

FOGLIO INFORMATIVO SUL PRODOTTO

Anticorpi monoclonali rilevanti antigeni umani

CD55

R-PE	RUO	REF	IQP-520R	▼ 100 tests		REF	IQP-520R50	▼ 50 tests
APC	RUO	REF	IQP-520A	▼ 100 tests		REF	IQP-520A50	▼ 50 tests

RUO
Solo per Uso Ricerca


Descrizione

Clone NaM16-4D3

Isotipo Murine IgG2a

Specificità CD55 è espresso come glicoproteina da 60-70 kD (negli eritrociti) ancorata alla membrana attraverso la coda GPI. In alter cellule il peso molecolare è qualche volta maggiore.

Distribuzione Antigenica

Espressione cellulare: Piastrine, Monociti, Linfociti ed eritrociti.

Sommario

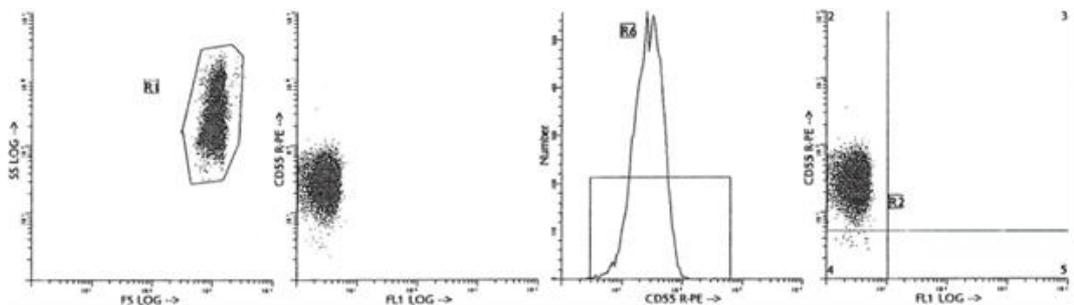
CD55 (clone NaM16-4D3) può essere applicato in citometria a flusso per analisi di campioni di sangue e di midollo osseo o in immunocitochimica utilizzando citospot. CD55 è una glicoproteina a singola catena di Glicosil-Fosfatidilinositolo (GPI) .Essa è compresa tra 4 corti consensi N-terminale che ripete (SCR) I moduli (4 Cys in 1-3,2-4 legame) con C3b/C4b legante e attività regolatoria in SCR 2,3,4. CD55 è spesso coinvolto nella protezione delle cellule nel danno complement mediato da autologo e sono parzialmente o completamente mancanti nelle cellule del sangue periferico. CD55 inibisce la formazione e accelera il decadimento del C3/C5 complesso della convertasi sia nel cammino classico che alternativo [1]. CD55 stabilisce una soglia di barriera protettiva contro l'inappropriata attivazione del complemento e la deposizione sulle membrane del plasma, specialmente attraverso il classico percorso dell'attivazione del complemento, attraverso una formazione limitante la vita media delle C3 convertasi. Poiché il CD55 è ben conosciuto come proteina regolatoria del complemento associate alle membrane, come CD59, e presente su tutte le cellule del sangue, CD55 e CD59 sembra essere l'anticorpo monoclonale più efficiente per determinare il subset cellulare nelle poche negative (meno dell' 1% sugli eritrociti o meno del 5% sui leucociti PMN).

Utilizzo

Tutti questi reagenti sono effettivamente formulati per colorazioni di immunofluorescenza diretta di tessuti umani per analisi di citometria a flusso utilizzando 10 µl/10⁶ di leucociti per singola marcatura e 20 µl/10⁶ leucociti in caso di doppie e triple combinazioni. Se le applicazioni variassero, ogni utilizzatore dovrebbe titolare il reagente per ottenere i risultati ottimali.

Dati rappresentativi

E' illustrate l'analisi in citometria a flusso di cellule di sangue normale colorate con anticorpi monoclonali CD55. La colorazione diretta è stata eseguita utilizzando 10 µl di anticorpo monoclonale coniugato con R-PE e 100 µl di sospensione di cellule del sangue.



Diagnosi di Emoglobinuria Parossistica Notturna(PNH)

Procedura

Eritrociti

-A- Preparazione della sospensione di Cellule Rosse del sangue

1. Utilizzare 10 ml di sangue intero in Eparina o EDTA e centrifugare per 10 min. 600g (partenza e freno leggeri).
2. Raccogliere il sangue ricco in Piastrine (PRP) e il buffy coat per ulteriori analisi di leucociti e piastrine, rispettivamente.
3. Lavare il pellet di eritrociti 3 volte con 2 ml di PBS e centrifugare per 2 min. 1000g.
4. Risospendere 1 volume di eritrociti sedimentati in 9 volumi di PBS.
5. Utilizzare un emocitometro o un contaglobuli automatico per calcolare il numero totale di RBC per ml di sangue raccolto in provette trattate con Eparina o EDTA.
6. Diluire gli RBC con PBS fino alla concentrazione finale di 50×10^6 cellule/ml.

-B- Colorazione di immunofluorescenza

7. Determinare l'ammontare necessario delle provette (controllo negativo (=controllo isotipico), controllo positivo (= es. anti-glicoforina A+B), CD55 e CD59 singoli o in doppia).
8. Aggiungere 100 μ l di RBC ad ogni provetta (5×10^6 cellule).
9. Aggiungere 10 μ l dei singoli (CD55, CD59) o 20 μ l dei doppi marcati.
10. Incubare per 30 min. a temperatura ambiente. Evitare la luce diretta.
11. Lavare due volte con 3 ml di PBS e centrifugare per 2 min. 1000g.
12. Risospendere le cellule in PBS (200-500 μ l).

-C- Acquisizione dati al citofluorimetro

13. Dovrebbero essere acquisiti in List mode files , 20.000 eventi in scala logaritmica per log FSC, log SSC e log fluorescenze.

Leucociti

-A- Preparazione della sospensione di Leucociti

1. Utilizzare 10 ml di sangue intero in Eparina o EDTA e centrifugare per 10 min. 600g (partenza e freno leggeri).
2. Raccogliere il plasma ricco in piastrine (PRP) per ulteriori analisi di piastrine.
3. Raccogliere il buffy coat e aggiungere 10 ml di tampone lisante.
4. Incubare 5 min. a temperatura ambiente (Massimo 10 min.).
5. Centrifugare 5 min. 400g per rimuovere il tampone lisante.
6. Lavare il pellet di leucociti due volte con 10 ml di PBS per 5 min. 400g.
7. Risospendere il pellet di leucociti in 1 ml di PBS.
8. Utilizzare un emocitometro o un contaglobuli automatico per calcolare il numero totale di Leucociti per ml di sangue raccolto in provette trattate con Eparina o EDTA.
9. Diluire i Leucociti con PBS fino a una concentrazione finale di 20×10^6 cellule/ml.

-B- Colorazione di immunofluorescenza

10. Determinare la quantità necessaria di provette (controllo negativo (= controllo isotipico), controllo positivo (= es. anti-HLA classe I), CD55 e CD59 singoli o doppi marcati).
11. Aggiungere 100 μ l di leucociti per ogni provetta (2×10^6 cells).
12. Aggiungere 10 μ l di marcatore singolo (CD55, CD59) o 20 μ l del doppio marcatore.
13. Incubare per 30 min. a temperatura ambiente. Evitare la luce diretta.
14. Lavare due volte in 3 ml PBS e centrifugare per 4 min. 400g.
15. Risospendere le cellule in PBS (200 – 500 μ l).

-C- Acquisizione dati al citofluorimetro

16. Acquisire almeno 20.000 cellule al citofluorimetro. Utilizzare gates basati sui parametri morfologici per eliminare detriti di cellule e rumore di fondo elettronico e separare Linfociti, Monociti, Granulociti.

Piastrine

Prepare PBS-EDTA 5 mM pH 7.4 (50 - 75 ml per paziente). Per migliori risultati dovrebbero essere utilizzati 0,45 µm filtrati di PBS-EDTA 5 mM. Il PBS-EDTA 5 mM dovrebbe essere fresco (deve essere utilizzato nella settimana in corso) e deve essere filtrato prima di ogni esperimento.

-A- Preparazione della sospensione delle Piastrine

1. Utilizzare 10 ml di sangue intero in Eparina o EDTA e centrifugare per 10 min. 600g (partenza e fermo graduati).
2. Raccogliere il plasma ricco (PRP) e diluire in PBS-EDTA 5 mM, fino ad un volume di 10 ml.
3. Centrifugare, 5 min. 2000g.
4. Scartare il surnatante e risospendere il pellet in 1 ml PBS-EDTA 5 mM.
5. Utilizzare un emocitometro o un contaglobuli automatico per calcolare il numero totale delle Piastrine per ml di sangue raccolto in provette trattate con Eparina o EDTA.
6. Diluire le Piastrine contaminate con PBS-EDTA 5 mM fino a una concentrazione finale di 10×10^6 cellule/ml.

-B- Colorazione di immunofluorescenza

7. Determinare la quantità necessaria di provette (controllo negativo (controllo isotipico), controllo positivo (CD61), CD55 and CD59 singoli o doppi marcati).
8. Aggiungere 100 µl di leucociti per ogni provetta (2×10^6 cellule).
9. Aggiungere 10 µl di coniugato singolo (CD55/CD59) o 20 µl di doppio marcato.
10. Incubare per 30 min. a temperature ambiente. Evitare la luce diretta.
11. Lavare due volte con 3 ml di PBS-EDTA 5 mM e centrifugare per 5 min. 2000g.
12. Risospendere le cellule in PBS-EDTA 5 mM (200 - 500 µl).

-C- Acquisizione dati al citofluorimetro

13. Per le analisi al citofluorimetro utilizzare un gate basato sui parametri morfologici per eliminare i detriti cellulari e il rumore di fondo elettronico e dovrebbero essere acquisiti in List Mode almeno 20.000 eventi con scala logaritmica su tutti i parametri: log FSC, log SSC e log fluorescenze.

Referenze

1. Socié G, Mary JY, de Gramont A, Rio B, Leporrier M, Rose C, et al. (1996) Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: long-term follow-up and prognostic factors. *Lancet*; 348:573-577.
2. Rotoli B, Luzzatto L (1989) Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Bailliere's Clin Haematol*; 2:113-138.
3. Kinoshita T, Inoue N, Takeda J (1995) Defective glycosyl phosphatidylinositol anchor synthesis and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Adv Immunol*; 60:57-103.
4. Yeh ETH, Rosse WF (1994) Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the glycosylphosphatidylinositol anchor. *J Clin Invest*; 93:2305-2310.
5. van der Schoot CE, Huizinga TWJ, van't Veer-Korthof ET, Wijmans R, Pinkster J, von dem Borne AEGK (1990) Deficiency of glycosyl-phosphatidylinositol-linked membrane glycoproteins of leukocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, description of a new diagnostic cytofluorometric assay. *Blood*; 76:1853-1859.
6. Navenot JM, Bernard D, Harousseau JL, Muller JY, Blanchard D (1996) Expression of glycosyl-phosphatidylinositol-linked glycoproteins in blood cells from paroxysmal nocturnal haemoglobinuria patients. A flow cytometry study using CD55, CD58 and CD59 monoclonal antibodies. *Leuk Lymphoma*; 21:143-151.
7. Hall SE, Rosse WF (1996) The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*; 87:5332-5340.
8. Iwamoto N, Kawaguchi T, Nagakura S, Hidaka M, Horikawa K, Kagimoto T, et al. (1995) Markedly high population of affected reticulocytes negative for decay-accelerating factor and CD59 in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*; 85:2228-2232.
9. Navenot JM (1996) Biological diagnosis and follow-up of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Contribution to the study of physiopathology. Thesis for PhD, University of Nantes, France.



Manipolazione e conservazione

Gli anticorpi sono forniti in fiala da 0,5ml per 100 test per la singola coniugazione, o per 50 tests (1 ml) per le fiale di doppia e tripla combinazione. Essi sono forniti in sodio fosfato 0.01 M, 0.15 M di NaCl; pH 7.3, 0.2% BSA, 0.09% sodioazide (NaN₃). Conservare le fiale a 2-8 °C. Gli anticorpi monoclonali dovrebbero essere protetti da esposizioni prolungate alla luce. I reagenti sono stabili per il periodo mostrato sull'etichetta della fiala quando conservati correttamente.

Garanzia

I prodotti venduti sono garantiti solo in conformità alla quantità e ai contenuti dichiarati in etichetta al tempo della spedizione al cliente. Non ci sono garanzie, espresso o implicite, che si estendono oltre alla descrizione dell'etichetta del prodotto. IQ Products non è responsabile per Danni alla proprietà, al personale o perdita economica causata dal prodotto.

Caratterizzazione

Per assicurare costantemente l'alta qualità dei reagenti, ogni lotto di anticorpo monoclonale è testato per essere conforme con le caratteristiche di un reagente standard. Il dato rappresentativo citometrico è incluso in questo foglio illustrativo.

Attenzione

Tutti i prodotti contengono sodioazide. Questo prodotto chimico è velenoso e pericoloso. Dovrebbe essere manipolato solo da personale esperto.

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