

Immunologie: Primärantikörper

Anti-Human CD90 (Thy-1) / Fibroblasten-Marker

Katalog-Nummer	Bezeichnung	ME	Preis/Euro*
DIA 100	Maus IgG1, kappa Anti-Human CD90 (Thy-1) / Fibroblasten-Marker, Klon AS02	200 µg	216,00
DIA 120	Maus IgG ₁ , kappa Anti-Human CD90 (Thy-1) / Fibroblasten-Marker, Klon AS02, FITC-konjugiert	1ml (100 Tests)	250,00

* inkl. Lieferung, zzgl. MwSt.

Immunogen:

Humane Hautfibroblasten

Spezifität

Humanes CD90 (Thy-1)(Nervenzellen, einige CD34-positive Blutstammzellen, Fibroblasten)

Speziesreaktivität

Human

Keine Reaktion mit Ratte (Fibroblastenkultur, FC), Maus (Fibrosarkom-Zelllinie L929, FC), Kaninchen (Haut, IH), Schwein (Haut, IH), Affe (Haut, IH), andere nicht getestet.

Katalog-Nr.:	DIA 120	Katalog-Nr.:	DIA 100
Produktform:	FITC-konjugiertes Maus IgG1 in 1 ml 15 mM PBS mit 2% BSA und 0,01% NaN ₃ , pH 7,4. Der Antikörper wurde durch Ionenaustauschchromatographie und Affinitätschromatographie mit HiTrap Protein G, Dialyse gegen PBS und Sterilfiltration aus Kulturüberstand gereinigt und in einem optimierten Standardverfahren an FITC gekoppelt. Ungekoppelter Farbstoff wurde gelchromatographisch entfernt.	Konzentration:	0,2 mg/ml
		Produktform:	200 µg Maus IgG1 in 1 ml 15 mM PBS mit 2% BSA und 0,01% NaN ₃ , pH 7,4. Der Antikörper wurde durch Ionenaustauschchromatographie und Affinitätschromatographie mit HiTrap Protein G, Dialyse gegen PBS und Sterilfiltration aus Kulturüberstand gereinigt (Reinheit > 95 % laut SDS-PAGE/Coomassie-Blau-Färbung).
Anwendungen	Verdünnung	Anwendungen	Verdünnung
Durchflusszytometrie (FC)	1:50-1:500 100 µl einer geeigneten Verdünnung für 5 x 10 ⁵ Zellen	Durchflusszytometrie (FC)	1:50 – 1:200
Immunfluoreszenz (IF)	1:50 – 1:100 100 µl einer geeigneten Verdünnung pro Gefrierschnitt (NICHT Paraffin) oder Monolayer fixierter Zellen	Gefrierschnitte (GS)	1:50 – 1:200
		Immunhistochemie (IH)	1:50 – 1:200
		Immunfluoreszenz (IF)	1:50 – 1:200
		Immunpräzipitation (IP) / Zellseparation	1:50 – 1:200
		Western Blot (WB), nativ	5 – 10 ng/ml
Die Verdünnungsangaben sind Richtwerte. Für spezielle Anwendungen sollte die optimale Verdünnung jeweils individuell bestimmt werden.		Die Verdünnungsangaben sind Richtwerte. Für spezielle Anwendungen sollte die optimale Verdünnung jeweils individuell bestimmt werden.	

Reaktivität

Der monoklonale Antikörper Klon AS02 bindet spezifisch an humanes CD90 (Thy-1), einem GPI-verankerten Glykoprotein der Immunglobulin-Superfamilie mit einem Molekulargewicht von 25 – 35 kDa (3). CD90 (Thy-1) wird im Menschen hauptsächlich von Nervenzellen exprimiert, darüber hinaus auf einer Subpopulation (20%) CD34-positiver Blutstammzellen und verschiedenen Fibroblasten (1-8), anders als bei Maus und Ratte allerdings nicht von Thymozyten und peripheren Blut T-Zellen. AS02 erkennt Fibroblasten unterschiedlichen Ursprungs, bindet jedoch nicht an humane Blutzellen, Keratinozyten, ruhende mikro- und makrovaskuläre Endothelzellen sowie Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibronectin, Kollagen Typ I, III, IV und Laminin. Deshalb eignet sich AS02 besonders zum Nachweis und zur Separation humaner Fibroblasten (2). Aktivierte Endothelzellen, nach Stimulation in vitro oder in Schnitten inflammatorischen Gewebes in vivo, können allerdings unterschiedlich starke AS02-Bindung aufweisen. Neuere Untersuchungen zeigen die Reaktion von AS02 mit aktivierten mikrovaskulären Endothelzellen (4,5), einer Subpopulation von Lungenfibroblasten (6), spezialisierten Lymphknoten-Fibroblasten, aber nicht Lymphozyten (7), sowie normalen als auch inflammatorischen Synovialfibroblasten im Menschen (8). Im Western Blot detektiert AS02 nicht reduziertes CD90 mit einer Bande bei 30 kDa (1,3).

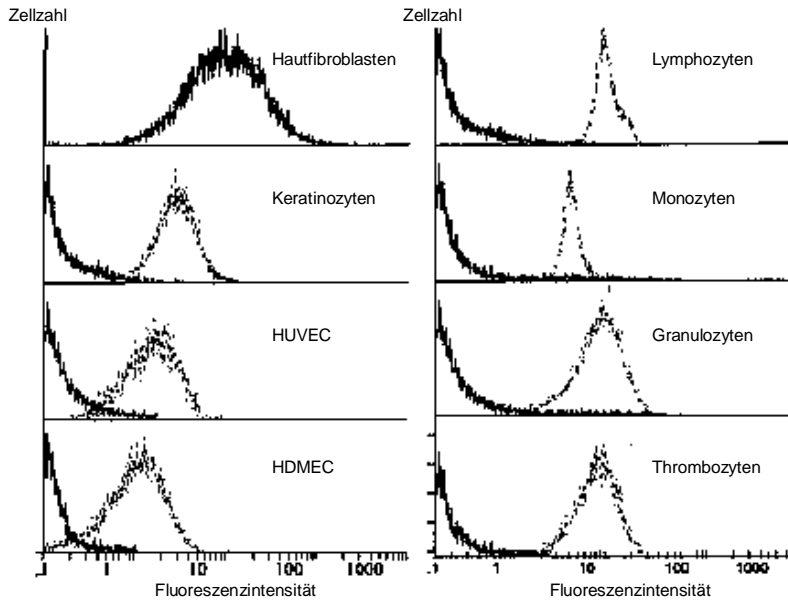
Reaktivität des Antikörpers AS02 in der Immunhistologie

Haut	Fibroblasten	+	Lymphknoten	Fibroblasten	+	
	Keratinozyten	-		Lymphozyten	-	
	Endothelzellen	-		Schilddrüse/ Leber/ Niere/ Gallenblasenwand	Fibroblasten	+
	Glatte Muskelzellen	-			Epithelzellen	-
	Drüsenzellen	-			Thyreozyten	-
	Makrophagen	-			Leberparenchym	-
	Langerhans-Zellen	-			Nierenparenchym	-
Knorpel	Chondrozyten	-	Tubulusepithelzellen	(+)		
			Plazenta	Fibroblasten (Mesenchym)	+	
Muskulatur	Glatte Muskulatur	-		Endothelzellen	-	
	Herzmuskulatur	-		Epithelzellen	-	
	Skelettmuskulatur	-	Gehirn	Nervenzellen	+	

Legende: + Bindung; (+) Markierung weniger Zellen; - keine Bindung

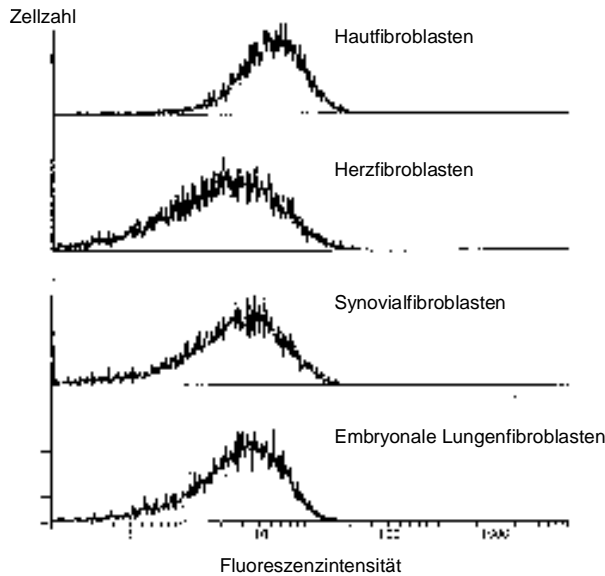
Reaktivität des Antikörpers AS02 in der Durchflusszytometrie

Die Bindung des monoklonalen Antikörpers AS02 an Fibroblasten wurde mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen bestätigt:



Durchflusszytometrische Analyse verschiedener Zelltypen mit dem Antikörper AS02.

Färbung von verschiedenen Typen humaner Zellen mit AS02 (—) im Vergleich zu einem Negativ-Kontrollantikörper (-----); HUVEC = makrovaskuläre humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen, HDMEC = mikrovaskuläre humane Haut-Endothelzellen.



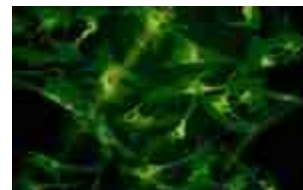
Durchflusszytometrische Untersuchungen an humanen Fibroblasten verschiedenen Ursprungs mit dem Antikörper AS02.

Färbung von verschiedenen Typen humaner Fibroblasten mit AS02 (—); die nur geringen Unterschiede in der mittleren Fluoreszenzintensität und damit der Bindungsstärke des monoklonalen Fibroblasten-Antikörpers AS02 belegen, dass dieser Antikörper auch Fibroblasten anderen Ursprungs sehr gut erkennt.

Anwendungshinweise

Anwendungsbereiche

- Durchflusszytometrie
- Laser Scanning Zytometrie
- **Keine** Färbung von Formaldehyd-fixierten Paraffinschnitten durch AS02
- Immunfluoreszenz: Ethanol-, Methanol- oder Aceton fixierte Zellen und Gefrierschnitte.



Immunofluoreszenz

1. Gefrierschnitte für 30 Minuten auf Raumtemperatur auftauen und anschließen für 10 Minuten in eiskaltem Aceton fixieren. Zellen direkt für 5 Minuten in eiskaltem Aceton fixieren. (alternativ ist eine Fixierung in Ethanol oder Methanol möglich).
2. Zellen/Schnitte dreimal je fünf Minuten in Waschpuffer waschen.
3. Optional: unspezifische Bindungen mit 5% FCS in PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur blockieren.
4. Für die Antikörper-Verdünnung FITC-konjugierten anti-CD90 Antikörper AS02 (DIA 120) 1:50 bis 1:100 in PBS/1%BSA verdünnen.
5. Zellen/Schnitte in ca. 50-100µl Antikörper-Lösung für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
6. Zellen/Schnitte dreimal je fünf Minuten in Waschpuffer waschen.
7. Zellen/Schnitte mit DAPI gegenfärben.
8. Eindecken der Zellen/Schnitte in Mountingmedium (80-90% Glycerol in PBS + 2,5% DABCO).
9. Lagerung der Objektträger bei 4 °C im dunkeln.

Durchflusszytometrie

1. Fibroblasten durch Zugabe von 0,025% Trypsin/0,01% EDTA oder 2,5mM/L EDTA/PBS und 5-10 Minütige inkubation bei 37°C ablösen.
2. Zellen zweimal mit kaltem PBS waschen und jeweils bei 200g für 5 Minuten sedimentieren.
3. Für die Antikörper-Verdünnung FITC-konjugierten anti-CD90 Antikörper AS02 (DIA 120) 1:50 bis 1:500 in PBS/1%BSA verdünnen und Zellen resuspendieren.
4. Ansatz für 45 Minuten bei 4°C im Dunklen inkubieren.
5. Zellen zweimal bis dreimal mit kaltem PBS waschen und jeweils bei 200g für 5 Minuten sedimentieren.
6. Zellen resuspendieren und direkt für die FACS-Analyse einsetzen oder für eine spätere Analyse (innerhalb 24 Stunden) in 1% neutral gepuffertem Formalin aufnehmen und bei 4°C im Dunkeln lagern.

Stabilität und Lagerung:

Lagerung unverdünnt bei 2-8°C. Bei geeigneter Lagerung ist der Antikörper 9 Monate stabil.

Literatur

1. Saalbach A, Aneregg U, Bruns M, Schnabel E, Herrmann K, Haustein UF. Novel fibroblast-specific monoclonal antibodies: properties and specificities. *J Invest Dermatol.* 106(6):1314-9, 1996.
2. Saalbach A, Aust G, Haustein UF, Herrmann K, Anderegg U. The fibroblast-specific MAb AS02: a novel tool for detection and elimination of human fibroblasts. *Cell Tissue Res* 290(3):593-9, 1997.
3. Saalbach A, Kraft R, Herrmann K, Haustein UF, Anderegg U. The monoclonal antibody AS02 recognizes a protein on human fibroblasts being highly homologous to Thy-1. *Arch Dermatol Res* 290(7):360-6, 1998.
4. Saalbach A, Wetzig T, Haustein UF, Anderegg U. Detection of human soluble Thy-1 in serum by ELISA. Fibroblasts and activated endothelial cells are a possible source of soluble Thy-1 in serum. *Cell Tissue Res* 298(2):307-15, 1999.
5. Saalbach A, Haustein UF, Anderegg U. A ligand of human thy-1 is localized on polymorphonuclear leukocytes and monocytes and mediates the binding to activated thy-1-positive microvascular endothelial cells and fibroblasts. *J Invest Dermatol* 115(5):882-8, 2000.
6. Hagood JS, Miller PJ, Lasky JA, Tousson A, Guo B, Fuller GM, McIntosh JC. Differential expression of platelet-derived growth factor-alpha receptor by Thy-1(-) and Thy-1(+) lung fibroblasts. *Am J Physiol* 277(1 Pt 1):L218-24, 1999.
7. Steiniger B, Barth P, Hellinger A. The perifollicular and marginal zones of the human splenic white pulp : do fibroblasts guide lymphocyte immigration? *Am J Pathol* 159(2):501-12, 2001.
8. Seemayer CA, Kuchen S, Kuenzler P, Rihoskova V, Rethage J, Aicher WK, Michel BA, Gay RE, Kyburz D, Neidhart M, Gay S. Cartilage destruction mediated by synovial fibroblasts does not depend on proliferation in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 162(5):1549-57, 2003

Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung mit AS02- und anti-Prolylhydroxylase-Antikörper auf kultivierten humanen Fibroblastenzellen dermalen Ursprungs.

Die sekundäre Markierung von AS02 mit DTAF-konjugiertem Ziege-anti-Maus (grüne Fluoreszenz) und vom anti-prolylhydroxylase Antikörper mit Cy3-konjugiertem Ziege-anti-Kaninchen (rote Fluoreszenz) (300-fache Vergrößerung) zeigt eine gleichmäßige Markierung der Zelloberfläche mit AS02 einschließlich der zahlreichen Pseudopodien. Eine verstärkte Färbung an Zell-Zell-Kontakten konnte nicht beobachtet werden.

Konfokale Laserscanning-Mikroskopie zeigt eine deutlich abgegrenzte Markierung der Zellmembran und zusätzlich eine diffuse zytoplasmatische Fluoreszenz, was darauf hindeutet, dass das Antigen hauptsächlich auf der Zelloberfläche, aber auch im Zytoplasma vorkommt.

Nur für Forschungs-, nicht für diagnostische Zwecke einsetzbar

dianova GmbH

Warburgstr. 45 | 20354 Hamburg

| www.dianova.de | Tel: 040 - 45067 0 | Fax: 040 - 450 45067 490