FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein

Klon DO-7

Ready-to-Use

(Dako Omnis)

Kód GA616

Použití

Pro diagnostiku in vitro.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein, Ready-to-Use (Dako Omnis) je určen pro použití v imunohistochemii (IHC) společně s přístrojem Dako Omnis. Tato protilátka značí standardní a mutační proteiny p53 a je vhodná pro vyšetřování akumulace p53 v lidských neoplaziích (1, 2). Diferenční klasifikaci nádorů napomáhají výsledky z panelu protilátek. Klinickou interpretaci zbarvení nebo jeho nepřítomnosti je třeba doplnit morfologickým vyšetřením s využitím patřičných kontrol a vyhodnotit s přihlédnutím k pacientově klinické anamnéze a k dalším diagnostickým testům provedeným kvalifikovaným patologem. Tato protilátka je určena k použití po primární diagnóze tumoru provedené konvenční histopatologií za použití neimunologických histochemických zbarvení.

Souhrn a výklad

p53 je nukleární fosfoprotein s molekulární hmotností 53 kDa. Protein p53 divokého typu se nachází v různých normálních buňkách, tento protein má však velmi krátký poločas rozpadu a proto je přítomný jen v minutových množstvích (1), všeobecně pod detekční úrovní imunohistochemických metod (3). Somatická mutace genu *p53* je velmi častým jevem v rámci vývoje lidské neoplazie, a protože mutační proteiny p53 jsou o mnoho stabilnější, než standardní proteiny p53, mutační protein p53 se akumuluje do vysokých úrovní (1). Akumulace proteinu p53 byla zpozorována v 76% z 212 případů lidských maligních lézí, včetně karcinomů prsu, tlustého střeva a žaludku, melanomu, embryonálního karcinomu varlat, přechodového karcinomu močového měchýře, karcinomu dělohy a sarkomů měkké tkáně (4).

Standardní protein p53 funguje jako faktor transkripce, t. j. jako modulátor, který může důležité geny zapnout nebo vypnout. Též potlačuje replikaci DNA a představuje kontrolní bod kontrolní molekuly buněčného cyklu. Protein p53 se kromě uvedeného aktivuje i v rámci regulace apoptózy. V rámci transfekčních testů se protein *p53* divokého typu chová jako supresor nádoru, zatímco mutační p53 se chová jako dominantní transformační onkogen (1).

V příručce *General Instructions for Immunohistochemical Staining (Obecné pokyny pro imunohistochemické barvení) společnosti Dako* nebo v návodu k systému detekce pro IHC metody naleznete informace týkající se těchto témat: Princip metody, Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky, Skladování, Příprava vzorku, Postup barvení, Kontrola kvality, Řešení problémů, Interpretace zabarvení, Obecná omezení.

Dodávaná reagencie

Monoklonální myší protilátka připravená k použití se dodává v kapalné podobě v pufru s obsahem stabilizujícího proteinu a 0,015 mol/l azidu sodného.

Klon: DO-7 (1). Izotyp: IgG2b, kappa.

Imunogen

Rekombinantní lidský protein p53 divokého typu (1).

Specificita

V rámci analýzy Western blot lyzátu buněčné linie lidského vulválního karcinomu A431 tato protilátka značí pruh s molekulovou hmotností 53 kDa, což odpovídá mutačnímu typu p53, který se nachází v A431. Epitop rozpoznaný touto protilátkou se nachází mezi N–koncovými aminokyselinami 1 a 45 a pravděpodobně i mezi aminokyselinami 37 a 45 lidského proteinu p53 (1).

Analýza SDS-PAGE imunousazenin vytvořených mezi lyzátem buněčné linie rakoviny prsu BT474 a protilátkou vykazuje reakci s proteinem 53 kDa, což koresponduje s p53 (1).

V rámci imunohistochemie tato protilátka značí mutantní typ p53 v buněčné linii A431 a divoký typ p53 v buněčné linii SVK14 (SV40-transformovaná linie keratinocytů) (1).

Bezpečnostní opatření

1. Pro diagnostiku in vitro.
2. Určeno pro profesionální uživatele.
3. Tento výrobek obsahuje azid sodný (NaN_3), který je v čisté formě vysoce toxický. Koncentrace azidu sodného v produktu není sice klasifikována jako nebezpečná, nicméně sloučenina může reagovat s olovem a mědí v odpadním potrubí a vytvářet vysoce explozivní azidy těchto kovů. Při likvidaci splachujte dostatečným množstvím vody, aby nedocházelo k usazování azidů kovů v potrubí.
4. Jako u každého výrobku biologického původu je nutno dodržovat řádná bezpečnostní opatření.
5. Používejte odpovídající osobní ochranné prostředky, aby nedošlo k zasažení očí nebo pokožky.
6. Nespotřebované roztoky je nutno likvidovat v souladu s místními a celostátními předpisy.

Uchovávání

Skladujte při teplotě 2-8 °C. Během skladování musí být víčko uzavřené. Nepoužívejte po datu exspirace uvedeném na lahvičce. Aplikační stabilita je 375 hodin. Aplikační stabilitu sleduje software Dako Omnis. Pokud se reagencie skladují za jakýchkoli jiných než uvedených podmínek, musí uživatel tyto podmínky ověřit. Případná nestabilita výrobku se neprojevuje žádnými známkami. Proto je nutno provádět současně s testováním vzorků pacienta pozitivní a negativní kontroly. Pokud zpozorujete neočekávané zabarvení, které nelze vysvětlit změnami laboratorních postupů, a máte podezření, že se jedná o problém s protilátkou, obraťte se na technickou podporu společnosti Dako.

Šablona protokolu barvení*

Krok		Komentáře
Fixace/zalití	Fixováno ve formalínu, zalito v parafínu	Odstranění parafínu v přístroji
Předběžné zpracování	EnVision FLEX, FLEX, High pH (kód GV804)	30 min HIER
Protilátka	Ready-to-use	20minutová inkubace
Negativní kontrola	FLEX Negative Control, Mouse (kód GA750)	20minutová inkubace
Vizualizace	EnVision FLEX (kód GV800)	Blok: 3 min; Polymer: 20 min; Chromogen: 5 min
Kontrastní barvivo	Hematoxylin (kód GC808)	3minutová inkubace
Kontrolní tkáň	Tlusté střevo a adenokarcinom tlustého střeva	Nukleární zabarvení
Sklíčka	FLEX IHC Microscope Slides (kód K8020)	Doporučeno kvůli lepší přilnavosti řezů tkání k podložním sklům.
Montáž	Je vyžadována bezvodá permanentní montáž	Po barvení je třeba řezy dehydratovat, vyčistit a montovat za použití permanentní montážní metody
Vybavení	Dako Omnis	Činidla se dodávají v ampulkách určených pro příslušný přístroj

**Uživatel se musí vždy seznámit s podrobnými pokyny k barvicímu postupu a s pokyny týkajícími se zacházení s produktem, které jsou uvedené v příbalové informaci.*

Příprava vzorku

Parafinové řezy: Protilátku lze používat k značení řezů tkání fixovaných ve formalínu a zalitých v parafínu. Vzorky tkání je nutno rozřezat na řezy o tloušťce 4 µm.

Předběžné zpracování: Je vyžadováno předběžné zpracování tkáňových řezů fixovaných ve formalínu a zalitých v parafínu tepelně indukovaným vyhledáváním epitopu (HIER). Doporučuje se předběžné zpracování tkání HIER pomocí naředěného roztoku EnVision

FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Dako Omnis), kód GV804. Odstranění parafínu, rehydratace a vyhledání cíle se provádějí v přístroji Dako Omnis. Viz Základní uživatelská příručka Dako Omnis.

Přístroj Dako Omnis zajistí, aby tkáňové řezy během předběžného zpracování a následného imunohistochemického barvení nevyschly. Z důvodu vyšší přilnavosti řezů tkání k podložním sklům se doporučuje používat podložní skla FLEX IHC Microscope Slides, kód K8020.

Postup barvení

Program: V softwaru přístroje Dako Omnis jsou předem naprogramovány kroky barvení a inkubační doby. Podrobné pokyny ke vkládání podložních skel a plnění činidel naleznete v Základní uživatelské příručce Dako Omnis. Pokud není v systému Dako Omnis připraven protokol, kontaktujte technickou podporu výrobce Dako. Všechny kroky inkubace se provádějí při teplotě 32 °C v přístroji Dako Omnis.

Vizualizace: Doporučený vizualizační systém je EnVision FLEX, High pH, (Dako GV800 Plus), kód GV800. Vizualizace se provádí v přístroji Dako Omnis.

Kontrastní barvení: Doporučené kontrastní barvivo je Hematoxylin (Dako Omnis), kód GC808. Kontrastní barvení se provádí v přístroji Dako Omnis.

Montáž: Po provedení barvení v přístroji Dako Omnis se řezy musí dehydratovat, vyčistit a namontovat pomocí permanentní montážní metody.

Kontrola kvality: Tkáně pro pozitivní a negativní kontroly a také činidlo pro negativní kontrolu je nutno testovat vždy současně použitím stejného protokolu jako vzorky pacienta. Tkáň pro pozitivní kontrolu musí obsahovat tlusté střevo a adenokarcinom tlustého střeva a mandle a buňky/struktury musí zobrazovat vzor reakce, jak je stanoveno pro tuto tkáň v části „Charakteristiky účinnosti“. Doporučené činidlo pro negativní kontrolu je FLEX Universal Negative Control, Mouse (Dako Omnis), kód GA750.

Interpretace zbarvení

Buňky označené protilátkou všeobecně vykazují nukleární zabarvení, v některých případech se však vykazuje cytoplazmatické zabarvení (5).

Charakteristiky účinnosti

Normální tkáně: V normálním a reaktivním mezotelu protilátka označila 0/40 případů, v 27 mezoteliomech byly normální buňky (např. fibroblasty) a endotelové buňky negativní (2). V tlustém střevu vykazovaly jen rozptýlené benigní základní epitelové buňky slabou až středně silnou reakci zabarvení jádra.

Abnormální tkáně: Ve folikulárním lymfomu byla zpozorována narůstající akumulace p53 v centroblastech s morfologickou progresí vedoucí k tomu, že 1/16 případů stupně I, 10/21 případů stupně II a k 6/6 případů stupně III bylo značeno (4). V mezoteliomech tato protilátka označila 7/26 případů epitelového typu (1 až 25 % označených buněk), 1/7 případů smíšeného typu (25 až 50 % označených buněk) a 1/3 případů mezenchymálního typu (více než 75 % označených buněk) (2). Neoplastické buňky v adenokarcinomu tlustého střeva vykazují středně silnou až silnou reakci zabarvení jádra.

Literatura

1. Vojtěšek B, Bártek J, Midgley CA, Lane DP. An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. J Immunol Methods 1992; 151:237-44.
2. Ramael M, Lemmens G, Eerdekens C, Buysse C, Deblier I, Jacobs W, et al. Immunoreactivity for p53 protein in malignant mesothelioma and non-neoplastic mesothelium. J Pathol 1992; 168:371-5.
3. Cooper K, Haffajee Z. bcl-2 and p53 protein expression in follicular lymphoma. J Pathol 1997; 182:307-10.
4. Bártek J, Bártková J, Vojtěšek B, Stašková Z, Lukáš J., Rejthar A, et al. Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. Oncogene 1991; 6:1699-703.
5. Kontogeorgos G, Kapranos N, Thodou E, Sambaziotis D, Tsagarakis S. Immunocytochemical accumulation of p53 in corticotroph adenomas: Relationship with heat shock proteins and apoptosis. Pituitary 1999; 1:207-12.

Vysvětlivky k symbolům

REF	Katalogové číslo	2 °C 8 °C	Teplotní rozmezí od do		Použitelné do
IVD	In vitro diagnostický zdravotnický prostředek	LOT	Číslo šarže		Výrobce
	Viz návod k použití	EC REP	Autorizovaný zástupce v Evropské unii		

Agilent Technologies Singapore (International) Pte Ltd.
No. 1 Yishun Avenue 7
Singapore, 768923
Tel. +44 161 492 7050
www.agilent.com

Revize 2020.11