

**Monoclonal Mouse
Anti-Human
CD235a, Glycophorin A**
Clone JC159
Code No./ Code/ Code-Nr. M 0819
Edition/ Ausgabe 27.02.03

ENGLISH	
Intended use	For in vitro diagnostic use. Monoclonal Mouse Anti-Human CD235a, Glycophorin A, Clone JC159, is intended for use in immunocytochemistry. The antibody labels erythroid cells at almost all stages of differentiation and is a useful tool for the identification of erythroleukaemia (1). Differential identification is aided by the results from a panel of antibodies. Interpretation must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.
Synonyms for antigen	CD235a, GPA, Sialoglycoprotein alpha (1, 2).
Introduction	Glycophorin A is a single-pass membrane sialoglycoprotein and carrier of the blood group specificities M and N. The gene is located on chromosome 4q28-q31 and share sequence homology with genes encoding glycophorin B and glycophorin E (2). Glycophorin A is expressed by erythroid cells beginning on morphologically recognizable erythroid precursors, just after the CFU-E stage, to the mature erythrocyte. Once glycophorin A is maximally expressed, the amount in each erythroid cell remains constant and does not appear to change during further maturation (3). The majority of cases of erythroleukaemia express glycophorin A on neoplastic erythroblasts, whereas acute myeloid leukaemia and acute lymphoblastic leukaemia only very rarely express glycophorin A (1, 4).
Reagent provided	Monoclonal mouse antibody provided in liquid form as cell culture supernatant dialysed against 0.05 mol/L Tris/HCl, pH 7.2, and containing 15 mmol/L NaN ₃ . <u>Clone:</u> JC159 (1). <u>Isotype:</u> IgG1, kappa. <u>Mouse IgG concentration:</u> See label on vial.
Immunogen	Membrane preparations from splenic hairy cell leukaemia cells (1).
Specificity	As demonstrated by haemagglutination and immunoblotting, the antibody reacts with a formalin-fixed, paraffin-embedded resistant epitope on the extracellular domain of the protein, probably located between amino acids 27 and 40. The antibody strongly labels normal erythroid cells at all stages of differentiation from the erythroblast to the mature red cell and does not react with glycophorin B (1).
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 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 user must verify the conditions. 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.
Specimen preparation	<u>Paraffin sections:</u> The antibody can be used for labelling paraffin-embedded tissue sections fixed in formalin. Pre-treatment of tissues with proteinase K or heat-induced epitope retrieval is recommended. For heat-induced epitope retrieval optimal results are obtained with DakoCytomation Target Retrieval Solution, code No. S 1700, DakoCytomation Target Retrieval Solution, High pH, code No. S 3308, 10 mmol/L citrate buffer, pH 6.0, or 10 mmol/L Tris buffer, 1 mmol/L EDTA, pH 9.0. The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunocytochemical staining procedure. <u>Frozen sections and cell preparations:</u> The antibody can be used for labelling acetone-fixed, frozen sections and cell smears (1).
Staining procedure	<u>Dilution:</u> Monoclonal Mouse Anti-Human CD235a, Glycophorin A, code No. M 0819, may be used at a dilution range of 1:50-1:400 when applied on formalin-fixed, paraffin-embedded sections of human tonsil and using 20 minutes heat-induced epitope retrieval in 10 mmol/L citrate buffer, pH 6.0, and 30 minutes incubation at room temperature with the primary antibody. Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation method, and should be determined by each individual laboratory. The recommended negative control is DakoCytomation Mouse IgG1, code No. X 0931, diluted to the same mouse IgG concentration as the primary antibody. Unless the stability of the diluted antibody and negative control has been established in the actual staining procedure, it is recommended to dilute these reagents immediately before use, or dilute in DakoCytomation Antibody Diluent, code No. S 0809. Positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimen. <u>Visualization:</u> DAKO LSAB™+/HRP kit, code No. K 0679, and DAKO EnVision™+/HRP kits, code Nos. K 4004 and K 4006, are recommended. For frozen sections and cell preparations, the DakoCytomation APAAP kit, code No.
(102464-001)	M 0819/EFG/COS/27.02.03 p. 1/4

K 0670, is a good alternative if endogenous peroxidase staining is a concern. Follow the procedure enclosed with the selected visualization kit.

Automation: The antibody is well-suited for immunocytochemical staining using automated platforms, such as the DakoCytomation Autostainer.

FRANÇAIS	
Intérêt	Pour diagnostic in vitro. Monoclonal Mouse Anti-Human CD235a, Glycophorin A, Clone JC159, est destiné pour un usage en immunocytochimie. L'anticorps marque les cellules érythroïdes à presque tous les stades de la différenciation et c'est un outil pratique pour identifier l'érythroleucémie (1). L'identification différentielle s'appuie sur les résultats obtenus à l'aide d'un panel d'anticorps. 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	CD235a, GPA, sialo-glycoprotéine alpha (1, 2).
Introduction	La glycophorine A est une sialo-glycoprotéine transmembranaire porteuse des spécificités des groupes sanguins M et N. Le gène est situé sur le chromosome 4q28-q31 et partage une séquence homologue avec les gènes codant la glycophorine B et la glycophorine E (2). La glycophorine A est exprimée par les cellules érythroïdes depuis les précurseurs érythroïdes morphologiquement reconnaissables après le stade CFU-E jusqu'à l'érythrocyte mature. Une fois la glycophorine A exprimée au maximum, son niveau dans chaque cellule érythroïde reste constant et ne semble pas changer au fur et à mesure de la maturation (3). Dans la majorité des cas d'érythroleucémie, la glycophorine A est exprimée sur les érythroblastes néoplasiques, alors que dans les cas de leucémie aiguë myéloïde et de leucémie aiguë lymphoblastique, elle n'est que très rarement exprimée (1, 4).
Réactif fourni	L'anticorps de souris monoclonale fourni à l'état liquide comme culture cellulaire surnageante dialysée contre 0,05 mol/L Tris/HCl, pH 7.2, et contenant 15 mmol/L NaN ₃ . <u>Clone:</u> JC159 (1). <u>Isotype:</u> IgG1, kappa. <u>Concentration IgG de Souris:</u> Voir l'étiquette sur le flacon de l'échantillon.
Immunogène	Préparations membranaires de cellules leucémiques spléniques à tricholeucocytes (1).
Spécificité	Comme l'a déterminé l'hémoagglutination et l'immunoblot, l'anticorps montre une réaction à l'épitope résistant inclus en paraffine, fixé au formol sur le domaine extracellulaire de la protéine, probablement situé entre les acides aminés 27 et 40. L'anticorps marque fortement les cellules érythroïdes normales à tous les stades de la différenciation, depuis les érythroblastes jusqu'aux globules rouges matures, et ne montre pas de réaction à la glycophorine B (1).
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 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.
Stockage	Stocker entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption mentionnée sur le flacon. Dans le cas où les réactifs sont conservés sous d'autres conditions que celles spécifiées, les 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.
Préparation de l'échantillon	<u>Coupes en paraffine:</u> L'anticorps peut être utilisé pour marquer des coupes de tissus incluses en paraffine, fixées au formol. Le prétraitement des tissus avec la protéinase K ou la restauration de l'épitope par la chaleur est requis. Pour le démasquage de l'épitope induite par la chaleur, des résultats optimaux sont obtenus avec DakoCytomation Target Retrieval Solution, code S 1700, DakoCytomation Target Retrieval Solution, pH élevé, code S 3308, ou tampon citrate 10 mmol/L, pH 6.0, ou tampon Tris 10mmol/L, EDTA 1 mmol/L, pH 9.0. Les coupes de tissus ne doivent pas sécher pendant le traitement ou la procédure d'immunomarquage immunocytochimique suivante. Coupes congelées et préparations cellulaires: L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes congelées, fixées à l'acétone et les frottis cellulaires fixés (1).
Procédure d'immunomarquage	<u>Dilution:</u> Monoclonal Mouse Anti-Human CD235a, Glycophorin A, code M 0819, peut être dilué entre 1:50 et 1:400 pour une application des coupes de tissus incluses en paraffine, fixées au formol de l'amygdale humaine pendant 20 minutes de démasquage de l'épitope induite par la chaleur dans 10 mmol/L tampon citrate, pH 6.0, and 30 minutes d'incubation à température ambiante avec l'anticorps primaire. Les conditions optimales peuvent varier selon l'échantillon et la méthode de préparation, et doivent être déterminées par chaque laboratoire particulier. Le contrôle négatif requis est DakoCytomation Mouse IgG1, code X 0931, dilué à la même concentration de l'IgG de souris que celle de l'anticorps primaire. A moins que la stabilité de l'anticorps dilué et du contrôle négatif ait été établie dans la procédure d'immunomarquage, il est recommandé de diluer ces réactifs juste avant leur emploi; ou de les diluer dans
(102464-001)	M 0819/EFG/COS/27.02.03 p. 2/4

DakoCytomation Antibody Diluent, code S 0809. Les contrôles positifs et négatifs doivent être opérés simultanément avec l'échantillon du patient.

Révélation: DAKO LSAB™+/HRP kit, code K 0679, et DAKO EnVision™+/HRP kits, codes K 4004 et K 4006, sont requis. Pour les coupes en congélation et préparations cellulaires, DakoCytomation APAAP kit, code K 0670, est une alternative valable si le marquage endogène péroxydasique est à craindre. Suivre la procédure incluse avec le kit de révélation choisi.

Automatisation: L'anticorps est bien adapté au marquage immunocytochimique sur des plates-formes automatisées comme le DakoCytomation Autostainer.

Performances

Les cellules marquées par cet anticorps montre un marquage confiné à la membrane cellulaire (5).

Tissus normaux: L'anticorps marque les cellules érythroïdes normales à tous les stades de la différenciation, depuis les précurseurs normoblastes jusqu'aux érythrocytes matures (1).

Tissus anormaux: Dans 5 cas sur 5 d'érythroleucémie, l'anticorps a marqué fortement les cellules blastiques (60 à 80 % des cellules positives).

DEUTSCH

Zweckbestimmung

Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.

Monoclonal Mouse Anti-Human CD235a, Glycophorin A, Clone JC159, ist für den immunzytochemischen Gebrauch bestimmt. Der Antikörper markiert Zellen der erythrozytären Reihe in beinahe sämtlichen Stadien der Differenzierung und hat sich bei der Identifizierung der Erythroleukämie (1) als nützlich erwiesen. Die differentielle Identifizierung wird durch die mit einem Antikörper-Panel erhaltenen Resultate unterstützt. Die Interpretation muss unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren durch einen erfahrenen Pathologen erfolgen.

Synonyme Bezeichnungen des Antigens

CD235a, GPA, Sialoglycoprotein-Alpha (1, 2).

Einleitung

Glycophorin A ist ein "single pass" Membran-Sialoglykoprotein und Träger der Blutgruppenspezifitäten M und N. Das Gen ist auf dem Chromosom 4q28-q31 lokalisiert und teilt Sequenzhomologie mit Genen, die Glycophorin B und Glycophorin E kodieren (2). Glycophorin A wird von erythroïden Zellen exprimiert, beginnend mit der Expression auf morphologisch erkennbaren Erythroidvorläufern, unmittelbar nach dem CFU-E-Stadium bis hin zum reifen Erythrozyten. Sobald Glycophorin A maximal exprimiert ist, bleibt die Menge in jeder erythroïden Zelle konstant und scheint sich während der weiteren Maturation nicht zu verändern (3). In den überwiegenden Fällen von Erythroleukämie wird Glycophorin A auf neoplastischen Erythroblasten exprimiert, wohingegen akute myeloische Leukämie und akute lymphoblastische Leukämie nur selten Glycophorin A exprimieren (1, 4).

Geliefertes Reagenz

Der monoklonale Mausantikörper wird in flüssiger Form als Zellkulturüberstand geliefert, wurde gegen 0,05 mol/L Tris/HCl, pH-Wert 7,2 dialysiert und enthält 15 mmol/L NaN₃.

Klon: JC159 (1). **Isotyp:** IgG1, Kappa.

Maus-IgG-Konzentration: Siehe Produktetikett.

Immunogen

Membranzubereitungen aus Haarzellenleukämiezellen der Milz (1).

Spezifität

Durch Hämagglutination und Immunblotting wurde der Nachweis erbracht, dass der Antikörper mit einem formalinfixierten, paraffineingebetteten Resistenz-Epitope auf der extrazellulären Domäne des wahrscheinlich zwischen den Aminosäuren 27 und 40 lokalisierten Proteins reagiert. Der Antikörper markiert in starkem Umfang normale Zellen der erythrozytären Reihe in sämtlichen Stadien der Differenzierung vom Erythroblasten bis zum reifen Erythrozyten und reagiert nicht mit Glycophorin B (1).

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

Bei 2 – 8 °C lagern. Nicht nach dem auf dem Fläschchen 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 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.

Probenvorbereitung

Paraffinschnitte: Der Antikörper kann für die Markierung von paraffineingebetteten, formalinfixierten histologischen Schnitten genutzt werden. Eine Vorbehandlung der Gewebe mit Proteinase K oder hitzeinduzierter Epitopdemaskierung wird empfohlen. Für die hitzeinduzierte Epitopdemaskierung werden optimale Resultate erzielt mit DakoCytomation Target Retrieval Solution, pH 6,1, Code-Nr. S 1700, DakoCytomation Target Retrieval Solution, pH 9,9, Code-Nr. S 3308, 10 mmol/L Citratpuffer, pH 6,0, oder 10 mmol/L Trispuffer, 1 mmol/L EDTA, pH 9,0. Während der Gewebepreparation und während der anschließenden immunzytochemischen Färbeprozedur dürfen die Gewebeschnitte nicht austrocknen.

Gefrierschnitte und zytologische Präparate: Der Antikörper kann für die Markierung von azetonfixierten Gefrierschnitten und Zellausstrichen verwendet werden (1).

Färbeprozedur

Verdünnung: Monoclonal Mouse Anti-Human CD235a, Glycophorin A, Code-Nr. M 0819, kann bei einem Verdünnungsbereich von 1:50 – 1:400 eingesetzt werden, wenn es für formalinfixierte, paraffineingebettete Schnitte der humanen Tonsille genutzt wird und wenn 20 Minuten lang die hitzeinduzierte Epitopdemaskierung in 10 mmol/L Citrat-Puffer, pH 6,0, gefolgt von 30 Minuten Inkubation mit dem primären Antikörper bei Raumtemperatur, durchgeführt wird. Die optimalen Bedingungen schwanken je nach Probe und Methode der Probenvorbereitung und sollten von jedem einzelnen Labor bestimmt werden. Die empfohlene Negativkontrolle ist DakoCytomation Mouse IgG1, Code-Nr. X 0931, das auf dieselbe murine IgG-Konzentration wie der primäre Antikörper verdünnt wurde. Solange mit dem eigentlichen Testsystem die Stabilität des verdünnten Antikörpers und der Negativkontrolle nicht sichergestellt ist, wird empfohlen, diese Reagenzien unmittelbar vor Gebrauch zu verdünnen oder die Verdünnung mit DakoCytomation Antibody Diluent, Code-Nr. S 0809, vorzunehmen. Es sollten die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientenproben mitgeführt werden.

Visualisierung: Folgende Kits werden empfohlen: DAKO LSAB™+/HRP-Kit, Code-Nr. K 0679 und DAKO EnVision™+/HRP-Kits, Code-Nr. K 4004 und K 4006. Falls bei Gefrierschnitten und Zellpräparaten Probleme mit endogener Peroxidasefärbung auftreten, bietet der DakoCytomation APAAP Kit, Code-Nr. K 0670, eine gute Alternative. Es ist dem Verfahren zu folgen, das in den Anleitungen des genutzten Kits für die Visualisierung erläutert wird.

Automatisierung: Der Antikörper ist gut für das immunzytochemische Färben unter Nutzung automatisierter Plattformen wie beispielsweise des „Autostainer“ von DakoCytomation geeignet.

Leistungseigenschaften

Durch den Antikörper markierten Zellen zeigen auf die Zellmembran begrenzte Färbung.








Normalgewebe: Der Antikörper markiert gesunde Zellen der erythrozytären Reihe in sämtlichen Stadien der Differenzierung von den Prekursor-Normoblasten bis zu den reifen Erythrozyten (1).

Anomales Gewebe: In 5/5 Fällen von Erythroleukämie wurden die Blastenzellen stark vom Antikörper markiert (60-80% positive Zellen) (1).

References/ Références/ Literatur

- Erber WN, McLachlan J, Cordell JL, Turley H, Reid M, Mason DY. A new monoclonal antibody (JC159) that detects glycophorin A for the diagnosis of erythroleukaemia. *Hematol Rev* 1991;5:113-20.
- van der Schoot CE, Baardman R, Ligthart P, de Jong I, von dem Borne AEK, de Haas M. RC4. CD235a and CD235b – Glycophorin A and Glycophorin B. 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. 577-9.*
- Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow: I. Normal erythroid development. *Blood* 1987;69:255-63.
- Greaves MF, Sieff C, Edwards PAW. Monoclonal antiglycophorin as a probe for erythroleukemias. *Blood* 1983;61:645-51.

Explanation of symbols/ Légende des symboles/ Erläuterung der Symbole

 REF	Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	 2 °C – 8 °C	Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich		Manufacturer Fabricant Hersteller
 IVD	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-Vitro-Diagnostikum	 LOT	Batch code Code du Lot Chargenbezeichnung		
	Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten		Use by Utiliser jusque Verwendbar bis		