



BD Oncomark Anti-HLA-DR FITC/CD13 PE

Кат. № 333180

7/2010

23-13736-01



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

Реагент BD Oncomark™ Anti-HLA-DR FITC/CD13 PE предназначен для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии *in vitro*. Эту комбинацию реагентов можно использовать для анализа развития миелоидной линии. Anti-HLA-DR и CD13 обычно реагируют с клетками миелоидной линии.¹⁻⁴ Anti-HLA-количественные анализы с DR/CD13 используются для диагностики гематологических заболеваний.¹⁻⁴

2. СОСТАВ

Anti-HLA-DR, клон L243, получают путем гибридизации клеток миеломы мышей NS-1/1-Ag4 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных линией В-клеток лимфобластомы человека RPMI 8866.⁵

CD13, клон L138, получают путем гибридизации клеток миеломы мышей Sp2/0 с клетками селезенки гибридов мышей x C57BL16 BALB/c, иммунизированных клетками линии KG-1a.

Anti-HLA-DR состоит из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышиного IgG_{2a}. CD13 состоит из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышиного IgG₁.

Этот реагент поставляется в виде комбинации Anti-HLA-DR FITC и CD13 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. № 646539, или эквивалентные).
- 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 Anti-HLA-DR FITC/CD13 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.^{6, 7}

ОСТОРОЖНО! Все биологические образцы и контактирующие с ними материалы рассматриваются как биологически опасные. Они подлежат обращению как с потенциальным источником инфицирования^{8, 9} 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.⁶

Во избежание интерференции сыворотки при использовании этих реагентов

необходимо предварительно промыть образец по меньшей мере 25 добавочными объемами однократного PBS с 0,1 % азида (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 Anti-HLA-DR/CD13 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.¹⁰

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).

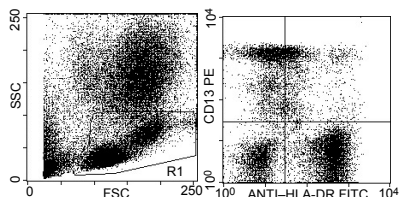


Рис. 1. Точечная диаграмма, отображающая область R1 и квадранты

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

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Anti-HLA-DR распознает антиген главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) класса II.^{5, 11} Этот антиген является трансмембранным гликопротеином, состоящим из α и β субъединиц с молекулярной массой 36 и 27 килодальтон (кДа) соответственно.^{5, 11}

CD13 распознает аминопептидазу N, одноцепочечный интегральный мембранный гликопротеин молекулярной массой от 150 до 170 килодальтон (кДа).^{12, 13}

Распределение антигена

Антиген Anti-HLA-DR экспрессируется на В-лимфоцитах, моноцитах, макрофагах, активированных Т-лимфоцитах, естественных киллерах (НК-лимфоцитах) и клетках-предшественниках человека.^{14–19} Он также присутствует на эпителии вилочковой железы, В-лимфоцитарных зонах селезенки и лимфатических узлов, а также на В-клеточных лимфомах.^{18–22}

Антиген CD13 экспрессируется на нейтрофилах периферической крови, эозинофилах, базофилах и моноцитах, но не на нормальных лимфоидных клетках, эритроцитах и тромбоцитах.¹⁷ Антиген CD13 экспрессируется у большинства пациентов с острой миелоидной лейкемией (ОМЛ)²³ и может быть aberrантно экспрессирован в случаях острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ).^{24–26}

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 Клетки анализировались позднее чем через 24 часа после окрашивания	Повторить окрашивание с большим количеством антител. 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

- Guglielmi C, Martelli MP, Diverio D, et al. Immunophenotype of adult and childhood acute promyelocytic leukaemia: correlation with morphology, type of PML gene breakpoint and clinical outcome. A cooperative Italian study on 196 cases. *Br J Haematol*. 1998;102(4):1035-1041.
- Paietta E, Andersen J, Gallagher R, et al. The immunophenotype of acute promyelocytic leukemia (APL): an ECOG study. *Leukemia*. 1994;8:1108-1112.
- Macedo A, Orfao A, Vidriales MB, et al. Characterization of aberrant phenotypes in acute myeloblastic leukemia. *Ann Hematol*. 1995;70(4):189-194.
- Terstappen LWM, Safford M, Könemann S, et al. Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia. Part II. Phenotypic heterogeneity at diagnosis. *Leukemia*. 1992;6:70-80.
- Lampson LA, Levy R. Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J Immunol*. 1980;125:293-299.
- 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.
- Brodsky FM. A matrix approach to human class II histocompatibility antigens: reactions of four monoclonal antibodies with the products of nine haplotypes. *Immunogenetics*. 1984;19:179-194.
- Gadd S. Cluster report: CD13. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:782-784.
- Look A, Ashmun R, Shapiro L, et al. Report on the CD13 (aminopeptidase N) 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; 1989:784-787.
- Tomkinson B, Wagner D, Nelson D, Sullivan J. Activated lymphocytes during acute Epstein-Barr virus infection. *J Immunol*. 1987;139:3802-3807.
- Levacher M, Tallet S, Dazza M, Dournon E, Rouveix B, Pocard J. T activation marker evaluation in ARC patients treated with AZT: comparison with CD4⁺ lymphocyte count in non-progressors and progressors towards AIDS. *Clin Exp Immunol*. 1990;81:177-182.
- Stites DP, Casavant CH, McHugh TM, et al. Flow cytometric analysis of lymphocyte phenotypes in AIDS using monoclonal antibodies and simultaneous dual immunofluorescence. *Clin Immunol Immunopathol*. 1986;38:161-177.
- Terstappen LWM, Hollander Z, Meiners H, Loken MR. Quantitative comparison of myeloid antigens on five lineages of mature peripheral blood cells. *J Leuk Biol*. 1990;48:138-148.
- Warnke RA, Levy R. Detection of T and B antigens with hybridoma monoclonal antibodies: a biotin-avidin-horseradish peroxidase method. *J Histochem Cytochem*. 1980;28:771-776.
- Edwards JA, Durant BM, Jones DB, Evans PR, Smith JL. Differential expression of HLA class II antigens in fetal human spleen: relationship of HLA-DP, DQ, and DR to immunoglobulin expression. *J Immunol*. 1985;137:490-497.
- Warnke R, Miller R, Grogan T, Pederson M, Dille J, Levy R. Immunologic phenotype in 30 patients with diffuse large-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 1980;303:293-300.
- Engleman EG, Warnke R, Fox RI, Dille J, Benike CJ, Levy R. Studies of a human T lymphocyte antigen recognized by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78:1791-1795.
- Zipf RF, Fox R, Dille J, Levy R. Definition of the high risk ALL patient by immunologic phenotyping with monoclonal antibodies. *Cancer Res*. 1981;41:4786.
- Foon KA, Todd III RF. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood*. 1986;68:1-31.
- Greaves MF, Chan LC, Furely AJW, Watt SM, Molgaard HV. Lineage promiscuity in hematopoietic differentiation and leukemia. *Blood*. 1986;67:1-11.
- Hurwitz CA, Loken MR, Graham ML, et al. Asynchronous antigen expression in B lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1988;72:299-307.
- Greaves MF, Harii G, Newman RA, Sutherland DR, Ritter MA, Ritz J. Selective expression of the common acute lymphoblastic leukemia (gp100) antigen on immature lymphoid cells and their malignant counterparts. *Blood*. 1983;61:628-639.