

Monoclonal Mouse
Anti-Human CD56/RPE
 Clone C5.9
Code No./ Code/ Code-Nr. R 7251
 Edition/ Ausgabe 01.01.03

ENGLISH	
Intended use	For in vitro diagnostic use. R 7251 is intended for use in flow cytometry. CD56 is the prototypic marker of human natural killer (NK) cells and it is also present on a subset of CD4-positive and CD8-positive T cells in peripheral blood (1). Interpretation of staining results with antibodies to CD56 must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a certified professional.
Synonym for antigen	Neural cell adhesion molecule (N-CAM), Leu-19, NKH1 (1).
Introduction	CD56 is a membrane glycoprotein which has multiple isoforms generated by alternative splicing from a single gene located on chromosome 11 (2). The core polypeptide is the 140 kDa isoform which can be variably glycosylated to produce mature species. The predominant isoform in NK and T cells is the transmembrane-anchored 140 kDa protein. In tissues, CD56 antigen is found in the cerebellum and cortex of the brain, and at neuromuscular junctions. This molecule is identical to the 140 kDa isoform of the neuronal cell adhesion molecule (N-CAM) (1, 3). Additionally, CD56 is also present in certain large granular lymphocyte leukaemias, small cell lung carcinomas, neural-derived tumours, myelomas, and myeloid leukaemias (1).
Reagent provided	R 7251, is a purified monoclonal mouse antibody conjugated with R-phycoerythrin (RPE). 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>Isotype:</u> IgG2b, kappa. <u>Conjugate concentration mg/L:</u> See label on vial.
Immunogen	Human NK cells.
Specificity	When using FACS analysis on buffy coat cells of peripheral blood as well as on gated lymphocyte populations and NK-cell cultures, Anti-CD56, C5.9, shows a positive reaction with NK-cells. The staining pattern parallels that observed with Anti-CD56, MOC-1, which has been clustered as an antibody to CD56 (2). The epitope recognized by Anti-CD56, C5.9, is heat and protease sensitive. Note, R 7251 labels CD56-positive cells with higher fluorescence intensity than Anti-CD56/RPE, Clone MOC-1, and provides a better separation between positive and negative cells.
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 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. In one test tube, mix 100 µL cell suspension with 10 µL R 7251. 5. In another test tube, mix 100 µL cell suspension with an appropriate volume, e.g. 10 µL, negative control reagent. The recommended negative control for R 7251 is DakoCytomation code No. X 0951. 6. Incubate in the dark at 4 °C for 30 minutes. 7. Wash twice with PBS containing 2% BSA. Resuspend the cells in each test tube 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.

FRANÇAIS	
Intérêt	Pour diagnostic in vitro. R 7251 est destiné pour un usage en cytométrie en flux. CD56 est le marqueur type des cellules "natural killer" (NK) humaines et il est également présent sur un sous-ensemble de lymphocytes T à cellules CD4 et CD8 positives dans le sang périphérique (1). L'interprétation des résultats doit être entreprise par un professionnel certifié selon le contexte de l'histoire clinique du patient et des autres examens diagnostiques.
Synonyme pour l'antigène	Molécule d'adhésion cellulaire neurale (N-CAM), Leu-19, NKH1 (1).
Introduction	CD56 est une glycoprotéine membranaire qui a plusieurs isoformes engendrées par l'épissage alternatif d'un gène unique situé sur le chromosome 11 (2). Le polypeptide central est l'isoforme de 140 kDa qui est glycosylée de façon variable pour produire des formes matures. L'isoforme prédominante dans les lymphocytes-T et NK est une protéine de 140 kDa ancrée dans la membrane. Dans les tissus, l'antigène CD56 est trouvé dans le cervelet et le cortex du cerveau ainsi que dans les jonctions neuromusculaires. Cette molécule est identique à l'isoforme de 140 kDa de la molécule d'adhésion de la cellule neuronale (N-CAM) (1, 3). De plus, CD56 est aussi présent dans certains grands lymphocytes granulaires des leucémies, dans les petites cellules de carcinomes pulmonaires, les tumeurs d'origine neurales, les myélomes et les leucémies myéloïdes (1).
Réactif fourni	R 7251 est un anticorps monoclonal purifié de souris conjugué avec la R-phycoérythrine (RPE). 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). <u>Isotype:</u> IgG2b, kappa. <u>Concentration du conjugué mg/L:</u> Voir l'étiquette sur le flacon de l'échantillon.
Immunogène	Cellules NK humaines.
Spécificité	Lors de l'utilisation d'analyses par FACS sur des cellules de la couche leucocyto-plaquettaire du sang périphérique ainsi que sur des populations de lymphocytes synchronisés et de cultures de cellules NK, le C5.9, anti-CD56, a montré une réaction positive aux cellules NK. Le modèle de marquage est équivalent à celui qui est observé pour le MOC-1, anti-CD56, qui a été regroupé en tant qu'anticorps dirigé contre le CD56 (2). L'épitope reconnu par le C5.9, anti-CD56, est sensible à la chaleur et à l'action de la protéase. Remarque que le R7251 marque les cellules CD56 positives avec une intensité de fluorescence supérieure à celle du clone MOC-1, anti-CD56/RPE, et permet une meilleure séparation entre les cellules positives et négatives.
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 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	1. Prélever le sang veineux dans un tube à essais contenant un anticoagulant. 2. Isoler les cellules mononucléaires par centrifugation dans un milieu de séparation. Sinon, lyser les globules rouges après l'étape 6. 3. Laver les cellules mononucléaires deux fois avec du RPMI 1640 ou du PBS, à 7,2-7,4 de pH. 4. Dans un tube à essai, mélanger 100 µL de suspension cellulaire avec 10 µL de R 7251. 5. Dans un autre tube à essai, mélanger 100 µL de suspension cellulaire dans un volume adéquat, par ex : 10 µL, de réactif de contrôle négatif. Le contrôle négatif requis pour le R 7251 est le réactif DakoCytomation, code X 0951. 6. Laisser incubé à l'obscurité, à 4°C, pendant 30 minutes. 7. Laver deux fois avec du PBS contenant 2% de BSA. Re-suspendre les cellules dans chaque tube à essai dans une solution appropriée pour cytométrie de flux, par ex 0,3 mL 1% de paraformaldéhyde (fixateur) dans 0,01 mol/L PBS, pH 7,4. 8. 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.

Zweckbestimmung Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.
R 7251 ist für den durchflusszytometrischen Gebrauch bestimmt. CD56 ist ein Prototyp des Markers humaner NK-Zellen und ist auch auf einer Untergruppe CD4-positiver und CD8-positiver T-Zellen im peripheren Blut vorhanden (1). Die Interpretation der Färbegergebnisse mit Antikörpern gegen CD56 muss unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Untersuchungen durch einen zertifizierten Facharzt vorgenommen werden.

Synonyme Bezeichnungen des Antigens Neural cell adhesion molecule (N-CAM; neurales Zelladhäsionsmolekül), Leu-19, NKH1 (1).

Einleitung CD56 ist ein Membranglykoprotein mit mehreren Isoformen, welche durch die alternative Spleißung eines einzigen, auf dem Chromosom 11 lokalisierten Gens generiert wurden (2). Das Kernpolypeptid ist die 140 kDa schwere Isoform, welche unterschiedlich glykosyliert wird, wodurch die ausgereiften Spezies entstehen. In NK- und T-Zellen ist die vorherrschende Isoform das transmembranisch verankerte Protein mit einer relativen Molekülmasse von 140 kDa. In Geweben wird das CD56-Antigen im Kleinhirn, in der Großhirnrinde und an neuromuskulären Synapsen nachgewiesen. Dieses Molekül ist mit der 140 kDa-Isoform des „neuronal cell adhesion molecule“ (N-CAM, neuronales Zelladhäsionsmolekül) identisch (1, 3).
Zudem liegt CD56 auch bei bestimmten Leukämien der NK-Zelllinie (LGL-Leukämien), kleinzelligen Bronchialkarzinomen, auf neurale Strukturen zurückgehenden Tumoren, Myelomen und Myeloischen Leukämien vor (1).

Geliefertes Reagenz R 7251 ist ein R-Phycoerythrin (RPE) konjugierter, gereinigter monoklonaler Maus-Antikörper. Das Konjugat wird in einer gepufferten Lösung mit 1 % bovinem Serumalbumin (BSA) und 15 mmol/L NaN₃, pH 7,2, geliefert. Jedes Fläschchen ist ausreichend für 100 Tests (10 µL des Konjugats sind für bis 10⁶ Leukozyten aus normalem, menschlichem peripheren Blut ausreichend).
Isotyp: IgG2b, Kappa. Konjugat-Konzentration mg/L: Siehe Produktetikett.

Immunogen Humane NK-Zellen.

Spezifität Anti-CD56, C5.9, zeigt eine positive Reaktion mit NK-Zellen, wenn an Zellen mit „Leukozytenmanschette“ (buffy coat cells) des peripheren Bluts ebenso wie an Populationen von isolierten Lymphozyten die FACS-Analyse durchgeführt wird. Das Färbemuster entspricht demjenigen, das mit Anti-CD56, MOC-1, beobachtet wird. Anti-CD56, MOC-1, wurde als ein Antikörper gegen CD56 gruppiert (2). Das von Anti-CD56, C5.9, erkannte Epitop ist hitze- und proteaseempfindlich.
Es sollte beachtet werden, dass R 7251 CD56-positive Zellen mit höherer Fluoreszenzintensität markiert als Anti-CD56/RPE, Clone MOC-1, und dass es bessere Differenzierung zwischen positiven und negativen Zellen bereitstellt.

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen
1. Für geschultes Fachpersonal.
2. Dieses Produkt enthält Natrium-Azid (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. 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
1. Venöse Blutprobe in ein Probenröhrchen mit gerinnungshemmendem Mittel gewinnen.
2. Mononukleäre Zellen durch Zentrifugieren auf einem Abtrennungsmittel isolieren. Alternativ hierzu können die Erythrozyten im Anschluss an Schritt 6 aufgelöst werden.
3. Die mononukleären Zellen zweimal mit RPMI 1640 oder mit PBS, pH 7,2-7,4, waschen.
4. In einem Probenröhrchen 100 µL Zellsuspension mit 10 µL R 7251 mischen.
5. In einem weiteren Probenröhrchen 100 µL Zellsuspension mit einem angemessenen Volumen, z. B. 10 µL, Negativkontrollreagenz vermischen. Das empfohlene Negativkontrollreagenz für R 7251 ist DakoCytomation Code-Nr. X 0951.
6. Im Dunkeln bei 4 °C 30 Minuten lang inkubieren.
7. Zweimal mit PBS waschen, das 2 % BSA enthält. Die Zellen 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.
8. 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. Poggi A. CD56. 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. 805-806.
2. Costa P. NK4. CD56 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. 271-2.
3. Lanier LL, Testi R, Bindl J, Phillips JH. Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. J Exp Med 1989;169: 2233-8.

Explanation of symbols/ Légende des symboles/ Erläuterung der Symbole

 Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	 2°C – 8°C 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	