

**Polyclonal Rabbit  
Anti-Human  
Lambda Light Chains/PerCP-Cy5.5  
Rabbit F(ab')<sub>2</sub>**

**Code PR712**

**ENGLISH**

<b>Intended use</b>	For in vitro diagnostic use. PR712 is intended for use in flow cytometry. The antibody is intended for use in the identification of cells in peripheral blood that express lambda light chains. In flow cytometry, antibodies to lambda light chains are useful for the demonstration of cell surface lambda light chains, and thus, for the identification of monoclonality (clonal excess) in B-cell lymphoproliferative disorders when used together with a panel of other antibodies. Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a certified professional.
<b>Summary and explanation</b>	Most B cells, except for pre-B progenitors, pre-B cells, and mature plasma cells, express immunoglobulin on their surface. Each cell expresses only one light chain type. In normal peripheral blood and lymph nodes, there is a mixture of kappa-positive and lambda-positive cells, with two-thirds of the cells expressing kappa and one-third expressing lambda (1). Since lymphoid neoplasms are usually clonal expansions of a single cell, malignant cells uniformly express the same light chain isotype. Neoplastic B-cell chronic lymphoproliferative disorders can frequently be suspected on basis of demonstration of a marked predominance of cells expressing a single light chain type (2, 3). Rare cases of kappa-negative or lambda-negative B-cell non-Hodgkin's lymphoma have been described (3, 4).
<b>Reagent provided</b>	The Anti-Lambda Light Chains conjugate, PR712, has been produced from a F(ab') <sub>2</sub> fragment of affinity-isolated polyclonal rabbit antibody. The conjugate is provided in liquid form in buffer containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 15 mmol/L NaN <sub>3</sub> , pH 7.2. Use 5 µL of the product for staining of up to 10 <sup>6</sup> leucocytes from normal human peripheral blood. It is recommended to use a non-reactive polyclonal F(ab') <sub>2</sub> antibody conjugated to PerCP-Cy5.5 as a negative control reagent. <u>Conjugate concentration:</u> See label on vial.
<b>Manufacturing of the PerCP-Cy5.5 conjugate</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. The antibody used for PerCP-Cy5.5 conjugation has been solid-phase absorbed with human plasma proteins to remove traces of contaminating antibodies.</li> <li>2. The absorbed antibody has been further purified by affinity chromatography on a column with immobilized human lambda light chains.</li> <li>3. The affinity-isolated antibody has subsequently been degraded with pepsin and the F(ab')<sub>2</sub> fragment isolated by gel filtration.</li> <li>4. Finally, the F(ab')<sub>2</sub> fragment has been conjugated with tandem fluorochrome peridinin chlorophyll protein-Cyanine 5.5 (PerCP-Cy5.5).</li> </ol>
<b>Immunogen</b>	Polyclonal immunoglobulin chains of lambda type isolated from a pool of human sera.
<b>Specificity</b>	Anti-Lambda Light Chains reacts with free lambda chains as well as lambda chains in intact immunoglobulin molecules. The specificity of this product has been ascertained by crossed immune electrophoresis. To obtain maximum sensitivity, the crossed immune electrophoresis specificity test was performed prior to affinity purification and pepsin degradation. When Anti-Lambda Light Chains is applied as described in the staining procedure in combination with Anti-CD19/RPE, HD37 or Anti-CD19/FITC, HD37, on lysed human whole blood, a specific staining of a part of the CD19-positive B lymphocytes is seen corresponding to the expected range of lambda light chain expression. Flow cytometric analysis of single suspensions from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples demonstrated that Anti-Lambda Light Chains labels reactive hyperplastic lymph nodes (10/10 cases) (1). In non-Hodgkin's lymphomas, the antibody labeled 5/10 cases. The remaining cases were positive for kappa light chains (4/10 cases) or showed no expression of light chains (1/10 case) (3). Flow cytometric analysis of peripheral blood lymphocytes demonstrated that Anti-Lambda Light Chains labels a proportion of B-cell chronic lymphocytic leukemias. Thus, in one study of 121 cases (5), 17 were positive for lambda. In another study of 165 cases (6), 68 were positive for lambda.
<b>Precautions</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. For in vitro diagnostic use.</li> <li>2. For professional users.</li> <li>3. 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.</li> <li>4. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.</li> <li>5. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.</li> <li>6. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.</li> </ol>
<b>Storage</b>	Store in the dark at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. During storage a small precipitate may occasionally develop causing a fine granular non-specific staining. By a simple filtration (0.22 µm cellulose acetate filter), the original high quality of the conjugate will be restored. Conjugates should not be stored in diluted form. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Services.
<b>Procedural notes</b>	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. 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. It has been observed that PerCP-Cy5.5-conjugates may bind to monocytes, resulting in background staining (7, 8).
<b>Staining procedure</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Collect venous blood into a test tube containing an anticoagulant.</li> <li>2. Transfer 100 µL of the anticoagulated blood into the test tube.</li> <li>3. Add 2 mL of 0.01 mol/L PBS, pH 7.4. Mix gently by using a vortex mixer.</li> </ol>

4. Centrifuge at 300 x g for 5 minutes, then aspirate the supernatant, leaving approximately 50 µL of fluid.
5. Repeat steps 3 and 4 two more times.
6. Add 10 µL rabbit immunoglobulin fraction, Code X0903, for blocking. Mix gently by using a vortex mixer and incubate in the dark at 37 °C for 30 minutes.
7. Add 5 µL of PerCP-Cy5.5-conjugated Anti-Lambda Light Chains. Mix gently.
8. Use a non-reactive F(ab')<sub>2</sub> fragment of rabbit immunoglobulin, and conjugated with the same fluorochrome, as a negative control.
9. Incubate in the dark at 4 °C for 30 minutes.
10. Add 1-2 mL of erythrocyte-lysing reagent to each tube and mix gently. Follow the reagent manufacturer's recommendations for volume, time and temperature of incubation. (During development product performance was validated with EasyLyse erythrocyte-lysing reagent Code S2364).
11. Centrifuge at 300 x g for 5 minutes.
12. Aspirate the supernatant, leaving approximately 50 µL of fluid.
13. Add 2 mL PBS, pH 7.4. Mix gently by using a vortex mixer.
14. Repeat steps 11 and 12.
15. Resuspend pellet in an appropriate fluid for flow cytometry, e.g. PBS, pH 7.4.
16. Analyze on a flow cytometer.

## FRANÇAIS

### Utilisation prévue

Pour utilisation diagnostique in vitro.

Le PR712 est destiné à être utilisé en cytométrie en flux. L'anticorps est destiné à être utilisé pour l'identification des cellules dans le sang périphérique qui expriment des chaînes légères lambda. En cytométrie de flux, les anticorps anti-chaînes légères lambda sont utiles pour la démonstration de chaînes légères lambda de surface cellulaire, et donc pour l'identification de la monoclonalité (excès clonal) dans les syndromes lymphoprolifératifs à lymphocytes B lorsqu'ils sont utilisés avec un panel d'autres anticorps. Les résultats doivent être interprétés par un professionnel qualifié et tenir compte des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques.

### Résumé et explication

La plupart des lymphocytes B, à l'exception des progéniteurs pré-B, des cellules pré-B et des cellules plasmiques matures, expriment l'immunoglobuline à leur surface. Chaque cellule exprime un seul type de chaîne légère. Dans le sang périphérique normal et les ganglions lymphatiques, il existe un mélange de cellules kappa positives et lambda positives, avec deux tiers des cellules exprimant kappa et un tiers exprimant lambda (1). Étant donné que les néoplasmes lymphoïdes sont généralement des expansions clonales d'une seule cellule, les cellules malignes expriment de manière uniforme le même isotype de chaîne légère. Les syndromes lymphoprolifératifs chroniques des lymphocytes B néoplasiques peuvent souvent être suspectés en raison de la présence d'une prédominance marquée de cellules exprimant un seul type de chaîne légère (2, 3). De rares cas de lymphomes non hodgkiniens à lymphocytes B négatifs à kappa ou négatifs à lambda ont été décrits (3, 4).

### Réactifs fournis

Le conjugué chaînes légères anti-lambda, PR712, a été produit à partir d'un fragment F(ab')<sub>2</sub> d'anticorps polyclonal de lapin isolé par affinité. 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<sub>3</sub>) d'un pH de 7,2. Utiliser 5 µl de produit pour colorer jusqu'à 10<sup>6</sup> leucocytes à partir de sang périphérique humain sain. Il est recommandé d'utiliser un anticorps F(ab')<sub>2</sub> polyclonal non réactif conjugué à la PerCP-Cy5.5 comme réactif de contrôle négatif.

Concentration des conjugués : Voir l'étiquette sur le flacon.

### Fabrication du conjugué PerCP-Cy5.5

1. L'anticorps utilisé pour la conjugaison PerCP-Cy5.5 a été absorbé en phase solide avec les protéines plasmiques humaines afin d'éliminer les traces d'anticorps contaminants.
2. L'anticorps absorbé a été à nouveau purifié par chromatographie d'affinité sur une colonne avec des chaînes légères lambda humaines immobilisées.
3. L'anticorps isolé par affinité est ensuite dégradé par la pepsine et le fragment F(ab')<sub>2</sub> isolé par filtration sur gel.
4. Enfin, le fragment F(ab')<sub>2</sub> a été conjugué au fluorochrome tandem de péridinine chlorophylle protéine-cyanine 5.5 (PerCP-Cy5.5).

### Immunogène

Chaînes d'immunoglobulines polyclonales de type lambda isolées à partir d'un pool de sérums humains.

### Spécificité

Les chaînes légères anti-lambda réagissent aux chaînes lambda libres et aux chaînes lambda présentes dans les molécules d'immunoglobuline intactes. La spécificité de ce produit a été vérifiée par immunoelectrophorèse croisée. Pour obtenir une sensibilité maximum, le test de spécificité par immunoelectrophorèse croisée a été réalisé avant la purification par affinité et la dégradation par la pepsine.

Quand les chaînes légères anti-lambda sont appliquées comme décrit dans la procédure de coloration en combinaison avec l'anti-CD19/RPE, HD37 ou Anti-CD19/FITC, 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. L'analyse cytométrique en flux des suspensions simples à partir d'échantillons de tissus fixés au formol et inclus en paraffine a démontré que les chaînes légères anti-lambda ont marqué les ganglions lymphatiques hyperplasiques réactifs (10 cas sur 10) (1). Dans les lymphomes non hodgkiniens, l'anticorps a marqué dans 5 cas sur 10. Les cas restants étaient positifs pour les chaînes légères kappa (4 cas sur 10) ou n'ont montré aucune expression des chaînes légères (1 cas sur 10) (3).

L'analyse cytométrique en flux des lymphocytes de sang périphérique a démontré que les chaînes légères anti-lambda ont marqué une proportion de leucémies lymphocytaires chroniques à lymphocytes B. Ainsi, dans une étude de 121 cas (5), 17 étaient positifs aux chaînes lambda. Dans une autre étude de 165 cas (6), 68 étaient positifs aux chaînes lambda.

### Précautions d'emploi

1. Pour utilisation diagnostique in vitro.
2. Pour utilisateurs professionnels.
3. 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 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 dans l'obscurité 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. Pendant la conservation, un petit précipité peut parfois se développer et entraîner une coloration non spécifique légèrement granulaire. Par simple filtration (filtre à acétate de cellulose de 0,22 µm), la haute qualité d'origine du conjugué sera restaurée. Les conjugués ne doivent pas être stockés sous forme diluée. 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 observée, ne pouvant être expliquée par un changement des procédures du laboratoire et en cas de suspicion d'un problème avec l'anticorps, contacter le service technique Dako.

### Remarques sur la procédure

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.

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.

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.

On a constaté que des conjugués à la PerCP-Cy5.5 peuvent se lier à des monocytes, entraînant une coloration de bruit de fond (7, 8).

#### Procédure de coloration

1. Prélever le sang veineux dans un tube à essai contenant un anticoagulant.
2. Transférer 100 µl de sang non coagulé dans le tube à essai.
3. Ajouter 2 ml de 0,01 mol/l de PBS, d'un pH de 7,4. Mélanger doucement à l'aide d'un mélangeur Vortex.
4. Centrifuger à 300 g pendant 5 minutes, puis aspirer le surnageant. Laisser environ 50 µl de liquide.
5. Répéter deux fois les étapes 3 et 4.
6. Ajouter 10 µl de fraction d'immunoglobuline de lapin, réf. X0903, pour bloquer. Mélanger doucement à l'aide d'un mélangeur Vortex et incuber dans l'obscurité à 37 °C pendant 30 minutes.
7. Ajouter 5 µl de chaînes légères anti-lambda conjuguées à la PerCP-Cy5.5. Mélanger doucement.
8. Utiliser un fragment F(ab')<sub>2</sub> non réactif d'immunoglobuline de lapin, et conjugué au même fluorochrome, comme contrôle négatif.
9. Incuber dans l'obscurité à 4 °C pendant 30 minutes.
10. Ajouter 1 à 2 ml de réactif de lyse érythrocytaire dans chaque tube et mélanger doucement. Suivre les recommandations du fabricant du réactif concernant le volume, la durée et la température d'incubation. (Pendant le développement, les performances du produit ont été validées avec le réactif de lyse érythrocytaire EasyLyse, réf. S2364).
11. Centrifuger à 300 g pendant 5 minutes.
12. Aspirer le surnageant en laissant environ 50 µl de liquide.
13. Ajouter 2 ml de PBS, d'un pH de 7,4. Mélanger doucement à l'aide d'un mélangeur Vortex.
14. Répéter les étapes 11 et 12.
15. Remettre le culot en suspension dans un liquide approprié pour la cytométrie en flux, par exemple PBS d'un pH de 7,4.
16. Analyser à l'aide d'un cytomètre en flux.

## DEUTSCH

#### Verwendungszweck

Zur In-vitro-Diagnostik.

PR712 ist für durchflusszytometrische Testverfahren bestimmt. Der Antikörper dient zur Identifizierung von Zellen in peripherem Blut, die Lambda-L-Ketten exprimieren. Bei der Durchflusszytometrie sind Antikörper gegen Lambda-L-Ketten bei der Verwendung mit einem Panel weiterer Antikörper hilfreich beim Nachweis von Lambda-L-Ketten auf der Zelloberfläche und damit bei der Identifizierung von Monoklonalität (klonaler Überschuss) bei lymphoproliferativen Erkrankungen der B-Zellen. Die Ergebnisse müssen von einem qualifizierten Experten unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer Diagnostiktests des Patienten ausgewertet werden.

#### Zusammenfassung und Erklärung

Die meisten B-Zellen, mit Ausnahme von Prä-B-Vorläuferzellen, Prä-B-Zellen und reifen Plasmazellen, exprimieren Immunglobulin auf ihrer Oberfläche. Jede Zelle exprimiert nur einen L-Ketten-Typ. In normalem peripherem Blut und Lymphknoten besteht eine Mischung aus Kappa-positiven und Lambda-positiven Zellen, wobei zwei Drittel der Zellen Kappa exprimieren und ein Drittel Lambda exprimiert (1). Da lymphoide Neoplasmen in der Regel klonale Expansionen einer einzelnen Zelle sind, exprimieren maligne Zellen einheitlich den gleichen L-Ketten-Isotyp. Neoplastische chronische lymphoproliferative Erkrankungen der B-Zellen können häufig auf der Grundlage des Nachweises einer ausgeprägten Prädominanz von Zellen, die einen einzigen L-Ketten-Typ exprimieren, vermutet werden (2, 3). Es wurden seltene Fälle von Kappa-negativen oder Lambda-negativen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen beschrieben (3, 4).

#### Geliefertes Reagenz

Das Anti-Lambda-L-Ketten-Konjugat, PR712, wurde aus einem F(ab')<sub>2</sub>-Fragment affinitätsisolierter polyklonaler Kaninchen-Antikörper hergestellt. Das Konjugat wird in flüssiger Form in einem Puffer mit 1% Rinderserum-Albumin (BSA) und 15 mmol/L Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, pH 7.2 geliefert. Um bis zu 10<sup>6</sup> Leukozyten aus normalem humanem peripherem Blut zu färben, 5 µL des Produkts verwenden. Es wird empfohlen, einen nichtreaktiven polyklonalen F(ab')<sub>2</sub>-Antikörper zu verwenden, der mit PerCP-Cy5.5 als Negativkontrollreagenz konjugiert wurde.

Konjugatkonzentration: Siehe Behälteretikett.

#### Herstellung des PerCP-Cy5.5-Konjugats

1. Spuren von Verunreinigungen des für die PerCP-Cy5.5-Konjugation verwendeten Antikörpers werden durch Festphasen-Absorption mit humanen Plasmaproteinen entfernt.
2. Der gebundene Antikörper wird durch Affinitätschromatographie in einer Säule mit immobilisierten humanen Lambda-L-Ketten weiter gereinigt.
3. Der affinitätsisolierte Antikörper wird anschließend durch Pepsin und die F(ab')<sub>2</sub>-Fraktion, die durch Gel-Filtration isoliert wird, abgebaut.
4. Zuletzt wird das F(ab')<sub>2</sub>-Fragment mit dem Tandemfluorochrom Peridinin-Chlorophyll-Protein-Zyanin 5.5 (PerCP-Cy5.5) konjugiert.

#### Immunogen

Aus gepooltem Humanserum isolierte polyklonale Immunglobulin-Ketten vom Typ Lambda.

#### Spezifität

Anti-Lambda-L-Ketten reagieren mit freien Lambda-Ketten sowie mit Lambda-Ketten in intakten Immunglobulin-Molekülen. Die Spezifität dieses Produktes wurde durch gekreuzte Immunelektrophorese ermittelt. Um eine maximale Sensitivität zu erreichen, wurde der Spezifitätstest mittels gekreuzter Immunelektrophorese vor der Affinitätsreinigung und dem Pepsin-Abbau durchgeführt.

Wenn Anti-Lambda-L-Ketten entsprechend dem beiliegenden Färbeverfahren zusammen mit Anti-CD19/RPE, HD37 oder Anti-CD19/FITC, 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. Die durchflusszytometrische Analyse von Einzelsuspensionen aus formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeproben zeigt, dass Anti-Lambda-L-Ketten reaktive hyperplastische Lymphknoten markieren (10/10 Fällen) (1). Bei Non-Hodgkin-Lymphomen markierte der Antikörper 5/10 Fällen. Die übrigen Fälle waren positiv auf Kappa-L-Ketten (4/10 Fällen) oder zeigten keine Expression von L-Ketten (1/10 Fällen) (3).

Die durchflusszytometrische Analyse von Lymphozyten aus peripherem Blut zeigte, dass Anti-Lambda-L-Ketten einen Teil der chronischen lymphozytären B-Zellen-Leukämien markieren. Daher waren in einer Studie mit 121 Fällen (5) 17 Fälle positiv auf Lambda. In einer weiteren Studie mit 165 Fällen (6) waren 68 Fälle positiv auf Lambda.

#### Vorsichtsmaßnahmen

1. Zur In-vitro-Diagnostik.
2. Für Fachpersonal.
3. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN<sub>3</sub>), 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 Patientengewebeprobe mitgeführt werden. Bei der Lagerung kann gelegentlich ein geringes Präzipitat entstehen, das eine feine granuläre, unspezifische Färbung verursacht. Durch eine einfache Filtration (0.22-µm-Celluloseacetat-Membranfilter) wird die ursprüngliche hohe Qualität des Konjugats wiederhergestellt. Konjugate dürfen nicht in verdünnter Form gelagert werden. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und ein Problem mit dem Antikörper vermutet wird, ist unser technischer Kundendienst zu verständigen.

## Verfahrensanleitung

Bevor Proben aus peripherem Blut gefärbt werden können, müssen die mononuklearen 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.

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.

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










## Färbeverfahren

1. Venöses Blut entnehmen und in ein Antikoagulans enthaltendes Teströhrchen abfüllen.
2. 100 µL des antikoagulierten Blutes in das Teströhrchen geben.
3. 2 mL 0.01 mol/L PBS, pH 7.4, hinzufügen. Mit dem Vortex-Mischer sorgfältig mischen.
4. 5 Minuten bei 300 x g zentrifugieren und anschließend den Überstand absaugen. Dabei etwa 50 µL Flüssigkeit übriglassen.
5. Schritte 3 und 4 zweimal wiederholen.
6. 10 µL Kaninchen-Immunglobulinfraktion, Code-Nr. X0903, zum Blockieren hinzufügen. Mit dem Vortex-Mischer sorgfältig mischen und das Teströhrchen bei 37 °C 30 Minuten im Dunkeln inkubieren.
7. 5 µL PerCP-Cy5.5-konjugierte Anti-Lambda-L-Ketten hinzufügen. Vorsichtig mischen.
8. Als Negativkontrolle ein nicht reaktives F(ab')<sub>2</sub>-Fragment des Kaninchen-Immunglobulins verwenden, das mit demselben Fluorochrom konjugiert ist.
9. Im Dunkeln bei 4 °C 30 Minuten inkubieren.
10. 1-2 mL Erythrozyten-Lysierungsreagenz in jedes Röhrchen geben und vorsichtig mischen. Die Empfehlungen des Reagenzherstellers hinsichtlich Volumen, Zeit und Temperatur der Inkubation befolgen. (Während der Entwicklung wurde die Produktleistung mit dem EasyLyse Erythrozyten-Lysierungsreagenz Code-Nr. S2364 validiert.)
11. 5 Minuten bei 300 x g zentrifugieren.
12. Den Überstand absaugen und ca. 50 µL Flüssigkeit übriglassen.
13. 2 mL PBS, pH 7.4, hinzufügen. Mit dem Vortex-Mischer sorgfältig mischen.
14. Schritte 11 und 12 wiederholen.
15. Pellet in einer für die Durchflusszytometrie geeigneten Flüssigkeit, z. B. PBS, pH 7.4, resuspendieren.
16. Auf einem Durchflusszytometer analysieren.

## References/ Bibliographie/ Literaturnachweise

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