

ENGLISH

Intended use For in vitro diagnostic use.
 F0801 and R0811 are intended for use in flow cytometry. The antibody labels CD25-expressing leucocyte subtypes (1, 2). Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Synonyms for antigen Interleukin-2 receptor (IL-2R), interleukin-2 receptor α chain, Tac antigen (3, 4, 5).

Summary and explanation The interleukin-2 receptors consist of three polypeptides (α , β , γ), which in different combinations bind IL-2 (1). The 55 kDa α chain is called CD25 (5). The α chain alone, the $\beta\gamma$ heterodimer, and the $\alpha\beta\gamma$ heterotrimer form the low-, intermediate- and high affinity IL-2R, respectively. The intermediate- and high affinity IL-2R play a role in intracellular signal transduction (3).

CD25 is strongly expressed on the surface of T cells activated by antigens, mitogens (phytohemagglutinin (PHA), concanavalin A (Con-A), pokeweed mitogen (PWM)), *Staphylococcus aureus*, viruses (HTLV-I, HTLV-II, Epstein-Barr virus) (6, 7), and is also expressed on B cells stimulated with anti-IgM and on monocytes/macrophages stimulated with lipopolysaccharide (2). In normal peripheral blood a variable staining of T lymphocytes is observed (8).

Reagent provided The Anti-CD25 conjugates, F0801 and R0811, have been produced from a purified monoclonal mouse antibody. The conjugates are provided in liquid form in buffer containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 15 mmol/L NaN₃, pH 7.2. Each vial contains conjugate for 100 tests (10 μ L of conjugate for up to 10⁶ cells).

Isotype: IgG1, kappa. Conjugate concentration: see label on vial.

Table 1

Antibody Code	Fluorochrome	Negative Control Code
F0801	FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1)	X0927
R0811	RPE (R-Phycoerythrin)	X0928

Immunogen Phytohemagglutinin-stimulated peripheral blood lymphocytes.

Specificity The specificity of Anti-CD25, ACT-1, is identical to that of CD25-clustered antibodies as indicated by analysis of immunoprecipitates and the immunohistochemical labeling pattern (1, 9).

- Precautions**
1. For in vitro diagnostic use.
 2. For professional users.
 3. 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.
 4. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
 5. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
 6. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

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 Dako Technical Support.

- Staining procedure**
1. Collect venous blood into a test tube containing an anticoagulant.
 2. Isolate mononuclear cells by centrifugation on a separation medium. Alternatively, lyse the red cells after step 6.
 3. Wash the mononuclear cells twice with RPMI 1640 or PBS, pH 7.2-7.4.
 4. Mix 100 μ L cell suspension with 10 μ L fluorochrome-conjugated Anti-CD25.
 5. Use a non-reactive monoclonal antibody of the same isotype, and conjugated with the same fluorochrome as a negative control (see table 1).
 6. Incubate in the dark at 4 °C for 30 minutes.
 7. Wash twice with PBS containing 2% BSA. 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.
 8. 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.

Utilisation prévue Pour une utilisation diagnostique in vitro.
F0801 et R0811 sont destinés à être utilisés en cytométrie de flux. L'anticorps marque les sous-types de leucocytes exprimant la protéine CD25 (1, 2). L'interprétation des résultats doit être réalisée par un pathologiste qualifié et tenir compte des antécédents cliniques du patient et des autres tests diagnostiques.

Synonymes de l'antigène Récepteur de l'interleukine 2 (IL-2R), chaîne α du récepteur de l'interleukine 2, antigène Tac (3, 4, 5).

Résumé et explication Les récepteurs de l'interleukine 2 se composent de trois polypeptides (α , β , γ), qui se lient à l'IL-2 dans différentes combinaisons (1). La chaîne α de 55 kDa est appelée CD25 (5). La chaîne α seule, l'hétérodimère $\beta\gamma$ et l'hétérotrimère $\alpha\beta\gamma$ forment une affinité IL-2R respectivement faible, moyenne et élevée. Les affinités IL-2R intermédiaires et élevées jouent un rôle dans la transduction du signal intracellulaire (3).

La protéine CD25 est fortement exprimée à la surface des lymphocytes T activés par les antigènes, mitogènes (phytohémagglutinine (PHA), concanavaleine A (Con-A), mitogène de la phytolaque (PWM)), *Staphylococcus aureus*, virus (HTLV-I, HTLV-II, virus d'Epstein-Barr) (6, 7) ; elle est également exprimée sur les lymphocytes B stimulés par les anti-IgM ainsi que sur les monocytes/macrophages stimulés par les lipopolysaccharides (2). Dans le sang périphérique normal, on observe une coloration variable des lymphocytes T (8).

Réactifs fournis Les conjugués anti-CD25, F0801 et R0811 ont été préparés à partir d'un anticorps monoclonal de souris purifié. Les conjugués sont fournis sous forme liquide dans un tampon contenant 1% d'albumine de sérum bovin (BSA) et 15 mmol/l d'azide de sodium (NaN_3) d'un pH de 7,2. Chaque flacon contient du conjugué pour 100 tests (10 μL de conjugué pour un maximum de 10^6 cellules).

Isotype : IgG1, kappa. Concentration des conjugués : Voir l'étiquette sur le flacon.

Tableau 1

Code de l'anticorps	Fluorochrome	Code de contrôle négatif
F0801	FITC (Isomère 1 de l'isothiocyanate de fluorescéine)	X0927
R0811	RPE (R-Phycoérythrine)	X0928

Immunogène Lymphocytes du sang périphérique stimulés par phytohémagglutinine.

Spécificité La spécificité de l'anti-CD25, ACT-1, est identique à celle des anticorps anti-CD25 groupés, comme indiqué par l'analyse des précipités immunologiques et par le profil de marquage immunohistochimique (1, 9).

Précautions d'emploi

1. Pour utilisation diagnostique in vitro.
2. Pour utilisateurs professionnels.
3. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN_3), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosives. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
4. Comme avec tout produit d'origine biologique, respecter les procédures de manipulation appropriées.
5. Porter un équipement de protection individuelle approprié pour éviter tout contact avec les yeux et la peau.
6. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales, nationales et européennes.

Conservation Conserver dans l'obscurité entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'existe pas de signe particulier pour indiquer l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par des différences dans les procédures du laboratoire et qu'un problème lié à l'anticorps est suspecté, contacter l'assistance technique de Dako.

Procédure de coloration

1. Prélever le sang veineux dans un tube à essai contenant un anticoagulant.
2. Isoler les cellules mononucléées par centrifugation sur un support séparé. Il est aussi possible de lyser les globules rouges après l'étape 6.
3. Laver les cellules mononucléées à l'aide de RPMI 1640 ou d'une solution saline de tampon phosphate (PBS), d'un pH de 7,2-7,4.
4. Mélanger 100 μL de suspension cellulaire avec 10 μL d'anti-CD25 conjugué à du fluorochrome.
5. Utiliser un anticorps monoclonal non réactif de même isotype et conjugué avec le même fluorochrome comme contrôle négatif (voir le tableau 1).
6. Incuber dans l'obscurité à 4 °C pendant 30 minutes.
7. Laver deux fois à l'aide d'une solution PBS contenant 2% d'albumine sérique bovine (BSA). Remettre les cellules en suspension dans un liquide approprié pour la cytométrie en flux ; ex. : 0,3 ml à 1% de paraformaldéhyde (fixateur) dans 0,01 mol/l de PBS, d'un pH de 7,4.
8. Analyser à l'aide d'un cytomètre en flux.










Il est recommandé d'inclure un échantillon de contrôle positif et négatif approprié avec chaque cycle en tant que contrôle de réactif et de préparation. Noter que les conjugués fluorochromes sont photosensibles. Les échantillons doivent être protégés de la lumière pendant la procédure de coloration et jusqu'à l'analyse.


- Verwendungszweck** Zur In-vitro-Diagnostik.
F0801 und R0811 sind zur Verwendung in der Durchflusszytometrie bestimmt. Der Antikörper markiert CD25-exprimierende Leukozyten-Untertypen (1, 2). Die Ergebnisse müssen von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer Diagnostiktests des Patienten ausgewertet werden.
- Synonyme für das Antigen** Interleukin-2-Rezeptor (IL-2R), Interleukin-2-Rezeptor- α -Kette, Tac antigen (3, 4, 5).
- Zusammenfassung und Erklärung**
Die Interleukin-2-Rezeptoren bestehen aus drei Polypeptiden (α , β , γ), die IL-2 in unterschiedlichen Kombinationen binden (1). Die 55 kDa- α -Kette wird CD25 genannt (5). Die α -Kette allein, das $\beta\gamma$ -Heterodimer und das $\alpha\beta\gamma$ -Heterotrimer bilden eine Form von IL-2R mit tiefer, mittlerer, bzw. hoher Affinität. IL-2R mit mittlerer und hoher Affinität spielen eine Rolle bei der intrazellulären Signalübermittlung (3).
CD25 wird stark exprimiert an der Oberfläche von T-Zellen, die durch Antigene, Mitogene (Phytohämagglutinin (PHA), Concanavalin A (Con-A), das Mitogen der *Phytolacca americana* (PWM)), durch *Staphylococcus aureus*, oder durch Viren (HTLV-I, HTLV-II, Epstein-Barr-Virus) aktiviert sind (6, 7). Ebenso wird es auf B-Zellen exprimiert, die mit Anti-IgM, sowie auf Monozyten/Makrophagen, die mit Lipopolysacchariden stimuliert wurden (2). Bei gesundem peripherem Blut wird eine variable Markierung der T-Lymphozyten beobachtet (8).
- Geliefertes Reagenz**
Die Anti-CD25-Konjugate F0801 und R0811 wurden aus einem gereinigten monoklonalen Mausantikörper hergestellt. Sie werden in flüssiger Form in einem Puffer mit 1% Rinderserum-Albumin (BSA) und 15 mmol/L NaN₃, pH 7.2 geliefert. Das Konjugat in jedem Behälter ist ausreichend für 100 Tests (10 μ L Konjugat für bis zu 10⁶ Zellen).
Isotyp: IgG1, Kappa. Konjugatkonzentration: Siehe Behälteretikett.
- Tabelle 1.**
- | Antikörper Code | Fluorochrom | Negativkontrolle Code-Nr. |
|-----------------|---|---------------------------|
| F0801 | FITC (Fluoreszein-Isothiozyanat-Isomer 1) | X0927 |
| R0811 | RPE (R-Phycoerythrin) | X0928 |
- Immunogen** Phytohämagglutininstimulierte Lymphozyten aus peripherem Blut.
- Spezifität** Die Analyse der Immunpräzipitate und das immunhistochemische Färbemuster (1, 9) zeigen, dass die Spezifität von Anti-CD25, ACT-1, derjenigen von CD25-geclusterten Antikörpern entspricht.
- Vorsichtsmaßnahmen**
1. Zur In-vitro-Diagnostik.
 2. Für Fachpersonal.
 3. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN₃), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann Natriumazid, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Wasserleitungen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metallazid-Anreicherungen führen. Nach der Entsorgung muss mit reichlich Wasser nachgespült werden, um Metallazid-Anreicherung zu vermeiden.
 4. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.
 5. Geeignete persönliche Schutzausrüstung (PSA) tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
 6. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, staatlichen und EU-rechtlichen Richtlinien zu entsorgen.
- Lagerung**
Bei 2-8 °C im Dunkeln aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Behälter aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien unter anderen als den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen diese Bedingungen vom Benutzer überprüft werden. Es gibt keine offensichtlichen Anhaltspunkte für die mögliche Instabilität dieses Produkts. Es sollten daher die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientengewebeproben mitgeführt werden. Wenn eine unerwartete Anfärbung 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 dem technischen Kundendienst von Dako aufzunehmen.
- Färbeverfahren**
1. Venöses Blut entnehmen und in ein mit Antikoagulans beschichtetes Teströhrchen abfüllen.
 2. Mononukleare Zellen durch Zentrifugieren auf einem Trennmedium isolieren. Alternativ die roten Blutkörperchen nach Schritt 6 lysieren.
 3. Die mononuklearen Zellen zweimal mit RPMI 1640 oder PBS, pH 7.2-7.4, waschen.
 4. 100 μ L Suspension von Zellen mit 10 μ L Fluorochrom-konjugiertem Anti-CD25 mischen.
 5. Einen nicht-reaktiven monoklonalen Antikörper desselben Isotyps, der auch mit demselben Fluorochrom konjugiert wurde, als Negativkontrolle verwenden (siehe Tabelle 1).
 6. Im Dunkeln bei 4 °C 30 Minuten inkubieren.
 7. Zweimal mit PBS mit 2% BSA waschen. Zellen in einer geeigneten Flüssigkeit, z. B. 0.3 mL 1% Paraformaldehyd (Fixiermittel) in 0.01 mol/L PBS, pH 7.4, für die Durchflusszytometrie resuspendieren.
 8. Auf einem Durchflusszytometer analysieren.
- Es wird empfohlen, als Kontrolle für das Reagenz und das Präparat bei jedem Testdurchlauf eine geeignete Positiv- und Negativkontrollprobe mitlaufen zu lassen. Bitte beachten, dass Fluorochrom-Konjugate lichtempfindlich sind und die Proben während des Färbeverfahrens und bis zur Analyse vor Licht geschützt werden müssen.

References/ Bibliographie/ Literaturnachweise

1. Schwarting R, Gerdes J, Ziegler A, Stein H. Immunoprecipitation of the interleukin-2-receptor from Hodgkin's disease derived cell lines by monoclonal antibodies. *Hematol Oncol* 1987;5:57-64.
2. Sugamura K. CD25. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editors. *Leukocyte 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. 1127-8.
3. Ishii N, Kondo M, Takeshita T, Sugamura K. CR2.1. mAb specific for the γ chain of the IL-2 receptor. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, et al., editors. *Leukocyte typing V. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 5th International Workshop and Conference; 1993 Nov 3-7; Boston, USA.* Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1995. p.1867-8.
4. Leonard WJ, Depper JM, Robb RJ, Waldmann TA, Greene WC. Characterization of the human receptor for T-cell growth factor. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1983;80:6957-61.
5. Kikutani H, Kishimoto T. CR1. The cytokine receptors: section report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, et al., editors. *Leukocyte typing V. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 5th International Workshop and Conference; 1993 Nov 3-7; Boston, USA.* Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1995. p.1855-64.
6. Uchiyama T, Broder S, Waldmann TA. A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells. I. Production of anti-Tac monoclonal antibody and distribution of Tac (+) cells. *J Immunol* 1981;126:1393-7.
7. Uchiyama T, Nelson DL, Fleisher TA, Waldmann TA. A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature T cells. II. Expression of Tac antigen on activated cytotoxic killer T cells, suppressor cells, and on one of two types of helper T cells. *J Immunol* 1981;126:1398-1403.
8. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+ CD25high regulatory cells in human peripheral Blood. *J Immunol* 2001; 167:1245-1253.
9. Aziz KE, McCluskey PJ, Wakefield D. Expression of selectins (CD62 E,L,P) and cellular adhesion molecules in primary Sjögren's syndrome: questions to immunoregulation. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;80:55-66.

Explanation of symbols / Explication des symboles / Erläuterung der Symbole

 REF	Catalogue number Référence du catalogue Katalognummer	 2°C - 8°C	Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich		Use by Utiliser avant Verwendbar bis
 IVD	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum		Keep away from sunlight (consult storage section) Conserver à l'abri de la lumière (voir la section Conservation) Vor Sonnenlicht schützen (siehe Abschnitt Aufbewahrung)		Manufacturer Fabricant Hersteller
	Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	 LOT	Batch code Réf. du lot Chargenbezeichnung	 EC REP	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

Revision / Révision / Revision 2020.11