

FOGLIO INFORMATIVO SUL PRODOTTO

Anticorpi monoclonali rilevanti antigeni umani

CD59

R-PE RUO REF IQP-561R ▾ 100 tests |

RUO **Ad esclusivo uso di ricerca**



Descrizione

Clone MEM43

Isotipo Murino IgG2a

Specificità L'anticorpo CD59 reagisce con un ben definito epitopo (W40, R-53) sul CD59 (Protectina), una glicoproteina da 18-20 kDa glicosilfosfatidilinositolo ancorata (GPI) espressa su tutte le cellule ematopoietiche; essa è ampiamente presente sulle cellule in tutti i tessuti.
 HLDA IV; WS Code NL 705
 HLDA V; WS Code AS S013
 HLDA V; WS Code BP BP345
 HLDA V; WS Code T T-103

Distribuzione antigenica

CD59 si può trovare nei fluidi corporei quali sangue, plasma, saliva, liquido amniotico, liquido seminale e urine. Sebbene CD59 è ben conosciuto come proteina regolatoria del complemento associata alla membrana, come CD55, e presente su tutte le cellule del sangue, CD55 e CD59 sembra essere il più efficace Anticorpo Monoclonale per determinare un subset cellulare molto poco negativo (meno dell' 1% sugli eritrociti o meno del 5% sui PMN leucocitari).

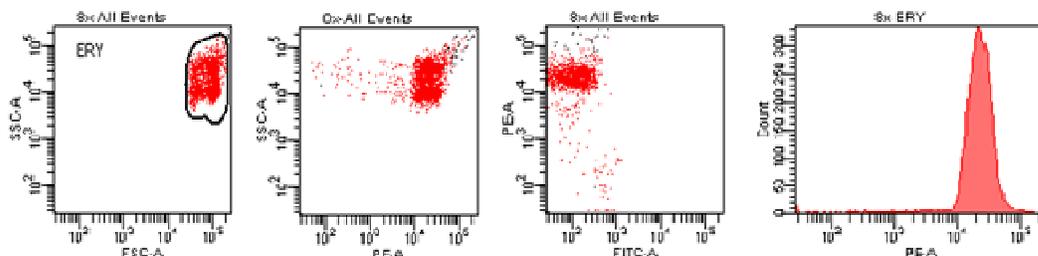
Sommario I difetti genetici nell'attacco dell'ancora GPI che causa una riduzione o perdita del CD59 e CD55 sugli eritrociti produce i sintomi della malattia emoglobinuria parossistica notturna (EPN). CD59 non blocca l'attività litica della perforina causata dalla citotossicità cellulo-mediata. E' improbabile che CD59 venga sintetizzato da tutte le cellule sulle quali è espresso.

Applicazioni CD59 (clone MEM43) può essere applicato in citometria a flusso per analisi di campioni di sangue e di midollo osseo.

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 leucociti per colorazioni singole e 20 µl/10⁶ leucociti in caso di doppie e triple marcature. Se le applicazioni variassero, ogni utilizzatore dovrebbe titolare il reagente per ottenere risultati ottimali.

Dati rappresentativi

La colorazione con CD59 anticorpi monoclonali di normali cellule del sangue è illustrate da analisi di citometria a flusso. La colorazione diretta è stata fatta utilizzando 10 µl di anticorpi coniugati con R-PE e 100 µl di sospensione di cellule rosse del sangue.



Diagnosi di Emoglobinuria Parossistica Notturna (EPN)

Procedura

Eritrociti

-A- Preparazione della sospensione di cellule rosse del sangue

1. Utilizzare 10 ml di sangue intero con Eparina o EDTA e centrifugare 10 min. 600g (partenza e fermo graduati).
2. Collezionare plasma ricco in piastrine (PRP) ed il buffy coat per ulteriori analisi di Leucociti e Piastrine, rispettivamente.
3. Lavare il pellet degli eritrociti tre volte con 2 ml di PBS per 2 min. 1000g.
4. Risospendere 1 volume di eritrociti impaccati 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 le RBC contaminate con PBS fino ad una concentrazione finale di 50×10^6 cellule/ml.

-B- Colorazione di immuno-fluorescenza

7. Determinare la quantità necessaria di provette (controllo negativo (=controllo isotipico), controllo positivo (= es. anti-glicoforina A+B), CD55 e CD59 singoli o doppio marcati).
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 del doppio marcato.
10. Incubare per 30 min. a temperatura ambiente. Evitare la luce diretta.
11. Lavare due volte in 3 ml di PBS e centrifugare per 2 min. 1000g.
12. Risospendere le cellule in PBS (200-500 μ l).

-C- Acquisizione dati in citometria a flusso

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

Leucociti

-A- Preparazione della sospensione cellulare di Leucociti

1. Utilizzare 10 ml di sangue intero in eparina o EDTA e centrifugare 10 min. 600g (partenza e fermo graduati).
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 dei leucociti due volte con 10 ml di PBS per 5 min. 400g.
7. Risospendere il pellet dei 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 in provette trattate con eparina o EDTA .
9. Diluire i Leucociti contaminati con PBS per una concentrazione finale di 20×10^6 cellule/ml.

-B- Colorazione di immuno-fluorescenza

10. Determinare il numero necessario di provette (controllo negativo= controllo isotipico), controllo positivo = es. anti-HLA classe I), CD55 e CD59 singoli o doppio marcati).
11. Aggiungere 100 μ l di Leucociti per ogni provetta (2×10^6 cellule).
12. Aggiungere 10 μ l del marcato singolo (CD55, CD59) o 20 μ l per il doppio marcato.
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 in citometria a flusso

16. Analizzare almeno 20.000 cellule con il citofluorimetro .Utilizzare le regioni basate sui parametri morfologici allo scopo di eliminare i detriti cellulari e il rumore di fondo elettronico e per separare Linfociti, Monociti e Granulociti.

Piastrine

Preparare PBS-EDTA 5 mM pH 7.4 (50 - 75 ml per paziente). Per i migliori risultati si dovrebbero usare 0,45 µm filtrati di PBS-EDTA 5mM . Il PBS-EDTA 5 mM dovrebbe essere fresco (deve essere utilizzato per la settimana lavorativa) e deve essere filtrate prima di ogni esperimento.

-A- Preparazione della sospensione cellulare di Piastrine

1. Utilizzare 10 ml di sangue intero con eparina o EDTA e centrifugare 10 min. 600g (partenza e fermata graduale).
2. Raccogliere il plasma ricco in piastrine (PRP) e diluire in PBS-EDTA 5 mM fino a 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 di 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 immuno-fluorescenza

7. Determinare il numero di provette necessarie (controllo negativo , controllo isotipico, controllo positivo I (CD61), CD55 e CD59 singoli o doppio marcati).
8. Aggiungere 100 µl di Leucociti ad ogni provetta (2×10^6 cellule).
9. Aggiungere 10 µl del marcato singolo (CD55/CD59) o 20 µl del doppio marcato.
10. Incubare per 30 min. a temperature ambiente. Evitare la luce diretta .
11. Lavare due volte in 3 ml 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 in citometria a flusso

13. Per analisi al FACS , utilizzare un regione basata sui parametri morfologici per poter eliminare i detriti cellulari e il rumore di fondo elettronico. Dovrebbero essere collezionati almeno in List mode files 20.000 eventi per parametri logaritmici log FSC, log SSC e log fluorescenze.

Referenze

1. Meri S, Morgan BP, Davies A, Daniels RH, Olavesen MG, Waldmann H, Lachmann PJ: Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. *Immunology*. 1990 Sep;71(1):1-9.
2. Rooney IA, Davies A, Griffiths D, Williams JD, Davies M, Meri S, Lachmann PJ, Morgan BP: The complement-inhibiting protein, protectin (CD59 antigen), is present and functionally active on glomerular epithelial cells. *Clin Exp Immunol*. 1991 Feb;83(2):251-6.
3. Menu E, Tsai BC, Bothwell AL, Sims PJ, Bierer BE: CD59 costimulation of T cell activation. CD58 dependence and requirement for glycosylation. *J Immunol*. 1994 Sep 15;153(6):2444-56.
4. Baalasubramanian S, Harris CL, Donev RM, Mizuno M, Omidvar N, Song WC, Morgan BP: CD59a is the primary regulator of membrane attack complex assembly in the mouse. *J Immunol*. 2004 Sep 15;173(6):3684-92.
5. Horejsi V, Hilgert I, Kristofova H, Bazil V, Bukovsky A, Kulhankova J: Monoclonal antibodies against human leucocyte antigens. I. Antibodies against beta-2-microglobulin, immunoglobulin kappa light chains, HLA-DR-like antigens, T8 antigen, T1 antigen, a monocyte antigen, and a pan-leucocyte antigen. *Folia Biol (Praha)*. 1986;32(1):12-25. (original description of MEM-43 antigen)
6. *Leukocyte Typing IV.*, Knapp W. et al. (Eds.), Oxford University Press (1989).
7. *Leukocyte Typing V.*, Schlossman S. et al. (Eds.), Oxford University Press (1995).
8. Forsberg UH, Bazil V, Stefanova I, Schroder J: Gene for human CD59 (likely Ly-6 homologue) is located on the short arm of chromosome 11. *Immunogenetics*. 1989;30(3):188-93.
9. Stefanova I, Hilgert I, Kristofova H, Brown R, Low MG, Horejsi V: Characterization of a broadly expressed human leucocyte surface antigen MEM-43 anchored in membrane through phosphatidylinositol. *Mol Immunol*. 1989 Feb;26(2):153-61.
10. Stefanova I, Horejsi V, Ansotegui IJ, Knapp W, Stockinger H: GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases. *Science*. 1991 Nov 15;254(5034):1016-9.
11. Cinek T, Horejsi V: The nature of large noncovalent complexes containing glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane glycoproteins and protein tyrosine kinases. *J Immunol*. 1992 Oct 1;149(7):2262-70.
12. Bodian DL, Davis SJ, Morgan BP, Rushmere NK: Mutational analysis of the active site and antibody epitopes of the complement-inhibitory glycoprotein, CD59. *J Exp Med*. 1997 Feb 3;185(3):507-16.
13. Cebecauer M, Cerny J, Horejsi V: Incorporation of leucocyte GPI-anchored proteins and protein tyrosine kinases into lipid-rich membrane domains of COS-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Feb 4;243(3):706-10.
14. Ilangumaran S, Briol A, Hoessli DC: CD44 selectively associates with active Src family protein tyrosine kinases Lck and Fyn in glycosphingolipid-rich plasma membrane domains of human peripheral blood lymphocytes. *Blood*. 1998 May 15;91(10):3901-8.
15. Omidvar N, Wang EC, Brennan P, Longhi MP, Smith RA, Morgan BP: Expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored CD59 on target cells enhances human NK cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol*. 2006 Mar 1;176(5):2915-23.



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 (NaN₃). 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, espresse 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.

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