

## FOGLIO INFORMATIVO SUL PRODOTTO

### Anticorpi monoclonali rilevanti antigeni umani

#### CD69

FITC

RUO

REF

IQP-553F



100 tests

REF

IQP-553F50



50 tests

RUO

**Ad esclusivo uso di ricerca**



#### Descrizione

##### Clone

FN50

##### Isotipo

Murino IgG1

##### Specificità

Clone FN50 produce immunoglobuline di topo IgG1 che riconoscono glicoproteine dendritiche da 28/34 kD. CD69 è un membro del gruppo tipo lectina V c.

#### Distribuzione Antigenica

L'antigene del CD69 è una glicoproteina di superficie cellulare precoce inducibile di tipo II per apparire 'in vitro' sotto attivazione delle cellule T, delle cellule NK e delle cellule B. CD69 non è determinabile sulla membrana plasmatica della maggior parte dei linfociti circolanti nel sangue periferico. (PBL). Altri tipi di cellule, incluse piastrine, neutrofilo, eosinofili, e cellule epidermiche di Langerhans, esprimono anche l'antigene del CD69. CD69 è altamente espresso sulle cellule T da infiltrate infiammatorie di parecchie malattie umane: artrite reumatoide, epatiti virali, disordini autoimmuni della tiroide. CD69 di costituzione espresso da un subset dei timociti midollari mature, da cellule B mantellari e da certe cellule CD4+ T nei centri germinativi dei normali linfonodi, piastrine, cellule epidermiche di Langerhans.

#### Sommario

CD69 è coinvolto negli eventi precoci dei Linfociti, Monociti e di attivazione piastrinica. CD69 contribuisce all'attivazione delle cellule T: flussi di  $Ca^{2+}$ , sintesi di differenti citochine e loro recettori, induzione dell'espressione di c-myc e c-fos proto-oncogeni. CD69 contribuisce all'attivazione delle piastrine. Esso ha anche un ruolo funzionale ridiretta lisi mediate da cellule NK attivate. In citometria a flusso l'anticorpo colora più del 90% di linfociti attivati del sangue umano periferico.

#### Applicazioni

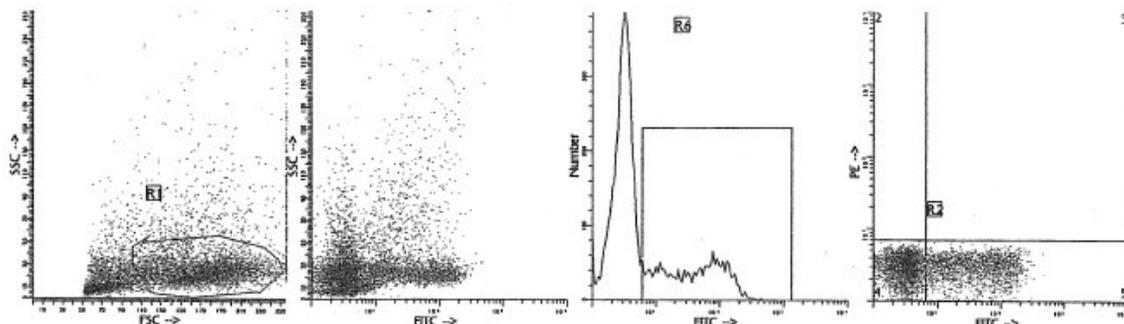
CD69, clone FN50, può essere applicato in citometria a flusso per analisi di campioni di sangue e di midollo osseo o in immunostochimica utilizzando citospot o sezioni di tessuto congelate o in paraffina o sezioni e in immunoprecipitazione.

#### Utilizzo

Tutti questi reagenti sono effettivamente formulate per colorazioni di immunofluorescenza diretta di tessuti umani per analisi di citometria a flusso utilizzando  $10 \mu\text{l}/10^6$  leucociti per colorazioni single e  $20 \mu\text{l}/10^6$  leucociti in caso di doppie e triple marcature. Se le applicazioni variassero, ogni utilizzatore dovrebbe titolare il reagente per ottenere risultati ottimali.

#### Dati rappresentativi

Gli anticorpi monoclonali FN50 (CD69) sono stati analizzati in citometria a flusso utilizzando linfociti CD3 attivati che sono stati isolate da un campione di sangue di un volontario umano. La colorazione diretta è stata fatta utilizzando  $10 \mu\text{l}$  di anticorpo monoclonale coniugato con FITC e  $100 \mu\text{l}$  di linfociti attivati.



## Limitazioni

1. I coniugati con fluorocromi più brillanti, quali PE e APC, avranno una separazione più grande di quelli coniugati con FITC e CyQ. Quando le popolazioni si sovrappongono, la percentuale delle cellule positive usando un marker selezionato può essere influenzata dalla scelta del fluorocromo utilizzato.
2. L'utilizzo di anticorpi monoclonali in pazienti in trattamento, può interferire con il riconoscimento dell'antigene bersaglio a causa di questo reagente. Questo dovrebbe essere tenuto in considerazione quando vengono analizzati campioni di pazienti trattati in terapia con anticorpi monoclonali. IQ Products non ha caratterizzato l'effetto della presenza di anticorpi terapeutici sulla prestazione di questo reagente.
3. I reagenti possono essere utilizzati in differenti combinazioni, quindi è necessario che i laboratori diventino familiari con le caratteristiche di prestazione di ogni anticorpo in relazione con i marcatori combinati in campioni normali e anormali.
4. Il dato della prestazione del reagente è basato su sangue trattato con EDTA. La prestazione del reagente può essere influenzata dall'uso di altri anticoagulanti.

## Reagenti e materiali richiesti ma non forniti

1. Citofluorimetro
2. Provette di polistirene con tappo per analisi al citofluorimetro 12 x 75-mm
3. Micropipette con puntali monouso
4. Agitatore Vortex
5. Centrifuga
6. IQ Lyse – soluzione lisante per eritrociti (IQP-199)
7. IQ Starfix – soluzione fissativa e permeabilizzante (IQP-200)
8. PBS (tampone fosfato salino)
9. 1% soluzione di paraformaldeide in PBS (conservare a 2-8 °C in vetro ambrato fino ad una settimana)

## Colorazione di immunofluorescenza e protocollo di lisi

### - A - Metodica citofluorimetrica per l'utilizzo di anticorpi monoclonali purificati

1. Aggiungere 100 µl di sangue trattato con EDTA (per esempio circa 10<sup>6</sup> leucociti) ad una provetta da 5 ml. Il contenuto di una provetta è sufficiente per eseguire un test.
2. Aggiungere ad ogni provetta 10 µl di anticorpo monoclonale purificato\*. Agitare la provetta con il vortex per una perfetta miscelazione delle cellule e dell'anticorpo.
3. Incubare la provetta per 15 minuti a temperatura ambiente e al buio.
4. Lavare le cellule marcate aggiungendo 2 ml di PBS contenente 0.001% (v/v) Eparina, agitare con il vortex e centrifugare (2 min 1000 x g.) e scartare il surnatante.
5. Aggiungere 50 µl di 1:10 diluizione di IQ Products F(ab)<sub>2</sub> Rabbit Anti Mouse IgG coniugato fluorescente, [FITC (IQP-190F); R-PE (IQP-190R)] in PBS contenente 0.001% (v/v) di Eparina per la provetta. Si raccomanda che la provetta sia protetta dalla luce.
6. Miscelare con il vortex e incubare per 15 minuti a temperatura ambiente e al buio.
7. Aggiungere 100 µl di IQ Lyse (IQP-199 pronto all'uso) e miscelare immediatamente.
8. Incubare per 10 minuti a temperatura ambiente e al buio.
9. Aggiungere 2 ml di acqua demineralizzata e incubare per 10 minuti al buio.
10. Centrifugare la sospensione di cellule marcate per 2 minuti a 1000 x g.
11. Rimuovere il surnatante e risospendere le cellule in 200 µl di PBS\*\*.
12. Analizzare al citofluorimetro entro 4 ore (in alternativa, le cellule dovrebbero essere fissate con 0.05% di formaldeide in tampone salino per analizzarle il giorno successivo. Alcuni antigeni sono subito distrutti dopo la fissazione e questo deve essere tenuto in considerazione quando si utilizza questa alternativa).

### - B - Metodica citofluorimetrica per l'uso di anticorpi monoclonali coniugati con (FITC, R-PE, Cy-Q or APC)

1. Aggiungere 100 µl di sangue trattato con EDTA (per esempio circa 10<sup>6</sup> leucociti) nella provetta da 5 ml. Il contenuto di una provetta è sufficiente per eseguire un test.
2. Aggiungere in ogni provetta 10 µl di anticorpo marcato\*. Agitare la provetta con il vortex per assicurare una buona miscelazione di anticorpo e cellule.
3. Incubare la provetta per 15 minuti a temperatura ambiente e al buio.
4. Aggiungere 100 µl di IQ Lyse (IQP-199 pronto all'uso) e miscelare immediatamente.
5. Incubare per 10 minuti a temperatura ambiente e al buio.
6. Aggiungere 2 ml di acqua demineralizzata e incubare per 10 minuti al buio.
7. Centrifugare la sospensione cellulare marcata per 2 minuti a 1000 x g.
8. Rimuovere il surnatante e risospendere le cellule in 200 µl di PBS\*\*.
9. Analizzare al citofluorimetro entro 4 ore (in alternativa, le cellule dovrebbero essere fissate con formaldeide allo 0.05% in tampone salino per analizzare il giorno successivo). Con la fissazione alcuni antigeni vengono subito distrutti e questo fatto dovrebbe essere tenuto in considerazione quando si usa questa alternativa).

- C - Metodica citofluorimetrica per l'utilizzo di doppie e triple combinazioni.

1. Aggiungere 100 µl di sangue trattato con EDTA (ad esempio 10<sup>6</sup> leucociti) nella provetta da 5 ml. Il contenuto di una provetta è sufficiente per eseguire un test.  
**Per combinazioni con Ig anti-kappa e/o anti-lambda Ig vedi nota applicativa qui sotto.**
2. Aggiungere a ogni provetta 20 µl di anticorpi monoclonali combinati\*.
3. Agitare con il Vortex la provetta per assicurarsi una perfetta miscelazione delle cellule con gli anticorpi
4. Incubare la provetta per 15 minuti a temperature ambiente al buio.
5. Aggiungere 100 µl di IQ Lyse (IQP-199 pronto all'uso) e miscelare immediatamente.
6. Incubare per 10 minuti a temperature ambiente al buio.
7. Aggiungere 2 ml di acqua demineralizzata e incubare per 10 minuti al buio.
8. Centrifugare la sospensione cellulare marcata per 2 minuti a 1000 x g.
9. Rimuovere il surnatante e risospendere le cellule in 200 µl di PBS\*\*.
10. Analizzare al citofluorimetro entro 4 ore (in alternative, le cellule dovrebbero essere fissate con formaldeide allo 0.05% in tampone salino per analizzare il giorno successivo). Con la fissazione alcuni antigeni vengono subito distrutti e questo fatto dovrebbe essere tenuto in considerazione quando si usa questa alternativa.

\* *Appropriati campioni di mouse Ig isotipo per controllo dovrebbero essere sempre inclusi in ogni studio di marcatura*

\*\* *PBS: Tampone Fosfato Salino, pH 7.2* \*

**Nota applicativa per combinazioni di Ig anti-kappa e/o anti-lambda**

Aggiungere 2 ml di PBS contenente lo 0.001% (v/v) di Eparina (**preriscaldata a 37 °C**) alla sospensione cellulare

Miscelare su vortex, centrifugare (2 min a 300x g) ed eliminare il surnatante

Ripetere il passaggio 2 volte

Risospendere le cellule ematiche in 100 µl di PBS contenente 0.001% (v/v) di Eparina



**Manipolazione e Conservazione**

Gli anticorpi sono forniti per 100 test per fiala (1 ml) per la singola marcatura o 50 tests per fiala I (1 ml) per le doppie e triple combinazioni. Essi sono forniti in 0.01 M di sodiofosfato, 0.15 M NaCl; pH 7.3, 0.2% BSA, 0.09% sodioazide (NaN<sub>3</sub>). Conservare le fiale a 2-8 °C. Gli anticorpi monoclonali dovrebbero essere protetti da lunghe esposizioni alla luce. I reagenti sono stabili per il periodo mostrato sull'etichetta della fiala quando conservati accuratamente.

**Garanzia**

I prodotti venduti qui di seguito sono garantiti solo per conformità alla e al contenuto dichiarato sull'etichetta al tempo della spedizione al cliente. Non ci sono garanzie, espresso o implicite, che si estendono oltre la descrizione sull'etichetta del prodotto. IQ Products non è responsabile per danno alla proprietà, ferita 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 alle caratteristiche di un reagente standard. Il dato citofluorimetrico rappresentativo è incluso in questo foglio illustrativo.

**Attenzione**

Tutti i prodotti contengono Sodio Azide. Questo prodotto chimico è velenoso e pericoloso. La manipolazione dovrebbe essere fatta solo da personale esperto.

---

## Referenze

1. Sanchez-Mateos, P., et al., 1991 Structure function and Immunochemical mapping of external and extracellular antigenic sites on the lymphocyte activation inducer molecule AIM/CD69., Eur. J. Immunol. 21: 2317-2325
  2. Testi R, et al., 1994, a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells., Immunol. Today 15, 479-483
  3. Cebrain M, et al., 1988, Triggering of T cell proliferation through AIM, J. Exp. Med. 168: 1621
  4. Ziegler S.F., et al., 1994, The activation antigen CD69. Stem Cells 12: 456-465
- 

## 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](mailto:marketing@iqproducts.nl)  
 Orders [orders@iqproducts.nl](mailto:orders@iqproducts.nl)  
 [www.iqproducts.nl](http://www.iqproducts.nl)