

Pan Citoqueratina – Anticorpo Monoclonal anti-humano*Mouse anti-human Pan Cytokeratin Monoclonal Antibody (Clone BS5)***Código** **EP-12-52423** **1ml**

- Diluição recomendada : 1:50
- Validade e lote do produto : Ver frasco
- Temperatura de armazenamento : 2 à 8°C (não congelar)
- Clone : BS5
- Isotipo Ig : Camundongo IgG1
- Imunógeno : -
- Reatividade : RUO – (Humanos – não testados em outras espécies)
- Controle positivo : Fígado ou TMA de diferentes tecidos contendo epitélio.
- 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:

As citoqueratinas são filamentos intermediários estruturais codificados em mais de 49 genes diferentes nos cromossomos 17 (I) e 12 (II). A nomenclatura adotada em 1982 por Moll e Franke atribui as classificações 1 a 8 para as citoqueratinas tipo II (neutras ou básicas) e entre 9 e 21 para as tipo I (ácidas). Hoje em dia, uma nomenclatura análoga foi definida para nomear a queratina do cabelo com a adição das letras Ha e Hb para separar as do grupo I do grupo II. Estruturalmente falando, as citoqueratinas compartilham com o restante dos filamentos intermediários um eixo central de 310 aminoácidos composto de quatro domínios α -hélices (1A, 1B, 2A e 2B) altamente preservados que definem o tipo de filamento intermediário que eles comporão após o seu empacotamento, separados por três locais de ligação “não-hélice” (L1, L12 e L2) e dois domínios extremos altamente diferentes em tamanho e sequência (cabeça-1 e cauda-2-), cada um deles com regiões constantes (E1 / E2), variáveis (V1 / V2) e homologia (H1 / H2), a última são característicos das queratinas tipo II e ausentes do tipo I. Geralmente, as queratinas se reúnem em heterodímeros I / II e são co-expressas em pares especificamente em cada tecido. O anticorpo detecta citoqueratina de amplo espectro, é usado para o reconhecimento de epitélios estratificados simples, cornificados e não-cornificados e para neoplasias originadas nos mesmos. O anticorpo foi recomendado pelo NordiQC para a detecção de queratinas em epitélios simples ou complexos, normais e tumorais.

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 (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 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 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. Kovarik J, Rejthar A, Lauerová L, Vojtěšek B, Bártková J. Monoclonal antibodies against individual cytokeratins in the detection of metastatic spread. *Int J Cancer Suppl.* 3:50 AM-5 (1988).
2. Vojtěšek B, Stasková Z, Nenutil R, Lauerová L, Kovarik J, Rejthar A, Bártková J, Bártek J. Monoclonal antibodies recognizing different epitopes of cytokeratin No.18. *Folia Biol (Praha).* 35(6):373-82 (1989).
3. Hatzfeld M, Weber K. Tailless keratins assemble into regular intermediate filaments in vitro. *J Cell Sci.* 97 (Pt 2):317-24 (1990).
4. Bártek J, Vojtěšek B, Stasková Z, Bártková J, Kerekés Z, Rejthar A, Kovarik J. A series of 14 new monoclonal antibodies to keratins: characterization and value in diagnostic histopathology. *J Pathol.* 164(3):215-24 (1991).
5. Hatzfeld M, Weber K. A synthetic peptide representing the consensus sequence motif at the carboxy-terminal end of the rod domain inhibits intermediate filament assembly and disassembles preformed filaments. *J Cell Biol.* 116(1):157-66 (1992).
6. Gabriel M, Obrebowska A, Spaczyński M. Bone marrow involvement in ovarian cancer by immunohistochemical assessment. *Ginekol Pol.* 70(11):819-23 (1999).
7. http://www.nordiqc.org/protocol_view.php?id=629

