



BD Oncomark
Anti-TCR- α/β -1
FITC/Anti-TCR- γ/δ -1
PE/CD3 PerCP-Cy5.4

Кат. № 335836

7/2010

23-13730-01



BD, логотип BD и другие товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © 2010 BD



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
San Jose, CA 95131
Тел.: 877-232-8995
Факс: 408-954-2347
ClinicalApplications@bd.com



BENEX Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ирландия
Тел.: 353-61-472920
Факс: 353-61-472907

BD Biosciences
Поддержка клиентов в Европе
Тел.: 322-400-9895
Факс: 322-401-7094
help.biosciences@europe.bd.com

bdbiosciences.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

BD Oncomark™ Anti-TCR- α/β -1 FITC/Anti-TCR- γ/δ -1 PE/CD3 PerCP-Cy5.4 предназначен для иммунофенотипирования клеток при гематологических заболеваниях методом проточной цитометрии *in vitro*.^{1, 2}

2. СОСТАВ

Anti-TCR- α/β -1, клон WT31, получают путем гибридизации клеток миеломы мышей Sp2/0-Ag14 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных человеческими тимоцитами.³

Anti-TCR- γ/δ -1, клон 11F2, получают путем гибридизации клеток миеломы мышей Sp2/0 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных частицами Sepharose®/CD3/ γ/δ комплекса рецепторов антигена Т-клетки (ТкР).⁴

CD3, клон SK7, получают путем гибридизации клеток миеломы мышей NS-1 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных человеческими тимоцитами.

Anti-TCR- α/β -1, Anti-TCR- γ/δ -1 и CD3 состоят из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышиного IgG₁.

Данный реагент поставляется в виде комбинации Anti-TCR- α/β -1 FITC, Anti-TCR- γ/δ -1 PE и CD3 PerCP-Cy5.4 в 1 мл фосфатно-солевого буфера (PBS), содержащего бычий сывороточный альбумин (BCA) и 0,1 % азида натрия.

ОСТОРОЖНО! Азид натрия вреден при приеме внутрь (R22). Хранить в недоступном для детей месте (S2). Держать вдали от пищи, напитков и корма для животных (S13). Использовать подходящую защитную одежду (S36). При попадании внутрь немедленно обратитесь за медицинской помощью и покажите данную упаковку или этикетку

(S46). При взаимодействии с кислотами выделяется высокотоксичный газ (R32). Азидные соединения при утилизации необходимо смывать большим количеством воды во избежание осаждения на свинцовых или медных трубах, где возможно образование взрывоопасных условий.

Чистота антител:

- FITC, PE, PerCP-Cy5.5: $\leq 20\%$ свободного флуорофора на момент упаковки по результатам измерения методом эксклюзионной хроматографии (SEC).

3. ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ

Реагент стабилен до даты истечения срока годности, указанной на этикетке, при хранении при температуре от 2 до 8 °C. После истечения срока годности не использовать. Реагент не замораживать и не подвергать воздействию прямого солнечного света при хранении или инкубации с клетками. Наружная поверхность пробирки с реагентом должна быть сухой.

Не использовать реагент, если наблюдаются какие-либо изменения внешнего вида. Осадок или обесцвечивание свидетельствуют о нестабильности или порче.

4. НЕОБХОДИМЫЕ РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ

- Одноразовые полистироловые пробирки с крышками BD Falcon™ 12 x 75 мм (BD кат. № 352058) или эквивалентные.
- Дозатор с наконечниками (электронная пипетка BD Electronic Pipette; BD кат. № 646539, или эквивалентные).
- Вихревая мешалка «вортекс».

- Лизирующий раствор BD FACSTM Lysing Solution (10-кратный) (BD кат. № 349202).

Инструкции по разбавлению и предупреждения см. на вкладыше к продукту.

- Центрифуга.
- Раствор BD CellWASH™ (BD кат. № 349524) или промывочный фосфатно-солевой буфер (PBS) с 0,1 % азида натрия.
- Раствор BD CellFIX™ (BD кат. № 340181) или 1 % раствор параформальдегида в PBS с 0,1 % азида натрия.

Хранить при температуре от 2 до 8 °C в бутылки из желтого стекла не более 1 недели.

ОСТОРОЖНО! Формальдегид вреден при вдыхании и при контакте с кожей и токсичен при попадании внутрь (R20/21, 25). Он обладает раздражающим действием на глаза и кожу (R36/38). В случае попадания в глаза немедленно промойте их большим количеством воды и обратитесь за медицинской помощью (S26). При продолжительном воздействии возможно развитие злокачественных новообразований. При взаимодействии с кислотами выделяется высокотоксичный газ (R32). Возможный риск необратимых эффектов (R68). Может вызывать сенсибилизацию при контакте с кожей (R43). При использовании не принимать пищу и напитки (S20).

- Правильно оборудованный цитометр. Проточный цитометр должен быть оснащен возбуждающим лазером с длиной волны 488 нм и детекторами светорассеяния и соответствующей

флуоресценции, а также иметь соответствующее аналитическое программное обеспечение для сбора и анализа данных. См. инструкции в руководстве по эксплуатации Вашего прибора.

5. ОБРАЗЦЫ

BD Oncomark Anti-TCR- α/β -1 FITC/Anti-TCR- γ/δ -1 PE/CD3 PerCP-Cy5.5 может использоваться для иммунофенотипирования клеток в образцах периферической крови и аспиратах костного мозга, собранных в EDTA (например, в пробирки BD Vacutainer™), методом проточной цитометрии. Различные типы образцов имеют разные требования к условиям хранения и ограничения, которые необходимо учесть перед забором и анализом.^{1, 2}

ОСТОРОЖНО! Все биологические образцы и контактирующие с ними материалы рассматриваются как биологически опасные. Они подлежат обращению как с потенциальным источником инфицирования^{5, 6} и требуют утилизации с соблюдением надлежащих мер предосторожности в соответствии с федеральными, региональными и местными нормативами. Не выполнять пипетирование ртом. Использовать надлежащую защитную одежду и перчатки.

6. ПРОЦЕДУРА

Необходимо оценить жизнеспособность образцов и установить пороговое значение. Рекомендуется пороговое значение не менее 80 % жизнеспособных клеток.¹

Во избежание влияния сыворотки на результаты анализа с использованием данного реагента, необходимо предварительно промыть образец однократным PBS с 0,1 % азида натрия в

количестве, обеспечивающем увеличение объема образца как минимум в 25 раз (т. е. для промывки 2 мл цельной крови требуется 48 мл однократного PBS с азидом натрия). Тщательно перемешайте. Осадите клетки в центрифуге и вновь внесите их в однократный PBS с 0,1 % с изначальным объемом.

1. Добавьте 20 мкл реагента BD Oncomark Anti-TCR- α/β -1/Anti-TCR- γ/δ -1/CD3 к 100 мкл цельной крови или предварительно профильтрованного костного мозга в пробирке 12 x 75 мм.
2. Аккуратно перемешайте на вортексе и инкубируйте от 15 до 20 минут в темноте при комнатной температуре (от 20 до 25 °C).
3. Добавьте 2 мл однократного BD FACS Lysing Solution.
4. Аккуратно перемешайте на вортексе и инкубируйте 10 минут в темноте при комнатной температуре.
5. Центрифугируйте при 300 x g в течение 5 минут.
Удалите супернатант.
6. Добавьте от 2 до 3 мл раствора BD CellWASH (или промывочного буфера) и центрифугируйте при 200 x g в течение 5 минут.
Удалите супернатант.
7. Добавьте 0,5 мл раствора BD CellFIX (или 1 % раствора параформальдегида) и тщательно перемешайте.

Храните до анализа при температуре от 2 до 8 °C.

Окрашенные образцы должны быть проанализированы в течение 24 часов после окрашивания.

Проточная цитометрия

1. Настройте цитометр в соответствии с рекомендациями производителя.

Ежедневно выполняйте анализ контрольного образца здорового взрослого донора или коммерческого контрольного образца цельной крови для оптимизации настроек прибора и в целях контроля качества системы.

2. Для уменьшения агрегации перед запуском в проточный цитометр тщательно перемешайте клетки на вортексе на малой скорости.¹⁶
3. Запустите анализ образца в проточном цитометре.

Удостоверьтесь, что все популяции расположены в пределах шкалы. В случае необходимости оптимизируйте настройки прибора.

4. Соберите и проанализируйте данные в режиме списка с использованием соответствующего ПО.
5. После получения соответствующих диаграмм изолируйте целевую популяцию с использованием требуемой комбинации гейтов, областей или квадрантов (Рис. 1.).

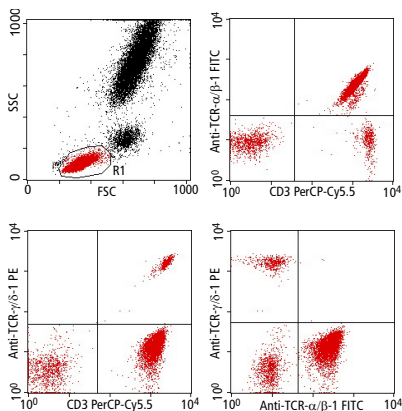


Рис. 1. Точечная диаграмма, отображающая область R1 и квадранты

6. Определите экспрессию антигена, основываясь на отрицательной популяции образца.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Anti-TCR- α/β -1 распознает конформационный эпитоп, формируемый рецептором Т-клетки (ТкР) для антигена и эпсилон-цепью CD3.^{7, 8} α/β TCR (ТкР) является гетеродимером массой 80 килодалтон (кДа), который образуется сшивкой дисульфидными связями и состоит из α цепи массой 44 кДа и β цепи массой 37 кДа.^{8, 9}

Anti-TCR- γ/δ -1 реагирует с вариотипической детерминантой γ/δ рецептора антигена Т-клетки (ТкР).^{4, 10} γ/δ ТкР является гетеродимерным гликопротеином, который нековалентно связан с антигеном CD3.^{4, 10–12} γ и δ цепи ТкР имеют постоянные и изменчивые части, которые кодируются отдельными участками гена.¹¹ γ цепь

образует с субъединицей δ гетеродимеры, соединенные дисульфидными или другими связями.^{4, 10—12}

CD3 вступает в реакцию с эpsilon-цепью комплекса рецепторов антигена CD3/антигена Т-клетки (ТкР).¹³ Этот комплекс состоит из не менее чем шести протеинов с молекулярной массой от 20 до 30 кДа.¹⁴ Антиген, распознаваемый антителами CD3, нековалентно связан с α/β или γ/δ TCR (от 70 до 90 кДа).¹⁵

Распределение антигена

Anti-TCR- α/β -1 распознает приблизительно 97 % Т-лимфоцитов нормальной периферической крови, которые экспрессируют антиген CD3.¹⁶ Антиген TCR- α/β -1 также экспрессируется на 50—70 % тимоцитов.¹⁶ Небольшая субпопуляция Т-лимфоцитов (1—9 %) и тимоцитов (менее 2 %) нормальной периферической крови не реагируют или слабо реагируют с антителом Anti-TCR- α/β -1.^{3, 16, 17} Эта CD3⁺ TCR- α/β -1-субпопуляция преимущественно экспрессирует γ/δ цепи комплекса ТкР.^{3, 16, 17}

γ/δ Т-клеточный рецептор присутствует на небольшой субпопуляции Т-лимфоцитов в периферической крови, тимусе, селезенке и лимфатических узлах.^{7—9} γ/δ ТкР-положительные Т-лимфоциты составляют 1—9 % от числа нормальных лимфоцитов периферической крови и менее 2 % нормальных тимоцитов.^{4, 10, 11}

Антиген CD3 присутствует на 61—85 % лимфоцитов нормальной периферической крови.¹⁸

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

Применение терапевтических моноклональных антител для лечения

пациентов может влиять на распознавание целевых антигенов данным реагентом. Это следует учитывать при анализе образцов от пациентов, подвергающихся такому лечению. BD Biosciences не исследовала влияние наличия терапевтических антител на рабочие характеристики данного реагента.

Использование комбинации данного реагента для диагностической оценки гематологических нарушений должно проводиться в контексте тщательного анализа иммунофенотипирования, в том числе включая другие соответствующие маркеры.

При проведении процедур с реагентами BD Oncoscreen необходимо придерживаться инструкции по эксплуатации соответствующего прибора, программного обеспечения и процедур контроля качества, используемых в Вашей лаборатории.

Рабочие характеристики реагентов определялись в основном с использованием образцов, обработанных EDTA. При применении других антикоагулянтов характеристики реагентов могут быть другими.

Образцы с большим количеством нежизнеспособных клеток могут давать ошибочные результаты из-за селективной гибели популяций и повышенного неспецифического связывания антител с нежизнеспособными клетками.

ГАРАНТИЯ

Для продаваемого согласно данным условиям продукта гарантируется только соблюдение количества и содержимого, указанных на этикетке на момент доставки заказчику. Не существует никаких гарантий, явных или подразумеваемых, выходящих за рамки описания на этикетке продукта. Вся ответственность компании BD ограничивается либо заменой продуктов, либо возмещением цены покупки. BD не несет ответственности за повреждение имущества, получение травм или экономический ущерб, вызванные продуктом.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разрешение между дебрисом и лимфоцитами	Взаимодействие клеток с другими клетками и тромбоцитами	Подготовить и окрасить другой образец.
	Неаккуратное приготовление клеточного образца	Проверить жизнеспособность клеток; центрифугировать клетки на меньших оборотах.
	Неподходящие настройки прибора	Строго выполнить процедуры настройки прибора; если необходимо, оптимизировать настройки прибора.
Слабое или тусклое окрашивание	Слишком высокая концентрация клеток на этапе окрашивания	Проверить и откорректировать концентрацию клеток или объем образца; окрасить свежий образец.
	Недостаточное количество реагента	Повторить окрашивание с большим количеством антител.
	Клетки анализировались позднее чем через 24 часа после окрашивания	Повторить окрашивание на свежем образце; провести анализ без задержки.
Клеток мало или нет вообще	Слишком низкая концентрация клеток	Подготовить свежий образец с более высокой концентрацией; повторить окрашивание и анализ.
	Неисправный цитометр	Проверить и исправить цитометр.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
2. Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy P, Jr., Lovett EJ, Schwartz A. US-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry*. 1997;30:214-230.
3. Weiss A, Newton M, Crommie D. Expression of T3 in association with a molecule distinct from the T cell antigen receptor heterodimer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83:6998.
4. Borst J, van Dongen J, Bolhuis R, et al. Distinct molecular forms of human T cell receptor γ/δ detected on viable T cells by a monoclonal antibody. *J Exp Med*. 1988;167:1625-1644.
5. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections—Second Edition; Approved Guideline*. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2001. NCCLS document M29-A2.
6. Centers for Disease Control. Update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR*. 1988;37:377-388.
7. Salmerón A, Sanchez-Madrid F, Ursa M, Fresno M, Alarcón B. A conformational epitope expressed upon association of CD3 ϵ with either CD3 δ or CD3 γ is the main target for recognition by Anti-CD3 monoclonal antibodies. *J Immunol*. 1991;147:3047-3052.
8. Spits H, Borst J, Tax W, Capel P, Terhorst C, de Vries J. Characteristics of a monoclonal antibody (WT-31) that recognizes a common epitope on the human T cell receptor for antigen. *J Immunol*. 1985;135:1922-1928.
9. Oettgen H, Kappler J, Tax W, Terhorst C. Characterization of the two heavy chains of the T3 complex on the surface of human T lymphocytes. *J Biol Chem*. 1984;259:12039-12048.
10. Lanier LL, Ruitenberg JJ, Bolhuis RL, Borst J, Phillips JH, Testi R. Structural and serological heterogeneity of γ/δ T cell antigen receptor expression in thymus and peripheral blood. *Eur J Immunol*. 1988;18:1985-1992.
11. Lanier LL, Serafini AT, Ruitenberg JJ, et al. The gamma T-cell antigen receptor. *J Clin Immunol*. 1987;7:429.
12. Testi R, Lanier LL. Functional expression of CD28 on T cell antigen receptor γ/δ -bearing T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1989;19:185.

13. van Dongen JJM, Krissansen GW, Wolvers-Tettero ILM, et al. Cytoplasmic expression of the CD3 antigen as a diagnostic marker for immature T-cell malignancies. *Blood*. 1988;71:603-612.
14. Brenner MB, Groh V, Porcelli SA, et al. Structure and distribution of the human γ/δ T-cell receptor. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:1049-1053.
15. Clevers H, Alarcón B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol*. 1988;6:629-662.
16. Lanier LL, Weiss A. Presence of Ti (WT31) negative T lymphocytes in peripheral blood and thymus. *Nature*. 1986;324:268.
17. Brenner MB, McClean J, Dialynas DP, et al. Identification of a putative second T cell receptor. *Nature*. 1986;322:145-149.
18. Reichert T, DeBruyère M, Deney V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopath*. 1991;60:190-208.