

**Monoclonal Mouse  
Anti-Human  
Prostein  
Klon 10E3**

**Kód M3615**

<b>Použití</b>	<p>K diagnostice in vitro.</p> <p>Protilátka Monoclonal Mouse Anti- Human Prostein, Clone 10E3 je určena pro použití v imunohistochemii. Tato protilátka je užitečná při identifikaci adenokarcinomů prostaty (1). Klinikou interpretaci zbarvení nebo jeho nepřítomnosti je třeba doplnit morfoloickým vyšetřením s využitím patřičných kontrol a vyhodnotit s přihlednutím k pacientově klinické anamnéze a k dalším diagnostickým testům provedeným kvalifikovaným patologem.</p>
<b>Synonyma antigenu</b>	P501S (2)
<b>Souhrn a vysvětlení</b>	<p>Monoklonální myši anti- prostein rozpoznává protein aminokyseliny 553, který byl identifikován subtrakcí z cDNA knihovny v konjunkci s vysoce výkonným skríníngem mikroarray adenokarcinomu prostaty (3). Prostein, rovněž nazývaný protein P501S, je protein typu IIIa plazmatické membrány, u něhož se prokázala výhradní exprese v buňkách normální a maligní prostaty pomocí Northern blot, cDNA mikroarray technologie, metody PCR v reálném čase a imunohistochemie (1, 3). Expres prosteinu nebyla detekována v jiných normálních nebo maligních glandulárních tkáních s výjimkou 2/35 uroteliálních karcinomů, kde bylo slabé imunologické barvivo, přítomné v méně než 25% nádorových buněk (1, 3, 4).</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.</p>
<b>Dodávaná reagensie</b>	<p>Monoklonální myši protilátka se dodává v kapalné podobě jako supernatant buněčných kultur obsahující 0,05 mol/L Tris/HCl, pH 7,2 a 0,015 mol/L azidu sodného. Tento produkt obsahuje stabilizující protein.</p> <p>Klon: 10E3 (1). Izotyp: IgG2a, kappa.</p> <p>Koncentrace myšního IgG v mg/l: Viz štítek na lahvičce.</p> <p>Koncentrace proteinu se může u jednotlivých šarží lišit, což však nemá vliv na optimální ředění. Titr každé jednotlivé šarže se porovnává a upravuje vůči referenční šarži tak, aby byla mezi šaržemi zajištěna konzistentní funkčnost imunohistochemického barvení.</p>
<b>Imunogen</b>	Rekombinantní zkrácený prostein, obsahující aminokyseliny 341-527 (1)
<b>Specifická</b>	<p>Bylo prokázáno, že monoklonální myši anti-prostein při testech Weastern blot provedených s lyzáty buněk HEK293 transfekovanými prosteinem reaguje s fragmentem rekombinantního prosteinu o hmotnosti 21 kD a s dubletou 50 kD. Anti-prostein detekoval dubletu 50 kD rovněž v testech s lyzáty buněk nádoru prostaty LNCaP a PC3, zatímco protilátka nereagovala při testech Western blots s negativními Du145 buňkami prosteinu a netransfekovanými buňkami HEK293 (1). Epitop rozpoznávaný anti-prosteinem byl mapován pomocí překrývajících se peptidů, které přemostují sekvence aminokyselin imunogenu anti-prosteinu. Pomocí testu ELISA byl lokalizován epitop rozpoznávaný anti-prosteinem na aminokyselinách 439-459 prosteinové sekvence (1). Specifická anti-prosteinu byla rovněž vyhodnocena při průtokové cytometrii s B buňkami imortalizovanými EBV (B-LCL), které byly trvale transdukovány prosteinem exprimujícím retrovir nebo jakoukoli irelevantní HLA-B8 molekulou. Bylo prokázáno, že anti-prostein specificky barví permeabilizované buňky B-LCL transdukové na expresi prosteinu, a že nereagují s buňkami exprimujícími HLA-B8 (1). Analýzy flow cytometrie buněčných linií LNCaP, PC3 a DU145 s anti-prosteinem prokázaly zbarvení, které koreluje s údaji kvantitativní reverzní transkripce-PCR. Buněčná linie LNCaP metastatického adenokarcinomu prostaty LNCaP se zbarvila intenzivněji, než buňky PC3 adenokarcinomu prostaty a bylo prokázáno, že nereagovala v rakovinových buňkách DU145 (3).</p>
<b>Bezpečnostní opatření</b>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Určeno pro profesionální uživatele.</li><li>2. 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>3. Jako u každého výrobku biologického původu je nutno dodržovat řádná bezpečnostní opatření.</li><li>4. Používejte odpovídající osobní ochranné prostředky, aby nedošlo k zasažení očí nebo pokožky.</li><li>5. Nespotebované roztoky je nutno likvidovat v souladu s místními a celostátními předpisy.</li></ol>

## Uchovávání

Skladujte při 2-8 °C. Nepoužívejte po datu expirace uvedeném na lahvičce. Pokud se reagentie 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 zabarvení, které nelze vysvětlit změnami laboratorních postupů a máte podezření, že se jedná o problém s protilátkou, obraťte se na technickou podporu společnosti Dako.

## Stručný návod\*

Krok		Komentáře
Fixace	Formalín	-
Předběžné zpracování	EnVision FLEX™, High pH, (kód K8004)	20 min HIER, 3 v 1 pomocí přístroje PT Link a stanice PT Link Rinse Station
Ředění	1:50	20minutová inkubace
Ředicí pufr	Dako Antibody Diluent (kód S0809)	Naředte bezprostředně před použitím
Negative Control	Negative Control, Mouse IgG <sub>2a</sub> (kód X0943)	20minutová inkubace
Vizualizace	EnVision™ FLEX, High pH (kód K8000/K8010).	20 min inkubace, 2x5 min DAB + inkubace
Kontrastní barvivo	EnVision™ FLEX Hematoxylin (kód K8008/K8018)	5minutová inkubace
Kontrolní tkáň	Prostata	Cytoplazmatické zabarvení
Podložní sklíčka	FLEX IHC Microscope Slides (kód K8020)	Doporučeno kvůli lepší přilnavosti řezů tkání k podložním sklům.
Montáž	Je vyžadována bezvodá permanentní montáž	Po provedení barvení se řezy musí dehydratovat, vyčistit a namontovat pomocí permanentního montážního média.
Vybavení	Autostainer Link 48 a Autostainer Plus	Používat ampulky určené pro příslušný přístroj (kód SK200–SK203 a kód S3425)

*\*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 ke značení řezů tkání fixovaných ve formalínu a zalitých v parafínu. Vzorky tkání je nutno rozřezat na řezy o tloušťce přibližně 4 µm.

**Předběžné zpracování:** Je vyžadováno předběžné zpracování tkáňových řezů fixovaných ve formalínu a zalitých v parafínu tepelně indukovaným vyhledáváním epitopu (HIER). Optimálních výsledků bylo dosaženo předběžným zpracováním tkání HIER pomocí naředěného roztoku EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (kód K8004). Odstranění parafínu, rehydratace a vyhledávání epitopu může být provedeno v přístroji Dako PT Link (kód PT100/PT101). Podrobné informace, viz uživatelská příručka k přístroji PT Link User Guide. Pro přístroj PT Link by mělo být použito následujících parametrů: Teplota předehřívání: 65 °C; teplota a čas vyhledávání epitopu: 97 °C a 20 (±1) minut; zchladit na 65 °C. Vyjměte stojan se sklíčky z PT nádrže a ihned sklíčka ponořte do nádoby/nádrže (např. stanice PT Link Rinse Station, kód PT109) s naředěným pufrům EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (kód K8007) při pokojové teplotě. Ponechat sklíčka v roztoku WashBufferpo dobu 1-5 minut.

Tkáňové řezy nesmějí během zpracování ani během následného imunohistochemického barvení vyschnout. Z důvodu vyšší přilnavosti řezů tkání k podložním sklům se doporučuje používat podložní skla FLEX IHC Microscope Slides (kód K8020). Po barvení je třeba řezy dehydratovat, vyčistit a pořídít z nich za použití permanentního montážního média preparáty.

## Postup barvení

**Ředění:** Doporučení ředění protilátky Monoclonal Mouse Anti-Human Prostein, Clone 10E3, kód M3615, je 1:50. Protilátku rozřeďte v Dako Antibody Diluent (kód S0809). Předběžně zpracované řezy tkáně inkubujte po dobu 20 minut při pokojové teplotě. Toto jsou pouze obecné pokyny. Optimální podmínky se mohou lišit v závislosti na vzorku a způsobu přípravy a měly by být v každé laboratoři ověřovány individuálně.

**Negativní kontrola:** Doporučené činidlo pro negativní kontrolu je Dako Negative Control, Mouse IgG<sub>2a</sub> (kód X0943), zředěné na stejnou koncentraci myší Ig jako primární protilátka. Pokud nebyla stanovena stabilita naředěné protilátky a negativní kontroly v stávajícím postupu barvení, doporučuje se naředit tato činidla bezprostředně před použitím. Souběžně s testováním vzorků pacienta je třeba provést pozitivní a negativní kontroly.

**Vizualizace:** Doporučený systém pro vizualizaci je EnVision™ FLEX, High pH (kód K8000/K8010) používající 20minutovou inkubaci při pokojové teplotě. Dodržujte postup přiložený ke zvolenému vizualizačnímu systému.

**Automatizace:** Protilátka se dobře hodí pro imunohistochemické barvení pomocí automatických zařízení jako Dako Autostainer, Autostainer Plus a Autostainer Link stejně jako PT Link pro předběžné zpracování.

**Kontrastní barvivo:** Doporučené kontrastní barvivo je EnVision™ FLEX Hematoxylin (kód K8008/K8018). Pro dosažení optimálních výsledků je doporučeno použít bezvodé permanentní montážní médium.

**Kontroly:** Pozitivní a negativní kontroly je nutno provádět vždy současně použitím stejného protokolu jako vzorky pacienta. Tkáň pro pozitivní kontrolu musí obsahovat prostatu a buňky/struktury musí zobrazovat vzor reakce, jak je stanoveno pro tuto tkáň v části „Charakteristiky účinnosti“.

**Interpretace zbarvení**

Buněčný barvicí vzor je cytoplasmatický.

**Charakteristiky účinnosti****Normální tkáně:**

Bylo prokázáno, že anti-prostein je imunoreaktivní s lumenálními epiteliálními buňkami normální prostaty, ale nereaguje s ostatními typy normálních tkání, které byly testovány (1, 2, 5). Epiteliální buňky vykazují střední až silnou reakci cytoplasmatického zbarvení v normální prostatické tkáni.

Typ tkáně (počet testovaných)	Pozitivní prvky tkáně	Typ tkáně (počet testovaných)	Pozitivní prvky tkáně
Nadledvina (3)	0/3	Slinivka břišní (3)	0/3
Kostní dřevina (3)	0/3	Příštítná tělíska (3)	0/3
Prs (3)	0/3	Hypofýza (3)	0/3
Malý mozek (3)	0/3	Prostata (3)	3/3 lumenální epiteliální buňky (40–90 %), cytoplasmatické
Mozek (3)	0/3	Slinná žláza (3)	0/3
Děložní hrdlo (3)	0/3	Kosterní sval	0/3
Tračník (3)	0/3	Kůže (3)	0/3
Jícen (3)	0/3	Tenké střevo (3)	0/3
Srdce (3)	0/3	Slezina (3)	0/3
Ledvina (3)	0/3	Žaludek (3)	0/3
Játra (3)	0/3	Varlata (3)	0/3
Plíce (3)	0/3	Brzlík (3)	0/3
Mezoteliální buňky (3)	0/3	Štítná žláza (3)	0/3
Nerv periferní (3)	0/3	Mandle (3)	0/3
Vaječník (3)	0/3	Děloha (3)	0/3

**Abnormální tkáně:** Anti-prostein byl testován na řadě neoplastických tkání a bylo zjištěno, že nereaguje se všemi hodnocenými neprostatickými maligními tkáněmi. Co se týče karcinomů prostaty, imunoreaktivita prosteinu byla prokázána ve většině primárních a metastatických karcinomech prostaty (193/203) (1,2,4-8). Mezi expresí prosteinu a Gleason skóre nebo metastatickým stavem nebyl žádný vztah (1).

**Literatura**

- Kalos M, Askaa J, Hylander BS, Repasky EA, Cai F, Vedvick T, et al. Prostein expression is highly restricted to normal and malignant prostate tissues. *Prostate* 2004;60:246.
- Yin M, Dhir R, Parwani AV. Diagnostic utility of p501s (prostein) in comparison to prostate specific antigen (PSA) for the detection of metastatic prostatic adenocarcinoma. *Diagn Pathol* 2007;2:41.
- Xu J, Kalos M, Stolk JA, Zasloff EJ, Zhang X, Houghton RL, et al. Identification and characterization of prostein, a novel prostate-specific protein. *Cancer Res* 2001;61:1563.
- Chuang A-Y, DeMarzo AM, Veltri RW, Sharma RB, Bieberich CJ, Epstein JI. Immunohistochemical differentiation of high-grade prostate carcinoma from urothelial carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2007;31:1246-55.
- Sheridan T, Herawi A, Epstein JI, Illei PB. The role of P501S and PSA in the diagnosis of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Am J Surg Pathol* 2007;31:1351-5.
- Owens CL, Epstein JI, Netto GJ. Distinguishing prostatic from colorectal adenocarcinoma on biopsy samples: the role of morphology and immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:599-603.
- Wang W, Epstein JI. Small cell carcinoma of the prostate: a morphological and immunohistochemical study of 95 cases. *Am J Surg Pathol* 2008;32:65-71.
- Osunkoya AO, Netto GJ, Epstein JI. Colorectal adenocarcinoma involving the prostate: report of 9 cases. *Human Pathol* 2007;38:1836-41.

<b>REF</b> Katalogové číslo	Toplotní rozmezí od do	Viz Návod k použití
Výrobce	<b>LOT</b> Číslo šarže	Použitelné do
<b>EC REP</b> Zplnomocněný zástupce	<b>IVD</b> In vitro diagnostický zdravotnický prostředek	

Dako North America, Inc.  
6392 Via Real  
Carpinteria, California 93013 USA  
Tel 805 566 6655  
Fax 805 566 6688  
Technical Support 800 424 0021  
Customer Service 800 235 5763

**EC REP**  
Dako Denmark A/S  
Produktionsvej 42  
DK-2600 Glostrup Denmark  
Tel +45 4485 9500  
Fax +45 4485 9595  
www.dako.com

PT0039/Rev C

Edition 03/13