

CD95 - Anticorpo Monoclonal anti-humano - Clone (EP208)

Rabbit anti-human CD95 Monoclonal Antibody (Clone EP208)

Código	EP-12-50893	1ml
• Diluição recomendada	:	1:50
• Validade e lote do produto	:	Ver frasco
• Temperatura de armazenamento	:	2 à 8°C (não congelar)
• Clone	:	EP208 ³
• Isotipo Ig	:	IgG
• Imunógeno	:	Um péptido sintético correspondente a resíduos da proteína CD95 humana.
• Reatividade	:	RUO - (Humanos - não testados em outras espécies)
• Controle positivo	:	Amígdalas para tecido normal.
• Marcação	:	Citoplasma e 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:

A proteína CD95 (Fas) é um receptor da superfície celular pertencente à família do fator de necrose tumoral (TNF) que traduz a sinalização de falecimento no acoplamento pelo ligante multimérico Fas (CD95L), dos quais existem oito na sua forma ligada à membrana ou na sua camada solúvel. forma resultante da clivagem por uma metaloproteinase putativa. O CD95 é uma proteína amplamente expressa. A apoptose mediada por CD95 é um mecanismo essencial para a manutenção da homeostase tecidual normal, e o rompimento dessa via de falecimento tem sido associado a uma ampla gama de doenças humanas, incluindo doenças autoimunes, distúrbios linfoproliferativos e malignidades. O sistema de falecimento FAS também desempenha um papel importante em várias condições de apoptose, tais como aquelas evocadas por irradiação, quimioterapia agentes e infecções virais. A expressão do CD95 serve como um marcador prognóstico na previsão do resultado da progressão da doença e tratamento em muitos tipos de tumores.

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 - Desparafinação - 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 desparafinar, 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.

Dois séries de solventes, conforme metodologia de cada kit:

- DESCENDENTE: para desparafinar 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 desparafinação 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. Inazawa J, Itoh N, Abe T, Nagata S. Assignment of the human Fas antigen gene (Fas) to 10q24.1. *Genomics*. 1992 Nov;14(3):821-2
2. Hueber AO. CD95: more than just a death factor? *Nat Cell Biol*. 2000 Feb;2(2):E23-5. Erratum in: *Nat Cell Biol* 2000 Mar;2(3):E50
3. Chen L, Park SM, Tumanov AV, Hau A, Sawada K, Feig C, Turner JR, Fu YX, Romero IL, Lengyel E, Peter ME. CD95 promotes tumour growth. *Nature*. 2010 May 27;465(7297):492-6. doi: 10.1038/nature09075. Erratum in: *Nature*. 2011 Mar 10;471(7337):254. *Nature*. 2011 Jul 14;475(7355):254. *Nature*. 2012 Nov 29;491(7426):784
4. Aspinall AI, Pinto A, Auer IA, Bridges P, Luider J, Dimnik L, Patel KD, Jorgenson K, Woodman RC. Identification of new Fas mutations in a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) and eosinophilia. *Blood Cells Mol Dis*. 1999 Jun-Aug;25(3-4):227-38
5. Verbeke CS, Wenthe U, Grobholz R, Zentgraf H. Fas ligand expression in Hodgkin lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2001 Mar;25(3):388-94
6. Botti C, Buglioni S, Benevolo M, Giannarelli D, Papaldo P, Cognetti F, Vici P, Di Filippo F, Del Nonno F, Venanzi FM, Natali PG, Mottolese M. Altered expression of FAS system is related to adverse clinical outcome in stage I-II breast cancer patients treated with adjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2004 Feb 15;10(4):1360-5
7. Wang WS, Chen PM, Wang HS, Liang WY, Su Y. Matrix metalloproteinase-7 increases resistance to Fas-mediated apoptosis and is a poor prognostic factor of patients with colorectal carcinoma. *Carcinogenesis*. 2006 May;27(5):1113-20
8. Shanmugam MP, Lakshmi A, Biswas J, Krishnakumar S. Prognostic significance of Fas expression in retinoblastoma. *Ocul Immunol Inflamm*. 2003 Jun;11(2):107-13
9. Yamana K, Bilim V, Hara N, Kasahara T, Itoi T, Maruyama R, Nishiyama T, Takahashi K, Tomita Y. Prognostic impact of FAS/CD95/APO-1 in urothelial cancers: decreased expression of Fas is associated with disease progression. *Br J Cancer*. 2005 Sep 5;93(5):544-51
10. Eser B, Sari I, Canoz O, Altuntas F, Cakmak E, Ozturk A, Ozkan M, Er O, Cetin M, Unal A. Prognostic significance of Fas (CD95/APO-1) positivity in patients with primary nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Hematol*. 2006 May;81(5):307-14
11. Takeshita M, Imayama S, Oshiro Y, Kurihara K, Okamoto S, Matsuki Y, Nakashima Y, Okamura T, Shiratsuchi M, Hayashi T, Kikuchi M. Clinicopathologic analysis of 22 cases of subcutaneous panniculitis-like CD56- or CD56+ lymphoma and review of 44 other reported cases. *Am J Clin Pathol*. 2004 Mar;121(3):408-16