

**Granzyme B – Anticorpo Monoclonal anti-humano – Clone (GrB-7)***Mouse anti-human Granzyme B Monoclonal Antibody (Clone GrB-7)***Código**                      **EP-12-51573**                      **1ml**

|                                |   |                                                   |
|--------------------------------|---|---------------------------------------------------|
| • Diluição recomendada         | : | 1:50                                              |
| • Validade e lote do produto   | : | Ver frasco                                        |
| • Temperatura de armazenamento | : | 2 à 8°C (não congelar)                            |
| • Clone                        | : | GrB-7                                             |
| • Isotipo Ig                   | : | IgG2a                                             |
| • Imunógeno                    | : | -                                                 |
| • Reatividade                  | : | RUO – (Humanos – não testados em outras espécies) |
| • Controle positivo            | : | Baço                                              |
| • Marcação                     | : | Citoplasma granular                               |

**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 granzima humana B. A granzima B é uma serina protease neutra que é armazenada em grânulos especializados dos linfócitos T citotóxicos (CD8) e células NK. A partir de células CD8 de murgancho e células NK, um grupo de granzimas denominadas alfabeticamente (A-G) que estão envolvidas na apoptose mediada por linfócitos citotóxicos foi identificado e clonado. A exocitose de grânulos que contêm granzima no citoplasma das células-alvo leva à fragmentação do DNA e subsequente apoptose. A granzima B foi localizada nas células positivas de Reed-Sternberg para o EBV na doença de Hodgkin. Este anticorpo é recomendado na localização dos grânulos líticos que contêm Granzyme B e na caracterização das células CD8 e NK ativadas.

**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 (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 horizontal, 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](http://www.grupoerviegas.com.br).

**Referências Bibliográficas**

1. Kummer JA, Kamp AM, Tadema TM, Vos W, Meijer CJ, Hack CE. Localization and identification of granzymes A and B-expressing cells in normal human lymphoid tissue and peripheral blood. *Clin. Exp. Immunol.* 100 :164-172 (1995).
2. Oudejans JJ, Kummer JA, Jiwa M, van der Valk P, Ossenkoppele GJ, Kluin PM, Kluin-Nelemans JC, Meijer CJ. Granzyme B expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin 's disease. *American Journal of Pathology.* 148(1):233-240 (1996).
3. Pham C T and Ley T J. The role of granzyme B cluster proteases in cell-mediated cytotoxicity. *Semin Immunol.* 9(2):127-133 (1997).
4. Oudejans JJ, Jiwa NM, Kummer JA, Ossenkoppele GJ, van Heerde P, Baars JW, Kluin PM, Kluin-Nelemans JC, van Diest PJ, Middeldorp JM, Meijer CJ. Activated cytotoxic T cells as prognostic marker in Hodgkin 's disease. *Blood.* 89(4):1376-1382 (1997).
5. de Bruin PC, Connolly CE, Oudejans JJ, Kummer JA, Jansen W, McCarthy CF, Meijer CJ. Enteropathy-associated T-cell lymphomas have a cytotoxic T-cell phenotype. *Histopathology.* 31 :313-317 (1997).
6. Cho MS, Lee MK, Yang WI, Yoon JH. Granzyme B immunoreactivity in T/natural killer cell lymphomas. *Yonsei Med. J.* 38(5):285-293 (1997).
7. Andrade F, Roy S, Nicholson D, Thornberry N, Rosen A, Casciola-Rosen L. Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implications for CTL-induced apoptosis. *Immunity.* 8(4):451-460 (1998).