

Monoclonal Mouse
Anti-Human
CD45RA/RPE
 Clone 4KB5
Code No./ Code/ Code-Nr. R 7086
 Edition/ Ausgabe 01.09.02

ENGLISH	
Intended use	For in vitro diagnostic use. R 7068 is intended for use in flow cytometry. Anti-CD45RA, 4KB5, reacts with most B cells in peripheral blood. It also recognizes a small subpopulation of T cells and monocytes (1). Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a certified professional.
Introduction	CD45 is a transmembrane glycoprotein expressed on most nucleated cells of haematopoietic origin. CD45, encoded by a single gene mapped to chromosome 1, has various isoforms, based on differential splicing of exons 4, 5 and 6. On human leucocytes, five different isoforms of CD45, named ABC, AB, BC, B and 0, have been identified. These isoforms are recognized by CD45RA, CD45RB, CD45RC and CD45R0 antibodies. Antibodies to CD45RA recognize the extracellular A domain in the two isoforms, ABC (Mr 220 000), and AB (Mr 200 000). All the CD45 isoforms share the same intracellular segment, which has been shown to have tyrosine phosphatase activity. Various leucocytes express characteristic CD45 isoforms, and T cells differentially express CD45 isoforms at various stages of their development and activation. B cells predominantly express the ABC isoform, and monocytes and dendritic cells predominantly express the B and 0 isoforms. Granulocytes principally express only the B and 0 isoforms (2). Discrimination between naive and memory T cells has been made by establishing their CD45 isoform. It is believed that CD45R0 is expressed preferentially on memory T cells and CD45RA on naive T cells (3).
Reagent provided	The Anti-CD45RA conjugate, R 7086, has been produced from a purified monoclonal mouse antibody. The conjugate is provided in liquid form in buffer containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 15 mmol/L NaN ₃ , pH 7.2. Each vial contains 100 tests (10 µL of conjugate for up to 10 ⁶ leucocytes from normal human peripheral blood). <u>Isotype:</u> IgG1, kappa. <u>Conjugate concentration mg/L:</u> See label on vial.
Immunogen	Human hairy cell leukaemia cells (4).
Specificity	The antibody was included at the Third (4) and clustered as anti-CD45RA at the Fourth (5) and Fifth (6) International Workshops and Conferences on Human Leucocyte Differentiation Antigens.
Precautions	1. For professional users. 2. This product contains sodium azide (NaN ₃), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing. 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	1. Collect venous blood into a test tube containing an anticoagulant. 2. Isolate mononuclear cells by centrifugation on a separation medium. Alternatively, lyse the red cells after step 6. 3. Wash the mononuclear cells twice with RPMI 1640 or PBS, pH 7.2-7.4. 4. Mix 100 µL cell suspension with 10 µL RPE-conjugated Anti-CD45RA. 5. Mix 100 µL cell suspension with 10 µL of the appropriate negative control. The recommended negative control reagent for R 7086 is code No. X 0928. 6. Incubate in the dark at 4 °C for 30 minutes. 7. 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. 8. 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 <i>in vitro</i> . R 7068 est destiné pour un usage en cytométrie en flux. L'anti-CD45RA, 4KB5, montre une réaction à la majeure partie des lymphocytes-B du sang périphérique. Il reconnaît également une petite partie de la population des lymphocytes-T et des monocytes (1). 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	CD45 est une glycoprotéine transmembranaire exprimée dans la plupart des cellules nucléées d'origine hématopoïétique. CD45, qui est codée par un gène unique situé sur le chromosome 1, a plusieurs isoformes qui dépendent du mode d'épissage des exons 4, 5 et 6. Sur les leucocytes humains, on a identifié cinq isoformes, dénommées ABC, AB, BC, B et 0. Ces isoformes sont dépistées par les anticorps CD45RA, CD45RB, CD45RC et CD45R0. Les anticorps de CD45RA reconnaissent les domaines extracellulaires A au niveau des deux isoformes ABC (RM 220 000), et AB (RM 200 000). Toutes les isoformes de CD45 ont en commun un segment intracellulaire pour lequel on a mis en évidence une activité tyrosine phosphatase. Les leucocytes expriment des isoformes de CD45 qui leur sont propres: ainsi les lymphocytes-T expriment une isoforme correspondant à leur stade de développement et leur niveau d'activation. Les lymphocytes B expriment plus particulièrement l'isoforme ABC, les monocytes et les cellules dendritiques expriment principalement les isoformes B et 0. Les granulocytes expriment seulement les isoformes B et 0 (2). Une discrimination entre les lymphocytes B naifs et les lymphocytes B à mémoire a été réalisée en établissant leur isoforme CD45. Une discrimination entre les lymphocytes B naifs et les lymphocytes B à mémoire a été réalisée en établissant leur isoforme CD45 (3).
Réactif fourni	Le conjugué Anti-CD45RA, R7086, a été produit à partir d'un anticorps purifié monoclonal de souris. Le conjugué est fourni à l'état liquide en tampon contenant 1% d'albumine de sérum bovin (BSA) et du NaN ₃ à 15 mmol/L, pH 7,2. Chaque flacon contient 100 tests (10 µL de conjugué pouvant traiter jusqu'à 10 ⁶ de leucocytes provenant de sang périphérique normal humain). <u>Isotype:</u> IgG1, kappa. <u>Concentration du conjugué mg/L:</u> Voir l'étiquette sur le flacon de l'échantillon.
Immunogène	Tricholeucocytes leucémiques humains (4).
Spécificité	L'anticorps a été inscrit et classé anti-CD45RA au cours des Third (3), Fourth (4) et Fifth (5) International Workshops and Conferences on Human Leucocyte Differentiation Antigens.
Précautions d'emploi	1. Pour utilisateurs professionnels. 2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN ₃), 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.
Conservation	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	1. Prélever le sang veineux dans un tube à essais contenant un anticoagulant. 2. Isoler les cellules mononucléaires par centrifugation dans un milieu de séparation. Sinon, lyser les globules rouges après l'étape 6. 3. Laver les cellules mononucléaires deux fois avec du RPMI 1640 ou du PBS, à 7,2-7,4 de pH. 4. Mélanger 100 µL de suspension cellulaire à 10 µL de conjugué-RPE anti-CD45RA. 5. Mélanger 100 µL de suspension cellulaire à 10 µL de contrôle négatif adéquat. Le réactif de contrôle négatif requis pour R 7086, est le X 0928. 6. Laisser incubé à l'obscurité, à 4°C, pendant 30 minutes. 7. 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. 8. Analyser sur un cytomètre en flux. Il est recommandé d'inclure un échantillon de contrôle positif et négatif adéquat à chacune des exécutions pour le contrôle du réactif et de la préparation. Noter que les conjugués fluorochromes sont sensibles à la lumière, et les échantillons doivent être protégés de cette dernière pendant la procédure d'immunomarquage et jusqu'à l'analyse.

DEUTSCH	
---------	--

Zweckbestimmung	Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen. R 7068 ist für den durchflusszytometrischen Gebrauch bestimmt. Anti-CD45RA, 4KB5, reagiert mit den meisten B-Zellen des peripheren Bluts und erkennt zudem eine kleine Unterpopulation von T-Zellen und Monozyten (1). Die Befunde müssen unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren von einem zertifizierten Facharzt interpretiert werden.
------------------------	--

Einleitung CD45 ist ein Transmembran-Glykoprotein, das auf den meisten kernhaltigen Zellen hämatopoetischen Ursprungs exprimiert wird. CD45, wird von einem einzigen, am Chromosom 1 kartierten Gen kodiert und erscheint in verschiedenen Isoformen, welche durch differentielles Spleißen der Exone 4, 5 und 6 bedingt ist. Fünf verschiedene Isoformen des CD45, genannt ABC, AB, BC, B und 0, wurden auf humanen Leukozyten identifiziert. Diese Isoformen werden von Antikörpern gegen CD45RA, CD45RB, CD45RC und CD45R0 erkannt. Antikörper gegen CD45RA erkennen den extrazellulären A-Bereich der beiden Isoformen ABC (M_r 220 000) und AB (M_r 200 000). Allen CD45-Isoformen ist das gleiche intrazelluläre Segment mit nachgewiesener Tyrosinphosphatase-Aktivität gemeinsam. Verschiedene Leukozyten exprimieren charakteristische CD45-Isoformen und CD45-Isoforme werden von T-Zellen in unterschiedlichen Stadien ihrer Entwicklung und Aktivierung differentiell exprimiert. B-Zellen exprimieren vorwiegend die ABC-Isoform, und Monozyten und dendritische Zellen exprimieren vorwiegend die B- und 0-Isoformen. Granulozyten exprimieren prinzipiell nur die B- und 0-Isoformen (2). Die Unterscheidung zwischen naiven und Gedächtnis-T-Zellen wurde durch Feststellen ihrer CD45-Isoform durchgeführt. Es wird angenommen, dass CD45R0 vorzugsweise auf Gedächtnis-T-Zellen und CD45RA auf naiven T-Zellen exprimiert wird (3).

Geliefertes Reagenz Das Anti-CD45RA-Konjugat R 7086 stammt von einem gereinigten monoklonalen Maus-Antikörper. Das Konjugat wird in einer gepufferten Lösung mit 1 % bovinem Serumalbumin (BSA) und 15 mmol/L NaN₃, pH 7,2, geliefert. Jedes Fläschchen ist ausreichend für 100 Tests (10 µL des Konjugats sind für bis 10⁶ Leukozyten aus normalem, menschlichem peripheren Blut ausreichend).
Isotyp: IgG1, Kappa. Konjugat-Konzentration mg/L: Siehe Produktetikett.

Immunogen Humane Haarzellenleukämie-Zellen (4).

Spezifität Die Aufnahme des Antikörpers erfolgte anlässlich des "Third" (3) und die Gruppierung als anti-CD45RA anlässlich des "Fourth (4) and Fifth (5) International Workshops and Conferences on Human Leucocyte Differentiation Antigens".

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

1. Für geschultes Fachpersonal.
2. Dieses Produkt enthält Natrium-Azid (NaN₃), 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.
3. 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

1. Venöse Blutprobe in ein Probenröhrchen mit gerinnungshemmendem Mittel gewinnen.
2. Mononukleäre Zellen durch Zentrifugieren auf einem Abtrennungsmittel isolieren. Alternativ hierzu können die Erythrozyten im Anschluss an Schritt 6 aufgelöst werden.
3. Die mononukleären Zellen zweimal mit RPMI 1640 oder mit PBS, pH 7,2-7,4, waschen.
4. 100 µL der Zellsuspension mit 10 µL des fluorochromkonjugierten Anti-CD45RA mischen.
5. 100 µL Zellsuspension mit 10 µL der entsprechenden Negativkontrolle vermischen. Das empfohlene Negativkontrollreagenz für R 7086 ist DakoCytomation Code-Nr. X 0928.
6. Im Dunkeln bei 4 °C 30 Minuten lang inkubieren.
7. Zweimal mit PBS waschen, das 2 % BSA enthält. Die Zellen in einer für Durchflusszytometrie geeigneten Flüssigkeit, z. B. 0,3 mL 1% Paraformaldehyd (Fixativ) in 0,01 mol/L PBS, pH 7,4, resuspendieren.
8. 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.

References/ Références/ Literatur

1. Davey FR, Gatter KC, Ralfkiaer E, Pulford KAF, Krissansen GW, Mason DY. Immunophenotyping of non-Hodgkin's lymphomas using a panel of antibodies on paraffin-embedded tissues. Am J Pathol 1987;129: 54-63.
2. 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.
3. Akbar AN, Salmon M, Janossy G. The synergy between naive and memory T cells during activation. Immunology Today 1991;12:184-6.
4. Pulford KAF, Falini B, Heryet A, Gatter KC, Mason DY. N1.9. 4KB5, a new monoclonal anti-B-cell antibody for the routine diagnosis of lymphoid tissue biopsies. 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. 828.

5. Schmidt RE. Non-lineage/natural killer section report: new and previously defined clusters. 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. 517-42.
6. Morimoto C. T18. CD45 cluster report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, et al., editors. Leucocyte typing V. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 5th International Workshop and Conference; 1993 Nov 3-7; Boston, USA. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1995. p. 386-9.

Explanation of symbols/ Légende des symboles/ Erläuterung der Symbole

 Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	 2°C – 8°C 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	