

CD45RA - Anticorpo Monoclonal anti-humano - Clone (SPM504)

Mouse anti-human CD45RA Monoclonal Antibody (Clone SPM504)

Código	EP-12-50733	1ml
• Diluição recomendada	:	1:50
• Validade e lote do produto	:	Ver frasco
• Temperatura de armazenamento	:	2 à 8°C (não congelar)
• Clone	:	SPM504
• Isotipo Ig	:	Camundongo IgG2a
• Imunógeno	:	Leucócitos humanos estimulados.
• Reatividade	:	RUO - (Humanos - não testados em outras espécies)
• Controle positivo	:	Amígdala ou seção de tecido linfonodal reativo.
• Marcação	:	Membrana celular

Aplicações conhecidas

Em Imuno-histoquímica (IHQ) para uso em tecidos embebidos em parafina. Não testado em tecidos congelados e técnicas de western-blotting.

Especificações:

Este anticorpo reage com a isoforma CD45RA com uma massa molecular de 220 kD. A CD45RA está presente nas células B do sangue periférico, manto folicular e centro, tímócitos medulares, monócitos e células T maduras que não foram moduladas por contato antigênico. A este respeito, e após o processamento imune no timo, as células T são libertadas para o sangue periférico para colonizar órgãos linfóides secundários, incluindo o baço, os nódulos linfáticos e o tecido linfóide associado à mucosa (MALT). Esses linfócitos, ainda não ativados *in vivo* por antígenos (células virgens), são fenotipicamente caracterizados pela co-expressão das isoformas de CD45 de maior massa molecular, CD45RAC e CD45RA e CD62L (receptor do linfonodo periférico) uma molécula decisiva para a fixação de células em áreas dependentes de timo de órgãos linfóides secundários. Quando estas células são estimuladas pelo seu antígeno específico expresso pelas correspondentes células apresentadoras de antígenos e são transformadas em células T efectoras, CD4 ou CD8 positivas ou células T de memória, a expressão de CD45RA e CD62L desaparece, sendo a primeira substituída pela isoforma inferior de massa molecular CD45RO, e a última, por várias integrinas tipo 1 e tipo 2 e receptor APO-1 / Fas (CD95), um indutor de apoptose. A molécula CD45, também chamada de antígeno comum de leucócitos, é uma glicoproteína de membrana que ocupa até 10% da superfície das células que a expressam. Nos mamíferos, sua homologia varia acentuadamente entre a região intracitoplasmática (maior que 90%) e a região extracelular (apenas 35%, embora com organização de domínio semelhante). Estruturalmente, existem múltiplas isoformas de CD45 determinadas pelas diferentes maneiras possíveis de se juntar os exons 4, 5 e 6 durante a síntese do mRNA que codifica o domínio extracelular da proteína. Essas isoformas são referidas como A, B e C, usando a terminologia RABC para a isoforma maior, que inclui todos os três exons, RA e RB quando a expressão exônica é restrita a um desses exons, e RO para designar a molécula menor, que não possui todos os três exons. A sequência destes três exons inclui múltiplos locais de glicosilação ligados ao oxigênio que podem ser variavelmente modificados pelo ácido siálico. Isto, por um lado, faz com que a massa molecular das diferentes isoformas varie entre 180 kD (RO) e 240 kD (RABC); por outro lado, dá a essas moléculas diferenças notáveis em termos de sua forma e carga aniônica. O resto do domínio extracelular do CD45 apresenta marcada glicosilação ligada a azoto e contém uma região rica em cisteína seguida de três repetições de aminoácidos análogos ao domínio de fibronectina de tipo III. O alto grau de glicosilação de CD45, atribuível ao ácido siálico e oligossacarídeos nos domínios variáveis e N-glicoconjugados no domínio extracelular constante, desempenha um papel importante na atividade funcional da molécula, como demonstrado pela interação entre CD45RO de células T e Células B que expressam CD22 ou os híbridos de manose em CD45 no desenvolvimento de tímócitos imaturos. O resto da molécula de CD45 consiste em um único domínio transmembrana seguido por uma cauda intracitoplasmática longa contendo dois domínios idênticos (D1 e D2) com homologia de proteína-tirosina fosfatase (PTPase). Destes domínios, apenas D1 possui atividade enzimica capaz de recuperar a ativação do sinal de TCR em linhas celulares deficientes em CD45. A função de D2 é dificilmente compreendida, embora pareça contribuir para a estabilidade intracitoplasmática da molécula. Embora em modelos *in vitro* o domínio extracelular de CD45 não seja essencial para sua função intracitoplasmática, a transcrição exônica deste domínio é fortemente regulada dependendo do tipo de célula que a expressa, seu desenvolvimento e seu grau de ativação, desempenhando assim um importante papel funcional *in vivo*. O epítipo CD45RA reconhecido pelo anticorpo MB1 é útil para o estudo de linfomas de células B; no entanto, como alguns deles não são positivos contra isso, é aconselhável usá-lo como parte de um grande painel de anticorpos. Como o epítipo reconhecido por MB1 pode ser alterado pela fixação prolongada de formol e, para assegurar uma interpretação correta dos resultados, é apropriado verificar se pelo menos algumas células B normais na seção histológica estão coradas. O anticorpo não mostra reatividade contra tímócitos corticais, células T imaturas e células B ativadas. Este anticorpo reage contra o tecido humano. Em outras espécies, não foi testado.

Armazenagem e estabilidade:

Armazenar entre 2°C e 8°C, porém o uso é feito em temperatura ambiente.

Conteúdo:

1. Ver frasco.

Notas técnicas importantes:

1. Evitar contato dos reagentes com os olhos e membranas mucosas. Caso os reagentes entrem em contato com áreas sensíveis lavar abundantemente com água.
2. Esse produto é prejudicial se ingerido.
3. Consulte as autoridades locais ou estaduais com relação ao método recomendado de descarte
4. Evitar a contaminação microbiana dos reagentes
5. Recomendado para uso em pesquisa (RUO)

Notas do protocolo:

A diluição ideal do anticorpo e protocolos para uma aplicação específica podem variar. Devido à sensibilidade superior destes reagentes exclusivos, os tempos de incubação recomendados não são aplicáveis a outros sistemas de detecção, pois os resultados podem variar. Os protocolos ideais para uma aplicação específica podem variar. Esses incluem, mas não estão limitados à fixação, método de recuperação de calor, tempos de incubação, diluição de anticorpos, espessura da secção de tecido. As recomendações e protocolos da literatura são baseados em uso exclusivo de produtos EasyPath. Em última análise, é responsabilidade do pesquisador para determinar as condições ideais. Este produto é apenas para uso profissional. A imuno-histoquímica é um processo de diagnóstico de múltiplas etapas que consiste em treinamento especializado na seleção dos reagentes apropriados, seleção de tecidos, fixação e em processamento, preparação da lâmina IHQ e interpretação do resultado de coloração. A utilização em tecido congelado não foi validado.

Protocolo:

- 1 - Desparafinização - Estufa 60-65 °C por 3 horas, depois bateria de Xilol e diluições decrescentes de álcool e lavar em água destilada
- 2 - Recuperação antigênica - Colocar 600ml de água destilada na câmara pressurizada MuscaePlus (EasyPath) e a(s) lâmina(s) no recipiente com tampão EDTA 10X pH8,5 (Recomendado EP-12-20553/6 EasyPath), tampar a câmara e deixar 15 minutos em 110° C, conforme pré-programado, esfriar em temperatura ambiente por 20 minutos no próprio tampão.
- 3 - Bloqueador de Peroxidase EasyPath por 5 minutos, lavar com TBS e em seguida secar a lâmina com papel macio.
- 4 - Anticorpo primário (Biocare ou EasyPath) por 30-60 minutos (Conforme padronização do laboratório), lavar com TBS e em seguida secar a lâmina com papel macio.
- 5 - Amplificador do anticorpo EasyPath por 15 minutos, lavar com TBS e em seguida secar a lâmina com papel macio.
- 6 - Polímero PolyFusion-HRP EasyPath por 30 minutos, lavar com TBS e em seguida secar a lâmina com papel macio. Nota: O polímero é sensível à luz. Evitar a exposição desnecessária.
- 7 - Preparar o DAB EasyPath com 15 minutos de antecedência (Proporção: 1ml de DAB Substrato para 1 gota de DAB Cromógeno).
- 8 - DAB EasyPath por 5 minutos, lavar com TBS, depois com lavar com água deionizada e secar a lâmina com papel macio.
- 9 - Potencializador do DAB EasyPath (etapa não obrigatória) por 2 minutos, lavar com TBS, depois com lavar com água deionizada e secar a lâmina com papel macio.
- 10 - Hematoxilina EasyPath por 1 minuto e lavar em água corrente por 1 minuto.
- 11 - Bateria de álcool e xilol.
- 12 - Montar a(s) lâmina(s).

INSTRUÇÕES GERAIS

Para a obtenção de um melhor resultado da metodologia e uma completa compreensão da terminologia utilizada, nós recomendamos as seguintes indicações:

Número de testes realizados *

O número mínimo de testes é calculado com 100µl gotas de reagente, aconselhamos seguir esta quantidade de reagentes. Em casos de seções pequenas, no entanto, pode-se utilizar menos.

Tempo de execução

O tempo de execução foi calculado somando-se a duração de todas as etapas do método. Ele não inclui o tempo de desparafinizar, hidratar e desidratar o corte.



Coloração final

A metodologia foi padronizada a uma temperatura média de 20°C e em condições normais de trabalho, utilizando-se os produtos indicados nesta literatura. Pode ocorrer uma pequena variação na coloração final, devido principalmente a variação da temperatura, ocorrendo esta variação, deve-se alterar o tempo utilizado em cada reagente, com o objetivo de intensificar ou diminuir a coloração.

Validade

Indica o tempo em que produto permanece inalterado a partir de sua fabricação, se armazenado adequadamente. Cada produto possui uma etiqueta com identificação do lote e data de vencimento.

Equipamento básico

Bandeja de incubação horizontal, comercializada pelo Grupo Erviegas, código EP-51-05022.

Câmara pressurizada MuscaePlus (EasyPath) para recuperação antigênica com controle de pressão, temperatura e tempo.

Duas séries de solventes, conforme metodologia de cada kit:

- DESCENDENTE: para desparafinizar e levar os cortes das seções para água destilada, composta de: xilol (x2), etanol absoluto (x2), etanol a 96%, etanol a 70% e água destilada.
- ASCENDENTE: para desidratar e limpar, composta de: etanol a 70%, etanol a 96%, etanol absoluto (x2) e xilol (x2).

Aconselhamos o uso do meio de montagem ERV-MOUNT, comercializado pela Grupo Erviegas código EP-51-05042 frasco com 500ml e EP-51-05041 frasco com 100ml.

Equipamento complementar

Podem-se ser utilizadas micropipetas para reduzir a quantidade de reagentes utilizados durante o processo, bem como outros sistemas de recuperação antigênica como micro-ondas, panela de pressão, banho maria ou sistema automatizados para imuno-histoquímica como intelliPATH (Biocare).

Fixação e meios de inclusão

Os tempos dos métodos foram determinados a partir de cortes histológicos de fragmentos fixados em formol tamponado com pH 7 com tampão fosfato e inclusos em parafina, pelo tempo mínimo de fixação (Recomendado – Histofix, fixador EasyPath). A utilização de outros fixados nas práticas histológicas comuns (piocromoformol de Bouin, B5), temperatura do processamento, inclusão e desparafinização podem interferir na metodologia e tempos de incubações.

Garantia Grupo Erviegas

O Grupo Erviegas garante o funcionamento do produto conforme especificado nesta literatura. Para mais informações sobre o produto ou detalhes sobre outras técnicas e produtos acesse nosso site www.grupoerviegas.com.br.

Referências Bibliográficas

1. Poppema S, Hollema H, Visser L, Vos H: Monoclonal antibodies (MT1, MT2, MB1, MB2, MB3) reactive with leukocyte subsets in paraffin-embedded tissue sections. *Am J Pathol.* 127:418-29 (1987).
2. Dobson CM, Myskow MW, Krajewski AS, Carpenter FH, Horne CH: Immunohistochemical staining of non-Hodgkin's lymphoma in paraffin sections using the MB1 and MT1 monoclonal antibodies. *J Pathol.* 153:203-12 (1987).
3. Myskow MW, Krajewski AS, Salter DM, Dobson CM, Miller EP: Paraffin section immunophenotyping of non-Hodgkin's lymphoma, using a panel of monoclonal antibodies. *Am J Clin Pathol.* 90:564-74 (1988).
4. Schmidt U, Herbst J, Metz KA, Leder LD: How to differentiate between T-cell-rich B-cell lymphoma and lymphocyte-predominant Hodgkin's disease. Evidence for the value of MB1 and 4KB5 immunostaining. *J Pathol.* 179:138-44 (1996).
5. Dutton RW, Bradley LM, Swain SL: T cell memory. *Annu Rev Immunol.* 16:201-23 (1998).
6. Van Lier RA, Baars PA: Assessing the replicative history of human T cells. *Mutat Res.* 17; 431:177-80 (1999).
7. Yu Y, Rabinowitz R, Polliack A, Ben-Bassat H, Schlesinger M: Hyposialated 185 kDa CD45RA+ molecules attain a high concentration in B lymphoma cells and in activated human B cells. *Eur J Haematol.* 68:22-30 (2002).
8. Hermiston ML, Xu Z, Weiss A: CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol.* 21:107-37 (2003)