

Fosfo-histona H3 – Anticorpo Policlonal anti-humano

Rabbit Polyclonal Anti-Human Phospho-Histone H3 (PHH3) - (Polyclonal)

Código	EP-12-52533	1ml
• Diluição recomendada	:	1:200
• Validade e lote do produto	:	Ver frasco
• Temperatura de armazenamento	:	2 à 8°C (não congelar)
• Clone	:	Policlonal
• Isotipo Ig	:	Coelho IgG
• Imunógeno	:	-
• Reatividade	:	RUO – (Humanos – não testados em outras espécies)
• Controle positivo	:	Amígdala
• Marcação	:	O anticorpo mostra coloração nuclear, para a interpretação, núcleos com coloração granular fina devem ser ignorados.

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 fosfohistona H3 (phh3) é a forma fosforilada da histona nuclear H3, que, juntamente com este último, forma o principal componente proteico da cromatina em células eucarióticas. Em células de mamíferos, a fosfohistona H3 é insignificante durante a interfase, mas atinge sua expressão máxima na mitose, mais precisamente na transição entre as fases G2 e M tardias do ciclo celular. Estudos imuno-histoquímicos mostraram que o anticorpo PHH3 detecta especificamente a histona nuclear H3 apenas quando a fosforilação da proteína ocorre no nível da serina 10 ou da serina 28. Esses estudos também mostraram que essa fosforilação durante a apoptose não ocorre na histona H3, de modo que a presença da molécula phh3 pode servir como um bom marcador para separar figuras mitóticas dos corpos apoptóticos e do detrito da cariotreia nuclear. e é provável que constitua uma ferramenta útil para classificação de tumores, estratificação de tratamento e acompanhamento de tumores, especialmente em tumores do SNC, pele, pulmão, esôfago, mama, tecido mole, gastrointestinal e ginecológico estromais. De fato, estudos recentes deram à PHH3 maior importância e relevância do que o Ki- 67 na identificação de figuras mitóticas e maior reprodutibilidade intra e inter nos casos de melanoma.

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. Gurley, LR et al. Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells. *Eur J Biochem* 1978; 84:1-15.
2. Hendzel, MJ et al. Chromatin condensation is not associated with apoptosis. *J Biol Chem* 1998;273:24470-8.
3. Colman, H et al. Assessment and prognostic significance of mitotic index using the mitosis marker phospho-histone H3 in low and intermediate-grade infiltrating astrocytomas. *Am J Surg Pathol* 2006;30:657-64.
4. Nasr, MR & El-Zammar, O. Comparison of pHH3, Ki-67, and survivin immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol* 2008; 30:117-22.
5. Kim, YJ et al. Prognostic significance of the mitotic index using the mitosis marker anti-phosphohistone H3 in meningiomas. *Am J Clin Pathol* 2007; 128:118-25.
6. Tsuta K, Liu DC, Kalthor N, Wistuba II, Moran CA. Using the mitosis-specific marker antiphosphohistone H3 to assess mitosis in pulmonary neuroendocrine carcinomas. *Am J Clin Pathol*. 2011 Aug;136(2):252-9.
7. Schimming TT, Grabellus F, Roner M, Pechlivanis S, Sucker A, Bielefeld N, Moll I, Schadendorf D, Hillen U. pHH3 immunostaining improves interobserver agreement of mitotic index in thin melanomas. *Am J Dermatopathol*. 2012 May;34(3):266-9.
8. Ladstein RG, Bachmann IM, Straume O, Akslen LA. Prognostic importance of the mitotic marker phosphohistone H3 in cutaneous nodular melanoma. *J Invest Dermatol*. 2012 Apr;132(4):1247-52.
9. Brunner A, Riss P, Heinze G, Brustmann H. pHH3 and survivin are co-expressed in high-risk endometrial cancer and are prognostic relevant. *Br J Cancer*. 2012 Jun 26;107(1):84-90.