

Monoclonal Mouse Anti-Human CD41, Platelet Glycoprotein IIb, Clone 5B12

Code No./ Code/ Code-Nr. F 7088 FITC-Conjugated
Code No./ Code/ Code-Nr. R 7058 RPE-Conjugated

ENGLISH

Intended use	For in vitro diagnostic use. F 7088 and R 7058 are intended for use in flow cytometry. CD41 is a selective marker of platelets and platelet precursors, and antibodies to CD41 may be of value for the immunophenotyping of megakaryoblastic leukaemias, and for the identification of Glanzmann's thrombasthenia (1). 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	Glycoprotein IIb (GPIIb), α IIb integrin (1).									
Introduction	CD41 is the α subunit of the CD41/CD61 complex (GPIIb-IIIa), a calcium-dependent, non-covalently associated heterodimer. CD41 is a 135 kDa molecule, consisting of 2 peptides: a 120 kDa α chain and a 23 kDa β chain. The α chain and the β chain are linked by a single disulphide bond. The α chain contains four calcium-binding sites and is entirely extracellular, while the β -chain has extracellular, transmembrane and cytoplasmic domains (1). The CD41/CD61 complex appears early in megakaryocyte maturation (2). The activated CD41/CD61 complex is a receptor for von Willebrand factor, soluble fibrinogen and fibronectin (1) and plays a central role in platelet activation and aggregation (1, 3). CD41 is expressed to a variable degree in megakaryoblastic/cytic leukaemias (4). It is absent from, or defective on the platelets of patients suffering from Glanzmann's thrombasthenia (5).									
Reagent provided	The Anti-CD41 conjugates, F 7088 and R 7058, 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 peripheral blood). <u>Isotype:</u> IgG1, kappa. <u>Conjugate concentration mg/L:</u> see label on vial.									
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Antibody Code No.</th> <th>Fluorochrome</th> <th>Negative Control Code No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>F 7088</td> <td>FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1)</td> <td>X 0927</td> </tr> <tr> <td>R 7058</td> <td>RPE (R-Phycoerythrin)</td> <td>X 0928</td> </tr> </tbody> </table>	Antibody Code No.	Fluorochrome	Negative Control Code No.	F 7088	FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1)	X 0927	R 7058	RPE (R-Phycoerythrin)	X 0928
Antibody Code No.	Fluorochrome	Negative Control Code No.								
F 7088	FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1)	X 0927								
R 7058	RPE (R-Phycoerythrin)	X 0928								
Immunogen	Normal human platelets.									
Specificity	Anti-CD41, 5B12, was included in the Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Boston 1993) and studies by a number of laboratories confirmed its reactivity with CD41. Erroneously the clone was listed as SB12 (6).									
Precautions	<ol style="list-style-type: none"> For professional users. 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. 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	<ol style="list-style-type: none"> Collect venous blood into a test tube containing EDTA as an anticoagulant. Within 5 minutes centrifuge at 200 x g for 5 minutes at room temperature. Collect 100 μL of the upper platelet-rich plasma (this is sufficient for 20 tests) and mix into 1 mL of 1% paraformaldehyd in 0.01 mol/L PBS, pH 7.4. Incubate at 4 °C for ½-1 hour. Centrifuge at 1200 x g for 5 minutes at room temperature. Gently aspirate the supernatant and discard it leaving approximately 50 μL of fluid. Add 2 mL 0.01 mol/L PBS, pH 7.4, and resuspend the platelets by using a vortex mixer. Centrifuge at 1200 x g for 5 minutes at room temperature. Gently aspirate the supernatant and discard it leaving approximately 50 μL of fluid. Add 1 mL 2% foetal calf serum in 0.01 mol/L PBS and resuspend the platelets by using a vortex mixer. Mix 50 μL platelet suspension with 10 μL fluorochrome-conjugated Anti-CD41. 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 1% paraformaldehyde (fixative) in 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.

FRANÇAIS

Intérêt	<p>Pour diagnostic in vitro.</p> <p>F 7088 et R 7058 sont destinés pour un usage en cytométrie de flux. CD41 est un marqueur électif des plaquettes et des précurseurs plaquetaires, et les anticorps dirigés contre le CD41 sont susceptibles d'être précieux pour l'immunophénotypage dans les cas de leucémies mégacaryoblastiques, et pour l'identification des thrombasthénies de Glanzmann (1). 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.</p>									
Synonymes de l'antigène	Glycoprotéine IIb (GPIIb), α IIb intégrine (1).									
Introduction	<p>CD41 est la sous-unité α du complexe CD41/CD61 (GPIIb-IIIa), un hétérodimère non-covalent et calcium dépendant. CD 41 est une molécule de 125 kDa constituée de 2 peptides : Une chaîne α de 120 kDa et une chaîne β de 23 kDa. La chaîne α et la chaîne β sont liées par une liaison disulfure simple. La chaîne α comporte 4 sites de liaison au calcium et elle est entièrement extracellulaire, alors que la chaîne β comporte des domaines extracellulaire, transmembranaire et cytoplasmique (1).</p> <p>Le complexe CD41/CD61 apparaît de manière précoce dans la maturation du mégacaryocyte (2). Le complexe CD41/CD61 activé est un récepteur du facteur von Willebrand, du fibrinogène soluble et de la fibronectine (1), il joue un rôle central dans l'activation et l'agrégation plaquetaires (1,3).</p> <p>Le CD41 est exprimé à des degrés variables au cours des leucémies mégacaryoblastiques/cytiques (4). Il est absent, ou déficient, sur les plaquettes des patients atteints de thrombasthénie de Glanzmann (5).</p>									
Réactif fourni	<p>Les conjugués Anti-CD41, f 7088 et R 7058, ont été obtenus à partir d'un 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 leucocytes provenant de sang périphérique normal).</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"> <thead> <tr> <th>Code de l'anticorps</th> <th>Fluorochrome</th> <th>Code du Contrôle Négatif</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>F 7088</td> <td>FITC (Isomère 1 d'isothiocyanate de fluorescéine)</td> <td>X 0927</td> </tr> <tr> <td>R 7058</td> <td>RPE (R-Phycoérythrine)</td> <td>X 0928</td> </tr> </tbody> </table>	Code de l'anticorps	Fluorochrome	Code du Contrôle Négatif	F 7088	FITC (Isomère 1 d'isothiocyanate de fluorescéine)	X 0927	R 7058	RPE (R-Phycoérythrine)	X 0928
Code de l'anticorps	Fluorochrome	Code du Contrôle Négatif								
F 7088	FITC (Isomère 1 d'isothiocyanate de fluorescéine)	X 0927								
R 7058	RPE (R-Phycoérythrine)	X 0928								
Immunogène	Plaquettes humaines normales.									
Spécificité	Le 5B12, anti-CD41, a été intégré au cours du Sixth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Boston 1993), et les études réalisées par de nombreux laboratoires ont confirmé sa réactivité vis-à-vis du CD41. Le clone a été inscrit par erreur sous le nom de SB12 (6).									
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 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 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	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	<ol style="list-style-type: none"> 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 pH 7,4. Laisser incubé 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. Centrifugieren 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 foetal 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-CD41.
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 de paraformaldéhyde (fixateur) dans du PBS 0,01 mol/L, à pH 7,4.
12. 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. Remarquer que les conjugués fluorochromes sont photosensibles, les échantillons doivent donc être protégés de la lumière pendant la procédure de marquage et jusqu'à l'analyse.

DEUTSCH

Zweckbestimmung

Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.

F 7088 und R 7058 sind für den durchflusszytometrischen Gebrauch bestimmt. CD61 ist ein selektiver Marker der Thrombozyten- und Thrombozytenvorläuferzellen. Antikörper gegen CD61 können für die Immunphänotypisierung der Megakaryozytenleukämien sowie für die Erkennung der Thrombasthenie (Glanzmann-Naegeli) von Nutzen sein (1). Die Befunde müssen unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren von einem erfahrenen Pathologen interpretiert werden.

Synonyme Bezeichnungen des Antigens

Glycoprotein IIb (GPIIb), α IIb-Integrin (1).

Einleitung

CD41 ist die α -Untereinheit des CD41/CD61-Komplexes (GPIIb-IIIa), eines kalziumabhängigen, nicht kovalent gebundenen Heterodimers. Das 135 kDa schwere CD41-Molekül besteht aus 2 Peptiden: einer 120 kDa α -Kette und einer 23 kDa β -Kette. Die α - und β -Ketten sind mittels einer einzigen Disulphid-Bindung vernetzt. Die α -Kette besitzt vier kalziumbindende Orte und ist vollständig extrazellulär, während die β -Kette aus extrazellulären, transmembranischen und zytoplasmatischen Domänen besteht (1).

Der CD41/CD61-Komplex erscheint in den frühen Stadien der Megakaryozytenreifung (2). Der aktivierte CD41/CD61-Komplex ist ein Rezeptor für den von Willebrand-Faktor, für lösliches Fibrinogen und Fibronectin (1) und spielt eine zentrale Rolle in der Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten (1, 3).

CD41 wird in unterschiedlichem Grad bei megakaryoblastischen/zytischen Leukämien exprimiert (4). Es fehlt oder ist defekt auf den Thrombozyten von Patienten mit Thrombasthenie (Glanzmann-Naegeli) (5).

Geliefertes Reagenz

Die Anti-CD41 Konjugate F 7088 und R 7058 stammen von einem gereinigten monoklonalen Maus-Antikörper. Die Konjugate werden in einer gepufferten Lösung mit 1% bovinem Serumalbumin (BSA) und 15 mmol/L NaN₃, pH 7,2 geliefert. Jedes Fläschchen ist für 100 Tests ausreichend (10 µL des Konjugats sind für bis 10⁶ Thrombozyten aus normalem peripherem Blut ausreichend).

Isotyp: IgG1, Kappa. Konjugat-Konzentration mg/L: Siehe Produktetikett.

Antikörper Code-Nr.	Fluorochrom	Negativkontrolle Code-Nr.
F 7088	FITC (Fluoresceinisothiocyanat-Isomer 1)	X 0927
R 7058	RPE (R-Phycoerythrin)	X 0928

Immunogen

Normale humane Thrombozyten.

Spezifität

Anti-CD41, 5B12, wurde Kontext des Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens aufgenommen (Kobe 1993) und Studien in einigen Laboratorien bestätigten seine Reaktivität mit CD41. Der Klon wurde irrtümlicherweise als SB12 gruppiert (6).

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 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 1200xg 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 1200xg 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-CD41 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 1%igem Paraformaldehyd (Fixativ) in 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 Färbeprozesses und bis zur Durchführung der Analyse vor Licht geschützt werden müssen.

References/ Références/ Literatur

1. Sun QH, Newman PJ. CD guide. CD41. 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. 1139.
2. Vinci G, Tabilio A, Deschamps JF, van Haeke D, Henri A, Guichard J, et al. Immunological study of *in vitro* maturation of human megakaryocytes. Br J Haematol 1984;56:589-605.
3. Nachman RL, Leung LLK. Complex formation of platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa with fibrinogen. J Clin Invest 1982;69:263-9.
4. Breton-Gorius J, Tabilio A, Vainchenker W, Vinci G, van Haeke D, Henri A, et al. Diagnosis of megakaryoblastic leukemias. Verh Dtsch Ges Path 1983;67:166-81.
5. George JN, Caen JP, Nurden AT. Glanzmann's thrombasthenia: the spectrum of clinical disease (review). Blood 1990;75:1383-95.
6. Honda S, Felding-Habermann B, Loftus J, Annis D, Kunicki TJ. CD41/CD61 cluster workshop report: localization of epitopes on integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ (CD41/CD61) and $\alpha_v\beta_3$ (CD51/CD61). 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. p. 1293-8.

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	 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