

MultiMix™

Triple-Colour Reagent
Anti-Human CD13/FITC
Anti-Human HLA-DR Antigen/RPE
Anti-Human CD117/APC
Code TC685

ENGLISH**Intended use**

For in vitro diagnostic use.

TC685 is intended for use in flow cytometry. The reagent is intended for use in identification of cells expressing CD13, HLA-DR Antigen and CD117.

CD13 is expressed on the surface of committed granulocyte-monocyte progenitors (CFU-GM) and by cells of the granulocyte and monocyte lineages at all stages of differentiation, as well as by the neoplastic counterparts of these cells (1, 2). The antigen is also expressed on a small proportion of large granular lymphocytes but not on other lymphocytes. Further, CD13 is found in some non-haematopoietic tissues (1-4).

The HLA-DR antigen is constitutively expressed on antigen-presenting cells, such as B lymphocytes, monocytes and dendritic cells but can also be detected on activated T lymphocytes and activated granulocytes (5, 6). Occasionally, natural killer cells express HLA-DR antigen (1). The antigen has been found expressed in cases of different types of acute lymphoblastic leukaemias, acute myeloid leukaemias (AML) except AML-M3, chronic T-cell leukaemias, chronic myeloid leukaemias (CML) and B- and T-cell non-Hodgkin's leukaemias (1, 7).

CD117 is useful for identification of AML, and for classification of leukaemias (8-10). CD117 is a marker for tissue mast cells, haematopoietic stem cells, and progenitor cells in normal human bone marrow. The majority (50-70%) of CD117-positive marrow cells coexpress CD34 and comprise progenitor cells and their precursors of all haematopoietic lineages (10).

TC685 is not intended for tissue typing. 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

TC685 comprises the following three matched fluorescent antibodies:

Monoclonal Mouse Anti-Human CD13, Clone WM-47, conjugated with fluorescein isothiocyanate isomer 1 (FITC).

Monoclonal Mouse Anti-Human HLA-DR Antigen, Clone AB3, conjugated with R-phycoerythrin (RPE).

Monoclonal Mouse Anti-Human CD117, Clone 104D2, conjugated with allophycocyanin (APC).

The three conjugates in TC685 have been produced from purified monoclonal mouse antibodies of isotypes IgG1, kappa (Anti-CD13), IgG2a, kappa (Anti-HLA-DR Antigen) and IgG1, kappa (Anti-CD117). TC685 is provided in liquid form in buffer containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 15 mmol/L NaN₃, pH 7.2. Each vial contains 50 tests (20 µL of conjugate for up to 10⁶ leucocytes from normal human peripheral blood).

Specificity

Anti-CD13, WM-47, was included in the Fourth and Fifth International Workshops and Conferences on Leucocyte Differentiation Antigens and studies by a number of laboratories confirmed its reactivity with the CD13 antigen (4, 11). Anti-CD13, WM-47, reacts with CFU-GM cells, normal granulocytic and monocytic cells at all stages of differentiation (1, 4, 11). It does not react with lymphocytes and platelets (3). Flow cytometric analysis demonstrated that Anti-CD13, WM-47, labels AML (9/9 cases) and CML in myeloid blast crisis (7/7 cases). It does not react with common acute lymphoblastic leukaemia (0/8 cases) or T-cell acute lymphoblastic leukaemia (0/1 case) (3).

Anti-Human HLA-DR Antigen, AB3, reacts with the DRw52 determinant of the HLA-DR molecule. The specificity has been tested with transfectants expressing HLA-DRw52. Anti-Human HLA-DR Antigen, AB3, does not react with transfectants expressing HLA-DP or HLA-DQ antigen. The antibody has been submitted to the Eighth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens.

Anti-CD117, 104D2, was included in the Sixth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens, and studies by a number of laboratories confirmed its reactivity with CD117 (10).

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.

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 reagent is suspected, contact our Technical Services.

Staining procedure

1. Transfer 100 µL of anticoagulated (EDTA) blood to a 12 mm x 75 mm polystyrene test tube.
2. Add 20 µL of TC685 and mix gently by using a vortex mixer.
3. Incubate the tube in the dark at 2-8 °C for 30 minutes or at room temperature (20-25 °C) for 15-30 minutes.
4. Add 100 µL of Uti-Lyse™ Reagent A (Dako code S3325) to the tube and mix gently by using a vortex mixer. Incubate the tube for 10 minutes at room temperature in the dark.
5. Add 1 mL of Uti-Lyse™ Reagent B (Dako code S3325) to the tube and mix gently by using a vortex mixer. Incubate the tube for 10 minutes at room temperature in the dark.
6. 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.
7. Add 2 mL of PBS (Dako code S3024) to the tube and resuspend the cells by using a vortex mixer.
8. Repeat step 6.
9. Resuspend the cells in an appropriate fluid for flow cytometry, e.g. 0.3 mL PBS.
10. Analyse the sample on a flow cytometer or store it in the dark at 2-8 °C until analysis. Samples should be analysed within 24 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 2: The volume of conjugate recommended is a guideline only. Optimal staining conditions may vary depending on specimen and preparation method and should be determined by each individual laboratory.

It is optional to include a control reagent test tube. The control reagent should match the isotypes and fluorochromes of the conjugated antibody reagent. The recommended Triple-Colour Control Reagent for TC685 is Dako code X7904.

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

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

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.

Le produit TC685 est destiné à être utilisé en cytométrie en flux. Le réactif est destiné à être utilisé pour l'identification des cellules exprimant le CD13, l'antigène HLA-DR et le CD117.

Le CD13 est exprimé sur la surface des précurseurs déterminés des granulocytes-monocytes (CFU-GM) et par les cellules des lignées granulocytaire et monocyttaire à tous les stades de la différenciation, ainsi que par les équivalents néoplasiques de ces cellules (1, 2). L'antigène est également exprimé sur une faible proportion des grands lymphocytes granuleux mais pas sur les autres lymphocytes. De plus, le CD13 est présent dans certains tissus non hématopoïétiques (1-4).

L'antigène HLA-DR est exprimé de façon constitutive dans les cellules présentant des antigènes, comme les lymphocytes B, les monocytes et les cellules dendritiques mais est également détectable sur les lymphocytes T activés et les granulocytes activés (5, 6). Il arrive que les cellules tueuses naturelles expriment l'antigène HLA-DR (1). On a constaté l'expression de l'antigène dans différents types de leucémies lymphoblastiques aiguës, de leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sauf les LAM-M3, les leucémies à lymphocytes T chroniques, les leucémies chroniques myéloïdes (LCM) et les leucémies non hodgkiniennes à lymphocytes B et T (1, 7).

Le CD117 facilite l'identification des LAM et la classification des leucémies (8-10). Le CD117 est un marqueur des mastocytes tissulaires, des cellules souches hématopoïétiques et des progéniteurs de la moelle osseuse humaine saine. La majorité (50-70%) des cellules médullaires positives au CD117 expriment simultanément le CD34 et comprennent les progéniteurs ainsi que leurs précurseurs toutes les lignées hématopoïétiques (10).

Le produit TC685 n'est pas conçu pour le typage des tissus. 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 TC685 comprend les trois anticorps fluorescents associés suivants :

Monoclonal Mouse Anti-Human CD13, clone WM-47, conjugué à l'isomère 1 de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC).

Monoclonal Mouse Anti-Human HLA-DR Antigen, clone AB3, conjugué à la R-phycoérythrine (RPE).

Monoclonal Mouse Anti-Human CD117, clone 104D2, conjugué à l'allophycocyanine (APC).

Les trois conjugués du TC685 ont été préparés à partir d'anticorps monoclonaux purifiés de souris, des isotypes IgG1, kappa (anti-CD13), IgG2a, kappa (antigène anti-HLA-DR) et IgG1, kappa (anti-CD117). Le TC685 est fourni sous forme liquide dans un tampon contenant 1 % d'albumine de sérum bovin (BSA) et 15 mmol/L de NaN₃ (azide de sodium) à pH 7,2. Chaque flacon contient la quantité de conjugué nécessaire pour effectuer 50 tests (20 µL de conjugué pour 10⁶ leucocytes au maximum à partir de sang périphérique humain sain).

Spécificité

L'anti-CD13, WM-47, a été inclus lors des Fourth and Fifth International Workshops and Conferences on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Quatrième et Cinquième Conférences et Ateliers Internationaux sur les Antigènes de Différenciation des Leucocytes Humains (HLDA)). Des études réalisées par plusieurs laboratoires ont confirmé sa réactivité au CD13 (4, 11). L'anti-CD13, WM-47, réagit aux cellules CFU-GM, aux cellules granulocytaires et monocytaires normales à tous les stades de la différenciation (1, 4, 11). Il ne réagit pas aux lymphocytes et aux plaquettes (3). Les analyses par cytométrie en flux indiquent que l'anti-CD13, WM-47, marque les LAM (dans 9 cas sur 9) et les LCM lors des crises blastiques de leucémie myéloïde (dans 7 cas sur 7). Il ne réagit pas aux leucémies lymphoblastiques aiguës communes (0 cas sur 8) ou aux leucémies lymphoblastiques aiguës à lymphocytes T (0 cas sur 1) (3).

L'antigène anti-HLA-DR humain, AB3, réagit au déterminant DRw52 de la molécule HLA-DR. La spécificité de cet antigène a été testée avec des transfectants exprimant la HLA-DRw52. L'antigène anti-HLA-DR humain, AB3, ne réagit pas aux transfectants exprimant les antigènes HLA-DP ou HLA-DQ. L'anticorps a été soumis aux études du Eighth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Huitième Conférence et Atelier Internationaux sur les Antigènes de Différenciation des Leucocytes Humains (HLDA)).

L'anti-CD117, 104D2, a été inclus 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 (HLDA)). Des études réalisées par plusieurs laboratoires ont confirmé sa réactivité au CD117 (10).

Précautions

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

Conserver à l'abri de la lumière 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 le réactif, contacter notre service technique.

Procédure de coloration

1. Transférer 100 µL de sang non coagulé (EDTA) dans un tube à essai en polystyrène de 12 mm x 75 mm.
2. Ajouter 20 µL de TC685 et mélanger doucement à l'aide d'un mélangeur vortex.
3. Incuber le tube dans l'obscurité entre 2 et 8 °C pendant 30 minutes ou à température ambiante (20-25 °C) pendant 15 à 30 minutes.
4. Ajouter 100 µL d'Uti-Lyse™ Reagent A (réf. S3325 de Dako) dans le tube et mélanger doucement à l'aide d'un mélangeur vortex. Incuber le tube dans l'obscurité pendant 10 minutes à température ambiante.
5. Ajouter 1 mL d'Uti-Lyse™ Reagent B (réf. S3325 de Dako) dans le tube et mélanger doucement à l'aide d'un mélangeur vortex. Incuber le tube dans l'obscurité pendant 10 minutes à température ambiante.
6. 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.
7. Ajouter 2 mL de PBS (réf. S3024 de Dako) dans le tube et remettre les cellules en suspension à l'aide d'un mélangeur vortex.

- Répéter l'étape 6.
- Remettre les cellules en suspension dans un liquide approprié pour la cytométrie en flux, ex. : 0,3 mL de PBS.
- Analyser l'échantillon sur un cytomètre en flux ou conserver à l'abri de la lumière entre 2 et 8 °C jusqu'à l'analyse. Analyser les échantillons dans les 24 heures qui suivent la coloration.

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 comme contrôle de réactif et de préparation.

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

Un tube à essai de réactif de contrôle est facultatif. Le réactif de contrôle doit correspondre aux isotopes et aux fluorochromes du réactif anticorps conjugué. Le Triple-Colour Control Reagent recommandé pour le TC685 porte la référence Dako X7904.

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

Étape 10 : Pour certaines maladies, on peut s'attendre à obtenir des anomalies du nombre de cellules exprimant l'antigène cible ou des niveaux aberrants d'expression de l'antigène. Cela peut modifier le 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. L'association du FITC, de la RPE et de l'APC est particulièrement facile à utiliser car le chevauchement des spectres d'émission de ces fluorochromes est minimal.

DEUTSCH

Verwendungszweck

Zur In-vitro-Diagnostik.

TC685 ist für durchflusszytometrische Testverfahren bestimmt. Das Reagenz dient zur Identifizierung von Zellen, die CD13, das HLA-DR Antigen und CD117 exprimieren.

CD13 wird auf der Oberfläche gebundener Granulozyten- und/oder Monozyten-Progenitorzellen (CFU-GM), von Zellen granulozytischen bzw. monozytischen Ursprungs in allen Stadien der Differenzierung sowie deren neoplastischen Entsprechungen exprimiert (1, 2). Ferner wird das Antigen von einem kleinen Teil der großzellig-granulären Lymphozyten, nicht jedoch von anderen Lymphozyten exprimiert. CD13 ist außerdem in bestimmten nicht-hämatopoetischen Geweben nachweisbar (1–4).

Das HLA-DR Antigen wird konstitutiv auf antigenbildenden Zellen wie z.B. B-Lymphozyten, Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert, ist aber auch auf aktivierten T-Lymphozyten und Granulozyten nachweisbar (5, 6). Gelegentlich exprimieren zudem natürliche Killerzellen das HLA-DR Antigen (1). Expression des Antigens wurde bei Fällen verschiedener Typen der akuten lymphoblastischen bzw. myeloischen Leukämie (AML) mit Ausnahme der AML-M3, der chronischen T-Zellen- bzw. myeloischen Leukämie (CML) sowie bei Non-Hodgkin-Leukämien vom B-Zell- und T-Zell-Typ nachgewiesen (1, 7).

CD117 dient zur Identifizierung der AML sowie zur Klassifizierung von Leukämien (8–10). Bei CD117 handelt es sich um einen Marker für Gewebe-Mastzellen, hämatopoetische Stammzellen und Vorläuferzellen in normalem humanem Knochenmark. Die Mehrzahl (50–70 %) der CD117-positiven Markzellen koexprimieren CD34; hierzu gehören Progenitorzellen und ihre Vorläufer aller hämatopoetischen Abstammungslinien (10).

TC685 ist nicht für die Gewebetypisierung bestimmt. Auswertungen müssen von einem qualifizierten Experten unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer Diagnostiktests des Patienten vorgenommen werden.

Mitgelieferte Reagenzien

TC685 enthält folgende drei aufeinander abgestimmte fluoreszierende Antikörper:

Monoclonal Mouse Anti-Human CD13, Klon WM-47, konjugiert mit Fluoreszein-Isothiozyanat-Isomer 1 (FITC).

Monoclonal Mouse Anti-Human HLA-DR Antigen, Klon AB3, konjugiert mit R-Phycoerythrin (RPE).

Monoclonal Mouse Anti-Human CD117, Klon 104D2, konjugiert mit Allophycocyanin (APC).

Die drei in TC685 enthaltenen Konjugate wurden aus gereinigten monoklonalen Mausantikörpern der Isotypen IgG1, Kappa (Anti-CD13), IgG2a, Kappa (Anti-HLA-DR Antigen) und IgG1, Kappa (Anti-CD117) hergestellt. TC685 wird in flüssiger Form in einem Puffer mit 1 % Rinder Serum-Albumin (BSA) und 15 mmol/L Na₂S₂O₃, pH 7,2 geliefert. Das Konjugat in jedem Fläschchen ist ausreichend für 50 Tests (20 µL Konjugat für bis zu 10⁶ Leukozyten aus normalem humanem peripherem Blut).

Spezifität

Anti-CD13, WM-47 wurde bei den Fourth and Fifth International Workshops and Conferences on Human Leucocyte Differentiation Antigens (4. und 5. Internationale(r) Workshop und Konferenz über menschliche Leukozyten differenzierende Antigene) untersucht; seine Reaktivität mit dem CD13-Antigen wurde in Studien einer Reihe von Labors bestätigt (4, 11). Anti-CD13, WM-47 reagiert mit CFU-GM-Zellen, normalen granulozytischen und monozytischen Zellen in allen Stadien der Differenzierung (1, 4, 11). Es reagiert weder mit Lymphozyten noch mit Thrombozyten (3). Durchflusszytometrische Analysen ergaben, dass Anti-CD13, WM-47 sowohl AML (9/9 Fällen) als auch CML in der myeloischen Blastenkrise (7/7 Fällen) markiert. Es reagiert nicht mit der akuten lymphoblastischen Leukämie (0/8 Fällen) bzw. der akuten lymphoblastischen T-Zell-Leukämie (0/1 Fall) (3).

Das Anti-Human HLA-DR Antigen, AB3 reagiert mit der DRw52-Determinante des HLA-DR-Moleküls. Die Spezifität wurde mit HLA-DRw52 exprimierenden Transfektanten getestet. Das Anti-Human HLA-DR Antigen, AB3 reagiert nicht mit Transfektanten, die das HLA-DP- bzw. HLA-DQ-Antigen exprimieren. Der Antikörper wurde bei dem/der Eighth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (8. Internationale(r) Workshop und Konferenz über menschliche Leukozyten differenzierende Antigene) untersucht.

Anti-CD117, 104D2 wurde bei dem/der Sixth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (6. Internationale(r) Workshop und Konferenz über humane Leukozyten differenzierende Antigene) untersucht, und seine Reaktivität mit CD117 wurde in Studien einer Reihe von Labors bestätigt (10).

Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für Fachpersonal bestimmt.
- Dieses Produkt enthält Natriumazid (Na₂N₂), 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.
- Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.

Aufbewahrung

Bei 2–8 °C im Dunkeln aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Fläschchen aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien anders als entsprechend den in der Packungsbeilage angegebenen Bedingungen aufbewahrt, muss deren Verwendung vom Benutzer validiert 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 Reagenz hindeutet, ist unser technischer Kundendienst zu verständigen.

Färbeverfahren

- 100 µL antikoaguliertes (EDTA) Blut in ein 12 mm x 75 mm Polystyrol-Teströhrchen geben.
- 20 µL TC685 zugeben und mit einem Vortexer vorsichtig mischen.
- 30 Minuten im Dunkeln bei 2–8 °C oder 15–30 Minuten bei Raumtemperatur (20–25 °C) inkubieren.

4. 100 µL Uti-Lyse™ Reagent A (Dako Code-Nr. S3325) zugeben und mit einem Vortexer vorsichtig mischen. Teströhrchen 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren.
5. 1 mL Uti-Lyse™ Reagent B (Dako Code-Nr. S3325) zugeben und mit einem Vortexer vorsichtig mischen. Teströhrchen 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren.
6. 5 Minuten bei 300 x g zentrifugieren. Den Überstand vorsichtig absaugen und entsorgen, dabei etwa 50 µL Flüssigkeit übriglassen.
7. 2 mL PBS (Dako Code-Nr. S3024) dazugeben und die Zellen auf einem Vortexer resuspendieren.
8. Schritt 6 wiederholen.
9. Zellen in einer geeigneten Flüssigkeit für die Durchflusszytometrie, z.B. 0,3 mL PBS, resuspendieren.
10. Die Probe auf einem Durchflusszytometer analysieren oder bis zur Analyse bei 2–8 °C im Dunkeln aufbewahren. Die Proben innerhalb von 24 Stunden nach dem Färben analysieren.

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

Es kann auch ein Teströhrchen mit einem Kontrollreagenz mitgefärbt werden. Das Kontrollreagenz sollte den Isotypen und Fluorochromen des konjugierten Antikörperreagenzes entsprechen. Für TC685 wird Dako Code-Nr. X7904 als dreifarbiges Kontrollreagenz empfohlen.

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










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

Für die umfangreiche Analyse von Durchflusszytometrieproben sind mehrfarbige Reagenzien einfarbigen vorzuziehen. Die korrekte Durchführung des Farbausgleichs ist bei der Mehrfarben-Analyse von besonderer Bedeutung. Die Kombination aus FITC, RPE und APC ist besonders einfach in der Anwendung, da es bei den Emissionsspektren dieser Fluorochrome nur zu minimalen Überschneidungen kommt.

References/ Références/ Literatur

1. van Dongen JJM, Adriaansen HJ. Immunobiology of leukemia. In: Henderson ES, Lister TA, Greaves MF, editors. Leukemia. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo: WB Saunders Company; 1996. p. 83-130.
2. Turni L, Shaw S, Watson B, Mason D. CD guide. In: Mason D, André P, Bensussan A, Buckley C, Civin C, Clark E, et al., editors. Leucocyte typing VII. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 7th International Workshop and Conference; 2000 June 19-23; Harrogate, United Kingdom. New York: Oxford University Press Inc.; 2002. p. 761.
3. Favaloro EJ, Bradstock KF, Kabral A, Grimsley P, Zowtyj H, Zola H. Further characterization of human myeloid antigens (gp160,95; gp150; gp67): investigation of epitopic heterogeneity and non-haemopoietic distribution using panels of monoclonal antibodies belonging to CD-11b, CD-13 and CD-33. *Br J Haematol* 1988;69:163-71.
4. Look AT, Ashmun RA, Shapiro LH, O'Connell PJ, Gerkis V, D'Apice AJ, et al. M2.1. Report on the CD13 (aminopeptidase N) cluster workshop. 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. 784-7.
5. Naverrete CV. The HLA system in blood transfusion. *Baillière's Clin Haematol* 2000;13:511-32.
6. Erber WN, Pinching AJ, Mason DY. Immunocytochemical detection of T and B cell populations in routine blood smears. *Lancet* 1984;i:1042-5.
7. Smith MEF, Holgate CS, Williamson JMS, Grigor I, Quirke P, Bird CC. Major histocompatibility complex class II antigen expression in B and T cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Pathol* 1987;40:34-41.
8. Bahia DMM, Yamamoto M, de Lourdes M, Chauffaille LF, Kimura EYS, Bordin JO, et al. Aberrant phenotypes in acute myeloid leukaemia: a high frequency and clinical significance. *Haematologica* 2001;86:801-6.
9. Bühring H-J, Ullrich A, Schaudt K, Müller CA, Busch FW. The product of the proto-oncogene c-kit (P145^{c-kit}) is a human bone marrow surface antigen of hemopoietic precursor cells which is expressed on a subset of acute nonlymphoblastic leukemic cells. *Leukemia* 1991;5:854-60.
10. Ashman LK, Cambareri AC, Nguyen L, Bühring H-J. CR5. CD117 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. 816-8.
11. Ashmun RA, Holmes KV, Shapiro LH, Favaloro EJ, Razak K, de Crom RPG, et al. M3. CD13 (aminopeptidase N) cluster workshop 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. Volume 1. p. 771-5.

Explanation of symbols/ Explication des symboles/ Erläuterung der Symbole

 <p>Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer</p>	 <p>Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich</p>	 <p>Use by Utiliser jusque Verwendbar bis</p>
 <p>In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-Vitro-Diagnostikum</p>	 <p>Keep away from sunlight (consult storage section) Tenir à l'abri de la lumière du soleil (voir la section Conservation) Vor Sonnenlicht schützen (siehe Abschnitt Aufbewahrung)</p>	 <p>Manufacturer Fabricant Hersteller</p>
 <p>Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten</p>	 <p>Batch code Code du lot Chargenbezeichnung</p>	 <p>Authorized representative in the European Community Représentant agréé dans la Communauté européenne Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft</p>



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