

**FLEX**  
**Monoclonal Mouse**  
**Anti-Human p63 Protein**  
Clone DAK-p63  
**Ready-to-Use**  
(Dako Omnis)

**Kód GA662**

<b>Použití</b>	<p>Pro diagnostiku in vitro.</p> <p>FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human p63 Protein, Clone DAK-p63, Ready-to-Use (Dako Omnis) je určen pro použití v imunohistochemii, společně s přístrojem Dako Omnis. Tato protilátka značí buňky exprimující p63 v normálních a neoplastických tkáních fixovaných ve formalínu a zalitých v parafínu (FFPE). 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 pro primární diagnóze nádoru provedené konvenční histopatologií za použití neimunologických histochemických zbarvení.</p>
<b>Synonyma antigenu</b>	Nádorový protein (p63).
<b>Souhrn a výklad</b>	<p>Protein p63 patří do genové rodiny p53, do které patří také p73. Gen p63 kóduje několik izoform: izoformy, které obsahují amino-terminální doménu se silnou transaktivací (izoformy TAp63) a izoformy bez této domény (izoformy ΔNp63) (1–2). I když izoformy TAp63 mohou transaktivovat cílové geny p53, např. Bax a p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, a indukovat apoptózu a zastavení buněčného cyklu (3), není P63 považován za nádorový supresor (2). Tyto izoformy ΔNp63 působí dominantně negativním způsobem kompeticí s cílovými geny p53 a nepřímo podporují růst buněk tím, že působí proti apoptóze a aktivaci zastavení buněčného cyklu pomocí izoform TAp63 a p53 (3-5).</p> <p>P63 lze nalézt v neinvazivních epiteliálních nádorech, zatímco ztrátu exprese p63 lze nalézt v invazivnějších nádorech, což ukazuje, že ztráta p63 urychluje tumorigenezi a metastázy (3).</p> <p>Často se stává, že nádory mají simultánní transkripční up regulaci izoformy TAp63 i ΔNp63 s tím, že ΔNp63 převládá na úrovni proteinů. Některé rakoviny plic a spinocelulární karcinomy hlavy a krku vykazují nadměrnou expresi proteinu p63 spojenou s mírným zvýšením počtu kopií genu p63, ale hlavními izoformami p63 jsou izoformy ΔNp63. Také u karcinomu nosohltanu a spinocelulárního karcinomu jícnu jsou izoformy ΔNp63 hlavními izotypy (2).</p> <p>Lokalizace proteinu p63 převládá v bazálních buňkách normálního epitelu v ektocervixu, jícnu, prostatě, kůži, mandlích, uterulu a vagině, v bazálních buňkách žlázových struktur prsu, průduškách a prostatě. Protein p63 je exprimován v myoepiteliálních buňkách prsu (2).</p> <p>V příručce <i>General Instructions for Immunohistochemical Staining</i> (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 zbarvení, obecná omezení.</p>
<b>Dodávaná reagensie</b>	<p>Monoklonální myší protilátka připravená k použití se dodává v kapalné podobě v pufru s obsahem stabilizujícího proteinu a 0,015 mol/l azidu sodného.</p> <p><u>Klon:</u> DAK-p63. <u>Izotyp:</u> IgG2a, kappa.</p>
<b>Imunogen</b>	Syntetický peptid odvozený z DNA-vazebné domény lidského proteinu p63 v jádru buňky.
<b>Specifita</b>	V analýze Western Blot detekuje protilátka pásma podle očekávaných molekulárních hmotností a podle vzorců exprese různých izoform (izoformy TAp63 a ΔNp63) p63 v lyzátu buněčných linií HCC1806 u skvamózního karcinomu a rakoviny tlustého střeva.
<b>Bezpečnostní opatření</b>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Pro diagnostiku in vitro.</li><li>2. Určeno pro profesionální uživatele.</li><li>3. Tento výrobek obsahuje azid sodný (NaN<sub>3</sub>), 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.</li><li>4. Jako u každého výrobku biologického původu je nutno dodržovat řádná bezpečnostní opatření.</li><li>5. Používejte odpovídající osobní ochranné prostředky, aby nedošlo k zasažení očí nebo pokožky.</li><li>6. Nespotřebované roztoky je nutno likvidovat v souladu s místními a celostátními předpisy.</li></ol>
<b>Uchovávání</b>	Uchovávejte při 2–8 °C. Během skladování musí být víčko uzavřené. Nepoužívejte po datu expirace uvedeném na lahvičce. Aplikační stabilita je 375 hodin. Aplikační stabilitu sleduje software Dako Omnis. Pokud se činidla skladují za jakýchkoli jiných než uvedených podmínek, musí uživatel tyto podmínky ověřit. Případná nestabilita výrobku by se neprojevila žádnými známkami. Proto je nutno provádět současně s testováním vzorků pacienta pozitivní a negativní kontroly. Pokud zpozorujete neočekávané zbarvení, 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	Reagencie	Protokol
Deparafinizace	Clearify™ (kód GC810)	Výchozí
Předběžné zpracování	EnVision FLEX, Low pH (kód GV805)	30minutové tepelně indukované vyhledávání epitopu
Primární protilátka	Ready-to-Use (kód GA662)	25minutová inkubace
Činidlo pro negativní kontrolu	FLEX Negative Control, Mouse (kód GA750)	25minutová inkubace
Vizualizace	EnVision FLEX (kód GV800)	Blok: 3 min; Polymer: 20 min; Chromogen: 5 min
Kontrastní barvivo	Hematoxylin (kód GC808)	3minutová inkubace
Montáž	Je vyžadována bezvodá permanentní montáž	Po vyjmutí nutno dehydratovat, vyčistit a namontovat
Kontrola kvality	Tkáň	Barvicí vzor
Kontrolní tkáň	Mandle	Nuclear. Cytoplazmatické zbarvení bylo též hlášeno u abnormální tkáně

\*Uživatel se musí vždy seznámit s používanými činidly, která jsou uvedena v příbalové informaci, a vyhledat si podrobnosti v uživatelských příručkách Dako Omnis.

**Příprava vzorku**

**Parafinové řezy:** Protílátku lze používat ke značení řezů tkání fixovaných ve formalínu a zalitých v parafínu. Vzorky tkání je nutno rozřezat na řezy o tloušťce 4 µm. Z důvodu vyšší přilnavosti řezů tkání k podložním sklům se doporučuje používat podložní skla FLEX IHC Microscope Slides, kód K8020.

**Postup barvení**

Odstranění parafínu, vyhledání cíle, imunohistochemické barvení a kontrastní barvení se provádějí v přístroji Dako Omnis. V softwaru přístroje Dako Omnis jsou předem naprogramovány kroky barvení a inkubační doby. Pokud není v systému Dako Omnis připraven protokol, lze jej stáhnout ze stránky *Dako Omnis Protocol Update* (Aktualizace protokolu Dako Omnis) na webu [www.agilent.com](http://www.agilent.com). Podrobné pokyny ke vkládání podložních skel a plnění činidel naleznete v Základní uživatelské příručce Dako Omnis.

Přístroj Dako Omnis zajistí, aby tkáňové řezy během předběžného zpracování a následného imunohistochemického barvení nevyschly.

**Předběžné zpracování:** Odstranění parafínu z tkáňových řezů FFPE se provádí pomocí roztoku Clearify™, kód GC810. Doporučuje se vyhledávání cíle s tepelně indukovaným vyhledáváním epitopu (HIER) pomocí naředěného roztoku EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis), kód GV805.

**Vizualizace:** Doporučený vizualizační systém je EnVision FLEX, High pH (Dako Omnis), kód GV800.

Poznámka: Pro HIER použijte EnVision FLEX Target Retrieval Solution, **Low pH** (50x) (Dako Omnis), kód GV805.

**Kontrastní barvení:** Doporučené kontrastní barvivo je Hematoxylin (Dako Omnis), kód GC808.

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

**Kontrola kvality**

Pozitivní a negativní kontroly a také činidlo pro negativní kontrolu je nutno provádět vždy současně použitím stejného protokolu jako vzorky pacienta. Tkáň pro pozitivní kontrolu musí obsahovat 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 Negative Control, Mouse, (Dako Omnis), kód GA750.

**Interpretace zbarvení**

Buněčný barvicí vzor je nukleární. Cytoplazmatické zbarvení bylo též hlášeno u abnormální tkáně (6).

**Charakteristiky účinnosti**

**Normální tkáň:** Skvamózní epitelální buňky v mandlích vykazují středně silnou až silnou nukleární reakci zbarvení, zatímco endotelální buňky vykazují slabou až středně silnou reakci zbarvení.

**Reaktivita normální tkáně (7).**

Typ tkáně (počet testovaných)	Pozitivní prvky tkáně	Typ tkáně (počet testovaných)	Pozitivní prvky tkáně
Brzlík (3)	3/3 Epitelální buňky	Periferní nervy (3)	0/3
Děloha (3)	1/3 Endometriální buňky podpůrné vazivové tkáně (<5 %) 1/3 Endometriální buňky žláz (<5 %)	Plice (3)	3/3 Bazální buňky v průduškách a bronchiolech (>90 %)
Děložní hrdlo (3)	1/3 Glandulární epitelální buňky (<10 %) 1/3 Glandulární epitelální buňky (především bazální buňky) (<10 %) 1/3 Glandulární epitelální buňky vč. bazálních buněk (>20 %) 2/3 Buňky povrchového epitelu (skvamózní buněčný epitel) (>90 %)	Prostata (3)	3/3 Bazální/myoepitelové buňky (>90 %)
Hypofýza (3)	0/3	Prs (3)	3/3 Bazální/myoepitelové buňky (>90 %)
Játra (3)	0/3	Příštítná tělíska (3)	0/3
Jícen (3)	3/3 Povrchové epitelální buňky (>50 %→60 %) 1/3 Bazální/myoepitelové buňky ve žlázách (>90 %)	Slezina (3)	0/3
Kosterní sval (3)	0/3	Slinná žláza (3)	3/3 Bazální/myoepitelové buňky (>75 %)
Kostní dřev (3)	0/3	Srdce (3)	0/3
Kůže (3)	3/3 Buňky povrchového epitelu (skvamózní buněčný epitel)	Štítná žláza (3)	1/3 Thyroidní epitelální buňky (<5 %)









	(>90 %) 3/3 Bazální/myoepitelové buňky (>90%)		
Ledvina (3)	0/3	Tenké střevo (3)	0/3
Mandle (3)	3/3 Skvamózní epitelální buňky (>75 %)	Tračník (3)	0/3
Mozek, malý mozek (3)	0/3	Vaječník (3)	0/3
Mozek, velký mozek (3)	0/3	Varlata (3)	3/3 Spermatoocyty (<5 %) 2/3 Pravděpodobně Leydigovy buňky (<5 %)
Nadledvina (3)	1/3 Buňky nadledvinek (<10 %)	Výstelkové buňky (hrudní stěna, břišní stěna, perikard, povrch gastrointestinální soustavy, vzorky srdce a/nebo plic) (3)	0/3
Pankreas (3)	0/3	Žaludek (3)	1/3 Epitelové buňky v povrchovém epitelu (50 %)

**Abnormální tkáně:** Tato protilátka označila bazální buňky u 10/10 hyperplazií prostaty a myoepitelové buňky u 5/5 karcinomů prsu in situ. Tato protilátka označila 6/6 spinocelulárních karcinomů plic, 6/6 spinocelulárních karcinomů děložního čípku, 0/10 karcinomů prostaty, 3/6 karcinomů prsu, 4/6 adenokarcinomů děložního hrdla a 4/6 adenokarcinomů plic (8).

#### Literatura

1. Marin MC, Kaelin WG, Jr. p63 and p73: old members of a new family. *Biochimica et biophysica acta*. 2000;1470(3):M93-M100.
2. Moll UM, Slade N. p63 and p73: Roles in Development and Tumor Formation. *Mol Cancer Res* 2004;2:371-386.
3. Melino C. p63 is a tumor suppressor of tumorigenesis and metastasis interacting with mutant p53. *Cell Death and Diff.* 2011;18:1487-99.
4. Di Como CJ, Marshall J, Babayan I, Drobnjak M, Hedvat CV, Teruya-Feldstein J, et al. p63 expression profiles in normal and tumor tissues. *Clin Cancer Res* 2002;8:494-501.
5. Courtois S, de Fromentel CC, Hainaut P. p53 protein variants: structural and functional similarities with p63 and p73. *Oncogene* 2004;23, 631-8.
6. Narahashi T, Niki W, Wang T, Goto A, Matsubara D, Funata N, et al. Cytoplasmic localization of p63 is associated with poor patient survival in lung adenocarcinoma. *Histopathology* 2006;49:349-57.
7. Dako in-house test. Report D42127.
8. Dako in-house documentation D14507.

#### 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
 i	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