

**Monoclonal Mouse
Anti-Human
CD22/PerCP-Cy5.5
Clone 4KB128**

Code PR707

ENGLISH

Intended use	For in vitro diagnostic use. Monoclonal Mouse Anti-Human CD22/PerCP-Cy5.5, Clone 4KB128, is intended for use in flow cytometry. Anti-CD22, clone 4KB128, is intended for use in the identification of cells expressing CD22. CD22 is a pan-B cell marker enabling detection of B cells in peripheral blood (1). CD22 is a recommended marker for B-cell lineage acute leukemia (2) together with a panel of other antibodies (3). Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a certified professional.
Synonyms for antigen	B lymphocyte cell adhesion molecule (BL-CAM), Lyb-8.2 (1, 4).
Summary and explanation	CD22 is a 140 kDa single chain type 1 transmembrane glycoprotein (5). Cloning of the CD22 gene has revealed that CD22 is a member of the IgG superfamily and homologous to several other proteins, including myelin basic protein and members of the carcinoembryonic antigen (CEA) family (4). The structural features of CD22 suggest that CD22 would mediate intercellular adhesion, however, further work is needed to understand the in vivo function of CD22 and to identify physiologically significant ligands (1). CD22 expression is restricted to normal and neoplastic B cells and is absent from other hematopoietic cell types (2). CD22 is first expressed in pro-B and pre-B cells, largely as a cytoplasmic protein, and only later at the mature B-cell stage is it found on the cell surface (1, 2). The antigen is lost during the terminal stages of differentiation prior to the plasma cell stage. Most precursor-B-cell acute lymphoblastic leukemias (ALL) express both cytoplasmic and membrane forms of CD22, thus prominent surface expression of CD22 was observed in 90% of 52 precursor-B-ALL (2).
Reagent provided	The Anti-CD22 conjugate, PR707, 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 (5 µL conjugate /test) of 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. It is recommended to use a non-reactive monoclonal antibody of the same isotype and conjugated to PerCP-Cy5.5 as a negative control reagent.
Immunogen	Neoplastic cells from hairy cell leukemia (6).
Specificity	Anti-CD22, 4KB128, was included in the Third and Fifth International Workshops and Conferences on Human Leucocyte Differentiation Antigens (2, 6), and studies by different laboratories confirmed its reactivity with the CD22 antigen. Anti-CD22, 4KB128, was shown to detect surface membrane CD22 on precursor B cells (2). A weak staining of neutrophils in blood smears may occasionally be observed with this antibody. Similarly, a weak staining of neutrophils may be seen when clone 4KB128 is used in flow cytometry for intracellular staining of leucocytes from normal human peripheral blood.
Precautions	1. For in vitro diagnostic use. 2. For professional users. 3. 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. 4. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used. 5. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin. 6. 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. 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 Support.
Staining procedure	1. Transfer 100 µL of anticoagulated blood to a 12 mm x 75 mm polystyrene test tube. 2. Add 5 µL of fluorochrome-conjugated anti-CD22 and mix gently by using a vortex mixer. 3. Incubate the tube in the dark at 2-8 °C for 30 minutes. 4. Add 2 mL of EasyLyse™ lysing reagent (Code S2364, diluted 20 times) to the tube and immediately mix gently using a vortex mixer. Incubate the tube for 15 minutes at room temperature in the dark. 5. 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. 6. Add 2 mL of PBS (Code S3024) to the tube and resuspend the cells using a vortex mixer.

7. Repeat step 5.
8. Resuspend the cells in an appropriate fluid for flow cytometry, e.g. 0.4 mL PBS.
9. Analyze the sample on a flow cytometer.

Procedural notes

The recommended anticoagulant is EDTA. Heparin and citrate may be used but occasionally give more debris. It is recommended to include a suitable positive and negative control sample with each run for reagent and preparation control.

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

Product-specific limitations

It has been observed that RPE-Cy5-conjugates and PerCP-Cy5.5-conjugates may bind to monocytes, resulting in background staining (7, 8).

FRANÇAIS

Utilisation prévue

Pour utilisation diagnostique in vitro.

Le Monoclonal Mouse Anti-Human CD22/PerCP-Cy5.5, Clone 4KB128, est destiné à être utilisé en cytométrie de flux. L'anticorps anti-CD22, clone 4KB128, est destiné à être utilisé pour l'identification des cellules exprimant le CD22. Le CD22 est un marqueur de cellules pan-B permettant la détection des lymphocytes B dans le sang périphérique (1). Le CD22 est un marqueur recommandé pour la leucémie aiguë de la lignée B (2) avec un panel d'autres anticorps (3). Les résultats doivent être interprétés par un professionnel qualifié et tenir compte des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques.

Synonymes de l'antigène

Molécule d'adhérence cellulaire des lymphocytes B (BL-CAM), Lyb-8.2 (1, 4).

Résumé et explication

Le CD22 est une glycoprotéine transmembranaire à simple chaîne de type 1 de 140 kDa (5). Le clonage du gène CD22 a révélé que le CD22 est un membre de la super-famille des IgG et qu'il est homologue à plusieurs autres protéines, y compris la protéine de base de la myéline et les membres de la famille des antigènes carcin-embryonnaires (ACE) (4). Les caractéristiques structurelles du CD22 suggèrent que le CD22 agirait comme médiateur de l'adhésion intercellulaire. Cependant, des travaux supplémentaires sont nécessaires pour comprendre la fonction *in vivo* du CD22 et pour identifier les ligands physiologiquement significatifs (1).

L'expression du CD22 est limitée aux lymphocytes B sains et néoplasiques. Elle est absente des autres types de cellules hématopoïétiques (2). Le CD22 est d'abord exprimé dans les cellules pro-B et pré-B, principalement sous forme de protéine cytoplasmique, et ce n'est que plus tard, au stade mature des lymphocytes B, qu'il apparaît sur la surface cellulaire (1, 2). L'antigène disparaît pendant les étapes terminales de la différenciation avant l'étape des plasmocytes. La plupart des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) à lymphocytes B précurseurs expriment à la fois des formes cytoplasmiques et membranaires du CD22. C'est pourquoi une expression en surface du CD22 importante a été observée dans 90% des 52 LAL à lymphocytes B précurseurs (2).

Réactif fourni

Le conjugué anti-CD22, PR707, a été préparé à partir d'un anticorps monoclonal de souris purifié. Le conjugué 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_3) d'un pH de 7,2. Chaque flacon contient du conjugué pour 100 tests (5 μL de conjugué/test) de 10^6 leucocytes au maximum à partir de sang périphérique humain sain.

Isotype : IgG1, kappa. **Concentration des conjugués en mg/L :** Voir l'étiquette sur le flacon.

Il est recommandé d'utiliser un anticorps monoclonal non réactif du même isotype et conjugué à la PerCP-Cy5.5 comme réactif de contrôle négatif.

Immunogène

Cellules néoplasiques issues de leucémies tricholeucocytes (6).

Spécificité

L'anticorps anti-CD22, 4KB128, a été inclus lors des Third and Fifth International Workshops and Conferences on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Troisième et Cinquième Conférences et Ateliers Internationaux sur les Antigènes de Différenciation des Leucocytes Humains (HLDA)) (2, 6). Des études réalisées par différents laboratoires ont confirmé sa réactivité avec l'antigène du CD22.

Il a été démontré que l'anticorps anti-CD22, 4KB128, détecte le CD22 de la membrane de surface des lymphocytes B précurseurs (2). Une faible coloration des neutrophiles dans les frottis sanguins peut parfois être observée avec cet anticorps.

De la même manière, une coloration faible des neutrophiles peut être observée lorsque le clone 4KB128 est utilisé en cytométrie de flux pour la coloration intracellulaire de leucocytes issus de sang périphérique humain sain.

Précautions d'emploi

1. Pour utilisation diagnostique in vitro.
2. Pour utilisateurs professionnels.
3. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN_3), produit chimique hautement毒ique 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 et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosives. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
4. Comme avec tout produit d'origine biologique, respecter les procédures de manipulation appropriées.
5. Porter un équipement de protection individuelle approprié pour éviter tout contact avec les yeux et la peau.
6. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales, nationales et européennes.

Conservation

Conserver à l'abri de la lumière entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée 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'existe pas de signe particulier pour indiquer l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par des différences dans les procédures du laboratoire et qu'un problème lié à l'anticorps est suspecté, contacter l'assistance technique de Dako.

Procédure de coloration	<ol style="list-style-type: none"> Transférer 100 µL de sang non coagulé dans un tube à essai en polystyrène de 12 mm x 75 mm. Ajouter 5 µL d'anticorps anti-CD22 conjugué à un fluorochrome et mélanger doucement à l'aide d'un mélangeur Vortex. Incuber le tube dans l'obscurité à 2-8 °C pendant 30 minutes. Ajouter 2 mL de réactif de lyse EasyLyse™ (réf. S2364, dilué 20 fois) dans le tube et mélanger immédiatement à l'aide d'un mélangeur Vortex. Incuber le tube dans l'obscurité pendant 15 minutes à température ambiante. 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. Ajouter 2 mL de PBS (réf. S3024) dans le tube et remettre les cellules en suspension à l'aide d'un mélangeur Vortex. Répéter l'étape 5. Remettre les cellules en suspension dans un liquide approprié pour la cytométrie en flux, ex. : 0,4 mL de PBS. Analyser l'échantillon à l'aide d'un cytomètre en flux.
Remarques sur la procédure	<p>L'anticoagulant recommandé est l'EDTA. L'héparine et le citrate peuvent être utilisés, mais ils produisent parfois plus de débris. Il est recommandé d'inclure un échantillon de contrôle positif et négatif approprié avec chaque cycle en tant que contrôle de réactif et de préparation.</p> <p>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.</p>
Limitations spécifiques du produit	<p>On a constaté que des conjugués à la RPE-Cy5 et des conjugués à la PerP-Cy5.5 peuvent se lier à des monocytes, entraînant une coloration de bruit de fond (7, 8).</p>

DEUTSCH

Verwendungszweck	Zur In-vitro-Diagnostik. Monoklonal Mouse Anti-Human CD22/PerCP-Cy5.5, Clone 4KB128, ist zur Verwendung in der Durchflusszytometrie bestimmt. Anti-CD22, Clone 4KB128, dient zur Identifizierung von Zellen, die CD22 exprimieren. Bei CD22 handelt es sich um einen Pan-B-Zellmarker, der den Nachweis von B-Zellen in peripherem Blut ermöglicht (1). CD22 wird als Marker für akute B-Zell-Leukämien (2) zusammen mit einem Panel weiterer Antikörper (3) empfohlen. Die Ergebnisse müssen von einem qualifizierten Experten unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer Diagnostiktests des Patienten ausgewertet werden
Synonyme Bezeichnungen des Antigens	B-Lymphozyten-Zelladhäsionsmolekül (BL-CAM), Lyb-8.2 (1, 4).
Zusammenfassung und Erklärung	CD22 ist ein einkettiges Typ I-Transmembran-Glykoprotein von 140 kDa (5). Durch Klonen des CD22-Gens wurde entdeckt, dass CD22 zur IgG-Superfamilie gehört und zu verschiedenen anderen Proteinen, darunter dem basischen Myelin und Mitgliedern der Familie der karzinoembryonalen Antigene(CEA) homolog ist (4). Aufgrund der strukturellen Eigenschaften von CD22 wird vermutet, dass es die interzelluläre Adhäsion vermittelt, allerdings sind noch weitere Forschungen erforderlich, um alle In-vivo-Funktionen von CD22 zu verstehen und physiologisch bedeutsame Liganden zu identifizieren (1). Die CD22-Expression beschränkt sich auf normale und neoplastische B-Zellen; sie fehlt bei anderen hämatopoetischen Zelltypen (2). CD22 wird als vorwiegend zytoplasmatisches Protein zunächst in Pro-B- und Prä-B-Zellen exprimiert und ist erst später, im Stadium der reifen B-Zellen, auf der Zelloberfläche nachweisbar (1, 2). In den terminalen Phasen der Differenzierung geht das Antigen noch vor dem Plasmazellstadium verloren. Die meisten Vorläuferzellen akuter lymphoblastischer Leukämien (ALL) vom B-Zelltyp exprimieren sowohl zytoplasmatische als auch membrane Formen von CD22; eine starke Oberflächenexpression von CD22 wurde bei 90% von 52 Fällen der Vorläufer-B-ALL beobachtet (2).
Geliefertes Reagenz	Das Anti-CD22-Konjugat PR707 wurde aus einem gereinigten monoklonalen Mausantikörper hergestellt. Das Konjugat wird in flüssiger Form in einem Puffer mit 1% Rinderserum-Albumin (BSA) und 15 mmol/L NaN ₃ , pH 7.2 geliefert. Jeder Behälter enthält 100 Tests (5 µL Konjugat/Test) für bis zu 10 ⁶ Leukozyten aus normalem humanem peripherem Blut. <u>Isotyp:</u> IgG1, Kappa. <u>Konjugatkonzentration mg/L:</u> Siehe Behälteretikett.
	Es wird empfohlen, einen nichtreaktiven monoklonalen Antikörper desselben Isotyps zu verwenden, der mit PerCP-Cy5.5 als Negativkontrollreagenz konjugiert wurde.
Immunogen	Neoplastische Zellen der Haarzellenleukämie (6).
Spezifität	Anti-CD22, 4KB128 wurde bei dem/der Third and Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (3. und 7. Internationale(r) Workshop und Konferenz über menschliche Leukozyten differenzierende Antigene) untersucht (6, 5); seine Reaktivität mit CD22 wurde in Studien einer Reihe von Labors bestätigt. Mit Anti-CD22, 4KB128 ist das Oberflächenmembran-CD22 auf Vorläufer-B-Zellen nachweisbar (2). Bei Blutausstrichen tritt mit diesem Antikörper gelegentlich eine schwache Färbung der Neutrophilen auf. Zu einer schwachen Färbung der Neutrophilen kann es ferner kommen, wenn Clone 4KB128 in der Durchflusszytometrie für die intrazelluläre Färbung von Leukozyten aus normalem humanem peripherem Blut verwendet wird.
Vorsichtsmaßnahmen	<ol style="list-style-type: none"> Zur In-vitro-Diagnostik. Für Fachpersonal. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN₃), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann Natriumazid, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Wasserleitungen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metallazid-Anreicherungen führen. Nach der Entsorgung muss mit reichlich Wasser nachgespült werden, um Metallazid-Anreicherung zu vermeiden.

4. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.
5. Geeignete persönliche Schutzausrüstung (PSA) tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
6. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, staatlichen und EU-rechtlichen Richtlinien zu entsorgen.

Lagerung

Bei 2-8 °C im Dunkeln aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Behälter aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien unter anderen als den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen diese Bedingungen vom Benutzer überprüft werden. Es gibt keine offensichtlichen Anhaltspunkte für die mögliche Instabilität dieses Produkts. Es sollten daher die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientengewebeproben mitgeführt werden. Wenn eine unerwartete Färbung beobachtet wird, welche durch Änderungen in den Labormethoden nicht erklärt werden kann, und falls Verdacht auf ein Problem mit dem Antikörper besteht, ist Kontakt mit dem technischen Kundendienst von Dako aufzunehmen.

Färbeverfahren

1. 100 µL antikoaguliertes Blut in ein 12 mm x 75 mm Polystyrol-Teströhrchen geben.
2. 5 µL Fluorochrom-konjugiertes Anti-CD22 dazugeben und mit einem Vortex-Mischer vorsichtig mischen.
3. Das Röhrchen im Dunkeln bei 2-8 °C 30 Minuten inkubieren.
4. 2 mL EasyLyse™ Lysierungsreagenz (Code-Nr. S2364, 20fach verdünnt) in das Röhrchen dazugeben und mit einem Vortex-Mischer vorsichtig mischen. Teströhrchen 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Das Röhrchen 5 Minuten bei 300 x g zentrifugieren. Den Überstand vorsichtig absaugen und entsorgen, dabei etwa 50 µL Flüssigkeit übriglassen.
6. 2 mL PBS (Code-Nr. S3024) in das Röhrchen dazugeben und die Zellen mit einem Vortex-Mischer resuspendieren.
7. Schritt 5 wiederholen.
8. Die Zellen in einer geeigneten Flüssigkeit, z. B. 0.4 mL PBS, für die Durchflusszytometrie resuspendieren.
9. Die Probe auf einem Durchflusszytometer analysieren.

Verfahrensanweisung

Der empfohlene Gerinnungshemmer ist EDTA. Heparin oder Zitrat können auch verwendet werden, allerdings entstehen dadurch mehr Zellrückstände. Es wird empfohlen, als Kontrolle für das Reagenz und das Präparat bei jedem Testdurchlauf eine geeignete Positiv- und Negativkontrollprobe mitlaufen zu lassen.

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

Produktspezifische Beschränkungen

Es wurde eine mögliche Bindung von RPE-Cy5-Konjugaten und PerCP-Cy5.5-Konjugaten an Monozyten, die zu einer Hintergrundfärbung führen kann, beschrieben (7, 8).

References/ Bibliographie/ Literaturnachweise

1. Tedder TF, Tuscano J, Sato S, Kehrl JH. CD22, a B lymphocyte-specific adhesion molecule that regulates antigen receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 1997;15:481-504.
2. Kehrl JH. B6. CD22 workshop panel 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. Volume 1. 1995. p. 523-5.
3. Wood, B. L., Arroz, M., Barnett, D., DiGiuseppe, J., Greig, B., Kussick, S. J., Oldaker, T., Shenkin, M., Stone, E. and Wallace, P. (2007), 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: Optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry*, 72B: S14–S22.
4. Wilson GL, Fox CH, Fauci AS, Kehrl JH. cDNA cloning of the B cell membrane protein CD22: a mediator of B-B cell interactions. *J Exp Med* 1991;173:137-46.
5. Engel P. CD guide. CD22. 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 Jun 19-23; Harrogate, United Kingdom. New York: Oxford University Press Inc.; 2002. p. 767-8. (3)
6. Moldenhauer G, Schwartz R, Dörken B, Hämmeler GJ. B2.2. Biochemical characterization and epitope analysis of B-lymphocyte-specific surface antigens defined by clustering Workshop monoclonal antibodies. 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. 378-82.
7. van Vugt MJ, van den Herik-Oudijk IE, van de Winkel JGJ. Binding of PE-CY5 conjugates to the human high-affinity receptor for IgG (CD64). *Blood* 1996;88:2358-61.
8. Shapiro HM. *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons Inc.; 2003. 4th ed. p. 337.

Explanation of symbols / Explication des symboles / Erläuterung der Symbole

REF	Catalogue number Référence du catalogue Katalognummer		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		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	LOT	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

