

**Monoclonal Mouse
Anti-Human CD68/FITC**

Clone KP1

Code No./ Code/ Code-Nr. F 7135
ENGLISH

Intended use For in vitro diagnostic use.
F 7135 is intended for use in flow cytometry. Anti-CD68, Clone KP1, is a monocytes/macrophage associated antigen and can be used, together with a panel of other antibodies, to discriminate cells of lymphoid and monocytes/macrophage origin (1, 2). Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a certified professional.

Synonyms for antigen Macrosialin, gp110 (8).

Introduction CD68 is a 110 kDa highly glycosylated lysosomal membrane protein. The CD68 protein belongs to a family of lysosomal glycoproteins/plasma membrane shuttling proteins that play a role in endocytosis and/or lysosomal trafficking (3, 7). Unlike many other CD leucocyte antigens, the CD68 molecule is antigenically very heterogeneous, and different antibodies to CD68 show different cellular reactivities (4).

CD68 is expressed strongly in cytoplasmic granules, and weakly on the surface of macrophages, monocytes, neutrophils, basophils and NK-cells (3). CD68 is also found in neoplastic cells of myeloid background. Additionally, CD68 is expressed by approximately 40% of peripheral blood B cells and is weakly expressed in 50% of B cell type acute lymphoblastic leukaemia cells (3). CD68 can also be found in the cytoplasm of non-haematopoietic tissues, especially the liver, glomeruli and renal tubules (3).

Reagent provided The Anti-CD68 conjugate, F 7135, has been produced from a purified monoclonal mouse antibody. The conjugate is provided in liquid form in buffer containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 15 mmol/L NaN₃, pH 7.2. Each vial contains 100 tests (10 µL of conjugate for up to 10⁶ leucocytes from normal human peripheral blood).

Isotype: IgG1, kappa. Conjugate concentration mg/L: See label on vial.

Antibody Code No.	Fluorochrome	Negative Control Code No.
F 7135	FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1)	X 0927

Immunogen Lysosomal fraction of human lung macrophages (6).

Specificity Anti-CD68, KP1, was clustered as anti-CD68 at the Fourth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens held in Vienna in 1989 (7).

Anti-CD68, KP1, labels the cytoplasm in type M1-M5 AML, giving a strong granular staining (1, 4).

Mast cells, both normal and neoplastic, and 1/1 true histiocytic neoplasia, were labelled by the antibody (2, 5).

Precautions

1. For professional users.
2. This product contains sodium azide (NaN₃), 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. 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 10⁶ cells) of the cell suspension to be analysed (whole blood, bone marrow or mononuclear cells) to each test tube.
2. Add 100 µL Dako IntraStain, Reagent A (Fixation), code no. K 2311. Mix gently by using a vortex mixer to ensure that 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 cells are in suspension and add 100 µL Dako IntraStain, Reagent B (Permeabilisation), code no. K 2311. Add 10 µL F 7135. Mix gently by using a vortex mixer to ensure that the cells are in suspension.
7. Use a non-reactive monoclonal antibody of the same isotype, and conjugated with the same fluorochrome, as a negative control (see table).
8. Incubate in the dark at room temperature for 15 minutes.
9. Repeat steps 4 and 5.

10. Resuspend the cells in an appropriate fluid for flow cytometry, e.g. 0.3 mL 1% paraformaldehyde (fixative) in 0.01 mol/L PBS, pH 7.4.
11. 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	<p>Pour diagnostic in vitro.</p> <p>F 7135 est destiné pour un usage en cytométrie en flux. Anti-CD68, Clone KP1, est antigène associé aux monocytes/macrophage et peut être utilisé en association avec un panel de d'autres anticorps pour distinguer les cellules d'origine lymphoïdes et de monocytes/macrophage (1, 2). L'interprétation des résultats doit être entreprise par un professionnel certifié dans le contexte de l'historique clinique du patient et des autres examens diagnostics.</p>						
Synonymes de l'antigène	Macrosialin, gp110 (8).						
Introduction	<p>CD68 est une protéine membranaire lysosomiale fortement glycosylée 110 kDa. La protéine CD68 appartient à une famille de glycoprotéines lysosomiales/protéines à mouvements alternatifs de la membrane plasmique qui jouent un rôle dans l'endocytose et/ou la circulation lysosomiale (3, 7). Contrairement à beaucoup d'autres antigènes leucocytaires CD, la molécule CD68 est antigéniquement très hétérogène, et les anticorps différents à CD68 révèlent des réactivités cellulaires différentes (4).</p> <p>CD68 est fortement exprimée dans les granules cytoplasmiques, et faiblement exprimée sur la surface des macrophages, des monocytes, des neutrophiles, des basophiles et des cellules NK (3). CD68 est aussi mis en évidence dans les cellules néoplasiques d'origine myéloïde. De plus, CD68 est exprimée par approximativement 40% des cellules B du sang périphérique et est faiblement exprimée dans 50% du type cellulaire B des cellules leucémiques lymphoblastiques aiguës (3). CD68 est aussi mis en évidence dans le cytoplasme des tissus non-hématopoïétiques, spécialement du foie, des glomérules et des tubules rénaux (3).</p>						
Réactif fourni	<p>Le conjugué Anti-CD68, F 7135, a été produit à partir d'un anticorps monoclonal purifié de la souris. Le conjugué est fourni à l'état liquide en tampon contenant 1% d'albumine de sérum bovin (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)</p> <p><u>Isotype:</u> IgG1, kappa. <u>Concentration du conjugué mg/L:</u> Voir l'étiquette sur le flacon de l'échantillon.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">Code de l'anticorps</th> <th style="text-align: center;">Fluorochrome</th> <th style="text-align: center;">Code du contrôle négatif</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">F 7135</td> <td style="text-align: center;">FITC (Isomère 1 d'isothiocyanate de fluorescéine)</td> <td style="text-align: center;">X 0927</td> </tr> </tbody> </table>	Code de l'anticorps	Fluorochrome	Code du contrôle négatif	F 7135	FITC (Isomère 1 d'isothiocyanate de fluorescéine)	X 0927
Code de l'anticorps	Fluorochrome	Code du contrôle négatif					
F 7135	FITC (Isomère 1 d'isothiocyanate de fluorescéine)	X 0927					
Immunogène	Fraction lysosomiale des macrophages pulmonaires humains (6).						
Spécificité	<p>Anti-CD68, KP1, était classé comme anti-CD68 durant la Fourth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens ayant eu lieu à Vienne en 1989 (7).</p> <p>Anti-CD68, KP1, marque le cytoplasme en type M1-M5 AML, produisant un marquage fort granulaire (1, 4).</p> <p>Les mastocytes normales aussi bien que néoplasiques, et 1/1 de néoplasie histiocytique authentique, étaient marqués par l'anticorps (2, 5).</p>						
Précautions d'emploi	<ol style="list-style-type: none"> 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 métallisés. Lors de l'élimination du produit, laisser couler l'eau à flot pour éviter toute accumulation d'azides métallisés dans la tuyauterie. 3. Comme pour tout dérivé biologique dangereux à manipuler, une précision s'impose. 						
Conservation	<p>Conserver 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. 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.</p>						
Procédure d'immunomarquage	<ol style="list-style-type: none"> 1. Transférer 50 μL (un maximum de 10^6 cellules) de la suspension cellulaire pour analyse (sang entier, moelle osseuse ou cellules mononucléaires) à chaque tube à essai. 2. Ajouter 100 μL Dako IntraStain, Reagent A (Fixation), code K 2311. Mélanger soigneusement en utilisant un mélangeur vortex afin d'assurer que les cellules sont en suspension. 3. Incuber à température ambiante pendant 15 minutes. 4. Ajouter 2 mL PBS et mélanger soigneusement à l'aide d'un mélangeur vortex. 5. Centrifuger à 300 x g pendant 5 minutes, puis aspirer le surnageant, laissant approximativement 50 μL de fluide. 6. Bien mélanger à l'aide d'un mélangeur vortex afin d'assurer que les cellules sont en suspension et ajouter 100 μL Dako IntraStain, Reagent B (Perméabilisation), code K 2311. Ajouter 10 μL F 7135. Mélanger soigneusement à l'aide d'un mélangeur vortex afin d'assurer que les cellules sont en suspension. 						

7. Utiliser un anticorps monoclonal non-réactif du même isotype, conjugué au même fluorochrome, en tant que contrôle négatif (voir tableau).
8. Laisser incuber à l'obscurité, à température ambiante, pendant 15 minutes.
9. Recommencer les étapes 4 et 5.
10. Re-suspendre les cellules dans un liquide adapté à la cytométrie en flux, par exemple 0,3 ml de paraformaldéhyde à 1 % (fixateur) dans du PBS 0,01 mol/l, à 7,4 de pH.
11. Analyser sur un cytomètre en flux.

Il est recommandé d'inclure un échantillon de contrôle positif et négatif appropriés à chacune des exécutions pour le contrôle du réactif et de la préparation. Noter que les conjugués fluorochromes sont sensibles à la lumière, et les échantillons doivent être protégés de cette dernière au cours de la procédure d'immunomarquage et jusqu'à l'analyse.

DEUTSCH

Zweckbestimmung	Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen. F 7135 ist für den durchflusszytometrischen Gebrauch bestimmt. Anti-CD68, Klon KP1, ist ein mit Monozyten/Makrophagen assoziiertes Antigen und kann zusammen mit einem Panel weiterer Antikörper dazu verwendet werden, Zellen mit lymphoider und Monozyten-/Makrophagenabstammung zu unterscheiden (1, 2). Die Befunde müssen unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren von einem zertifizierten Facharzt interpretiert werden.						
Synonyme Bezeichnungen des Antigens	Macrosialin, gp110 (8).						
Einleitung	CD68 ist ein stark glykosyliertes, lysosomales Membranprotein mit 110 kDa. Das CD68-Protein gehört zu einer Familie von lysosomalen Glykoproteinen/Plasmamembran-Shuttleproteinen, die bei der Endozytose und/oder dem lysosomalen „Trafficking“ eine Rolle spielen (3, 7). Im Gegensatz zu vielen anderen CD-Leukozytenantigenen ist das CD68-Molekül hinsichtlich seiner Antigeneigenschaften sehr heterogen, und verschiedene CD68-Antikörper zeigen unterschiedliche zelluläre Reaktivitäten (4). CD68 wird stark auf zytoplasmischen Granula und schwach auf der Oberfläche von Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen, Basophilen und NK-Zellen exprimiert (3). CD68 findet sich auch in neoplastischen Zellen myeloider Herkunft. Außerdem wird CD68 von ungefähr 40% der peripheren Blut-B-Zellen exprimiert und liegt schwach bei 50% der akuten lymphoblastischen Leukämiezellen des B-Zellen-Typs vor (3). CD68 wurde auch im Zytoplasma von nicht hämatopoetischen Geweben, insbesondere in der Leber, den Glomeruli und Nierentubuli festgestellt (3).						
Geliefertes Reagenz	Das Anti-CD68-Konjugat F 7135 stammt von einem gereinigten monoklonalen Maus-Antikörper. Das Konjugat wird in einer gepufferten Lösung mit 1% bovinem Serumalbumin (BSA) und 15 mmol/L NaN ₃ , pH 7,2, geliefert. Jedes Fläschchen ist ausreichend für 100 Tests (10 µL des Konjugats sind für bis 10 ⁶ Leukozyten aus normalem, menschlichem peripheren Blut ausreichend). <u>Isotyp:</u> IgG1, Kappa. <u>Konjugat-Konzentration mg/L:</u> Siehe Produktetikett.						
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Antikörper Code-Nr.</th> <th>Fluorochrom</th> <th>Negativkontrolle Code- Nr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>F 7135</td> <td>FITC (Fluoresceinisothiocyanat-Isomer 1)</td> <td>X 0927</td> </tr> </tbody> </table>	Antikörper Code-Nr.	Fluorochrom	Negativkontrolle Code- Nr.	F 7135	FITC (Fluoresceinisothiocyanat-Isomer 1)	X 0927
Antikörper Code-Nr.	Fluorochrom	Negativkontrolle Code- Nr.					
F 7135	FITC (Fluoresceinisothiocyanat-Isomer 1)	X 0927					
Immunogen	Lysosomale Fraktion menschlicher Lungenmakrophagen (6).						
Spezifität	Anti-CD68, KP1, wurde im Kontext des „Fourth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens“ (Wien, 1989) als Anti-CD68 eingestuft (7). Anti-CD68, KP1, markiert das Zytoplasma beim Typ M1-M5 AML mit einer starken granulären Färbung (1, 4). Sowohl normale und neoplastische Mastzellen als auch 1/1 Fällen von echter histiozytärer Neoplasie wurden von dem Antikörper markiert (2, 5).						
Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	1. Für geschultes Fachpersonal. 2. Dieses Produkt enthält Natrium-Azid (NaN ₃), eine in reiner Form hochtoxische chemische Verbindung. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann Natrium-Azid, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Wasserleitungen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metall-Azid-Anreicherungen führen. Nach der Entsorgung muss mit reichlich Wasser nachgespült werden, um Metall-Azid-Anreicherung zu vermeiden. 3. Wie bei allen aus biologischen Materialien gewonnenen 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. 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 bitte Kontakt mit unserem technischen Kundendienst aufzunehmen.						
Färbeprozedur	<ol style="list-style-type: none"> 1. 50 µL (bis 10⁶ Zellen) aus der zu untersuchenden Zellsuspension (Vollblut, Knochenmark oder mononukleäre Zellen) in jedes Probenröhrchen geben. 2. 100 µL Dako IntraStain, Reagenz A (Fixation), Code-Nr. K 2311, hinzugeben. 3. 15 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren. 						










4. 2 mL PBS zufügen und vorsichtig im Vortex-Mixer mischen.
5. 5 Minuten lang bei 300 x g zentrifugieren, dann den Überstand aspirieren, so dass ungefähr 50 µL zurückbleiben.
6. Mit einem Vortexmixer gründlich mischen, um sicherzustellen, dass alle Zellen suspendiert sind, und 100 µL Dako IntraStain, Reagens B (Permeabilisation), Code-Nr. K 2311, hinzugeben. 10 µL F 7135 zusetzen. Vorsichtig in einem Vortex-Mixer mischen, um sicherzustellen, dass die Zellen suspendiert sind.
7. Als Negativkontrolle einen nicht reaktiven, monoklonalen Antikörper des gleichen Isotyps, konjugiert an dasselbe Fluorochrom, verwenden (s. Tabelle).
8. Im Dunkeln bei Raumtemperatur 15 Minuten lang inkubieren.
9. Schritte 4 und 5 wiederholen.
10. Die Zellen in einer für Durchflusszytometrie geeigneten Flüssigkeit, z. B. 0,3 mL 1% Paraformaldehyd (Fixativ) in 0,01 mol/L PBS, pH 7,4, resuspendieren.
11. 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

1. Horny H-P, Wehrmann M, Steinke B, Kaiserling E. Assessment of the value of immunohistochemistry in the subtyping of acute leukemia on routinely processed bone marrow biopsy specimens with particular reference to macrophage-associated antibodies. *Hum Pathol* 1994;25:810-4.
2. Warnke RA, Pulford KAF, Pallesen G, Ralfkiaer E, Brown DC, Gatter KC, et al. Diagnosis of myelomonocytic and macrophage neoplasms in routinely processed tissue biopsies with monoclonal antibody KP1. *Am J Pathol* 1989;135:1089-95.
3. Goyert SM. MC12. CD68 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editors. Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference; 1996 Nov 10-14; Kobe, Japan. New York, London: Garland Publishing Inc; 1997. p. 1015-6.
4. Falini B, Flenghi L, Pileri S, Gambacorta M, Bigerna B, Durkop H, et al. PG-M1: a new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant epitope on the macrophage-restricted form of the CD68 molecule. *Am J Pathol* 1993;142:1359-72.
5. Horny H-P, Schaumburg-Lever G, Bolz S, Geerts ML, Kaiserling E. Use of monoclonal antibody KP1 for identifying normal and neoplastic human mast cells. *J Clin Pathol* 1990;43:719-22.
6. Pulford KAF, Rigney EM, Micklem KJ, Jones M, Stross WP, Gatter KC, et al. KP1: a new monoclonal antibody that detects a monocyte/macrophage associated antigen in routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* 1989;42:414-21.
7. Micklem K, Cordell J, Rigney E, Simmons D, Pulford K, Stross P, et al. M13.1. A macrophage-associated antigen defined by five mAB. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, et al., editors. Leucocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference; 1989 Feb 21-25; Vienna, Austria. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1989. p. 843-6.
8. Goyert SM. CD Guide. CD68. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editors. Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference; 1996 Nov 10-14; Kobe, Japan. New York, London: Garland Publishing Inc.; 1997. p. 1166.

Explanation of symbols / Explication des symboles / Erläuterung der Symbole

 Catalogue number Référence du catalogue Katalognummer	 Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	 Use by Utiliser avant Verwendbar bis
 In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum	 Contains sufficient for <n> tests Contenu suffisant pour <n> tests Inhalt ausreichend für <n> Tests	 Manufacturer Fabricant Hersteller
 Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	 Batch code Réf. du lot Chargenbezeichnung	 Authorized representative in the European Community Représentant agréé dans la Communauté européenne Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft



Agilent Technologies Singapore (International) Pte Ltd.
No. 1 Yishun Avenue 7
Singapore, 768923
Tel. +44 161 492 7050
www.agilent.com