal rabbit antibody. The conjugates are provided in liquid form in buffer containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 15 mmol/L NaN₃, pH 7.2. Use 10 µL of the product for staining of up to 10⁶ leucocytes from normal human peripheral blood.

Conjugate concentration g/L: See label on vial.

Antibody Code	Fluorochrome	Ig Reagent Code
F0435	FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1)	X0929
R0437	RPE (R-Phycoerythrin)	X0930

Preparation

1. The antibody used for FITC and RPE conjugation has been solid-phase absorbed with human plasma proteins to remove traces of contaminating antibodies.
2. The absorbed antibody has been further purified by affinity chromatography on a column with immobilized human lambda light chains.
3. The affinity-isolated antibody has then been degraded with pepsin and the F(ab')₂ fragment isolated by gel filtration.
4. Finally, the F(ab')₂ fragment has been conjugated with fluorescein isothiocyanate isomer 1 or R-phycoerythrin.

Immunogen

Polyclonal immunoglobulin chains of lambda type isolated from a pool of human sera.

Specificity

Anti-Lambda Light Chains reacts with free lambda chains as well as lambda chains in intact immunoglobulin molecules. The specificity has been ascertained as described below. To obtain maximum sensitivity, the crossed immunoelectrophoresis specificity test was performed prior to affinity purification and pepsin degradation.

Crossed immunoelectrophoresis: Only lambda-related precipitates appear when the antibody is run against human plasma. Staining: Coomassie Brilliant Blue.

Flow cytometry: When Anti-Lambda Light Chains is applied as described in the staining procedure in combination with Anti-CD19/RPE, HD37 or Anti-CD19/FITC, HD37, on lysed human whole blood, a specific staining of a part of the CD19-positive B lymphocytes is seen corresponding to the expected range of lambda light chain expression. Flow cytometric analysis of single suspensions from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples demonstrated that Anti-Lambda Light Chains labels reactive hyperplastic lymph nodes (10/10 cases) (5). In non-Hodgkin's lymphomas, the antibody labeled 5/10 cases. The remaining cases were positive for kappa light chains (4/10 cases) or showed no expression of light chains (1/10 case) (4).

Flow cytometric analysis of peripheral blood lymphocytes demonstrated that Anti-Lambda Light Chains labels a proportion of B-cell chronic lymphocytic leukemias. Thus, in one study of 121 cases (2), 17 were positive for lambda. In another study of 165 cases (3), 68 were positive for lambda.

Precautions

1. For professional users.
2. 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.
3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
5. 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. During storage a small precipitate may occasionally develop causing a fine granular non-specific staining. By a simple filtration (0.22 µm cellulose acetate filter), the original high quality of the conjugate will be restored. Conjugates should not be stored in diluted form. 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 Services.

Procedural note

Before staining samples of peripheral blood, the mononuclear cells must be isolated by centrifugation on a separation medium or the blood sample washed to remove the soluble serum proteins. As human monocytes bind serum immunoglobulins via their surface Fc receptors, these cells should be removed by depletion or identified.

Staining procedure

1. Collect venous blood into a test tube containing an anticoagulant.
2. Transfer 100 µL of the anticoagulated blood into the test tube.
3. Add 2 mL of 0.01 mol/L PBS, pH 7.4. Mix gently by using a vortex mixer.
4. Centrifuge at 300 x g for 5 minutes, then aspirate the supernatant, leaving approximately 50 µL of fluid.
5. Repeat steps 3 and 4 two more times.
6. Add 10 µL rabbit immunoglobulin fraction, Code X0903, for blocking. Mix gently by using a vortex mixer and incubate in the dark at 37 °C for 30 minutes.
7. Add 10 µL of fluorochrome-conjugated Anti-Lambda Light Chains. Mix gently.
8. Use a non-reactive F(ab')₂ fragment of rabbit immunoglobulin, and conjugated with the same fluorochrome, as a negative control (see table).
9. Incubate in the dark at 4 °C for 30 minutes.
10. Add 1-2 mL of erythrocyte-lysing reagent to each tube and mix gently. Follow the reagent manufacturer's recommendations for time and temperature of incubation.
11. Centrifuge at 300 x g for 5 minutes.

12. Aspirate the supernatant, leaving approximately 50 µL of fluid.
13. Add 2 mL 0.01 mol/L PBS, pH 7.4. Mix gently by using a vortex mixer.
14. Repeat steps 11 and 12.
15. Resuspend pellet in an appropriate fluid for flow cytometry, e.g. 0.3 mL 1% paraformaldehyde (fixative) in 0.01 mol/L PBS, pH 7.4.
16. 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.

FRANÇAIS

Intérêt
Pour diagnostic *in vitro*.

F0435 et R0437 sont destinés pour un usage en cytométrie en flux. En cytométrie de flux, les anticorps aux chaînes légères lambda, ainsi qu’une gamme d’autres anticorps, sont utiles pour la détermination des chaînes légères lambda de surface cellulaire, et, ainsi, à l’identification de la monoclonalité (excès clonal) dans les troubles lymphoprolifératifs des cellules B (1-4). L’interprétation des résultats doit être entreprise par un professionnel certifié dans le contexte de l’historique clinique du patient et des autres examens diagnostics.

Introduction
La plupart des lymphocytes B (à l’exception des cellules souches pré-B et des cellules pré-B) et des plasmocytes matures, expriment de l’immunoglobuline à leur surface. Chaque cellule n’exprime qu’un type de chaîne légère. Dans le sang périphérique normal et dans les ganglions lymphatiques, un mélange est exprimé de cellules positives à kappa et à lambda, dont les deux-tiers expriment une chaîne légère kappa et un tiers exprime une chaîne légère lambda (5). Les néoplasmes lymphoïdes étant en général des expansions clonales d’une cellule unique, les cellules tumorales expriment toujours le même isotype de chaîne légère. Le syndrome lymphoprolifératif chronique néoplasique du lymphocyte B peut souvent être détecté par la détermination d’une prédominance marquée de cellules exprimant un seul type de chaîne légère (4). Des cas rares de lymphomes non hodgkiniens à lymphocyte B négatif à lambda ou négatif à kappa ont été rapportés (4, 6).

Réactif fourni
Les conjugués de chaînes légères anti-lambda, F0435 et R0437, sont fournis à partir d’un fragment F(ab’)₂ de l’anticorps polyclonal de lapin isolé par affinité. 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. Utiliser 10 µL de produit pour colorer 10⁶ leucocytes au maximum à partir de sang périphérique humain d’un individu sain.
Concentration du conjugué g/l: Voir l’étiquette sur le flacon de l’échantillon.

Code de l' anticorps	Fluor	Code de Réactif Ig
F0435	FITC (Isomère 1 d’isothiocyanate de fluorescéine)	X0929
R0437	RPE (R-Phycoérythrine)	X0930

Préparation de l’échantillon
1. L’anticorps utilisé pour la conjugaison à FITC et à (RPE) a été absorbé à l’état solide avec des protéines de plasma humain pour éliminer les traces d’anticorps contaminants.
2. L’anticorps absorbé a été plus amplement purifié par chromatographie d’affinité sur colonne avec des chaînes légères humaines immobilisées lambda.
3. L’anticorps isolé par affinité a ensuite été dégradé avec de la pepsine et le fragment F(ab’)₂ a été isolé par chromatographie de filtration sur gel.
4. Enfin, le fragment F(ab’)₂ a été conjugué avec l’isomère 1 d’isothiocyanate de fluorescéine ou la phycoérythrine R.

Immunogène
Chaînes d’immunoglobulines polyclonales de type lambda, isolées d’une sélection de sérums humains.

Spécificité
Les chaînes légères anti-lambda montrent une réaction aux chaînes libres lambda ainsi qu’aux chaînes lambda des molécules d’immunoglobuline intactes. Sa spécificité a été déterminée de la manière décrite ci-dessous. Pour obtenir une sensibilité maximum, le test de spécificité d’immunoélectrophorèse croisée a été effectué avant la purification par affinité et la dégradation à la pepsine.
Immuno-électrophorèse croisée: Seuls les précipités apparentés au lambda apparaissent lorsque l’anticorps est testé pour le plasma humain. Marquage: Bleu de Coomassie.

Cytométrie de flux: Lorsque les chaînes légères anti-lambda sont appliquées de la manière décrite dans la procédure d’immunomarquage en combinaison avec l’Anti-CD19/RPE, HD37 ou l’Anti-CD19/FITC, HD37, sur du sang complet humain lysé, un marquage spécifique dans une partie des lymphocytes B positifs aux CD19 est observé, correspondant à la gamme attendue de l’expression de la chaîne légère lambda.

L’analyse en cytométrie de flux de suspensions unicellulaires de prélèvements de tissus fixés au formol, inclus en paraffine a déterminé que les chaînes légères anti-lambda marquent les ganglions lymphatiques hyperplastiques réactifs (dans 10 cas sur 10) (5). Dans les lymphomes non hodgkiniens, l’anticorps a marqué 5 cas sur 10. Les cas restants étaient positifs aux chaînes légères kappa (4 cas sur 10), ou ne montraient aucune expression de chaînes légères (1 cas sur 10) (4).

L’analyse en cytométrie de flux des lymphocytes du sang périphérique a déterminé que l’anticorps des chaînes légères anti-lambda marque un certain nombre de leucémies lymphoïdes chroniques B. Ainsi, dans une étude de 121 cas (2), 17 étaient positifs à lambda. Dans une autre étude de 165 cas (3), 68 étaient positifs à lambda.

Précautions d’emploi
1. Pour utilisateurs professionnels.
2. 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.
3. Comme pour tout dérivé biologique dangereux à manipuler, une précision s’impose.
4. Porter un équipement de protection individuelle approprié pour éviter tout contact avec les yeux et la peau.
5. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.

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. Au cours du stockage, un petit précipité peut se développer entraînant un léger marquage granulaire non-spécifique. Il est possible de rétablir la qualité optimale initiale du conjugué par simple filtration (filtre d’acétate de cellulose de 0,22 µm). Les conjugués ne doivent pas être stockés à l’état dilué. 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 l’assistance technique de Dako.

Remarques relatives à la Procédure
Avant le marquage des échantillons de sang périphérique, les cellules mononucléaires doivent être isolées par centrifugation sur un milieu de séparation ou bien l’échantillon de sang doit être lavé pour enlever les protéines de sérum solubles. Les monocytes humains liant les immunoglobulines sériques via leurs récepteurs Fc, ces cellules doivent être enlevées par déplétion ou bien être identifiées.

Procédure d’immunomarquage
1. Prélever le sang veineux dans un tube à essais contenant un anticoagulant.
2. Transférer 100 µl de sang anti-coagulé dans le tube à essai.
3. Ajouter 2 ml de PBS à 0,01 mol/l, pH 7,4. Mélanger délicatement à l’aide d’un agitateur de type vortex.
4. Centrifuger à 300 x g pendant 5 minutes, puis aspirer le surnageant, en laissant environ 50 µl de fluide.

- Répéter deux fois supplémentaires les étapes 3 et 4.
- Ajouter 10 µl de fraction d'immunoglobuline de lapin, code X0903 pour bloquer. Mélanger délicatement à l'aide d'un agitateur de type vortex et incuber dans l'obscurité pendant 30 minutes à 37°C.
- Ajouter 10 µl de chaînes légères anti-lambda conjugué à un fluorochrome. Mélanger délicatement.
- Utiliser un fragment F(ab')₂ non réactif d'immunoglobuline de lapin, et, conjugué avec le même fluorochrome, utiliser comme contrôle négatif (voir tableau).
- Incuber à l'obscurité à 4 °C pendant 30 minutes.
- Ajouter 1-2 ml de réactif lysant d'érythrocyte dans chaque tube et mélanger délicatement. Se reporter aux recommandations du fabricant pour la durée et la température d'incubation.
- Centrifuger à 300 x g pendant 5 minutes.
- Aspirer le surnageant, en laissant environ 50 µl de fluide.
- Ajouter 2 ml de PBS à 0,01 mol/l, pH 7,4. Mélanger délicatement à l'aide d'un agitateur de type vortex.
- Recommencer les étapes 11 et 12.
- Remettre les cellules en suspension dans un liquide approprié pour cytométrie en flux, comme 0,3 ml d'une solution à 1% de paraformaldéhyde (fixateur) dans du PBS à 0,01 mol/l, pH 7,4.
- Analyser sur un cytomètre en flux.

Il est recommandé d'inclure un contrôle positif et négatif adéquat à chaque technique pour contrôler le réactif et la préparation. Noter que les conjugués fluorochromes sont sensibles à la lumière, et les échantillons doivent être protégés de cette dernière au cours de la procédure d'immunomarquage et jusqu'à l'analyse.

DEUTSCH

Zweckbestimmung

Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.

F0435 und R0437 sind für den durchflusszytometrischen Gebrauch bestimmt. In der Durchfluss-Zytometrie sind Antikörper gegen Lambda-Leichtketten beim Nachweis von Lambda-Leichtketten auf der Zelloberfläche nützlich und sind daher - zusammen mit einem Panel weiterer Antikörper – bei der Identifikation von Monoklonalität (klonaler Überschuss) bei lymphoproliferativen Erkrankungen der B-Zellen behilflich (1-4). Die Befunde müssen unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren von einem zertifizierten Facharzt interpretiert werden.

Einleitung

Die meisten B-Zellen - mit Ausnahme der Prä-B-Vorläuferzellen, Prä-B-Zellen und reifen Plasmazellen – exprimieren ebenso wie ausgereifte Plasmazellen Immunglobulin auf ihrer Oberfläche. Jede Zelle exprimiert nur einen Leichtketten-Typ. In normalem peripherem Blut und Lymphknoten liegt eine Mischung aus Kappa-positiven und Lambda-positiven Zellen vor, wobei zwei Drittel der Zellen Kappa und ein Drittel Lambda exprimieren (5). Da lymphoide Neoplasmen normalerweise klonale Expansionen einer einzigen Zelle darstellen, exprimieren maligne Zellen einheitlich den gleichen Leichtketten-Isotyp. Neoplastische chronische lymphoproliferative Störungen der B-Zellen können häufig auf Grundlage des Nachweises einer ausgeprägten Vorherrschaft von Zellen vermutet werden, die einen einzigen Leichtketten-Typ exprimieren (4). Es sind seltene Fälle von Kappa-negativen oder Lambda-negativen Non-Hodgkin-Lymphomen der B-Zellen beschrieben worden (4,6).

Geliefertes Reagenz

Die Anti-Lambda Light Chains Konjugate F0435 und R0437 werden aus einem F(ab')₂-Fragment des affinitätsisolierten polyklonalen Kaninchenantikörpers hergestellt. Die Konjugate werden in einer gepufferten Lösung mit 1 % bovinem Serumalbumin (BSA) und 15 mmol/l Na₂S₂O₃, pH 7,2, geliefert. Verwenden Sie 10 µl des Produkts zur Färbung von bis zu 10⁶ Leukozyten aus normalem peripheren menschlichem Blut.

Konjugat-Konzentration g/l: Siehe Produktetikett.

Antikörper Code-Nr.	Fluorochrom	Ig-Reagenz Code- Nr.
F0435	FITC (Fluoresceinisothiocyanat-Isomer 1)	X0929
R0437	RPE (R-Phycoerythrin)	X0930

Präparation

- Der für die FITC- und RPE-Konjugation verwendete Antikörper wurde zur Entfernung von Spuren kontaminierender Antikörper mit menschlichen Plasmaproteinen in der Festphase absorbiert.
- Der absorbierte Antikörper wurde weitergehend mit Hilfe der Affinitätschromatografie auf einer Säule mit immobilisierten menschlichen Lambda-Leichtketten gereinigt.
- Daraufhin erfolgte der Abbau des affinitätsisolierten Antikörpers mit Pepsin und das F(ab')₂-Fragment wurde anhand der Gelfiltration isoliert.
- Abschließend wurde der F(ab')₂-Anteil mit Fluorescein-Isouthiocyanat, Isomer 1, oder R-Phycoerythrin konjugiert.

Immunogen

Aus einem Pool humaner Seren isolierte polyklonale Immunglobulin-Leichtketten des Lambda-Typs.

Spezifität

Anti-Lambda Light Chains reagieren mit freien Lambda-Ketten sowie Lambda-Ketten in intakten Immunglobulinmolekülen. Die Spezifität wurde wie unten beschrieben ermittelt. Zum Erzielen maximaler Sensitivität wurde der Kreuz-Immunelektrophorese-Spezifitätstest vor der Affinitätsreinigung und der proteolytischen Spaltung mit Pepsin durchgeführt.

Kreuzimmunelektrophorese: Bei der Analyse des Antikörpers gegen humanes Plasma erscheint nur die halbmondförmige Lambda-bezogene Präzipitationslinie. Anfärben: Coomassie® Brilliantblau.

Durchflusszytometrie: Wenn Anti-Lambda Light Chains beim Färbeverfahren wie beschrieben in Kombination mit Anti-CD19/RPE, HD37 oder Anti-CD19/FITC, HD37, bei lysiertem menschlichem Vollblut angewendet werden, wird eine spezifische Färbung eines Teils der CD19-positiven B-Lymphozyten beobachtet, die dem erwarteten Bereich der Expression von Lambda-Leichtketten entspricht.

Die durchflusszytometrische Analyse der Einzelzell-Suspensionen aus formalinfixierten paraffineingebetteten Gewebeproben zeigt auf, dass Anti-Lambda Light Chains reaktive hyperplastische Lymphknoten markieren (10/10 Fälle). Bei Non-Hodgkin-Lymphomen markierte der Antikörper 5/10 Fälle. Die verbleibenden Fälle waren für Kappa-Leichtketten positiv (4/10 Fälle) oder zeigten keine Expression von leichten Ketten (1/10 Fällen) (4).

Die durchflusszytometrische Analyse von Lymphozyten aus peripherem Blut verdeutlicht, dass Anti-Lambda Light Chains einen Teil der Fälle mit chronischen lymphozytären Leukämien der B-Zellen markieren. So testeten in einer Studie von 121 (2) Fällen 17 positiv auf Lambda. In einer anderen Studie von 165 Fällen testeten 68 Lambda-positiv (3).

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Für geschultes Fachpersonal.
- Dieses Produkt enthält Natrium-Azid (Na₃N), 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.
- Geeignete Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
- Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.

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. Während der Lagerung kann sich mitunter ein geringfügiges Präzipitat bilden, das eine unspezifische, feine granuläre Anfärbung bewirkt. Durch einfache Filtrierung (0,22 µm Zellulose-Azetat-Filter) wird die ursprüngliche hohe Qualität des Konjugats wiederhergestellt. Konjugate sollten nicht in verdünnter Form gelagert 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 Dako Technischen Kundendienst aufzunehmen.

Verfahrenshinweis

Vor dem Färben von Proben aus peripherem Blut müssen die mononukleären Zellen durch Zentrifugieren auf einem Separationsmedium isoliert oder die Blutprobe muss gewaschen werden, um die löslichen Serumproteine zu entfernen. Da menschliche Monozyten Serumimmunglobuline über ihre Fc-Oberflächenrezeptoren binden, müssen diese Zellen durch Depletion entfernt oder identifiziert werden.

Färbeprozedur

1. Venöses Blut in ein Antikoagulans enthaltendes Probenröhrchen gewinnen.
2. 100 µl des Antikoagulans-versetzten in das Probenröhrchen pipettieren.
3. 2 ml 0,01 mol/l PBS, pH 7,4, zusetzen. Mit einem Vortexmixer vorsichtig mischen.
4. 5 Minuten lang bei 300 x g zentrifugieren, dann den Überstand aspirieren, so dass ungefähr 50 µl zurückbleiben.
5. Schritte 3 und 4 zwei Mal wiederholen.
6. 10 µl Kaninchenimmunglobulin-Fraktion, Code-Nr. X0903, zur Blockierung hinzufügen. Vorsichtig mit einem Vortexmixer mischen und dann im Dunkeln 30 Minuten lang bei 37 °C inkubieren.
7. 10 µl Fluorochrom-konjugierte Anti-Lambda Light Chains hinzufügen. Vorsichtig mischen.
8. Ein nicht-reaktives F(ab')₂-Fragment des Kaninchenimmunglobulins, das mit dem gleichen Fluorochrom konjugiert ist, als Negativkontrolle verwenden (siehe Tabelle).
9. Im Dunkeln bei 4 °C 30 Minuten lang inkubieren.
10. In jedes Röhrchen 1-2 ml Erythrozyten lysierendes Reagenz pipettieren und vorsichtig mischen. Die Anleitungen des Reagenz-Herstellers bezüglich Inkubationszeit und -temperatur befolgen.
11. 5 Minuten lang bei 300 x g zentrifugieren.
12. Den Überstand aspirieren, so dass ungefähr 50 µl Flüssigkeit zurückbleiben.
13. 2 ml 0,01 mol/l PBS, pH 7,4, zusetzen. Mit einem Vortexmixer vorsichtig mischen.
14. Schritte 11 und 12 wiederholen.
15. Das Pellet in einer für die Durchflusszytometrie geeigneten Flüssigkeit, z. B. 0,3 ml 1%igem Paraformaldehyd (Fixativ) in 0,01 mol/l PBS, pH 7,4, resuspendieren.
16. 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 Färbvorgangs und bis zur Durchführung der Analyse vor Licht geschützt werden müssen.

References/ Références/ Literatur

1. Johnson A, Olofsson T. Flow cytometric clonal excess analysis of peripheral blood, routine handling, and pitfalls in interpretation. *Cytometry* 1993;14:188-95.
2. Cartron G, Linassier C, Bremond JL, Desablens B, Georget MT, Fimbel B, et al. CD5 negative B-cell chronic lymphocytic leukemia: clinical and biological features of 42 cases. *Leuk Lymphoma* 1998;31:209-16.
3. Gandini D, Lanza F, Latorraca A, Levato F, Del Senno L, Castoldi G. Immunophenotypic and genotypic characterization of B-cell chronic lymphocytic leukemia patients from Northern Italy. *Haematologica* 1993;78:18-24.
4. Leers MPG, Theunissen PHMH, Ramaekers FCS, Schutte B, Nap M. Clonality assessment of lymphoproliferative disorders by multiparameter flow cytometry of paraffin-embedded tissue: an additional diagnostic tool in surgical pathology. *Hum Pathol* 2000;31:422-7.
5. Deegan MJ. B lymphocytes and plasma cells: their development and identification. In: Keren DF, editor. *Flow cytometry in clinical diagnosis*. Chicago: ASCP Press; 1989. p. 139-63.
6. Kaleem Z, Zehnbauser BA, White G, Zutter MM. Lack of expression of surface immunoglobulin light chains in B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Am J Clin Pathol* 2000;113:399-405.

Explanation of symbols / Explication des symboles / Erläuterung der Symbole

	Catalogue number Référence du catalogue Katalognummer		Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich		Use by Utiliser avant 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'abri de la lumière (voir la section Conservation) Vor Sonnenlicht schützen (siehe Abschnitt Aufbewahrung)		Manufacturer Fabricant Hersteller
	Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten		Batch code Réf. du lot Chargenbezeichnung		Authorized representative in the European Community Représentant agréé dans la Communauté européenne Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft



Agilent Technologies Singapore (International) Pte Ltd.
No. 1 Yishun Avenue 7
Singapore, 768923
Tel. +44 161 492 7050
www.agilent.com

Revision / Révision / Revision 2020.11