

p53 – Anticorpo Monoclonal anti-humano – Clone (SP5)

Rabbit anti-human p53 Monoclonal Antibody (Clone SP5)

Código	EP-12-52343	1ml
• Diluição recomendada	:	1:50
• Validade e lote do produto	:	Ver frasco
• Temperatura de armazenamento	:	2 à 8°C (não congelar)
• Clone	:	SP5
• Isotipo Ig	:	Coelho IgG
• Imunógeno	:	Proteína p53 de tipo selvagem humano de comprimento completo recombinante.
• Reatividade	:	RUO – (Humanos – não testados em outras espécies)
• Controle positivo	:	Mama e cólon
• Marcação	:	Nuclear

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 p53 é um gene supressor de tumor expresso em uma ampla variedade de tipos de tecido e está envolvido na regulação do crescimento, replicação e apoptose celular. O gene p53 está localizado no cromossomo 17p, uma localização freqüente na perda de alelos em muitos tumores, como pulmão, cólon, mama e cérebro. A expressão da p53 está associada a um mau prognóstico no câncer de mama. Nos tumores do cólon, a proteína p53 é expressa em 47% dos cânceres e em apenas 9% dos adenomas. Além disso, as mutações da p53 estão associadas a um grande número de tumores malignos, incluindo ovariano, bexiga e melanomas. Nos tumores ginecológicos, a grande maioria dos carcinomas serosos expressa o p53 nuclear e pode ser usada para orientar o diagnóstico.

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 - 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 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 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 desparafinação 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. Banks L, Matlashewski G and Crawford L. Isolation of human p53 specific monoclonal antibodies and their use in human p53 expression. *European Journal of Biochemistry*. 159: 529-534 (1986).
2. Cattoretti G, Rilke F, Andreola S, D'Amato L, Delia D. p53 expression in breast cancer. *International Journal of Cancer*. 41: 178-183 (1988).
3. Lane D P and Benchimol S. p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes and Development*. 4: 1-8 (1990).
4. Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet*. 335(ii): 675-679 (1990).
5. Gannon JV, Greaves R, Iggo R, Lane DP. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO Journal*. 9: 1595-1601 (1990).
6. Purdie CA, O'Grady J, Piris J, Wyllie AH, Bird CC. p53 expression in colorectal tumours. *American Journal of Pathology*. 138: 807-813 (1991).
7. Vojtěšek B, Bártek J, Midgley CA, Lane DP. An immunochemical analysis of human nuclear phosphoprotein p53: new monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *Journal of Immunological Methods*. 151: 237-244 (1992).
8. Moreno Sierra J, López García Asenjo JA, Redondo González E, Fernández Pérez C, Maestro de las Casas ML, Blanco Jiménez E, Silmi Moyano A, Resel Estévez L. Usefulness of p53 oncoprotein immunohistochemistry in the follow-up of bladder carcinoma: a 5-year study. *Arch. Esp. Urol*. 52 (8):840-848 (1999).
9. Tweddle DA, Malcolm AJ, Cole M, Pearson AD, Lunec J. p53 cellular localization and function in neuroblastoma. *American Journal of Pathology*. 158 (6): 2067-2077 (2001).
10. Takes RP, Baatenburg deJong RJ, Wijffels K, Schuurin E, Litvinov SV, Hermans J, van Krieken JH. Expression of genetic markers in lymph node metastases compared with their primary tumours in head and neck cancer. *Journal of Pathology*. 194: 298-302 (2001).
11. Lam KY, Lo CY, WatNM, Luk JM, Lam KS. The clinicopathological features and importance of p53, Rb, and mdm2 expression in pheochromocytomas and paragangliomas. *Journal of Clinical Pathology*. 54: 443-448 (2001).