

Monoclonal Mouse Anti-Human CD3/APC, Clone UCHT1
Monoclonal Mouse Anti-Human CD3/FITC, Clone UCHT1
Monoclonal Mouse Anti-Human CD3/PerCP, Clone UCHT1
Monoclonal Mouse Anti-Human CD3/RPE, Clone UCHT1
Monoclonal Mouse Anti-Human CD3/RPE-Cy5, Clone UCHT1

Nr kat. C7225
Nr kat. F0818
Nr kat. PR702
Nr kat. R0810
Nr kat. C7067

Przeznaczenie

Do badań diagnostycznych *in vitro*.

Produkty o nr kat. C7225, F0818, PR702, R0810 oraz C7067 są przeznaczone do stosowania w cytometrii przepływowej. CD3 jest antygenem specyficznym dla wszystkich linii limfocytów T, stanowiącym cenny marker normalnych i nowotworowych limfocytów T. Przeciwciała przeciw CD3 odgrywają istotną rolę we wczesnej ocenie ostrych i przewlekłych zaburzeń limfoproliferacyjnych (1). Interpretację powinien przeprowadzić wykwalifikowany patolog w oparciu o historię choroby pacjenta oraz inne testy diagnostyczne.

Streszczenie i informacje ogólne

Ludzki antygen TCR/CD3 jest złożoną strukturą zlokalizowaną na powierzchni limfocyta. Składa się z heterodimeru TCR $\alpha\beta$ lub TCR $\gamma\delta$ oraz przyłączonego kompleksu CD3. Kompleks CD3 jest złożony z sześciu polipeptydów, które zazwyczaj zawierają cztery różne łańcuchy transmembranowego CD3: γ (gamma), δ (delta), ϵ (epsilon) i ζ (zeta). Kompleks CD3 tworzą trzy różne dimery $\gamma\epsilon$, $\delta\epsilon$ oraz $\zeta\zeta$. Mr dla CD3 ϵ wynosi 20 000 (2).

Kompleks CD3 ma zasadnicze znaczenie dla przekazywania sygnałów rozpoznania antygeny do cytoplazmy limfocytów T oraz dla regulacji ekspresji kompleksu TCR na powierzchni komórki. Ponadto odgrywa istotną rolę w różnicowaniu tymocytów (2).

Antygen CD3 jest wykrywany najwcześniej w niedojrzałych tymocytach, a jego pojawienie się najprawdopodobniej stanowi jedną z pierwszych oznak różnicowania w kierunku linii limfocytów T. W tymocytach korowych we wczesnych stadiach dojrzewania antygen CD3 jest obecny głównie w cytoplazmie komórki. W tymocytach rdzeniowych antygen ten wykrywany jest głównie na powierzchni komórki (3, 4).

Większość nowotworów pochodzących z linii limfocytów T również wykazuje ekspresję CD3, lecz nie obserwuje się go w złośliwych nowotworach limfatycznych o innym pochodzeniu (5). Zgodnie ze schematem syntezy antygeny w normalnych tymocytach, CD3 w komórkach nowotworowych najwcześniej wykrywany jest w cytoplazmie komórki (3).

Odczynnik dostarczony

Koniugaty anti-CD3, C7225, F0818, PR702, R0810 oraz C7067 zostały wyprodukowane z oczyszczonego mysiego przeciwciała monoklonalnego. Koniugaty są dostarczane w postaci płynnej w buforze zawierającym 1% albuminę surowicy bydlęcej (BSA) oraz 15 mmol/L Na $_2$ SO $_4$ o pH 7,2. Każda fiołka zawiera 100 testów (10 μ L koniugatu przeznaczone jest dla maksymalnie 10⁶ leukocytów z normalnej krwi obwodowej).

Izotyp: IgG1, kappa. Stężenie koniugatu mg/L: zob. informację podaną na etykiecie fiołki.

Przeciwciało nr kat.	Fluorochrom	Kontrola ujemna nr kat.
F0818	FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1)	X0927
R0810	RPE (R-Phycoerythrin)	X0928
PR702	PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein)	X7909
C7067	RPE-Cy5 (R-Phycoerythrin-Cyanine 5)	X0955
C7225	APC (Allophycocyanin)	X0968

Immunogen

Niedojrzałe tymocyty ludzkie i limfocyty pacjenta z zespołem Sézary'ego (6).

Swoistość

Przeciwciało Anti-CD3, UCHT1, włączono do programu Pierwszych i Trzecich Międzynarodowych Warsztatów i Konferencji: Ludzkie antygeny różnicowania leukocytów (International Workshops and Conferences on Human Leucocyte Differentiation Antigens) (Paryż 1982, Oksford 1986), a badania przeprowadzone przez liczne laboratoria potwierdziły jego reaktywność z antygenem CD3 (7). Przeciwciało Anti-CD3, UCHT1, reaguje z łańcuchem CD3 ϵ o masie 20 kDa (8).

Przeciwciało Anti-CD3 znakuje limfocyty T w grasicy, szpiku kostnym, śledzionie, migdałkach i krwi. (3-6). Znakuje również komórki Purkiniego w mózdzku, stanowiące jedyny inny znany typ komórek wiążących przeciwciała przeciw CD3 (9).

W obecności interleukiny-2 (IL-2) przeciwciało może wywołać proliferację *in vitro* dojrzałych tymocytów oraz limfocytów T (10).

Środki ostrożności

1. Do stosowania przez wyszkolony personel.
2. Produkt zawiera azcydek sodu (Na $_2$ S $_2$ O $_3$), substancję chemiczną silnie toksyczną w czystej postaci. Azcydek sodu, zastosowany w produkcie w stężeniu, które nie jest sklasyfikowane jako niebezpieczne, może reagować z elementami kanalizacji wykonanymi z ołowiu i miedzi, powodując nagromadzenie silnie wybuchowych azcydków metali. Po usunięciu spłukać dużą ilością wody, aby zapobiec nagromadzeniu się azcydku metalu w kanalizacji.
3. Podobnie jak w przypadku wszelkich materiałów pochodzących ze źródeł biologicznych należy stosować prawidłowe procedury postępowania.
4. W celu uniknięcia kontaktu z oczami i skórą należy nosić odpowiednie osobiste wyposażenie ochronne.
5. Niewykorzystany odczynnik należy usuwać zgodnie ze stosownymi przepisami lokalnymi i krajowymi.

Przechowywanie

Przechowywać w ciemnym miejscu w temp. 2–8 °C. Nie używać po upływie daty ważności podanej na etykiecie fiołki. Jeśli odczynniki są przechowywane w warunkach innych niż podane powyżej, użytkownik musi

zweryfikować takie warunki. Nie ma oczywistych oznak wskazujących na utratę stabilności produktu. Dlatego jednocześnie z badaniem próbek pacjenta należy wykonywać dodatnie i ujemne próby kontrolne. Jeśli wystąpi nieoczekiwany wzór barwienia, którego nie można wyjaśnić różnicami w procedurach laboratoryjnych i istnieje podejrzenie, że przyczyną może być problem z przeciwciałem, należy niezwłocznie skontaktować się z działem pomocy technicznej naszej firmy.

Procedura barwienia

1. Przenieść 100 µL krwi z dodatkiem środka przeciwzkrzepowego (EDTA) do próbówki polistyrenowej o wymiarach 12 mm x 75 mm.
2. Dodać 10 µL sprzężonego z fluorochromem anti-CD3 i wymieszać ostrożnie mieszadłem wibracyjnym.
3. Inkubować próbówkę w ciemności przez 30 minut w temperaturze 2–8 °C lub w temperaturze pokojowej (20–25 °C) przez 15–30 minut.
4. Dodać do próbówki 100 µL odczynnika Uti-Lyse™ Reagent A (nr kat. Dako S3325) i delikatnie mieszać mieszadłem wibracyjnym. Inkubować próbówkę przez 10 minut w temperaturze pokojowej, w ciemnym pomieszczeniu.
5. Dodać do próbówki 1 mL odczynnika Uti-Lyse™ Reagent B (nr kat. Dako S3325) i delikatnie mieszać mieszadłem wibracyjnym. Inkubować próbówkę przez 10 minut w temperaturze pokojowej, w ciemnym pomieszczeniu.
6. Odwirować próbówkę przy 300 x g przez 5 minut. Delikatnie odciągnąć supernatant i odrzucić go, pozostawiając w próbówce około 50 µL cieczy.
7. Dodać do próbówki 2 mL odczynnika PBS i odtworzyć zawiesinę za pomocą mieszadła wibracyjnego.
8. Powtórzyć etap 6.
9. Odtworzyć zawiesinę komórek w odpowiednim płynie do cytometrii przepływowej, np. 0,3 mL PBS.
10. Podać próbkę analizie w cytometrze przepływowym lub przechowywać do analizy w ciemności i temperaturze 2–8 °C. Próbkę powinny zostać poddane analizie przed upływem 24 godzin od barwienia.

Należy pamiętać, że koniugaty fluorochromowe są wrażliwe na światło. Odczynniki przechowywać z dala od światła oraz podczas procedury barwienia i do wykonania analizy próbki powinny być chronione przed światłem.

Uwagi dotyczące procedury

Etap 1. Opcjonalnie do każdego pomiaru można dołączyć odpowiednie dodatnie i ujemne próbki kontrolne w celu weryfikacji odczynnika i przygotowania próbek.

Etap 2. Zalecana objętość koniugatu jest jedynie wartością orientacyjną. Optymalne warunki barwienia mogą się zmieniać w zależności od rodzaju materiału i sposobu jego przygotowania i powinny być określone indywidualnie w każdym laboratorium.

Uwzględnienie próbki z odczynnikiem kontrolnym jest opcjonalne. Odczynnik kontrolny powinien być dopasowany do izotypu i fluorochromu sprzężonego przeciwciała. Zalecane odczynniki kontrolne przedstawiono w tabeli powyżej.

Etap 4 i 5. Jeśli używany jest inny odczynnik do lizy komórek, należy przy jego doborze kierować się poniższymi zaleceniami. Należy zauważyć, że jeśli alternatywny odczynnik do lizy nie zawiera utwalacza, np. Dako EasyLyse™, nr kat. S2364), PBS w etapie 9 powinien zawierać 1% paraformaldehydu, chyba że próbka zostanie przeanalizowana w czasie zalecanym dla odczynnika do lizy.

Etap 10. W przypadku niektórych chorób można oczekiwać nieprawidłowej liczby komórek, w których zachodzi ekspresja antygenu docelowego, lub nieprawidłowego poziomu ekspresji antygenu. Do przeprowadzenia właściwej analizy konieczna jest znajomość prawidłowego wzorca ekspresji antygenu oraz jego związków z ekspresją innych istotnych antygenów.

Zaleca się dołączenie do każdego pomiaru odpowiednich dodatnich i ujemnych próbek kontrolnych w celu weryfikacji odczynnika i przygotowania próbek. Należy pamiętać, że koniugaty fluorochromowe są wrażliwe na światło, w związku z czym w trakcie wykonywania odczynu i do wykonania analizy próbki powinny być chronione przed światłem.

Ograniczenia specyficzne dla produktu

Zaobserwowano, iż koniugaty RPE-Cy5 mogą wiązać się z monocytami, co jest przyczyną nieswoistego barwienia tła (11).










Piśmiennictwo

1. Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH. Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting. *Cytometry* 2001;46:23-7.
2. Saito T, Yamazaki T. TC4. CD3 workshop panel report. Pod redakcją: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M i wsp. W: *Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference*; 1996, 10-14 listopad; Kobe, Japonia. Nowy Jork, Londyn: Garland Publishing Inc.; 1997. str. 44-48.
3. Campana D, Thompson JS, Amlot P, Brown S, Janossy G. The cytoplasmic expression of CD3 antigens in normal and malignant cells of the T lymphoid lineage. *J Immunol* 1987;138:648-55.
4. Swerdlow SH, Angermeier PA, Hartman AL. Intrathymic ontogeny of the T cell receptor associated CD3 (T3) antigen. *Lab Invest* 1988;58:421-7.
5. Erber WN, Mynheer LC, Mason DY. APAAP labelling of blood and bone-marrow samples for phenotyping leukaemia. *Lancet* 1986;i:761-5.
6. Beverley PC, Callard RE. Distinctive functional characteristics of human "T" lymphocytes defined by E rosetting or a monoclonal anti-T cell antibody. *Eur J Immunol* 1981;11:329-34.
7. McMichael AJ, Gotch FM. T-cell antigens: new and previously defined clusters. Pod redakcją: McMichael AJ, Beverley PCL, Cobbold S, Crumpton MJ, Gilks W, Gotch FM i wsp. W: *Leucocyte typing III. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 3rd International Workshop and Conference*; 1986, 21-26 wrzesień; Oksford, Anglia. Oksford, Nowy Jork, Tokio: Oxford University Press; 1987. str.31-62.
8. Tunnacliffe A, Olsson C, Traunecker A, Krissansen GW, Karjalainen K, de la Hera A. T3.2. The majority of CD3 epitopes are conferred by the epsilon chain. Pod redakcją: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber

EP, Schmidt RE, Stein H i wsp. W: Leucocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference; 1989, 21-25 luty; Wiedeń, Austria. Oksford, Nowy Jork, Tokio: Oxford University Press; 1989. str. 295-6.

9. Garson JA, Beverley PC, Coakham HB, Harper EI. Monoclonal antibodies against human T lymphocytes label Purkinje neurones of many species. Nature 1982;298:375-7.
10. Denning SM, Tuck DT, Singer KH, Haynes BF. T2.11. Activation of human thymocytes via CD3 and CD2 molecules. Pod redakcją: McMichael AJ, Beverley PCL, Cobbold S, Crumpton MJ, Gilks W, Gotch FM i wsp. W: Leukocyte Typing III. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 3rd International Workshop and Conference. Oksford-Nowy Jork-Tokio: Oxford University Press; 1987. str. 144-7.
11. van Vugt MJ, van den Herik-Oudijk IE, van de Winkel JGJ. Binding of PE-CY5 conjugates to the human high-affinity receptor for IgG (CD64). Blood 1996;88:2358-61.

Objaśnienie symboli

 REF	Numer katalogowy	 Chronić przed słońcem (patrz sekcja nt. przechowywania)	 Producent
 i	Sprawdzić w instrukcji stosowania	 LOT	 IVD
 2°C 8°C	Temperatura przechowywania	 Zużyć przed	 EC REP



Agilent Technologies Singapore (International) Pte Ltd.
No. 1 Yishun Avenue 7
Singapore, 768923
Tel. +44 161 492 7050
www.agilent.com

Wersja 11.2020