

Claudina-1 - Anticorpo Policlonal anti-humano

Rabbit anti-human Claudin-1 Antibody (Polyclonal)

| Código | EP-12-50963 | 1ml |
|--------------------------------|-------------|---|
| • Diluição recomendada | : | 1:50 |
| • Validade e lote do produto | : | Ver frasco |
| • Temperatura de armazenamento | : | 2 à 8°C (não congelar) |
| • Clone | : | Policlonal |
| • Isotipo Ig | : | Coelho IgG |
| • Imunógeno | : | Peptídeo sintético correspondente ao C-terminal da Claudina humana 1. |
| • Reatividade | : | RUO - (Humanos - não testados em outras espécies) |
| • Controle positivo | : | Rim normal |
| • 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:

As proteínas Claudin são uma família de proteínas associadas a junções apertadas. Junções apertadas são regiões especializadas de contato célula à célula; composto de rede de fios para atuar como uma junta molecular para evitar o vazamento de íons, água etc. entre as células. São abundantes nas folhas epiteliais luminais, onde mantêm a polaridade das células epiteliais. Diferentes tecidos exibem diferentes composições de Claudina.

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 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. Halford S, Spencer P, Greenwood J, Winton H, Hunt DM, Adamson P. Assignment of claudin-1 (CLDN1) to human chromosome 3q28-->q29 with somatic cell hybrids. *Cytogenet Cell Genet*; 88: 217. 2000.
2. Miwa N, Furuse M, Tsukita S, Niikawa N, Nakamura Y, Furukawa, Y. Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol. Res*; 12: 469-476. 2001.
3. Martin TA, Jiang WG. Tight junctions and their role in cancer metastasis. *Histol & Histopathol*; 16: 1183-1195. 2001.
4. Billings SD, Walsh SV, Fisher C, Nusrat A, Weiss SW, Folpe AL. Aberrant expression of tight junction-related proteins ZO-1, claudin-1 and occludin in synovial sarcoma: an immunohistochemical study with ultrastructural correlation. *Mod Pathol*; 17: 141-149. 2004.
5. Rajaram V, Brat DJ, Perry A. Anaplastic meningioma versus meningeal hemangiopericytoma: immunohistochemical and genetic markers. *Hum Pathol*; 35: 1413-1418. 2004.
6. Dhawan P. Singh AB, Deane NG, No Y, Shiou SR, Schmidt C, Neff J, Washington MK, Beauchamp RD. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest*; 115: 1765-1776. 2005.
7. Resnick MB, Gavilanez M, Newton E, Konkin T, Bhattacharya B, Britt DE, Sabo E, Moss SF. Claudin expression in gastric adenocarcinomas: a tissue microarray study with prognostic correlation. *Hum Pathol*; 36: 886-892. 2005.
8. Schuetz AN, Rubin BP, Goldblum JR, Shehata B, Weiss SW, Liu W, Wick MR, Folpe AL. Intercellular junctions in Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor: additional evidence of epithelial differentiation. *Mod Pathol*; 18: 1403-1410. 2005.
9. Shiou SR, Singh AB, Moorthy K, Datta PK, Washington MK, Beauchamp RD, Dhawan P. Smad4 regulates claudin-1 expression in a transforming growth factor-beta-independent manner in colon cancer cells. *Cancer Res*; 67: 1571-1579. 2007.
10. Kleinberg L, Holth A, Fridman E, Schwartz I, Shih leM, Davidson B. The diagnostic role of claudins in serous effusions. *Am J Clin Pathol*; 127: 928-937. 2007.
11. Paschoud S, Bongiovanni M, Pache JC, Citi S. Claudin-1 and claudin-5 expression patterns differentiate lung squamous cell carcinomas from adenocarcinomas. *Mod Pathol*; 20: 947-954. 2007.
12. Szabó I, Kiss A, Schaff Z, Sobel G. Claudins as diagnostic and prognostic markers in gynecological cancer. *Histol & Histopathol*; 24: 1607-1615. 2009.
13. Thway K, Fisher C, Debiec-Rychter M, Calonje E. Claudin-1 is expressed in perineurioma-like low-grade fibromyxoid sarcoma. *Hum Pathol*; 40: 1586-1590. 2009.
14. Ouban A, Ahmed AA. Claudins in human cancer: a review. *Histol Histopathol*. 25(1): 83-90. 2010.
15. Wang X, Tully O, Ngo B, Zitin M, Mullin JM. Epithelial tight junctional changes in colorectal cancer tissues. *Scientific World Journal*; 11: 826-841. 2011.