

FOGLIO INFORMATIVO SUL PRODOTTO

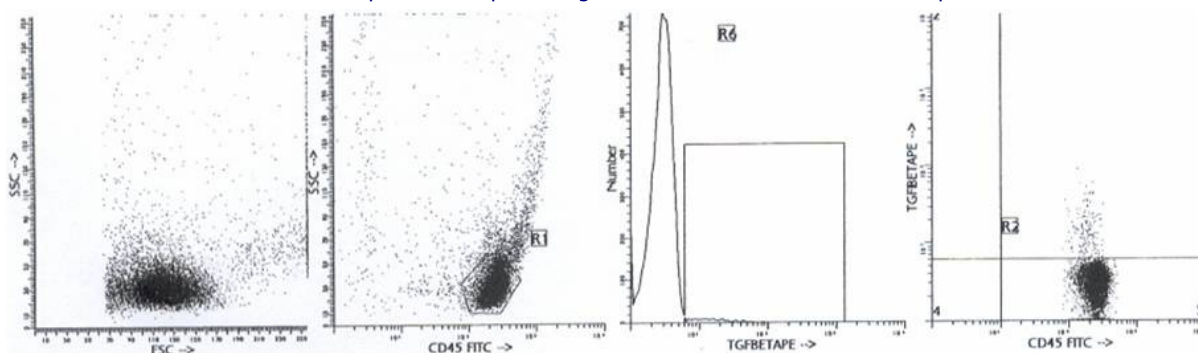
Anticorpi monoclonali rilevanti antigeni umani

Anti-TGFβ

PURE	RUO	REF	IQP-169P	▽	50 tests
R-PE	RUO	REF	IQP-169R	▽	50 tests

RUO **Ad esclusivo uso di ricerca**

	Descrizione
Clone	TB21
Isotipo	murino IgG1k
Specificità	TB21 reagisce con Transforming Growth Factor-Beta 1 (TGF-β1) umano. In citometria a flusso questo anticorpo determina la forma intracellulare del TGF-β (così chiamata latente, LAP-legame o inattivo TGF-β) così come con il legame di membrana TGF-β (forma nella matrice extracellulare). La tecnica Western blotting ha dimostrato che questo anticorpo reagisce con la forma dimerica (25 kDa) e monomera (12,5 kDa) del TGF-β (forma attiva) rispettivamente sotto condizioni sia di non riduzione che riduzione. Questo anticorpo riconosce sia le piastrine umane derivate sia il TGF-β ricombinante in ELISA.
Distribuzione dell'antigene	TGF-β è presente sulla maggior parte dei tipi di cellule incluse le cellule T e i monociti.
Riepilogo	TGF-β fu originariamente identificato per la sua abilità a indurre trasformazioni fenotipiche dei fibroblasti in diversi tipi di cellule. Questa proteina controlla la proliferazione, la differenziazione e molte altre funzioni di vari tipi di cellule.
Applicazioni	<p>Area della ricerca – Fattori di crescita, ormoni e loro recettori, angiogenesi.</p> <p>Citometria a flusso – Per studiare il contatto cellula-cellula con le cellule CD4+ T regolatorie che coesprimono il legame di membrana TGF-β o utilizzandolo come marker potenziale per apoptosis in pazienti COPD.</p> <p>Western Blotting – quando utilizzato ad una concentrazione di anticorpo di 5-20 ng/ml si ottiene una visualizzazione di 100 ng/corsia di TGF-β.</p> <p>Test di neutralizzazione – L'anticorpo TB21 neutralizza l'attività TGF-β in vitro, in un test di inibizione di crescita delle cellule CCL/64 e neutralizza l'azione di promozione di crescita del TGF-β nel test di formazione della colonia NRK-49F. L'effetto di microiniezioni in questo anticorpo in un blastomero di embrioni Xenopus allo stadio di due cellule indicava che erano effettivamente capaci di neutralizzare la bioattività del TGF-β in vivo.</p> <p>IHC – Il monoclonale potrebbe essere utilizzato nelle tecniche di immunistochemica per localizzare il TGF-β1 all'interno dei tessuti. TB21 è stato utilizzato in sezioni di tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina, in sezioni congelate es: tessuto ovario ovino, sezioni di carcinoma della mammella (1:1000 diluito). Come una conseguenza dell'intensa colorazione degli eritrociti è possibile localizzare una singola cellula nello stroma ovarico rendendolo utile nel localizzare una rete molto fine capillare all'interno del tessuto.</p>
Utilizzo	Tutti questi reagenti sono formulati per la colorazione di immunofluorescenza diretta di tessuto umano per analisi in citometria a flusso: utilizzare per singola colorazione 10 µl/10 ⁶ di leucociti e 20 µl/10 ⁶ di leucociti nel caso di doppie o triple combinazioni. Se le applicazioni variano, ogni utilizzatore dovrebbe titolare il reagente per ottenere il risultato ottimale.
Dati rappresentativi	La colorazione con gli anticorpi monoclonali TGF-β (clone TB21) è illustrata con analisi di citometria a flusso su cellule mononucleate attivate. Colorazione diretta è stata processata utilizzando 10 µl di anticorpo coniugato direttamente con R-PE e 100 µl di cellule stimulate.



Limitazioni

1. I coniugati con fluorocromi più brillanti quali PE e APC, presenteranno una maggiore separazione rispetto ai coniugati con i fluorocromi quali FITC e CyQ. Quando le popolazioni si sovrappongono, il calcolo della percentuale delle cellule positive per un determinato marcatore può essere influenzato dalla scelta del fluorocromo.
2. L'utilizzo di anticorpi monoclonali nel trattamento di pazienti può interferire con il riconoscimento degli antigeni bersaglio da parte di questo reagente. Questo dovrebbe essere preso in considerazione quando i campioni analizzati sono di pazienti trattati in questo modo. IQ Products non ha verificato l'effetto della presenza di anticorpi terapeutici sul funzionamento di questo reagente.
3. I reagenti possono essere utilizzati in diverse combinazioni; pertanto, gli operatori di laboratorio dovranno acquistare familiarità con le caratteristiche di ciascun anticorpo in relazione ai marcatori combinati in campioni normali e anormali.
4. I dati relativi all'attività del reagente si basano su sangue trattato con EDTA. L'attività del reagente può essere influenzata se vengono utilizzati altri anticoagulanti.

Reagenti e materiali necessari ma non in dotazione

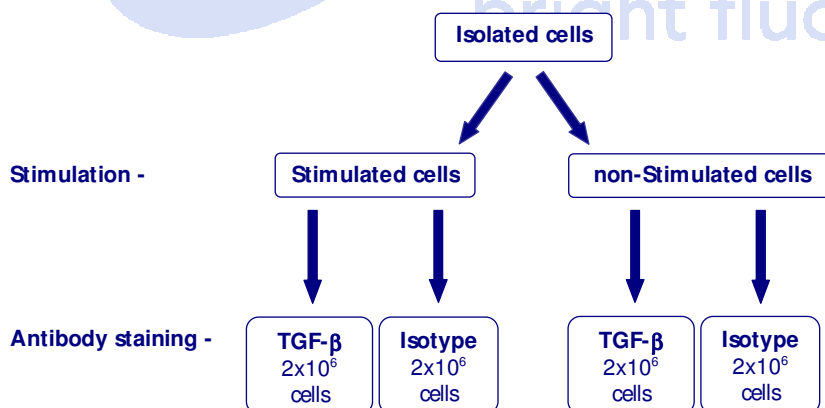
- 1 Citometro a flusso
- 2 Provetta da test con tappo in polistirene monouso 12 x 75 mm per citometro a flusso
- 3 Micropipetta con puntali monouso
- 4 Miscelatore a vortice
- 5 Centrifuga
- 6 IQ Lyse- soluzione lisante di eritrociti (IQP-199)
- 7 IQ Starfiqs - soluzione permeabilizzante e fissante (IQP-200)
- 8 PBS (soluzione salina di tampone fosfato)
- 9 1% di soluzione paraformaldeide in PBS (conservare a 2-8 °C in vetro ambrato per un massimo di 1 settimana)

-A- Procedura di colorazione intracellulare del TGF- β

1. Isolamento dei PBMCs

- a. Raccogliere 5-10 ml di sangue in una provetta trattata con eparina o EDTA e separare i PBMC utilizzando Ficoll Paque.
- b. Lavare le cellule una volta con 10 mL HBSS e centrifugare a 400 g per 15 minuti.
- c. Lavare le cellule una volta con 10 mL RPMI 1640 medium base per culture cellulari e centrifugare a 300g per 10 minuti.
- d. Risospendere le cellule in 5 mL RPMI 1640 medium base per culture cellulari, contare e aggiustare la concentrazione a 2×10^6 cellule/ml.

Vedere schema qui di seguito per calcolare l'ammontare dei campioni necessari per cellule stimolate e controlli non stimolati



2. Stimolazione dei PBMCs

- a. Raccogliere 5-10 ml di sangue in una provetta con eparina o EDTA e separare PBMC utilizzando Ficoll Paque.
- b. Aggiungere 1 ml di sospensione cellulare per pozzetto su una piastra per coltura da 24 pozzetti e aggiungere 20 μ l di PMA e 10 μ l Ionomicina e Monensina in ogni pozzetto.
- c. Incubare a 37 °C e 5% CO₂ per 24 ore.
- d. Lavare le cellule per pozzetto con 10 mL HBSS e centrifugare a 300g per 10 minuti.

3. Fissazione

- a. Scartare il surnatante e aggiungere 500 μ l di tampone di fissazione freddo (4 °C).
- b. Incubare a temperatura ambiente per 10 minuti.
- c. Lavare le cellule con 10 ml HBSS e centrifugare a 300g per 10 minuti.

4. Permeabilizzazione

- Scartare il surnatante e aggiungere 1.5 ml di tampone permeabilizzante.
- Centrifugare a 200g per 5 minuti.
- Scartare il surnatante e risospendere le cellule in 100 µl di tampone permeabilizzante.

5. Colorazione anticorpo

- Trasferire la sospensione cellulare (100 µl) in una provetta per citometro.
- Aggiungere 10 µl di anti-TGF-β R-PE (IQP-169R) e controllo isotipico IgG1 R-PE (IQP-191R) alle provette e miscelare bene.
- Incubare al buio a 4 °C per 20 minuti.
- Aggiungere 1,5 ml di tampone permeabilizzante, e centrifugare a 200g per 5 minuti.
- Scartare il surnatante e risospendere le cellule in un sufficiente quantitativo di tampone permeabilizzante per analisi di citofluorimetria.

6. Analisi con citofluorimetro

- Analizzare le cellule con il citometro a flusso e utilizzare un appropriato processore di dati.

- B - Reagenti e soluzioni

1. Soluzione di lavoro di PMA e Ionomicina

- Preparare separate le soluzioni di lavoro di 1 mg/ml PMA e 1,25 mg/ml Ionomicina in DMSO.
- Conservare in aliquote di 10-20 µl a -20 °C.
- Prima di stimolare, diluire la soluzione di lavoro di PMA 1:1000 e quella di Ionomicina 1:50 in RPMI 1640.

2. Soluzione di lavoro di Monensina

- Preparare la soluzione di lavoro di 17,6 mg/ml in etanolo al 98% e conservare in aliquote di 10-20 µl a -20 °C.
- Prima di stimolare diluire la soluzione di lavoro 1:100 in RPMI 1640.

3. Tampone di permeabilizzazione

- Sciogliere 0,6 g Hepes in 150 ml di acqua demineralizzata.
- Aggiungere 25 ml 10 x PBS, 2,5 ml Fetal Calf 1 Serum, 0,25 g Saponine e 0,25 g NaN₃.
- Aggiungere acqua demineralizzata fino ad un volume finale di 250 ml.

4. Tampone di fissazione

- Sciogliere 2,0 g paraformaldeide in 5 ml di acqua demineralizzata, incubare 3 ore a 70 °C.
- Aggiungere poche gocce di NaOH, 6M finchè la soluzione diventa chiara.
- Sciogliere 825 mg NaH₂PO₄ in 30 ml di acqua demineralizzata, aggiungere 188 mg NaOH e 0.5 ml Fetal Calf 1 Serum.
- Aggiungere la soluzione di formaldeide e aggiustare il pH a 7.4 - 7.6.
- Aggiungere acqua demineralizzata fino ad un volume finale di 50 ml.
- Filtrare la soluzione con un filtro da 0.2 µm.

Reagenti	Quantità richiesta per 50 tests*
PMA	1 ml
Ionomicina	500 µl
Monensina	500 µl
Tampone fissazione	50 ml
Permeabilizzante	250 ml

*) "tests" referiti ad un campione e al suo controllo



Manipolazione e conservazione

Gli anticorpi sono forniti come fiala per 50 test (0.5 ml) per combinazioni singole. Sono forniti in 0,01 M fosfato di sodio, 0,15 M NaCl; pH 7.3, 0,2% BSA, 0,9% sodio azide (NaN₃). Conservare le fiale a 2-8 °C. Gli anticorpi monoclonali dovranno essere protetti dall'esposizione prolungata alla luce. I reagenti sono stabili per il periodo indicato sull'etichetta della fiala, se conservati correttamente.

Garanzia

La sola garanzia offerta è di conformità a quantità e contenuti indicati sull'etichetta al momento della fornitura al cliente. Non vengono concessi altri tipi di garanzia, espressi o impliciti, che esulino dalla descrizione riportata sull'etichetta del prodotto. IQ Products non sarà responsabile di danni alla proprietà, ferite personali o perdite economiche causate dal prodotto.

Caratterizzazione

Per garantire un livello qualitativo costantemente elevato, ciascun lotto di anticorpi monoclonali è testato circa la conformità con le caratteristiche di un reagente standard. Dati rappresentativi relativi alla citometria a flusso sono inclusi nella presente scheda.

Attenzione Tutti i prodotti contengono sodio azide, sostanza chimica velenosa e pericolosa. L'uso sarà consentito esclusivamente a operatori specializzati.

Riferimenti bibliografici

1. Crawford, S.E.. 1998. Thrombospondin-1 is a Major Activator of TGF-beta1 In Vivo. Cell 93:1159-1170
2. Reiss, M. 1999. TGF-β and cancer. Microbes and Infection. 1:1237-1347
3. Wei-kang, S., Qin-wei, Y., Lin-pin, B. 1993. Biological Characterization of A Monoclonal Antibody TB21 Against Human Transforming Growth Factor-Beta. Aeta Biologica Experimentalis Sinica Vol. 26, No. 2:141-150
4. Garba, M. L., Frelinger. J.A. 2001. Intracellular cytokine staining for TGF-β. J. Immunol. Methods 258:193.
5. Garba, M.L., Pilcher, C. D., Bingham, A.L., Eron, J., Frelinger, J.A. 2002. HIV Antigens Can Induce TGF-β1-Producing Immunoregulatory CD8+ T Cells. The Journal of Immunology, 168: 2247-2254.
6. Hodge, S., Hodge, G., Holmes, M., Flower, R., Scicchitano, R. 2001. Interleukin-4 and tumour necrosis factor-α inhibit transforming growth factor-β production in a human bronchial epithelial cell line: Possible relevance to inflammatory mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease. Respirology 6, 205-211
7. Hodge, S., Hodge, G., Flower, R., Reynolds, P.N., Scicchitano, R., Holmes, M. 2002. Up-regulation of production of TGF-β and IL-4 and down-regulation of IL-6 by apoptotic human bronchial epithelial cells. Immunology and Cell Biology 80:537-543
8. Hodge, S., Hodge, G., Reynolds, P. N., Scicchitano, R., Holmes, M. 2003. Increased production of TGF-β and apoptosis of T lymphocytes isolated from peripheral blood in COPD. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 285: L492-L499
9. Ostroukhova, M., Seguin-Devaux, C., Oriss, T.B., Dixon-McCarthy, B., Yang, L., Ameredes, B.T., Corcoran, T.E., Ray, A. 2004. Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4+ T cells expressing membrane-bound TGF-β and FOXP3. J. Clin. Invest. 114:28-38

Legenda dei simboli

	Consultare le Istruzioni per l'uso
	Numero di catalogo
	Sufficiente per
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Attenzione, consultare il documento allegato
	Conservare al riparo dalla luce (solare)
	Rischio biologico
	Limiti di temperatura (°C)
	Ad esclusivo uso di ricerca
	Codice del lotto
	Utilizzare entro aaaa-mm-gg
	Fabbricante
	Mandatario nella Comunità Europea
	Conformité Européenne (Conformità Europea)

		etichetta - tandem	Ex -max (nm)	Em -max (nm)
P	PURE	Materiale purificato	-	-
F	FITC	FITC	488	519
R	R-PE	PE	488, 532	578
C	CyQ	PE-Cy5.18	488, 532	667
A	APC		595, 633, 635, 647	660
PC	PerCP		488, 532	678
PCC	PerCP-Cy5.5		488, 532	695

IQ Products BV
Rozenburglaan 13a
9727 DL Groningen, The Netherlands

+31 (0)50 57 57 000
 +31 (0)50 57 57 002
 Technical marketing@iqproducts.nl
 Orders orders@iqproducts.nl
 www.iqproducts.nl