

**Polyclonal Rabbit
Anti-Human
Lactoferrin/FITC
Code No./ Code/ Code-Nr. F 0395
Edition/ Édition/ Ausgabe 01.08.03**

ENGLISH	
Intended use	For in vitro diagnostic use. F 0395, Polyclonal Rabbit Anti-Human Lactoferrin/FITC, is intended for use in flow cytometry. F 0395 has been optimized for the labelling of intracellular lactoferrin when used in combination with the DakoCytomation IntraStain Fixation and Permeabilization Kit, code No. K 2311. Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a certified professional.
Introduction	Lactoferrin is an 80 kDa cationic iron-binding glycoprotein with a proposed immunoregulatory, bactericidal and bacteriostatic activity (1, 2). Free lactoferrin is present in mammalian secretions, such as milk, tears and sperm (1). In the blood, lactoferrin is present in the secondary granules of neutrophil granulocytes and is rarely demonstrated in monocytes and lymphocytes (3). The expression is restricted among haematopoietic cells to the postmitotic maturation compartment of the granulocytic lineage starting from the myelocyte stage. Normal and malignant myeloblasts and promyelocytes are lactoferrin negative (4). In flow cytometry, antibodies to lactoferrin are useful for the subclassification of acute myeloid leukaemia (AML) (4, 5), as lactoferrin is preferentially present in the more mature myeloid subpopulation.
Reagent provided	F 0395 is the purified immunoglobulin fraction of rabbit antiserum conjugated with fluorescein isothiocyanate isomer 1 (FITC). The conjugate is provided in liquid form in buffer containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 15 mmol/L NaN ₃ , pH 7.2. Each vial contains 100 tests (10 µL of conjugate for up to 10 ⁶ leucocytes from normal human peripheral blood). <u>Immunoglobulin concentration g/L:</u> See label on vial. <u>F/P ratio:</u> E _{495 nm} /E _{278 nm} = 1.00 ± 0.15 corresponding to a molar FITC/protein ratio of 4.
Immunogen	Lactoferrin isolated from human colostrum.
Specificity	The antibody reacts with human lactoferrin. Traces of contaminating antibodies have been removed by liquid-phase absorption with human plasma proteins. The specificity has been ascertained as follows: <u>Crossed immunoelectrophoresis:</u> Only the lactoferrin precipitation arch appears when using 12.5 µL unconjugated antibody per square cm gel area against 2 µL human milk, and no precipitation arch is seen when using 2 µL human plasma. Staining: Coomassie Brilliant Blue. In immunoelectronmicroscopy, the unconjugated antibody labels the secondary granules of neutrophil granulocytes, whereas primary granules, mitochondria, Golgi apparatus and nuclei are negative (6).
Precautions	1. For professional users. 2. This product contains sodium azide (NaN ₃), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing. 3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
Storage	Store in the dark at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. Conjugates should not be stored in diluted form. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact our Technical Services.
Staining procedure	1. Transfer 50 µL (up to 10 ⁶ cells) of the cell suspension to be analysed (whole blood, bone marrow or mononuclear cells) to a test tube. 2. Add 100 µL DakoCytomation IntraStain Reagent A (Fixation), code No. K 2311. Mix gently by using a vortex mixer to ensure that the cells are in suspension. 3. Incubate at room temperature for 15 minutes. 4. Add 2 mL PBS and mix gently by using a vortex mixer. 5. Centrifuge at 300 x g for 5 minutes, then aspirate the supernatant, leaving approximately 50 µL of fluid. 6. Mix thoroughly by using a vortex mixer to ensure that the cells are in suspension and add 100 µL DakoCytomation IntraStain Reagent B (Permeabilization), code No. K 2311. Add 10 µL of F 0395. Mix gently by using a vortex mixer to ensure that the cells are in suspension. 7. Use a non-reactive polyclonal rabbit antibody conjugated with FITC, as a negative control. 8. Incubate in the dark at room temperature for 15 minutes. 9. Repeat steps 4 and 5.

- Resuspend the pellet in an appropriate fluid for flow cytometric analysis, e.g. 0.3 mL 1% paraformaldehyde (fixative) in 0.01 mol/L PBS, pH 7.4.
- Analyse on a flow cytometer.

It is recommended to include a suitable positive and negative control sample with each run for reagent and preparation control. Note that fluorochrome conjugates are light sensitive, and samples should be protected from light during the staining procedure and until the analysis.

FRANÇAIS	
Intérêt	Pour diagnostic in vitro. F 0395, Polyclonal Rabbit Anti-Human Lactoferrin/FITC, est destiné pour un usage en cytométrie en flux. F 0395 a été optimisé pour le marquage de la lactoferrine intracellulaire lorsqu'il est utilisé en combinaison avec Dakocytomation IntraStain Fixation and Permeabilisation Kit, code K 2311. L'interprétation des résultats doit être entreprise par un professionnel certifié, dans le contexte de l'histoire clinique et des autres examens diagnostiques.
Introduction	La lactoferrine est une glycoprotéine de liaison du fer cationique de 80 kDa qui posséderait une activité immunorégulatoire, bactéricide et bactériostatique (1, 2). La lactoferrine libre est présente dans les sécrétions mammaliennes, comme le lait, les larmes et le sperme (1). Dans le sang, la lactoferrine est présente dans les granules secondaires des granulocytes neutrophiles et est rarement mise en évidence dans les monocytes et les lymphocytes (3). Son expression est restreinte au sein des cellules hématopoïétiques jusqu'aux compartiments de maturation post-mitotique de la lignée granulocytaire en commençant par le stade myélocyte. Les myéloblastes normaux et malins et les promyélocytes sont négatifs pour la lactoferrine (4). En cytométrie en flux, les anticorps dirigés contre la lactoferrine sont utiles pour la sous-classification des leucémies myéloïdes aiguës (AML) (4, 5), puisque la lactoferrine est présente de préférence dans une sous-population myéloïde plus mature.
Réactif fourni	F 0395 est la fraction de l'immunoglobuline de l'antisérum de lapin purifiée, conjuguée à l'isomère 1 de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Le conjugué est fourni à l'état liquide dans un tampon contenant 1% d'albumine sérique bovine (BSA) et du NaN ₃ à 15 mmol/L, pH 7,2. Chaque flacon contient 100 tests (10 µL de conjugué pouvant traiter jusqu'à 10 ⁶ de leucocytes provenant de sang périphérique normal humain). <u>Concentration en immunoglobuline g/L:</u> Voir l'étiquette sur le flacon. <u>Rapport F/P:</u> E _{495 nm} /E _{278 nm} = 1,00 ± 0,15 correspondant à un rapport molaire FITC/protéine de 4.
Immunogène	Lactoferrine isolée à partir de colostrum humain.
Spécificité	L'anticorps montre une réaction à la lactoferrine humaine. Les traces d'anticorps contaminants ont été éliminées par absorption en phase liquide avec les protéines de plasma humain. La spécificité a été déterminée de la manière décrite ci-dessous. <u>Immuno-électrophorèse croisée:</u> Seul l'arc de précipitation de la lactoferrine apparaît lorsqu'on utilise 12,5 µL d'anticorps conjugué par cm ² de surface de gel contre 2 µL de lait humain, par contre aucun arc de précipitation n'a été observé lors de l'utilisation de 2 µL de plasma humain. Marquage: Bleu de Coomassie. En microscopie électronique, l'anticorps non-conjugué marque les granules secondaires des granulocytes neutrophiles, alors que les granules primaires, les mitochondries, l'appareil de Golgi et les noyaux sont négatifs (6).
Précautions d'emploi	1. Pour utilisateurs professionnels. 2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN ₃), un produit chimique hautement toxique sous forme pure. Aux concentrations du produit, bien qu'il ne soit pas classé comme étant nuisible, l'azide de sodium peut réagir avec la tuyauterie en plomb et en cuivre pour former des dépôts hautement explosifs d'azides métallisé. Lors de l'élimination du produit, laisser couler l'eau à grand flot pour éviter toute accumulation d'azide métallisé dans la tuyauterie. 3. Comme pour tout dérivé biologique dangereux à manipuler, une précision s'impose.
Conservation	Conservez à l'obscurité entre 2° et 8°C. Ne pas utiliser après la date de péremption mentionnée sur le flacon. Si les réactifs ont été conservés dans d'autres conditions que celles spécifiées, ces conditions doivent être vérifiées par l'utilisateur. Il n'existe pas de signe particulier pour indiquer l'instabilité de ce produit. Par conséquent, les contrôles doivent être opérés simultanément avec les échantillons du patient. Les conjugués ne doivent pas être stockés à l'état dilué. En cas de résultats imprévus qui ne peuvent pas être expliqués par des changements de procédures de laboratoire et qu'un problème avec le produit est suspecté, contactez nos Services Techniques.
Procédure d'immunomarquage	1. Transférez 50 µL (jusqu'à 10 ⁶ de cellules) de la suspension cellulaire afin de les analyser (sang total, de la moelle osseuse ou cellules mononucléaires) dans un tube à essai. 2. Ajoutez 100 µL de Dakocytomation IntraStain Reagent A (Fixation), code K 2311. Mélangez doucement à l'aide d'un mélangeur vortex pour s'assurer que toutes les cellules sont en suspension. 3. Incubez à température ambiante pendant 15 minutes. 4. Ajoutez 2 mL de PBS et agitez doucement à l'aide d'un mélangeur vortex. 5. Centrifugez à 300 g pendant 5 minutes, puis aspirez le surnageant et conservez environ 50 µL de liquide. 6. Mélangez soigneusement à l'aide d'un mélangeur vortex pour s'assurer que les cellules sont en suspension et ajoutez 100 µL de Dakocytomation IntraStain Reagent B (Permeabilisation), code K 2311. Ajoutez 10 µL de F 0395. Mélangez doucement à l'aide d'un mélangeur vortex pour s'assurer que les cellules sont en suspension. 7. Utilisez un anticorps polyclonal de lapin non-réactif conjugué avec FITC, comme contrôle négatif. 8. Laissez incuber à l'obscurité, à température ambiante, pendant 15 minutes.

- Recommencez les étapes 4 et 5.
- Remettez le culot cellulaire in suspension dans un liquide adapté à la cytométrie en flux, par exemple 0,3 mL de paraformaldéhyde 1 % (fixateur) dans du PBS 0,01 mol/L, à 7,4 de pH.
- Analysez sur un cytomètre en flux.

Il est conseillé d'inclure un échantillon de contrôle positif et négatif appropriés à chacun des essais pour le contrôle du réactif et de la préparation. Remarquez que les conjugués à un fluorochrome sont sensibles à la lumière, les échantillons doivent donc être protégés de cette dernière au cours de la procédure de marquage et jusqu'à l'analyse.

DEUTSCH

Zweckbestimmung Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.
F 0395, Polyclonal Rabbit Anti-Human Lactoferrin/FITC ist für den durchflusszytometrischen Gebrauch bestimmt. F 0395 wurde für die Markierung des intrazellulären Lactoferrins beim kombinierten Gebrauch mit dem DakoCytomation IntraStain Fixation and Permeabilization Kit, Code Nr. K 2311, optimiert. Die Befunde müssen unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren von einem zertifizierten Facharzt interpretiert werden.

Einleitung Lactoferrin ist ein 80 kD schweres kationisches eisenbindendes Glykoprotein und es wird ihm eine immunregulatorische, bakterizide und bakteriostatische Aktivität zugesprochen (1, 2). Freies Lactoferrin kommt in den Ausscheidungsflüssigkeiten der Säugetiere, wie Milch, Tränen und Sperma, vor (1). Im Blut findet sich Lactoferrin in den sekundären Granula der neutrophilen Granulozyten und wird selten in Monozyten und Lymphozyten nachgewiesen (3). Die Expression auf hämatopoetischen Zellen ist auf den postmitotischen Anteil der Granulozytenzelllinienreife beschränkt, von dem Myelozytenstadium angefangen. Normale und maligne Myeloblasten und Promyelozyten sind auf Lactoferrin negativ (4). In der Durchflusszytometrie sind Antikörper gegen Lactoferrin bei der Subklassifikation der akuten myeloischen Leukämien (AML) (4, 5) nützlich, weil Lactoferrin vorzugsweise in den reiferen myeloiden Subpopulationen auftritt.

Delivered Reagent Bei F 0395 handelt es sich um die gereinigte Immunglobulinfraktion des an Fluorescein-Isothiocyanat Isomer 1 (FITC) konjugierten Kaninchenantisera. Das Konjugat wird in einer gepufferten Lösung mit 1 % bovinem Serumalbumin (BSA) und 15 mmol/L Na₂S₂O₃, pH 7,2, geliefert. Jedes Fläschchen ist für 100 Tests ausreichend (10 µL des Konjugats sind für bis 10⁶ Leukozyten aus normalem, menschlichem peripherem Blut ausreichend).

Immunglobulin-Konzentration g/L: Siehe Produktetikett.

F/P-Quotient: E_{495 nm}/E_{278 nm} = 1,00 ± 0,15 entsprechend einem molaren FITC/Protein-Quotienten von 4.

Immunogen Lactoferrin, aus humanem Kolostrum isoliert.

Spezifität Der Antikörper reagiert mit humanem Lactoferrin. Durch die Absorption in der flüssigen Phase mit humanen Plasmaproteinen wurden Spuren verunreinigender Antikörper entfernt.
Die Spezifität wurde auf folgende Art und Weise gesichert:

Kreuzimmunelektrophorese: Lediglich der Lactoferrin-Präzipitationsbogen erscheint beim Gebrauch von 12,5 µL nicht konjugierten Antikörpers per 1 cm² Gelfläche gegen 2 µL humaner Milch, während kein Präzipitationsbogen kann beim Gebrauch von 2 µL humanen Plasmas festgestellt werden. Anfärben: Coomassie-Brillantblau.

In der Immunelektronmikroskopie markiert der Antikörper die sekundären Granula der neutrophilen Granulozyten, während primäre Granula, Mitochondrien, Golgi-Apparat und Zellkerne negativ bleiben.

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen 1. Für geschultes Fachpersonal.

2. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN₃), eine in reiner Form hochtoxische chemische Verbindung. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann Natriumazid, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Abflussinstallationen vorhandenem Blei und Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metall-Azid-Anreicherungen führen. Nach der Entsorgung muss mit reichlich Wasser nachgespült werden, um Metall-Azid-Anreicherung in Abflussrohren zu vermeiden.

3. Wie bei allen aus biologischen Quellen stammenden Produkten müssen die ordnungsgemäßen Handhabungsverfahren eingehalten werden.

Lagerung Im Dunkeln bei 2 – 8 °C lagern. Nicht nach dem auf dem Produkt angegebenen Verfallsdatum verwenden. Falls die Reagenzien unter anderen Bedingungen als den beschriebenen aufbewahrt werden, so müssen diese vom Anwender verifiziert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anhaltspunkte für die mögliche Instabilität dieses Produktes. Es sollten daher die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientenproben mitgeführt werden.

Konjugate sollten nicht in verdünnter Form gelagert werden. Wenn unerwartete Verfärbung beobachtet wird, welche durch Änderungen in den Labormethoden nicht erklärt werden kann und falls Verdacht auf ein Problem mit dem Antikörper besteht, ist Kontakt mit unserem Technischen Kundendienst aufzunehmen.

- Färbeprozedur**
- 50 µL (bis 10⁶ Zellen) aus der zu untersuchenden Zellsuspension (Vollblut, Knochenmark oder mononukleäre Zellen) in ein Probenröhrchen geben.
 - 100 µL DakoCytomation IntraStain, Reagent A (Fixation), Code-Nr. K 2311, hinzugeben. Sanft in einem Vortex-Mixer mischen, um sicher zu gehen, dass die Zellen suspendiert sind.
 - 15 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren.
 - 2 mL PBS zufügen und vorsichtig im Vortex-Mixer mischen.
 - 5 Minuten lang bei 300 x g zentrifugieren, dann den Überstand aspirieren, so dass ungefähr 50 µL Flüssigkeit zurückbleiben.









- Gut in einem Vortex-Mixer mischen, um sicher zu gehen, dass die Zellen suspendiert sind und 100 µL DakoCytomation IntraStain Reagent B (Permeabilization), Code Nr. K 2311, zugeben. 10 µL F 0395 zugeben. Sanft in einem Vortex-Mixer mischen, um sicher zu gehen, dass die Zellen suspendiert sind.
- Als Negativkontrolle ist ein nicht reaktiver polyklonaler an FITC konjugierter Kaninchen-Antikörper einzusetzen.
- Im Dunkeln bei Raumtemperatur 15 Minuten lang inkubieren.
- Schritte 4 und 5 wiederholen.
- Das Zellpellet in einer für Durchflusszytometrie geeigneten Flüssigkeit, z. B. 0,3 mL 1%igem Paraformaldehyd (Fixativ) in 0,01 mol/L PBS, pH 7,4, resuspendieren.
- Im Durchflusszytometer analysieren.

Es wird empfohlen, eine geeignete Positiv- und Negativkontrolle für jede Durchführung der Reagenz- und Präparationsprüfung mitzuführen. Es ist zu beachten, dass Fluorochromkonjugate lichtempfindlich sind und dass die Proben während der Färbeprozedur und bis zur Durchführung der Analyse vor Licht geschützt werden müssen.

References/ Références/ Literatur

- Német K, Simonovits I. The biological role of lactoferrin. Haematologia 1985;18:3-12.
- Brock J. Lactoferrin: a multifunctional immunoregulatory protein? Immunol Today 1995;16:417-9
- Butler TW, Heck LW, Huster WJ, Grossi CE, Barton JC. Assessment of total immunoreactive lactoferrin in hematopoietic cells using flow cytometry. J Immunol Methods 1988;108:159-70.
- Knapp W, Strobl H, Majdic O. Flow cytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in leukemia diagnosis. Cytometry 1994;18:187-98.
- Koniková E, Glasová M, Kusenda J, Babušíková O. Intracellular markers in acute myeloid leukemia diagnosis. Neoplasma 1998;45:282-91.
- Esaguy N, Águas AP, Silva MT. High-resolution localization of lactoferrin in human neutrophils: labeling of secondary granules and cell heterogeneity. J Leukoc Biol 1989;46:51-62.

Explanation of symbols/ Légende des symboles/ Erläuterung der Symbole

 Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	 Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	 Use by Utiliser jusque Verwendbar bis
 In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-Vitro-Diagnostikum	 Keep away from sunlight (consult storage section) Conserver à l'écart du soleil (se reporter à la section conservation) Lichtgeschützt lagern (siehe Abschnitt zur Lagerung)	 Manufacturer Fabricant Hersteller
 Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	 Batch code Code du Lot Chargenbezeichnung	