# Monoclonal Mouse Anti-Human CD42b, Platelet Glycoprotein Ib, Clone AN51

**Code No./ Code/ Code-Nr. F 0802** **FITC-Conjugated**
**Code No./ Code/ Code-Nr. R 7014** **RPE-Conjugated**

## ENGLISH

**Intended use**

For in vitro diagnostic use.

F 0802 and R 7014 are intended for use in flow cytometry. Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a certified professional.

**Synonym for antigen**

Glycoprotein Iba (GPIba), Glycoprotein Ibα (GPIbα) and Glycocalicin (1).

**Introduction**

CD42b is a 145 kDa protein, which together with CD42c forms a 160 kDa heterodimer composed of an α-chain and a β-chain respectively. The subunits are linked together by a disulphide bond. CD42b and CD42c forms a non-covalent complex together with CD42a and CD42d in the platelet plasma membrane. The CD42 complex serves as a receptor for von Willebrand factor and thrombin and mediates adhesion of platelets to subendothelial matrices (exposed upon damage to the endothelium) at high shear rates. Absence of the CD42 complex leads to the Bernard-Soulier syndrome. The binding sites for von Willebrand factor and thrombin lies on CD42b (1).

**Reagent provided**

The Anti-CD42b conjugates, F 0802 and R 7014, 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 $NaN_3$, pH 7.2. Each vial contains 100 tests (10 µL of conjugate for up to $10^6$ platelets from normal human peripheral blood).

Isotype: IgG2a, kappa. Conjugate concentration mg/L: See label on vial.

| Antibody Code No. | Fluorochrome | Negative Control Code No. |
|---|---|---|
| F 0802 | FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1) | X 0933 |
| R 7014 | RPE (R-Phycoerythrin) | X 0950 |

**Immunogen**

Mixture of human platelets and lymphocytes. (2)

**Specificity**

Anti-CD42b, AN51, was included in the Fourth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (3). Anti-CD42b, AN51, is capable of blocking the von Willebrand factor binding domain of CD42b (4) and inhibiting adrenaline induced platelet aggregation (5).

Anti-CD42b, AN51, is expressed on megakarytocytes and platelets (2).

**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. 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. Collect venous blood into a test tube containing EDTA as an anticoagulant.
2. Within 5 minutes centrifuge at 200 x g for 5 minutes at room temperature.
3. Collect 100 µL of the upper platelet-rich plasma (this is sufficient for 20 tests) and mix into 1 mL of 0.01 mol/L PBS, pH 7.4. Incubate at 4 °C for ½-1 hour.
4. Centrifuge at 1200 x g for 5 minutes at room temperature. Gently aspirate the supernatant and discard it leaving approximately 50 µL of fluid.
5. Add 2 mL 0.01 mol/L PBS, pH 7.4, and resuspend the platelets by using a vortex mixer.
6. Centrifuge at 1200 x g for 5 minutes at room temperature. Gently aspirate the supernatant and discard it leaving approximately 50 µL of fluid.
7. Add 1 mL 2% fetal calf serum in 0.01 mol/L PBS and resuspend the platelets by using a vortex mixer.
8. Mix 50 µL platelet suspension with 10 µL fluorochrome-conjugated Anti-CD42b.
9. Use a non-reactive monoclonal antibody of the same isotype, and conjugated with the same fluorochrome, as a negative control (see table).
10. Incubate in the dark at 4 °C for 20 minutes.
11. Wash twice with PBS containing 2% BSA. Resuspend the platelets in an appropriate fluid for flow cytometry, e.g. 0.3 mL 0.01 mol/L PBS, pH 7.4.

12. 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.

**Product-specific limitations** The fluorescence intensity of the antibody is reduced by the addition of 1% paraformaldehyde. Addition of paraformaldehyde after the antibody reaction will decrease the intensity of the signal.

## FRANÇAIS

**Intérêt** Pour diagnostic in vitro.

F 0802 et R 7014 sont destinés pour un usage en cytométrie en flux. L'interprétation des résultats doit être entreprise par un professionnel certifié dans le contexte de l'histoire clinique du patient et des autres examens diagnostics.

**Synonyme pour l'antigène** Glycoprotéine Iba (GPIba), Glycoprotéine Ibα (GPIbα) et Glycocalicine (1).

**Introduction** Le CD42b est une protéine de 145 kDa qui forme avec le CD42c un hétérodimère de 160 kDa constitué d'une chaîne α et d'une chaîne β respectivement. Les sous-unités sont reliées par une liaison disulfure. Le CD42b et le CD42c forment un complexe non-covalent avec le CD42a et le CD42d au niveau de la membrane des plaquettes plasmatiques. Le complexe CD42 constitue le récepteur du facteur von Willebrand et de la thrombine et joue un rôle de médiateur lors de l'adhésion des plaquettes aux matrices subendothéliales (exposées en cas de dommages subis par l'endothélium) à des vitesses de cisaillement élevées. L'absence du complexe CD42 provoque l'apparition d'un syndrome de Bernard-Soulier. Les sites de liaison du facteur von Willebrand et de la thrombine se situent au niveau du CD42b (1).

**Réactif fourni** Les conjugués Anti-CD42b, F 0802 et R 7014, sont fournis de l'anticorps monoclonal de souris purifié. Les conjugués sont fournis à l'état liquide dans un tampon contenant 1% d'albumine sérique bovine (BSA) et 15 mmol/L de $NaN_3$, à 7,2 de pH. Chaque flacon permet de réaliser 100 analyses (10 µL de conjugué pouvant traiter jusqu'à $10^6$ de leucocytes provenant de sang périphérique normal).

Isotype: IgG2a, kappa. Concentration du conjugué mg/L: Voir l'étiquette sur le flacon de l'échantillon.

| Code de l'anticorps | Fluor | Code du Contrôle Négatif |
|---|---|---|
| F 0802 | FITC (Isomère 1 d'isothiocyanate de fluorescéine) | X 0933 |
| R 7014 | RPE (R-Phycoérythrine) | X 0950 |

**Immunogène** Mélange de plaquettes et de lymphocytes humains. (2)

**Spécificité** L'AN51, anti-CD42b, a été intégré au cours de la Quatrième Conférence-Atelier Internationale sur les Antigènes de Différenciation du Leucocyte Humain (3). L'AN51, anti-CD42b, est capable de bloquer le domaine de fixation du CD42b au facteur von Willebrand (4) et d'inhiber l'agrégation plaquettaire induite par l'adrénaline (5)

L'AN51, anti-CD42b, est exprimé sur les mégacaryocytes et les plaquettes (2).

**Précautions d'emploi** 1. Pour utilisateurs professionnels.

2. Ce produit contient de l'azide de sodium ($NaN_3$), un produit chimique hautement toxique à l'état pur. 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 dépots 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.

**Stockage** 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.

**Procédure d'immunomarquage**

1. Prélever le sang veineux dans un tube à analyse contenant de l'EDTA comme anticoagulant
2. Dans les 5 minutes qui suivent le prélèvement, centrifuger à 200g pendant 5 minutes à température ambiante.
3. Prélever 100 µL du plasma surnageant riche en plaquettes (quantité suffisante pour 20 analyses) et les mélanger à 1 mL de paraformaldéhyde à 1% dans du PBS 0,01 mol/L, à 7,4 de pH. Laisser incuber à 4 °C pendant ½ à 1 heure.
4. Centrifuger à 1200g pendant 5 minutes à température ambiante. Aspirer délicatement le surnageant et le rejeter tout en conservant environ 50 µL de liquide.
5. Ajouter 2 mL de PBS 0,01 mol/L, à pH 7,4, et remettre les plaquettes en suspension à l'aide d'un agitateur vortex.
6. Centrifuger à 1200g pendant 5 minutes à température ambiante. Aspirer délicatement le surnageant et le rejeter tout en conservant environ 50 µL de liquide.
7. Ajouter 1 ml de sérum fœtal de veau à 2% dans du PBS à 0,01 mmol/L et remettre les plaquettes en suspension à l'aide d'un agitateur vortex.
8. Mélanger 50 µL de la suspension de plaquettes avec 10 µL de conjugué fluorochrome Anti-CD42b.
9. Utiliser un anticorps monoclonal non-réactif du même isotype, conjugué au même fluorochrome, en tant que contrôle négatif (voir tableau).
10. Laisser incuber à l'obscurité, à 4°C, pendant 20 minutes.

11. Laver deux fois avec du PBS contenant 2% de BSA. Re-suspendre les plaquettes dans un liquide adapté à la cytométrie en flux, par exemple 0,3 mL 0,01 mol/L PBS, pH 7,4.
12. Analyser sur un cytomètre en flux.

Il est recommandé d'inclure un contrôle positif et négatif adéquats à chaque technique pour contrôler le réactif et la préparation. Notez que les conjugués fluorochromes sont sensibles à la lumière, les échantillons doivent donc être protégés de cette dernière au cours de la procédure d'immunomarquage et jusqu'à l'analyse.

**Limites spécifiques du produit**

L'intensité de la fluorescence de l'anticorps est réduite par l'addition de 1% de paraformaldéhyde. L'addition de paraformaldéhyde après la réaction de l'anticorps augmentera l'intensité du signal.

## DEUTSCH

**Zweckbestimmung**

Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.

F 0802 und R 7014 sind für den durchflusszytometrischen Gebrauch bestimmt. 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**

Glycoprotein Iba (GPIba), Glycoprotein Ibα (GPIbα) und Glycocalicin (1).

**Einleitung**

CD42b ist ein 145 kDa-Protein, das zusammen mit CD42c ein 160 kDa-Heterodimer bildet, das sich aus einer α- beziehungsweise einer β-Kette zusammensetzt. Die Untereinheiten sind über eine Disulfidbrücke verknüpft. CD42b und CD42c bilden zusammen mit CD42a und CD42d einen nicht kovalenten Komplex in der Thrombozyten-Plasmamembran. Der CD42-Komplex dient als Rezeptor für den von Willebrand-Faktor und für Thrombin und vermittelt bei hohen Schergeschwindigkeiten die Thrombozytenadhäsion an subendotheliale Matrices (deren Offenlegung nach Beschädigung des Endothels erfolgte). Fehlen des CD42-Komplexes führt zum Bernard-Soulier-Syndrom. Die Bindungsstellen für den von Willebrand-Faktor und Thrombin liegen auf CD42b (1).

**Geliefertes Reagenz**

Die Anti-CD42b Konjugate F 0802 und R 7014 stammen von einem gereinigten monoklonalen Maus-Antikörper. Die Konjugate werden 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 Konjugat ist für bis $10^6$ Thrombozyten aus normalem, humanem peripherem Blut ausreichend).

Isotyp: IgG2a, Kappa. Konjugat-Konzentration mg/L: Siehe Produktetikett.

| Antikörper Code-Nr. | Fluorochrom | Negativkontrolle Code- Nr. |
|---|---|---|
| F 0802 | FITC (Fluoresceinisothiocyanat-Isomer 1) | X 0933 |
| R 7014 | RPE (R-Phycoerythrin) | X 0950 |

**Immunogen**

Aus menschlichen Thrombozyten und Lymphozyten bestehende Mischung. (2)

**Spezifität**

Anti-CD42b, AN51 wurde im Kontext des „Fourth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens" aufgenommen (3). Anti-CD42b, AN51, ist zur Blockierung der Bindungsdomäne von CD42b (4) für den von Willebrand-Faktor und zur Inhibierung der durch Adrenalin vermittelten Thrombozytenaggregation befähigt (5).

Anti-CD42b, AN51, wird auf Megakaryozyten und Thrombozyten exprimiert (2).

**Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen**

1. Für geschultes Fachpersonal.

2. Dieses Produkt enthält Natriumazid ($NaN_3$), 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. Sollten die Reagenzien unter anderen Bedingungen als den beschriebenen aufbewahrt worden sein, 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 Anfärbung 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**

1. Venöses Blut in ein EDTA als Antikoagulans enthaltendes Probenröhrchen gewinnen.
2. Innerhalb von 5 Minuten bei 200 x g 5 Minuten lang bei Raumtemperatur zentrifugieren.
3. 100 µL des thrombozytenreichen überständigen Plasma (dies ist für 20 Tests ausreichend) gewinnen und mit 1 mL 1%igem Paraformaldehyd in 0,01 mol/L PBS, pH 7,4, mischen. ½-1 Stunde bei 4 °C inkubieren.
4. Bei 1200 x g 5 Minuten lang bei Raumtemperatur zentrifugieren. Den Überstand vorsichtig aspirieren und entsorgen, so dass ungefähr 50 µL Flüssigkeit zurückbleiben.
5. 2 ml 0,01 mol/L PBS, pH 7,4, zugeben und die Thrombozyten unter Verwendung eines Vortexmischers resuspendieren.

6. Bei 1200 x g 5 Minuten lang bei Raumtemperatur zentrifugieren. Den Überstand vorsichtig aspirieren und entsorgen, so dass ungefähr 50 µL Flüssigkeit zurückbleiben.
7. 1 mL 2 % fötales Kälberserum in 0,01 mol/L PBS zugeben und die Thrombozyten unter Verwendung eines Vortexmischers resuspendieren.
8. 50 µL der Thrombozytensuspension mit 10 µL des fluorochromkonjugierten Anti-CD42b mischen.
9. Als Negativkontrolle einen nicht reaktiven, monoklonalen Antikörper des gleichen Isotyps, konjugiert an dasselbe Fluorochrom, verwenden (s. Tabelle).
10. Im Dunkeln bei 4 °C 20 Minuten lang inkubieren.
11. Zweimal mit PBS waschen, das 2 % BSA enthält. Die Thrombozyten in einer für die Durchflusszytometrie geeigneten Flüssigkeit, z. B. 0,3 mL, 0,01 mol/L PBS, pH 7,4, resuspendieren.
12. Im Durchflusszytometer analysieren.

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

**Produktspezifische Beschränkungen**

Die Fluoreszenzintensität des Antikörpers wird durch die Zugabe von 1 %igem Paraformaldehyd reduziert. Die Zugabe von Paraformaldehyd nach Ablaufen der Antikörperreaktion setzt die Signalintensität herab.

**References/ Références/ Literatur**


1. de Haas M, von dem Borne A. CD42b. CD Guide. In: Mason D, André P, Bensussan A, Buckley C, Civin C, Clark E, et al., editors. Leucocyte typing VII. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 7th International Workshop and Conference; 2000 Jun 19-23; Harrogate, United Kingdom. New York: Oxford University Press Inc.; 2002. p. 787-788.
2. McMichael AJ, Rust NA, Pilch JR, Sochynsky R, Morton J, Mason DY, et al. Monoclonal antibody to human platelet glycoprotein I. I. Immunological studies. Br J Haematol 1981;49:501-9.
3. CD 42b. Appendix A CD Guide. 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 1085.
4. Fauvel-Lafève F, Tabaka V, Caen JP, Legrand YJ. Defective adhesion of blood platelets to vascular microfibrils in the Bernard-Soulier syndrome. Blood 1993;82:1985-8.
5. Mustonen P, Lassila R. P8.14 Adrenaline-induced platelet aggregation is inhibited by AN51 (DAKO-Ib), a murine mAb to human platelet gpIb (CD42b). In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, et al., editors. Leucocyte 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. Volume 2. p. 1338-9.


**Explanation of symbols / Explication des symboles / Erläuterung der Symbole**

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