



BD Oncomark CD14 FITC/CD64 PE

Кат. № 333179

7/2010

23-13735-01



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™ CD14 FITC/CD64 PE предназначен для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии *in vitro*. Эти реагенты можно использовать для изучения моноцитарного развития.¹ CD64 окрашивает моноциты ярче, чем гранулоциты. CD14 может быть использован для обнаружения дифференцировки по моноцитоидному пути. Количественный анализ CD14/CD64 используется для диагностики гематологических заболеваний.^{1, 2}

2. СОСТАВ

CD14, клон МФР9^{3,4}, получают путем гибридизации клеток миеломы мышей Sp2/0 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных моноцитами периферической крови человека с ревматоидным артритом.

CD64, клон MD22, получают при слиянии клеток миеломы P3X63Ag8 со спленоцитами мышей BALB/c nu/nu, иммунизированных FcγRI.

CD14 состоит из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышиного IgG_{2b}. CD64 состоит из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышиного IgG₁.

Этот реагент поставляется в виде комбинации CD14 FITC и CD64 PE в 1 мл фосфатно-солевого буфера (PBS), содержащего желатин 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: $\leq 20\%$ 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. № 6464539, 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 CD14 FITC/CD64 PE можно применять для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии с периферической кровью и аспиратами костного мозга, собранными в EDTA (например, в пробирках BD Vacutainer™). Различные типы образцов имеют разные требования к условиям хранения и ограничения, которые необходимо учесть перед забором и анализом.^{5, 6}

ОСТОРОЖНО! Все биологические образцы и контактирующие с ними материалы рассматриваются как биологически опасные. Они подлежат обращению как с потенциальным источником инфицирования^{7, 8} 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.⁵

Во избежание интерференции сыворотки при использовании этих реагентов необходимо предварительно промыть образец по меньшей мере 25 добавочными объемами однократного PBS с 0,1 % азидом (например 48 мл однократного PBS с азидом на 2 мл цельной крови). Тщательно перемешайте. Осадите клетки в центрифуге и вновь внесите их в PBS (однократный) с 0,1 % с изначальным объемом.

1. Добавьте 20 мкл реагента BD Oncomark CD14/CD64 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 вихрексе на малой скорости.⁹
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. На соответствующих графиках при помощи комбинации гейтов, областей или квадрантов изолируйте целевую популяцию (рис. 1).

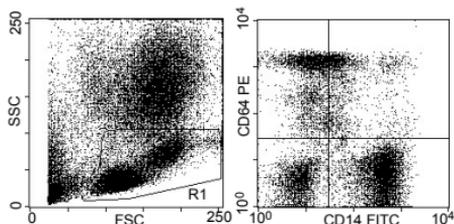


Рис. 1. Точечная диаграмма, отображающая область R1 и квадранты

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

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

CD14 распознает антиген моноцитов/макрофагов человека молекулярной массой 55 килодальтон (кДа).¹⁰

CD64 распознает Fc γ RI гликопротеин человека молекулярной массой 72 кДа, способный связывать мономерные IgG.^{11, 12}

Распределение антигена

Антиген CD14 присутствует на большинстве моноцитов нормальной периферической крови.¹³ CD14 слабо реагирует с гранулоцитами периферической крови.¹⁴

Антиген CD64 является одним из трех рецепторов Fc к иммуноглобулинам, включая человеческий Fc γ RII (антиген CD32) и человеческий Fc γ RIII (антиген CD16), которые присутствуют на поверхности лейкоцитов.^{11, 12} В то время как Fc γ RII и Fc γ RIII являются низкоаффинными рецепторами к иммуноглобулину, Fc γ RI связывается с высокоаффинными.^{11, 12} Fc γ RI является активатором полиморфноядерных нейтрофилов (ПМН),^{15–17} моноцитов¹⁸ и дендритных клеток¹⁹ IFN-g. Кроме того, Fc γ RI является активатором ПМН посредством гранулоцитарного колониестимулирующего фактора.^{17, 20–22} Растворимые молекулы Fc γ RI человека были обнаружены в сыворотке крови человека.²³ Антиген CD64 экспрессируется на моноцитах, макрофагах, на очень низком уровне на ПМН,^{11, 12} и на субпопуляции циркулирующих дендритных клеток.¹⁹ CD64 является ранним маркером грануломоноцитарной линии на кветворных клетках-предшественниках CD34⁺.¹

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 лимфоцитам	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. Olweus J, Terstappen LWMM, Thompson PA, Lund-Johansen F. Expression and function of receptors for stem cell factor and erythropoietin during lineage commitment of human hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1996;88:1594-1607.
2. Krasinskas AM, Wasik MA, Kamoun M, Schretzenmair R, Moore J, Salhany K. The usefulness of CD64, other monocyte-associated antigens, and CD45 gating in the subclassification of acute myeloid leukemias with monocytic differentiation. *Am J Clin Pathol*. 1998;110:797-805.
3. Dimitriu-Bona A, Burmester GR, Waters SJ, Winchester RJ. Human mononuclear phagocyte differentiation antigens. I. Patterns of antigenic expression on the surface of human monocytes and macrophages defined by monoclonal antibodies. *J Immunol*. 1983;130:145-152.
4. Herrmann F, Komischke B, Odenwald E, Ludwig WD. Use of monoclonal antibodies as a diagnostic tool in human leukemia. I. Acute myeloid leukemia and acute phase of chronic myeloid leukemia. *Blut*. 1983;47:157-163.
5. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
6. 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.
7. *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.
8. 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.
9. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.

10. Goyert SM, Ferrero E. Biochemical analysis of myeloid antigen and cDNA expression of gp55 (CD14). In: McMichael AJ, ed. *Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1987:613-619.
11. van de Winkel JGJ, Capel JA. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implication. *Immunol Today*. 1993;14:215-221.
12. van de Winkel JGJ, Anderson CL. Biology of human immunoglobulin G Fc receptors. *J Leukoc Biol*. 1991;49:511-524.
13. Bernstein ID, Self S. Joint report of the myeloid section of the Second International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human Myeloid and Hematopoietic Cells*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;3:1-25.
14. Jayaram Y, Hogg N. Surface expression of CD14 molecules on human neutrophils. In: Knapp W, Dörken B, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:796-797.
15. Shen L, Guyre PM, Fanger MW. Polymorphonuclear leukocyte function triggered through the high affinity Fc receptor for monomeric IgG. *J Immunol*. 1987;139:534-548.
16. Petroni KC, Shen L, Guyre PM. Modulation of human polymorphonuclear leukocyte IgG Fc receptors and Fc receptor-mediated functions by IFN- γ and glucocorticoids. *J Immunol*. 1988;140:3467-3472.
17. Buckle A-M, Hogg N. The effect of IFN- γ and colony-stimulating factors on the expression of neutrophil cell membrane receptors. *J Immunol*. 1989;143:2295-2301.
18. Perussia B, Dayton ET, Lazarus R, Fanning V, Trinchieri G. Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG₁ on human monocytic and myeloid cells. *J Exp Med*. 1983;158:1092-1113.
19. Fanger NA, Wardwell K, Shen L, Tedder TF, Guyre PM. Type I (CD64) and Type II (CD32) Fc γ receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol*. 1996;157:541-548.
20. Valerius T, Repp R, de Wit TPM, et al. Involvement of the high-affinity receptor for IgG (Fc γ RI; CD64) in enhanced tumor cell cytotoxicity of neutrophils during granulocyte colony-stimulating factor therapy. *Blood*. 1993;82:931-939.
21. Repp R, Valerius T, Sandler A, et al. Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (Fc γ RI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*. 1991;78:885-889.
22. Kerst JM, van de Winkel JGJ, Evans AH, et al. Granulocyte colony-stimulating factor induces hFc gamma RI (CD64 antigen)-positive neutrophils via an effect on myeloid precursor cells. *Blood*. 1993;6:1457-1464.
23. Ernst LK, van de Winkel JGJ, Chiu IM, Anderson CL. Three genes for the human high affinity Fc receptor for IgG (Fc gamma RI) encode four distinct transcription products. *J Biol Chem*. 1992;267:15692-15700.