

Anticorpo Monoclonal CD20 – Clone (L26)*Mouse Anti-CD20 Monoclonal Antibody (Clone L26)*

Código	EP-12-50543	1ml	Concentrado
•	Diluição recomendada	:	1:100
•	Validade e lote do produto	:	Ver frasco
•	Temperatura de armazenamento	:	2 à 8°C (não congelar)
•	Clone	:	L26
•	Isotipo Ig	:	Camundongo IgG2a/ kappa.
•	Imunógeno	:	Células B das amígdalas humanas.
•	Reatividade	:	RUO – (Humanos – não testados em outras espécies)
•	Controle positivo	:	Amígdalas
•	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:

O CD20 é um antígeno de diferenciação não LG das células B e a expressão de CD20 é restrita às células B normais e neoplásicas, estando ausente de todos os outros leucócitos e tecidos. Atua como canal de cálcio envolvido na ativação de células B e na progressão do ciclo celular. O anticorpo é útil para identificar malignidades linfóides de células B, quer sejam linfoma não-Hodgkin, leucemias linfocíticas B agudas ou crônicas e leucemia de células pilosas. Além disso, o anticorpo anti-CD20 cora as células tumorais do subtipo nodular predominante de linfócitos da doença de Hodgkin e, ocasionalmente, as células Reed-Sternberg de outras variantes histológicas da doença de Hodgkin clássica.

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 entrarem 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 1 hora, 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 (Muscae Plus/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 Muscae Plus (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. Hokland P, Ritz J, Schlossman SF, Nadler LM: Orderly expression of B cell antigens during the in vitro differentiation of nonmalignant human pre-B cells. J Immunol. 1985; 135:1746-51
2. Golay JT, Clark EA, Beverley PC: The CD20 (Bp35) antigen is involved in activation of B cells from the G0 to the G1 phase of the cell cycle: J Immunol. 1985; 135:3795-801.
3. Cartun RW, Coles FB, Pastuszak WT: Utilization of monoclonal antibody L26 in the identification and confirmation of B-cell lymphomas. A sensitive and specific marker applicable to formalin-and B5-fixed, paraffin-embedded tissues. Am J Pathol. 1987; 129:415-21.
4. Linder J, Ye Y, Armitage JO, Weisenburger DD: Monoclonal antibodies marking B-cell non-Hodgkin's lymphoma in paraffin-embedded tissue. ModPathol. 1988; 1:29-34.
5. Tedder TF, Streuli M, Schlossman SF, Saito H: Isolation and structure of a cDNA encoding the B1(CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988; 85:208-12.
6. Tedder TF, Klejman G, Schlossman SF, Saito H: Structure of the gene encoding the human B lymphocyte differentiation antigen CD20 (B1). J Immunol. 1989; 142:2560-8.
7. Tedder TF, Distech CM, Louie E, Adler DA, Croce CM, Schlossman SF, Saito H: The gene that encodes the human CD20 (B1) differentiation antigen is located on chromosome 11 near the t(11;14)(q13;q32) translocation site. J Immunol. 1989; 142:2555-9.
8. Mason DY, Comans-Bitter WM, Cordell JL, Verhoeven MA, van Dongen JJ: Antibody L26 recognizes an intracellular epitope on the B-cell-associated CD20 antigen. Am J Pathol. 1990; 136:1215-22.
9. Quintanilla-Martinez L, Preffer F, Rubin D, Ferry JA, Harris NL: CD20+ T-cell lymphoma. Neoplastic transformation of a normal T-cell subset. Am J Clin Pathol. 1994; 102: 483-9. Davis TA, Czerwinski DK, Levy R: Therapy of B-cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression. Clin Cancer Res. 1999; 5:611