

MAP-2 – Anticorpo Monoclonal anti-humano – Clone (AP20)

Mouse anti-human MAP-2 Monoclonal Antibody (Clone AP20)

Código	EP-12-51943	1ml
• Diluição recomendada	:	1:100
• Validade e lote do produto	:	Ver frasco
• Temperatura de armazenamento	:	2 à 8°C (não congelar)
• Clone	:	AP20
• Isotipo Ig	:	Camundongo IgG1
• Imunógeno	:	Proteína de microtúbulos cerebrais bovinos.
• Reatividade	:	RUO – (Humanos – não testados em outras espécies)
• Controle positivo	:	Córtex cerebral ou medula espinhal.
• Marcação	:	Corpos celulares neuronais e dendritos

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 MAP-2 (proteína 2 associada aos microtúbulos) é uma das várias proteínas de alto peso molecular que desempenham um papel importante na montagem dos microtúbulos do neurônio cerebral. Além de sua associação com microtúbulos, a MAP-2 associa-se a neurofilamentos e filamentos de actina, sugerindo que ela pode guiar a interação entre microtúbulos, outros elementos do citoesqueleto e organelas citoplasmáticas. MAP-2 é um marcador rigoroso para neurônios. Além disso, o MAP-2 apresenta especificidade intracelular. No sistema nervoso central, a MAP-2 está confinada a corpos celulares e dendritos neuronais. Há exceções, no entanto, onde alguns axônios se marcam positivamente para pequenas quantidades de MAP-2. A MAP-2 é uniformemente distribuída por toda a célula quando expressa pela primeira vez em neurônios cultivados, mas se torna seletivamente localizada à medida que o desenvolvimento dendrítico ocorre.

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 Citrato pH6 (Recomendado EP-12-20557/8 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 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 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. Blanchart, A., et al., J. Comparative Neurology (2006) 496:529-543.
2. Bossolasco, P. et al. (2005). Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro. Exp. Neurol. 193(2): 312-325.
3. Siman, R. et al. (2004). Proteins released from degenerating neurons are surrogate markers for acute brain damage. Neurobiol. Dis. 16: 311-320.
4. Quilty, MC et al (2003). Localization of alpha, beta, and gamma synuclein during neuronal development and alterations associated with the neuronal response to axonal trauma. Exp Neurol 182: 195-207.
5. Hevner, R., et al. (2001). Tbr1 regulates differentiation of the preplate and layer 6. Neuron 29: 353-366.
6. Wang, HF Liu FC (2001). Developmental restriction of the LIM homeodomain transcription factor Islet-1 expression to cholinergic neurons in the rat striatum.. Neuroscience 103: 999-1016.
7. Dotti, C.G. et al. (1987). The expression and distribution of the microtubule-associated proteins tau and microtubule-associated protein 2 in hippocampal neurons in the rat in situ and in cell culture. Neurosci. 23(1): 121-130.
8. Binder, L. I. et al. (1986). Differential localization of MAP-2 and tau in mammalian neurons in situ. Ann. N.Y. Acad. Sci. 466: 145-166.
9. Caceres, A. et al. (1986). Immunocytochemical localization of tubulin and microtubule-associated protein 2 during the development of hippocampal neurons in culture. J. Neurosci. 6(3): 714-722.
10. Binder, L.I. et al. (1984). Heterogeneity of microtubule-associated protein 2 during rat brain development. PNAS USA 81(17): 5613.
11. Caceres, A. et al. (1984). Differential subcellular localization of tubulin and the microtubule-associated protein MAP2 in brain tissue as revealed by immunocytochemistry with monoclonal hybridoma antibodies. J. Neurosci. 4(2): 394-410.
12. Falini, B. & Taylor, C.R. (1983). Arch. Path. Lab. Med. 107: 105.
13. Theurkauf, W. E. and Vallee, R. B. (1983). Extensive cAMP-dependent and cAMP-independent phosphorylation of microtubule-associated protein 2. J. Biol. Chem. 258(12): 7883-7886.
14. Towbin, H. et al. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose