



# BD Oncomark CD3 FITC/Anti- Myeloperoxidase (MPO) PE/CD79a PerCP-Cy5.5

Кат. № 333164

7/2010

23-13711-01



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™ CD3 FITC/Anti-MPO PE/CD79a PerCP-Cy5.5 предназначается для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии *in vitro* для идентификации линий лейкозных бластных клеток. CD3 распознает лимфоциты в линии Т-клеток, анти-миелопероксидаза (МПО) распознает клетки в миелоидной линии,<sup>1-3</sup> а CD79a распознает лимфоциты в линии В-клеток.<sup>4</sup> Эту комбинацию реагентов следует использовать с методикой внутриклеточного окрашивания.<sup>5, 6</sup> Анализ с использованием CD3/Anti-MPO/CD79a применяется в диагностике гематологических заболеваний.<sup>1-4</sup>

## 2. СОСТАВ

CD3, клон UCHT1, получают путем гибридизации клеток миеломы мышей NS-1 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных человеческими тимоцитами.

Anti-MPO, клон 5B8, получают путем гибридизации клеток миеломы X63.Ag8-653 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных технически чистой миелопероксидазой.<sup>7</sup>

CD79a, клон HM47,<sup>8</sup> получают путем гибридизации клеток миеломы Sp2/0 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных конъюгатом синтетического пептида с тиреоглобулином. Пептид содержит аминокислоты в соответствии с последовательностью 202—216 включительно, определенной по последовательности нуклеотидов mb-1 кДНК человека.

CD3, Anti-MPO и CD79a состоят из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышиного IgG<sub>1</sub>.

Данный реагент поставляется в виде комбинации CD3 FITC, Anti-MPO PE и CD79a PerCP-Cy5.5 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: ≤ 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; 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 сенсibilизацию при контакте с кожей (R43). При использовании не принимать пищу и напитки (S20).

- Правильно оборудованный цитометр.

Длина волны возбуждающего лазера проточных цитометров должна быть установлена на 488 нм, они должны быть оснащены детекторами светорассеяния и соответствующей флуоресценции и иметь соответствующее аналитическое программное обеспечение для сбора и анализа данных. См. инструкции в руководстве по эксплуатации Вашего прибора.

## 5. ОБРАЗЦЫ

BD Oncomark CD3 FITC/Anti-MPO PE/CD79a 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.<sup>9, 10</sup>

**ОСТОРОЖНО!** Все биологические образцы и контактирующие с ними материалы рассматриваются как биологически опасные. Они подлежат обращению как с потенциальным источником инфицирования<sup>11, 12</sup> 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.<sup>9</sup>

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 2 мл однократного BD FACS Lysing Solution к 100 мкл цельной крови или предварительно отфильтрованного костного мозга в пробирке 12 x 75 мм.
2. Центрифугируйте при 500 x g в течение 5 минут.

Удалите супернатант.

3. Добавьте 500 мкл пермеабилизирующего раствора BD FACS.
4. Аккуратно перемешайте на вортексе и инкубируйте от 15 до 20 минут в темноте при комнатной температуре (от 20 до 25 °C).

5. Добавьте от 2 до 3 мл раствора BD CellWASH (или промывочного буфера) и центрифугируйте при 500 x g в течение 5 минут.

Удалите супернатант.

6. Добавьте 20 мкл реагента BD Oncomark CD3/Anti-MPO/CD79a.
7. Аккуратно перемешайте на вортексе и инкубируйте 30 минут в темноте при комнатной температуре (от 20 до 25 °C).
8. Добавьте от 2 до 3 мл раствора BD CellWASH (или промывочного буфера) и центрифугируйте при 200 x g в течение 5 минут.

Удалите супернатант.

9. 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 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.<sup>13</sup>

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 программного обеспечения.

5. На соответствующих графиках при помощи комбинации гейтов, областей или квадрантов изолируйте целевую популяцию (рис. 1).

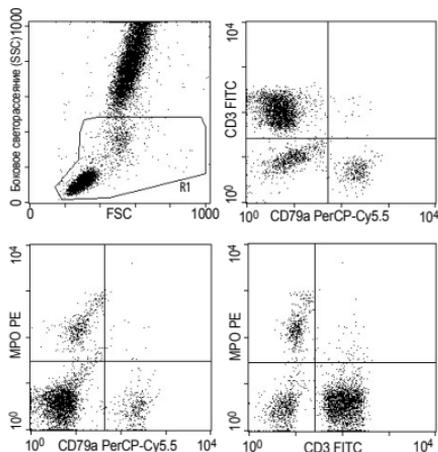


Рис. 1. Точечные диаграммы, отображающие область R1 и квадранты

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

## 7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### Специфичность

CD3 вступает в реакцию с эpsilon-цепью комплекса рецепторов антигена CD3/антигена Т-клетки (ТкР).<sup>14</sup> Антиген, распознаваемый антителами к CD3, нековалентно связан с  $\alpha/\beta$  или  $\gamma/\delta$  субъединицами ТкР (от 70 до 90 кДа).<sup>15</sup>

Anti-MPO вступает в реакцию с внутриклеточной миелопероксидазой (МПО) — гемопротеином, состоящим из двух молекулярных субъединиц с массами 60 и 12 килодалтон.<sup>16</sup> МПО является основным ферментом, вовлеченным в реализацию воспалительных реакций нейтрофильных лейкоцитов. Он катализирует синтез хлорноватистой кислоты, которая обладает мощным противомикробным действием.<sup>3</sup>

CD79a распознает цитоплазматический домен мембранного гликопротеина массой 47 килодалтон, который присутствует на В-лимфоцитах.<sup>8</sup>

### Распределение антигена

Антиген к CD3 присутствует на 61—85 % лимфоцитов нормальной периферической крови.<sup>17</sup>

МПО является лизисомным ферментом, расположенным в азурофильных гранулах зрелых гранулоцитов<sup>1</sup> и в небольшом количестве присутствует в циркулирующих моноцитах. МПО также была обнаружена в миелобластах при некоторых случаях острого миелоидного лейкоза.<sup>18</sup>

Антиген CD79a, который также упоминается как mb-1, экспрессируется на В-клетках на разных этапах дифференцировки — от пред-В-клеточного этапа (вероятно перед экспрессией цитоплазматической  $\mu$  цепи) до этапа

плазмочита, на котором он выявляется только в цитоплазме.<sup>8, 19</sup> Антиген CD79a связывается с антигеном CD79b, формируя при этом часть комплекса В-клеточного рецептора. Предположительно, антиген CD79a может играть роль в обеспечении транспорта IgM на клеточную поверхность.<sup>4, 19</sup>

## 8. ОГРАНИЧЕНИЯ

Применение терапевтических моноклональных антител для лечения пациентов может влиять на распознавание целевых антигенов данным реагентом. Это следует учитывать при анализе образцов 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 крови, обработанной 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 разделение дегресса и лимфоцитов	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	Выполнить соответствующие процедуры настройки прибора; при необходимости оптимизировать настройки.
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	Приготовить новый образец с большей концентрацией; повторить окрашивание и анализ.
	Неисправный цитометр	Проверить и устранить неисправность прибора.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grégoire C, Welch H, Astarie-Dequeker C, Maridonneau-Parini I. Expression of azurophil and specific granule proteins during differentiation of NB4 cells in neutrophils. *J Cell Physiol.* 1998;175:203-210.
2. Scheinecker C, Strobl H, Fritsch G, et al. Granulomonocyte-associated lysosomal protein expression during in vitro expansion and differentiation of CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 1995;86:4115-4123.
3. Tobler A, Miller CW, Johnson KR, Selsted ME, Rovera G, Koeffler HP. Regulation of gene expression of myeloperoxidase during myeloid differentiation. *J Cellular Physiol.* 1988;136:215-225.
4. Mason DY, Corkell JL, Tse AGD, et al. The IgM-associated protein mb-1 as a marker of normal and neoplastic B cells. *J Immunol.* 1991;147:2474-2482.
5. Dworzak MN, Fritsch G, Fröschl G, Printz D, Gadner H. Four-color flow cytometric investigation of terminal deoxynucleotidyl transferase-positive lymphoid precursors in pediatric bone marrow: CD79a expression precedes CD19 in early B-cell ontogeny. *Blood.* 1998;92:3203-3209.
6. Nakase K, Sartor M, Bradstock K. Detection of myeloperoxidase by flow cytometry in acute leukemia. *Cytometry.* 1998;34(4):198-202.
7. Audrain MAP, Baranger TAR, Moguilevski N, et al. Anti-native and recombinant myeloperoxidase monoclonals and human autoantibodies. *Clin Exp Immunol.* 1997;107:127-134.
8. Engel P, Wagner N, Tedder TF. CD79 Workshop report. In: Schlossman SF, Bousmell L, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1995:667-679.
9. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia.* 1996;10:877-895.
10. 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.
11. *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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
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. Nauseef WM, Malech HL. Analysis of the peptide subunits of human neutrophil myeloperoxidase. *Blood.* 1986;5:1504-1507.
17. Reichert T, DeBruyère M, Deneys V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopath.* 1991;60:190-208.
18. Knapp W, Strobl H, Majdic O. Flow cytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in leukemia diagnosis. *Cytometry.* 1994;18:187-198.
19. Sakaguchi N, Kashiwamura S, Kimoto M, Thalmann P, Melchers F. B lymphocyte lineage-restricted expression of mb-1, a gene with CD3-like structural properties. *EMBO J.* 1988;7:3457-3464.