



BD Oncomark CD15 FITC/CD117 PE

Кат. № 333177

7/2010

23-13734-01



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™ CD15 FITC/CD117 PE предназначен для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии *in vitro*. Количественные анализы CD15/CD117 используется для диагностики гематологических заболеваний.^{1—7}

2. СОСТАВ

CD15, клон MMA, получают путем гибридизации клеток мышиной миеломы P3-X63-Ag8.653 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных гистиоцитарной клеточной линией U-937.

CD117, клон 104D2, получают при слиянии клеток миеломы со спленоцитами мышей BALB/c, иммунизированных мегакариоцитарными клетками линии MOLM-1.^{8, 9}

CD15 состоит из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышиного IgM. CD117 состоит из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышиного IgG₁.

Этот реагент поставляется в виде комбинации CD15 FITC и CD117 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 ПОСТАВКИ

- 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 эквивалентная).
- Вихревая мешалка «вортекс».
- Лизирующий раствор BD FACS™ 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).

- Оснащенный соответствующим образом 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 CD15 FITC/CD117 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.^{10, 11}

ОСТОРОЖНО! Все биологические образцы и контактирующие с ними материалы рассматриваются как биологически опасные. Они подлежат обращению как с потенциальным источником инфицирования^{12, 13} 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.¹⁰

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 PBS (однократный) с 0,1 % с изначальным объемом.

1. Добавьте 20 мкл реагента BD Oncomark CD15/CD117 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.¹⁴
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).

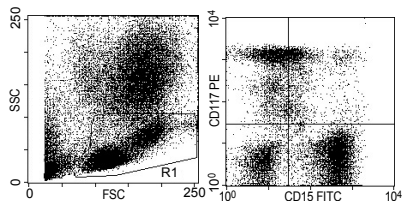


Рис. 1. Точечная диаграмма, отображающая область R1 и квадранты

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

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

CD15 распознает миеломоноцитарный антиген человека лакто-N-фуктопентоза III.¹⁵

CD117 связывается с рецептором фактора стволовых клеток (ФСК).^{16—22} Он выборочно распознает клетки NIH-3T3, трансфицированные с с-комплексом человека, ген, который кодирует SCF-R.

Распределение антигена

Антиген CD15 присутствует на более 95 % зрелых эозинофилов и нейтрофилов периферической крови и в небольшой плотности на циркулирующих моноцитах.²³

Антиген CD117 (SCF-R) экспрессируется в основном на кровяных клетках-предшественниках^{16—21} костного мозга. Рецептор очень выражено экспрессируется на тех же уровнях на субпопуляциях эмбриональных, эритроидных и грануломоноцитарных CD34⁺ клеток, в то время как В-лимфоидные коммитированные клетки-предшественники (CD34⁺CD19⁺) экспрессируются на низких уровнях SCF-R.²¹ Среди CD34⁺ клеток костного мозга лишь небольшое число клеток (в основном эритроидных) экспрессирует рецептор.²¹

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 Oncomark 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

- Schwartz S, Heinecke A, Zimmermann M, et al. Expression of the C-kit receptor (CD117) is a feature of almost all subtypes of de novo acute myeloblastic leukemia (AML), including cytogenetically good-risk AML, and lacks prognostic significance. *Leuk Lymphoma*. 1999;34(1-2):85-94.
- Cascavilla N, Musto P, D'Arena G, et al. CD117 (c-kit) is a restricted antigen of acute myeloid leukemia and characterizes early differentiative levels of M5 FAB subtype. *Haematologica*. 1998;83(5):392-397.
- Macedo A, Orfao A, Gonzalez M, et al. Immunological detection of blast cell subpopulations in acute myeloblastic leukemia at diagnosis: implications for minimal residual disease studies. *Leukemia*. 1995;9:993-998.
- Wells SJ, Bray RA, Stempora LL, Farhi DC. CD117/CD34 expression in leukemic blasts. *Am J Clin Pathol*. 1996;106(2):192-195.
- Terstappen LWMM, Safford M, Könemann S, et al. Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia. Part II. Phenotypic heterogeneity at diagnosis. *Leukemia*. 1992;6:70-80.
- Cohen PL, Hoyer JD, Kurtin PJ, Dewald GW, Hanson CA. Acute myeloid leukemia with minimal differentiation. A multiple parameter study [see comments]. *Am J Clin Pathol*. 1998;109(1):32-38.
- Sun T, Sangaline R, Ryder J, et al. Gating strategy for immunophenotyping of leukemia and lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 1997;108(2):152-157.
- Matsuo Y, Adachi T, Tsubota T, Imanishi J, Minowada J. Establishment and characterization of a novel megakaryoblastoid cell line, MOLM-1, from a patient with chronic myelogenous leukemia. *Human Cell*. 1991;4:261-264.
- Ashman LK, Cambareri A, Nguyen L, Bühring H-J. CD117 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEGK, et al, eds. *Leucocyte Typing VI: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Garland Publishing, Inc; 1997:816-818.
- Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Skubitz K, Balke J, Ball E, et al. Report on the CD15 cluster workshop. In: Knapp W, Dörken B, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:800-805.
- Berardi AC, Wang A, Levine JD, Lopez P, Scadden DT. Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells. *Science*. 1995;267:104-108.
- Gunji Y, Nakamura M, Osawa H, et al. Human primitive hematopoietic progenitor cells are more enriched in KIT^{low} cells than in KIT^{high} cells. *Blood*. 1993;82:3283-3289.
- Broudy VC, Lin N, Zsebo KM, et al. Isolation and characterization of a monoclonal antibody that recognizes the human c-kit receptor. *Blood*. 1992;79:338-346.
- Briddell RA, Broudy VC, Bruno E, Brandt JE, Srou EF, Hoffman R. Further phenotypic characterization and isolation of human hematopoietic progenitor cells using a monoclonal antibody to the c-kit receptor. *Blood*. 1992;79:3159-3167.
- Simmons P, Aylett G, Niutta S, To L, Juttner C, Ashman L. *c-kit* is expressed by primitive human hematopoietic cells that give rise to colony-forming cells in stroma-dependent or cytokine-supplemented culture. *Exp Hematol*. 1994;22:157-165.
- 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.
- Yarden Y, Kuang W-J, Yang-Feng T, et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J*. 1987;6:3341-3351.
- Hanjan SN, Kearney JF, Cooper MD. A monoclonal antibody (MMA) that identifies a differentiation antigen on human myelomonocytic cells. *Clin Immunol Immunopathol*. 1982;23:172-188.