

**MultiMix™****Triple-Colour Reagent****Anti-Human Plasma Cell/FITC****Anti-Human Lambda Light Chains/RPE****Anti-Human Kappa Light Chains/APC****Code No./ Ref./ Code-Nr. TC670****ENGLISH****Intended use**

For in vitro diagnostic use.

TC670 is intended for use in flow cytometry. The reagent is intended for intracellular identification of the plasma cell antigen, p63 protein, and kappa and lambda light chain expression. Anti-Human Plasma Cell, VS38c, labels normal and neoplastic plasma cells (1, 2). The kappa and lambda light chain antibodies allow evaluation of intracellular light chain expression in VS38c-positive plasma cells, which is of value in detection of clonality in neoplastic plasma cells. Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a certified professional.

**Reagent provided**

TC670 comprises the following three matched fluorescent antibodies:

Monoclonal Mouse Anti-Human Plasma Cell, Clone VS38c, conjugated with fluorescein isothiocyanate isomer 1 (FITC).

Polyclonal Rabbit Anti-Human Lambda Light Chains, conjugated with R-phycoerythrin (RPE).

Polyclonal Rabbit Anti-Human Kappa Light Chains, conjugated with allophycocyanin (APC).

The FITC conjugate in TC670 has been produced from a purified monoclonal mouse antibody of isotype IgG1, kappa. The RPE and APC conjugates in TC670, Anti-Lambda Light Chains and Anti-Kappa Light Chains, have been produced from F(ab')<sub>2</sub> fragments of affinity-isolated polyclonal rabbit antibodies. TC670 is provided in liquid form in buffer containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 15 mmol/L NaNa<sub>3</sub>, pH 7.2. Each vial contains 50 tests (20 µL of conjugate for up to 10<sup>6</sup> cells (a mixture of the cell lines HS-Sultan, U266 and Amo-1)).

**Immunogens**

Monoclonal Mouse Anti-Human Plasma Cell, Clone VS38c: Membrane preparation of MCF-7 AdR cells (breast carcinoma cell line) (2).

Rabbit Anti-Human Kappa Light Chains: Polyclonal immunoglobulin light chains of kappa type isolated from a pool of human sera.

Rabbit Anti-Human Lambda Light Chains: Polyclonal immunoglobulin light chains of lambda type isolated from a pool of human sera.

**Specificity**

Anti-Plasma Cell, VS38c, was submitted to and characterized as anti-p63 protein at the Sixth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (1).

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 F(ab')<sub>2</sub> fragmentation.

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

Flow cytometry: When Anti-Lambda Light Chains is applied as described in the enclosed staining procedure in combination with Anti-CD19/RPE, 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.

Anti-Kappa Light Chains reacts with free kappa chains as well as kappa 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 F(ab')<sub>2</sub> fragmentation.

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

Flow cytometry: When Anti-Kappa Light Chains is applied as described in the enclosed staining procedure in combination with Anti-CD19/RPE, 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 kappa light chain expression.

**Precautions**

1. For professional users.
2. This product contains sodium azide (NaN<sub>3</sub>), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.

**Storage**

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

**Staining procedure**

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.

1. Transfer 50 µL (up to 10<sup>6</sup> cells) anticoagulated (EDTA) blood cells to a 12 mm x 75 mm polystyrene test tube.
2. Add 2 mL of PBS (Dako code No. S3024). Mix gently by using a vortex mixer.
3. 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.
4. Repeat steps 2 and 3 two more times.
5. Add 10 µL Rabbit Immunoglobulin Fraction (Dako code No. X0903) for blocking. Mix gently by using a vortex mixer and incubate the tube at 37 °C for 30 minutes.
6. Add 100 µL IntraStain Reagent A (Fixation) (Dako code No. K2311) to the tube and mix gently by using a vortex mixer to ensure that the cells are in suspension. Incubate the tube for 15 minutes at room temperature.
7. Add 2 mL PBS (Dako code No. S3024) and mix gently by using a vortex mixer.
8. 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.
9. Mix thoroughly by using a vortex mixer to ensure that the cells are in suspension.
10. Add 100 µL IntraStain Reagent B (Permeabilization) (Dako code No. K2311) to the tube.
11. Then add 20 µL of TC670 and mix gently by using a vortex mixer.
12. Incubate the tube for 15 minutes at room temperature in the dark.
13. Repeat steps 7 and 8.
14. Resuspend the cells in an appropriate fluid for flow cytometry, e.g. 0.3 mL PBS.

15. Analyse the sample on a flow cytometer or store it in the dark at 2-8 °C until analysis. Samples should be analysed within 8 hours after staining.

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

#### 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 11: 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 conjugated antibody reagent. The recommended Triple-Colour Control Reagent for TC670 is Dako code No. X0979.

Step 15: Abnormal numbers of cells expressing the target antigen or cell 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.

Multicolour reagents are preferable to single-colour reagents for the comprehensive analysis of flow cytometry specimens. The correct use of colour compensation is particularly important in multicolour analysis. The combination of FITC, RPE and APC is especially easy to work with since the emission spectra of these fluorochromes show minimum spectral overlap.

## FRANÇAIS

#### Utilisation prévue

Pour utilisation en diagnostic in vitro.

TC670 est destiné à être utilisé en cytométrie en flux. Le réactif est destiné à être utilisé pour l'identification intracellulaire de l'antigène des plasmocytes, de la protéine p63, ainsi que de l'expression des chaînes légères kappa et lambda. Le plasmocyte anti-humain, VS38c, marque les plasmocytes sains et néoplasiques (1, 2). Les anticorps portant des chaînes légères kappa et lambda permettent l'évaluation de l'expression des chaînes légères intracellulaires sur les plasmocytes VS38c positifs, ce qui est utile pour la détection de la clonalité des plasmocytes néoplasiques. Les résultats doivent être interprétés par un professionnel qualifié et tenir compte des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques.

#### Réactifs fournis

Le TC670 comprend les trois anticorps fluorescents suivants:

Monoclonal Mouse Anti-Human Plasma Cell, Clone VS38c, conjugué à l'isomère 1 de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC).

Polyclonal Rabbit Anti-Human Lambda Light Chains, conjugué à la R-phycoérythrine (RPE).

Polyclonal Rabbit Anti-Human Kappa Light Chains, conjugué à l'allophycocyanine (APC).

Le conjugué FITC du TC670 a été préparé à partir d'un anticorps monoclonal purifié de souris, d'isotype IgG1, kappa. Les conjugués RPE et APC du TC670, du Anti-Lambda Light Chains et du Anti-Kappa Light Chains, ont été préparés à partir de fragments de F(ab)<sub>2</sub> d'anticorps polyclonaux de lapin isolés par affinité. TC670 est fourni sous forme liquide dans un tampon contenant 1 % d'albumine de sérum bovin (BSA) et 15 mmol/L d'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>) à pH 7,2. Chaque flacon contient 50 tests (20 µL de conjugué pour 10<sup>6</sup> cellules au maximum (mélange des lignées cellulaires HS-Sultan, U266 et Amo-1)).

#### Immunogènes

Monoclonal Mouse Anti-Human Plasma Cell, Clone VS38c: Préparation de la membrane des cellules MCF-7 AdR (lignée cellulaire de carcinome du sein) (2).

Rabbit Anti-Human Kappa Light Chains: Chaînes légères d'immunoglobulines polyclonales de type kappa isolées à partir d'un pool de sérums humains.

Rabbit Anti-Human Lambda Light Chains: Chaînes légères d'immunoglobulines polyclonales de type lambda isolées à partir d'un pool de sérums humains.

#### Spécificité

La cellule anti-plasmatique, VS38c, a été soumise lors de la Sixth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Sixième Conférence et Atelier Internationaux sur les Antigènes de Différenciation des Leucocytes Humains) et caractérisée comme protéine anti-p63 (1).

Les chaînes légères anti-lambda réagissent aux chaînes lambda libres et aux chaînes lambda présentes dans les molécules d'immunoglobuline intactes. La spécificité a été mise en évidence comme décrit ci-dessous. Pour obtenir une sensibilité maximum, le test de spécificité par immunoelectrophorèse croisée a été réalisé avant la purification par affinité et la fragmentation de F(ab)<sub>2</sub>.

Immunoélectrophorèse croisée: Seuls les précipités lambda apparaissent quand l'anticorps est testé sur le plasma humain. Coloration : Coomassie Brilliant Blue.

Cytométrie en flux: Quand les chaînes légères anti-lambda sont appliquées comme décrit dans la procédure de coloration ci-jointe en combinaison avec l'anti-CD19/RPE, HD37, sur le sang total humain lysé, une coloration spécifique d'une partie des lymphocytes B CD19 positifs correspond à la plage attendue de l'expression des chaînes légères lambda.

Les chaînes légères anti-kappa réagissent aux chaînes kappa libres et aux chaînes kappa présentes dans les molécules d'immunoglobuline intactes. La spécificité a été mise en évidence comme décrit ci-dessous. Pour obtenir une sensibilité maximum, le test de spécificité par immunoelectrophorèse croisée a été réalisé avant la purification par affinité et la fragmentation de F(ab)<sub>2</sub>.

Immunoélectrophorèse croisée: Seuls les précipités kappa apparaissent quand l'anticorps est testé sur le plasma humain. Coloration : Coomassie Brilliant Blue.

Cytométrie en flux: Quand les chaînes légères anti-kappa sont appliquées comme décrit dans la procédure de coloration ci-jointe en combinaison avec l'anti-CD19/RPE, HD37, sur le sang total humain lysé, une coloration spécifique d'une partie des lymphocytes B CD19 positifs correspond à la plage attendue de l'expression des chaînes légères kappa.

#### Précautions

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations pour former des accumulations d'azides métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
3. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées.

#### Conservation

Conservé à l'obscurité entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date limite 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, les contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que des échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, ne pouvant être expliquée par un changement des procédures du laboratoire et en cas de suspicion d'un problème avec l'anticorps, contacter notre service technique.

#### Procédure de coloration

Avant de colorer des échantillons de sang périphérique, isoler les cellules mononucléées par centrifugation sur un support séparé ou laver l'échantillon de sang pour éliminer les protéines de sérum solubles. Étant donné que les monocytes humains lient les immunoglobulines sériques via leurs récepteurs Fc de surface, éliminer ces cellules par déplétion ou les identifier.

1. Transférer 50 µL (jusqu'à 10<sup>6</sup> cellules) de sang total non coagulé (EDTA) dans un tube à essai en polystyrène de 12 mm x 75 mm.
2. Ajouter 2 mL de PBS (réf. Dako S3024). Mélanger doucement à l'aide d'un vortex.
3. 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.
4. Répéter deux fois les étapes 2 et 3.
5. Ajouter 10 µL de fraction d'immunoglobuline de lapin (réf. Dako X0903) pour bloquer. Mélanger doucement à l'aide d'un vortex et incubé le tube à 37 °C pendant 30 minutes.

6. Ajouter 100 µL de Réactif A IntraStain (Fixation) (réf. Dako K2311) au tube et mélanger doucement à l'aide d'un vortex pour s'assurer que les cellules sont en suspension. Incuber le tube pendant 15 minutes à température ambiante.
7. Ajouter 2 mL de PBS (réf. Dako S3024) et mélanger doucement à l'aide d'un vortex.
8. 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.
9. Bien mélanger à l'aide d'un vortex pour s'assurer que les cellules sont en suspension.
10. Ajouter 100 µL de Réactif B IntraStain (Perméabilisation) (réf. Dako K2311) au tube.
11. Ajouter 20 µL de TC670 et mélanger doucement à l'aide d'un vortex.
12. Incuber le tube dans l'obscurité pendant 15 minutes à température ambiante.
13. Répéter les étapes 7 et 8.
14. Remettre les cellules en suspension dans un liquide approprié pour la cytométrie en flux, par exemple 0,3 mL de PBS.
15. Analyser l'échantillon sur un cytomètre en flux ou conserver dans l'obscurité entre 2 et 8 °C jusqu'à l'analyse. Analyser les échantillons dans les 8 heures qui suivent la coloration.

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

#### Remarques sur la procédure

Étape 1: Il est facultatif d'inclure un échantillon de contrôle positif et négatif approprié avec chaque cycle en tant que contrôle de réactif et de préparation.

Étape 11: 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 au réactif anticorps conjugué. Le réactif de contrôle tricolore recommandé pour TC670 est Dako réf. X0979.

Étape 15: 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. Ceci peut modifier le profil 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.

Les réactifs multicolores sont préférables aux réactifs unicolores pour l'analyse complète des échantillons de cytométrie en flux. L'utilisation correcte de la compensation de couleur est particulièrement importante dans les analyses multicolores. La combinaison du FITC, RPE et APC est particulièrement facile à utiliser car le chevauchement des spectres d'émission de ces fluorochromes est minimal.

## DEUTSCH

#### Verwendungszweck

Zur In-vitro-Diagnostik.

TC670 ist zur Verwendung bei der Durchflusszytometrie vorgesehen. Das Reagenz dient zur intrazellulären Identifizierung vom Plasmazellantigen, p63 Protein und Expression von Kappa- und Lambda-L-Ketten. Anti-humane Plasmazellen, VS38c, markieren normale und neoplastische Plasmazellen (1,2). Die Antikörper der Kappa- und Lambda-L-Ketten gestatten eine Beurteilung der intrazellulären Expression leichter Ketten in VS38c-positiven Plasmazellen, was beim Nachweis von Klonalität in neoplastischen Plasmazellen von Bedeutung ist. Auswertungen der Ergebnisse müssen von einem qualifizierten Experten unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer Diagnostiktests des Patienten vorgenommen werden.

#### Mitgelieferte Reagenzien

TC670 enthält die folgenden drei abgestimmten fluoreszierenden Antikörper:

Monoklonale Anti-Human-Plasmazelle (Maus), Klon VS38c, konjugiert mit Fluoreszein-Isotiozyanat-Isomer 1 (FITC).

Polyklonale Anti-Human Lambda-L-Ketten (Kaninchen), konjugiert mit R-Phycoerythrin (RPE).

Polyklonale Anti-Human Kappa-L-Ketten (Kaninchen), konjugiert mit Allophycocyanin (APC).

Das in TC670 enthaltene FITC-Konjugat wurde aus einem gereinigten monoklonalen Mausantikörper vom Isotyp IgG1, Kappa hergestellt. Die in TC670 enthaltenen RPE- und APC-Konjugate, Anti-Lambda-L-Ketten und Anti-Kappa-L-Ketten wurden aus F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten aus affinitätsisolierten polyklonalen Kaninchenantikörpern hergestellt. TC670 wird in flüssiger Form in einem Puffer mit 1 % Rinderserum-Albumin (BSA) und 15 mmol/L Na<sub>2</sub>Na<sub>3</sub>, pH 7,2 geliefert. Jedes Fläschchen enthält 50 Tests (20 µL Konjugat für bis zu 10<sup>6</sup> Zellen (ein Gemisch der Zelllinien HS-Sultan, U266 und Amo-1)).

#### Immunogene

Monoklonale Anti-Human-Plasmazelle (Maus), Klon VS38c: Membranpräparat aus MCF-7 AdR Zellen (Zelllinie der Brustkarzinome) (2).

Anti-Human-Kappa-L-Ketten (Kaninchen): Aus gepooltem Humanserum isolierte polyklonale Immunglobulin-L-Ketten vom Typ Kappa.

Anti-Human-Lambda-L-Ketten (Kaninchen): Aus gepooltem Humanserum isolierte polyklonale Immunglobulin-L-Ketten vom Typ Lambda.

#### Spezifität

Anti-Plasmazelle, VS38c, wurde für den/die Sixth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (6. Internationale(r) Workshop und Konferenz über menschliche Leukozyten differenzierende Antigene) eingereicht und dort als Anti-p63-Protein beschrieben. (1)

Anti-Lambda-L-Ketten reagieren mit freien Lambda-Ketten sowie mit Lambda-Ketten in intakten Immunglobulin-Molekülen. Die Spezifität wurde wie nachstehend beschrieben erforscht. Um eine maximale Sensitivität zu erreichen, wurde der Spezifitätstest zur gekreuzten Immunoelktrophorese vor der Affinitätsreinigung und F(ab')<sub>2</sub> Fragmentierung durchgeführt.

Gekreuzte Immunoelktrophorese: Es erscheinen nur Lambda-verwandte Präzipitate, wenn der Antikörper mit Humanplasma getestet wird. Färbung: Coomassie Brillant Blau.

Durchflusszytometrie: Wenn Anti-Lambda-L-Ketten entsprechend dem beiliegenden Färbeprotokoll zusammen mit Anti-CD19/RPE, HD37 auf lysiertes humanes Vollblut gegeben werden, lässt sich eine spezifische Färbung eines Teils der CD19-positiven B-Lymphozyten erkennen, entsprechend dem erwarteten Bereich der Lambda-L-Ketten-Expression.

Anti-Kappa-L-Ketten reagieren mit freien Kappa-Ketten sowie mit Kappa-Ketten in intakten Immunglobulin-Molekülen. Die Spezifität wurde wie nachstehend beschrieben erforscht. Um eine maximale Sensitivität zu erreichen, wurde der Spezifitätstest zur gekreuzten Immunoelktrophorese vor der Affinitätsreinigung und F(ab')<sub>2</sub> Fragmentierung durchgeführt.

Gekreuzte Immunoelktrophorese: Es erscheinen nur Kappa-verwandte Präzipitate, wenn der Antikörper mit Humanplasma getestet wird. Färbung: Coomassie Brillant Blau.

Durchflusszytometrie: Wenn Anti-Kappa-L-Ketten entsprechend dem beiliegenden Färbeprotokoll zusammen mit Anti-CD19/RPE, HD37 auf lysiertes humanes Vollblut gegeben werden, lässt sich eine spezifische Färbung eines Teils der CD19-positiven B-Lymphozyten erkennen, entsprechend dem erwarteten Bereich der Kappa-L-Ketten-Expression.

#### Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur für Fachpersonal bestimmt.
2. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN<sub>3</sub>), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Ansammlungen von Natriumazid können auch in Konzentrationen, die nicht als gefährlich klassifiziert sind, mit Blei- und Kupferabflussrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Azidansammlungen in den Leitungen vorzubeugen.
3. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs ist auch dieses entsprechend zu handhaben.

#### Aufbewahrung

Bei 2–8 °C im Dunkeln 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 Produktinstabilität. Positiv- und Negativkontrollen sollten daher zur gleichen Zeit wie die Patientenproben getestet werden. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Antikörper hindeutet, ist unser technischer Kundendienst zu verständigen.

## Färbeverfahren

Bevor Proben aus peripherem Blut gefärbt werden können, müssen die mononukleären Zellen durch Zentrifugieren auf einem Trennmedium isoliert oder die Blutprobe gewaschen werden, um die löslichen Serumproteine zu entfernen. Da humane Monozyten über ihre Oberflächen-Fc-Rezeptoren Serumimmunoglobuline binden, sollten diese Zellen durch Depletion oder Identifizierung entfernt werden.

1. 50 µL (bis zu 10<sup>6</sup> Zellen) antikoagulierte (EDTA) Blutzellen in ein 12 mm x 75 mm Polystyrol-Teströhrchen geben.
2. 2 ml PBS (Dako Code-Nr. S3024) hinzufügen. Mit dem Vortexer sorgfältig mischen.
3. 5 Minuten bei 300 x g zentrifugieren. Den Überstand vorsichtig absaugen und entsorgen, dabei etwa 50 µL Flüssigkeit übriglassen.
4. Schritte 2 und 3 zweimal wiederholen.
5. Zur Blockierung 10 µL Rabbit Immunoglobulin Fraction (Dako Code-Nr. X0903) hinzugeben. Mit dem Vortexer sorgfältig mischen und das Teströhrchen bei 37 °C 30 Minuten inkubieren.
6. Dem Teströhrchen 100 µL IntraStain Reagent A (Fixation) (Dako Code-Nr. K2311) hinzugeben und mit dem Vortexer sorgfältig mischen und dabei gewährleisten, dass alle Zellen suspendiert werden. 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
7. 2 mL PBS (Dako Code-Nr. S 3024) dazugeben und mit einem Vortexer vorsichtig mischen.
8. 5 Minuten bei 300 x g zentrifugieren. Den Überstand vorsichtig absaugen und entsorgen, dabei etwa 50 µL Flüssigkeit übriglassen.
9. Mit einem Vortexer gründlich mischen, um zu gewährleisten, dass die Zellen suspendiert sind.
10. Dem Teströhrchen 100 µL IntraStain Reagent B (Permeabilization) (Dako Code-Nr. K2311) hinzugeben.
11. Dann 20 µL TC670 dazugeben und vorsichtig mit einem Vortexer mischen.
12. Das Teströhrchen 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren.
13. Schritte 7 und 8 wiederholen.
14. Zellen in einer geeigneten Flüssigkeit, z.B. 0,3 mL PBS, für die Durchflusszytometrie resuspendieren.
15. Die Probe auf einem Durchflusszytometer analysieren oder bis zur Analyse bei 2–8 °C im Dunkeln aufbewahren. Die Proben sollten innerhalb von 8 Stunden nach dem Färben analysiert werden.

Bitte beachten, dass Fluorochrom-Konjugate lichtempfindlich sind und die Proben während des Färbeverfahrens und bis zur Analyse vor Licht geschützt werden müssen.

## Hinweise

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

Schritt 11: Das empfohlene Volumen des Konjugats gilt nur als Richtlinie. Optimale Färbungsbedingungen können je nach Probe und Präparationsmethode unterschiedlich sein und sollten vom jeweiligen Labor selbst bestimmt werden.

Es kann auch ein Teströhrchen mit einem Kontrollreagenz mitgefärbt werden. Das Kontrollreagenz sollte dem konjugierten Antikörperreagenz entsprechen. Für TC670 wird Dako Code-Nr. X0979 als dreifarbiges Kontrollreagenz empfohlen.









Schritt 15: Bei einigen Krankheitsbildern sind anomale Mengen von Zellen, die die Zielantigene exprimieren, 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.


Für die umfangreiche Analyse von Durchflusszytometrieproben werden mehrfarbige Reagenzien gegenüber einfarbigen Reagenzien vorgezogen. Bei der Mehrfarben-Analyse ist die korrekte Durchführung des Farbausgleichs von besonders hoher Bedeutung. Die Kombination aus FITC, RPE und APC ist besonders einfach in der Anwendung, da es bei den Emissionsspektren dieser Fluorochrome nur zu einer minimalen Überschneidung kommt.

## References/ Références/ Literatur

1. Turley H, Banham A, Pulford K, Gatter K. BC28.11. B-cell blind panel: antibodies recognizing the human p63 protein. 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. 245-8.
2. Turley H, Jones M, Erber W, Mayne K, de Waele M, Gatter K. VS38: a new monoclonal antibody for detecting plasma cell differentiation in routine sections. J Clin Pathol 1994;47:418-22.

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

 REF	Catalogue number Référence du catalogue Katalognummer	 2 °C - 8 °C	Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich		Use by Utiliser avant Verwendbar bis
 IVD	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum	 LOT	Batch code Réf. du lot Chargenbezeichnung		Manufacturer Fabricant Hersteller
	Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	 EC REP	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