

p62 – Anticorpo Monoclonal anti-humano – Clone (3/P62 LCK LIGAND)

Mouse anti-human P62 Monoclonal Antibody (Clone 3/P62 LCK LIGAND)

Código	EP-12-52363	1ml
• Diluição recomendada	:	1:100
• Validade e lote do produto	:	Ver frasco
• Temperatura de armazenamento	:	2 à 8°C (não congelar)
• Clone	:	3/P62 LCK LIGAND
• Isotipo Ig	:	IgG1
• Imunógeno	:	Polipeptídio correspondente a 257-437 do ligando p62Lck humano.
• Reatividade	:	RUO – (Humanos – não testados em outras espécies)
• Controle positivo	:	Secção do fígado com hialina de Mallory. Carcinoma hepatocelular.
• Marcação	:	Citoplasma 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 reconhece a fosfotirosina p62, um membro da família c-src das quinases citoplasmicas, que se liga como um ligando aos domínios SH2 de p56 (Lcr) na ausência de fosfotirosina. p62 / SQSTM1 é uma proteína adaptadora direcionada aos agregados proteicos ubiquitinados pela degradação lisossomal. p62 / SQSTM1 é seletivamente degradado pela via autofágica. Os corpos hialinos de Mallory e hialinos intracelulares estão associados a doenças hepáticas crônicas não neoplásicas (esteato-hepatite, relacionada ou não ao abuso de álcool; colestase crônica tóxica ou metabólica) e a doenças hepáticas neoplásicas, como o carcinoma hepatocelular. Essas inclusões estão relacionadas e contêm agregados de queratina, especialmente queratina 8, ubiquitina, proteínas de choque térmico, e a proteína adaptadora de estresse p62, estabilizada por ligações catalisadas por transglutaminases. O P62 liga-se à ubiquitina e age como um adaptador para ligar as proteínas ubiquitinadas. A autofagia é um mecanismo evolutivo altamente conservado que afeta os componentes do citoplasma e contribui para a homeostase ao possibilitar a substituição de organelas. Ao contrário do sistema ubiquitina-proteassoma, o mecanismo de autofagia ocorre em múltiplas etapas que incluem a formação do fagóforo, que aprisiona proteínas e organelas para sua degradação. e o autofagossomo, que, através de mecanismos que envolvem os microtúbulos do citoesqueleto, se funde com os lisossomas para formar autolisossomos, onde o material é eventualmente degradado. Este anticorpo é útil para a identificação da p62, encontrada nos corpos hialinos de Mallory e hialinos intracelulares presentes nas hepatopatias crônicas e nos carcinomas hepatocelulares. Também é útil detectar p62 em vacúolos autofágicos presentes em várias doenças neuromusculares neurodegenerativas, infecciosas neoplásicas e inflamatórias.

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 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. Kuusisto E, Kauppinen T, Alafuzoff I. Use of p62/SQSTM1 antibodies for neuropathological diagnosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*; 34: 169-180. 2008.
2. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*; 132: 27-42. 2008.
3. Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P. Autophagy in health and disease. 1. Regulation and significance of autophagy: An overview. *Am J Physiol Cell Physiol*; 298: C776-785. 2010.
4. Denk H, Stumptner C, Fuchsichler A, Müller T, Farr G, Müller W, Terracciano L, Zatloukal K. Are the Mallory bodies and intracellular hyaline bodies in neoplastic and non-neoplastic hepatocytes related? *J Pathol*; 208(5): 653-661. 2006.
5. Komatsu M, Ichimura Y. Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS Lett*; 584: 1374-1378. 2010.
6. Lee HS, Daniels BH, Salas E, Bollen AW, Debnath J, Margeta M. Clinical Utility of LC3 and p62 Immunohistochemistry in Diagnosis of Drug-Induced Autophagic Vacuolar Myopathies: A Case-Control Study. *PLoS One*; 7(4): e36221. 2012.