

**Monoclonal Mouse
Anti-Human Chromogranin A**
Clone DAK-A3
Code No./ Code/ Code-Nr. M 0869
Edition/ Ausgabe 19.12.02

ENGLISH	
Intended use	For in vitro diagnostic use. Monoclonal Mouse Anti-Human Chromogranin A, Clone DAK-A3, is intended for use in immunocytochemistry. The antibody labels chromogranin A present in secretory granules of endocrine cells. Chromogranin A is a marker for neuroendocrine differentiation and antibodies to chromogranin A are a useful tool for the identification of neuroendocrine-derived tumours. Differential identification is aided by the results from a panel of antibodies. Interpretation must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.
Introduction	Chromogranin A is a protein prohormone with a molecular mass of 48 kDa. The gene encoding the 439 amino acids protein is localized on chromosome 14 (1-3). Potentially biologically active peptides derived from chromogranin A are; vasostatins (aa 1-17/113), chromostatin (aa 124-143), chromacins (aa 173-194), pancreastatin (aa 243-294), WE-14 (aa 316-329), catestatin (aa 344-364), parastatin (aa 347-419) and GE-25 (aa 367-391) (1). Chromogranin A was first isolated from chromaffin cells in the adrenal medulla but was later found to be present in secretory granules in cells of most neuroendocrine organs. Since then it has been used as an important broadspectrum histochemical marker for the identification of neuroendocrine cells and tumours (1, 4, 5).
Reagent provided	Monoclonal mouse antibody provided in liquid form as cell culture supernatant dialysed against 50 mmol/L Tris/HCl, pH 7.2, and containing 15 mmol/L NaN ₃ . <u>Clone:</u> DAK-A3. <u>Iso</u> type: IgG2b, kappa. <u>Mouse IgG concentration:</u> see label on vial.
Immunogen	The C-terminal 20 kDa fragment of human chromogranin A corresponding to amino acids 210-439. The fragment has been isolated from the urine of patients with carcinoid syndrome, and was pure as shown by N-terminal amino acid analysis.
Specificity	In ELISA, the antibody reacts with the pure chromogranin A fragment used for immunization. In immunocytochemistry the antibody shows a staining pattern essentially as that of an established polyclonal antibody to chromogranin A, DakoCytomation code No. A 0430, when tested on 84 different tumours and 30 different normal tissues. The labelling corresponds to the known distribution of chromogranin A. In addition, labelling of melanin and lipofuscin pigment was observed with both antibodies as also with an unrelated monoclonal antibody to chromogranin A, Clone LK2H10, after demasking of antigens with citrate buffer.
Precautions	1. For professional users. 2. This product contains sodium azide (NaN ₃), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing. 3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
Storage	Store at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the user must verify the conditions. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact our Technical Services.
Specimen preparation	<u>Paraffin sections:</u> The antibody can be used for labelling paraffin-embedded tissue sections fixed in formalin. Pre-treatment of tissues with heat-induced epitope retrieval is required. Optimal results are obtained with DakoCytomation Target Retrieval Solution, High pH, code No. S 3308, or 10 mmol/L Tris buffer, 1 mmol/L EDTA, pH 9.0. Less optimal results are obtained with DakoCytomation Target Retrieval Solution, code No. S 1700, or 10 mmol/L citrate buffer, pH 6.0. Pre-treatment of tissues with proteinase K was found inefficient. The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunocytochemical staining procedure. <u>Frozen sections:</u> The antibody can be used for labelling acetone-fixed frozen sections.
Staining procedure	<u>Dilution:</u> Monoclonal Mouse Anti-Human Chromogranin A, code No. M 0869, may be used at a dilution range of 1:100-1:200 when applied on formalin-fixed, paraffin-embedded sections of human colon and using 20 minutes heat-induced epitope retrieval in DakoCytomation Target Retrieval solution, High pH, code No. S 3308, and 30 minutes incubation at room temperature with the primary antibody. Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation method, and should be determined by each individual laboratory. The recommended negative control is DakoCytomation Mouse IgG2b, code No. X 0944, diluted to the same mouse IgG concentration as the primary antibody. Unless the stability of the diluted antibody and negative control has been established in the actual staining procedure, it is recommended to dilute these reagents immediately before use, or dilute in DakoCytomation Antibody Diluent, code No. S 0809. Positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimen.

Visualization: DAKO LSAB™+/HRP kit, code No. K 0679, and DAKO EnVision™+/HRP kits, code Nos. K 4004 and K 4006, are recommended. Follow the procedure enclosed with the selected visualization kit.

Automation: The antibody is well-suited for immunocytochemical staining using automated platforms, such as the DakoCytomation Autostainer.

Product-specific limitations	The antibody labels melanin and lipofuscin pigment after heat induced epitope retrieval in 10 mmol/L citrate buffer, pH 6.0.
Performance characteristics	Cells labelled by the antibody display a cytoplasmic, granular staining pattern. <u>Abnormal tissues:</u> The antibody labelled 13/18 of neuroendocrine tumours of various types. None of 39 carcinomas, 7 sarcomas, 4 melanomas, 6 lymphomas, 2 seminomas, 2 mesotheliomas, 1 each of meningioma, astrocytoma and Warthin's tumour were labelled.

FRANÇAIS	
Intérêt	Pour diagnostic <i>in vitro</i> . Monoclonal Mouse Anti-Human Chromogranin A, Clone DAK-A3, est destiné pour un usage en immunocytochimie. L'anticorps marque la chromogranine A présente dans les granules sécrétoires des cellules endocrines. La chromogranine A est un marqueur de différenciation neuroendocrine, et les anticorps dirigés contre la chromogranine A constituent des instruments utiles pour l'identification des tumeurs d'origine neuroendocrine. L'identification différentielle s'appuie sur les résultats obtenus à l'aide d'un panel d'anticorps. L'interprétation des résultats doit être entreprise dans le contexte de l'histoire clinique du patient et des autres examens diagnostics.
Introduction	La chromogranine est une prohormone protéique dont la masse moléculaire est de 48 kDa. Le gène codant la protéine constituée de 439 acides aminés est situé sur le chromosome 14 (1-3). Les peptides potentiellement actifs, dérivés de la chromogranine A sont, les vasostatines (aa 1-17/113), la chromostatine (aa 124-143), les chromacines (aa 173-194), la pancréastatine (aa 243-294), le WE-14 (aa 316-329), la catéstatine (aa 344-364), la parastatine (aa 347-419) et le GE-25 (aa 367-391) (1). La chromogranine A a été isolée pour la première fois à partir des cellules chromaffines de la médullosurrénale, sa présence a été signalée par la suite dans les granules sécrétoires des cellules de la plupart des glandes neuroendocrines. Dès lors, elle a constitué un important marqueur histochimique à large spectre pour l'identification des cellules et des tumeurs neuroendocrines (1,4,5).
Réactif fourni	Anticorps monoclonal de souris à l'état liquide utilisé comme surnageant de la culture cellulaire, dialysé dans 50 mmol/l Tris/HCl, pH 7,2, et contenant 15 mmol/l de NaN ₃ . <u>Clone:</u> DAK-A3. <u>Iso</u> type: IgG2b, kappa. <u>Concentration IgG de Souris:</u> Voir l'étiquette sur le flacon de l'échantillon.
Immunogène	Fragment C-terminal de la chromogranine humaine, d'une masse moléculaire de 20 kDa, correspondant aux acides aminés 210-439. Ce fragment a été isolé dans l'urine des patients atteints de syndrome carcinoïde, sous une forme pure comme le montre l'analyse des acides aminés N-terminaux.
Spécificité	En ELISA, l'anticorps montre une réaction au fragment de chromogranine pure utilisé pour l'immunisation. En immunocytochimie, l'anticorps a montré un modèle de marquage voisin, pour l'essentiel, de celui d'un anticorps polyclonal dirigé contre la chromogranine A existant, DakoCytomation code A 0430, lors de tests réalisés sur 84 tumeurs diverses et 30 tissus normaux divers. Le marquage correspond à la distribution connue de la chromogranine A. De plus, le marquage de deux pigments, la mélanine et de la lipofuchisine, a été observé avec les deux anticorps ainsi qu'avec un anticorps monoclonal n'ayant aucun rapport avec la chromogranine A, clone LK2H10, après démasquage des antigènes par un tampon citrate.
Précautions d'emploi	1. Pour utilisateurs professionnels. 2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN ₃), un produit chimique hautement toxique à l'état pur. Aux concentrations du produit, bien qu'il ne soit pas classé comme étant nuisible, l'azide de sodium peut réagir avec la tuyauterie en plomb et en cuivre pour former des dépôts hautement explosifs d'azides métallisés. Lors de l'élimination du produit, laisser couler l'eau à flot pour éviter toute accumulation d'azides métallisés dans la tuyauterie. 3. Comme pour tout dérivé biologique dangereux à manipuler, une précision s'impose.
Stockage	Stocker entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption mentionnée sur le flacon. Dans le cas où les réactifs sont conservés sous d'autres conditions que celles spécifiées, les conditions doivent être vérifiées par l'utilisateur. Il n'existe pas de signe particulier pour indiquer l'instabilité de ce produit. Par conséquent, les contrôles doivent être opérés simultanément avec les échantillons du patient. En cas de résultats imprévus qui ne peuvent pas être expliqués par des changements de procédures de laboratoire et qu'un problème avec le produit est suspecté, contactez nos Services Techniques.
Préparation de l'échantillon	<u>Coupes en paraffine:</u> L'anticorps peut être utilisé pour marquer des coupes de tissus incluses en paraffine, fixées au formol. Le prétraitement des tissus par restauration de l'épitope par la chaleur est requis. Des résultats optimaux sont obtenus avec DakoCytomation Target Retrieval Solution, à pH élevé, code S 3308, ou en tampon Tris 10 mmol/l, 1 mmol/l EDTA, à 9,0 de pH. Des résultats plus faibles sont obtenus avec DakoCytomation Target Retrieval Solution, code S 1700, ou 10 mmol/L tampon citrate, pH 6.0. Le prétraitement des tissus par la protéinase K est inefficace. Les coupes de tissus ne doivent pas sécher pendant le traitement ou la procédure d'immunomarquage immunocytochimique suivante. <u>Coupes congelées:</u> L'anticorps peut être utilisé pour marquer des coupes congelées, fixées à l'acétone.

Procédure d'immunomarquage Dilution: Monoclonal Mouse Anti-Human Chromogranin A, code M 0869, peut être dilué entre 1:100 et 1:200 pour application sur des coupes de tissus incluses en paraffine, fixées au formol du col humain pendant 20 minutes de démasquation de l'épitope par la chaleur dans DakoCytomation Target Retrieval Solution, pH élevé, code S 3308 et 30 minutes d'incubation à température ambiante avec l'anticorps primaire. Les conditions optimales peuvent varier selon l'échantillon et la méthode de préparation, et doivent être déterminées par chaque laboratoire particulier. Le contrôle négatif requis est DakoCytomation Mouse IgG2b, code X 0944, dilué à la même concentration en IgG de souris que l'anticorps primaire. A moins que la stabilité de l'anticorps dilué et du contrôle négatif ait été établie dans la procédure d'immunomarquage réelle, il est recommandé de diluer ces réactifs juste avant leur emploi; ou de les diluer dans DakoCytomation Antibody Diluent, code S 0809. Les contrôles positifs et négatifs doivent être opérés simultanément avec l'échantillon du patient.

Révélation: DAKO LSAB™+/HRP kit, code K 0679, et DAKO EnVision™+/HRP kits, codes K 4004 et K 4006, sont requis. Suivre la procédure incluse avec le kit de révélation choisi.

Automatisation: L'anticorps est bien adapté au marquage immunocytochimique sur des plates-formes automatisées comme le DakoCytomation Autostainer.

Limites du produit L'anticorps marque deux pigments, la mélanine et la lipofuch sine, après démasquation de l'épitope induite par la chaleur en tampon citrate 10 mmol/l, à 6,0 de pH.

Performances Les cellules marquées par l'anticorps présentent un modèle de marquage cytoplasmique granulaire.

Tissus anormaux: L'anticorps a marqué 13 tumeurs neuroendocrines sur 18 de types variés. Aucun marquage parmi 39 carcinomes, 7 sarcomes, 4 mélanomes, 6 lymphomes, 2 séminomes, 2 mésothéliomes, 1 méningiome, 1 astrocytome et 1 tumeur de Warthin n'a été observé.

DEUTSCH

Zweckbestimmung Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.

Monoclonal Mouse Anti-Human Chromogranin A, Clone DAK-A3, ist für den immunzytochemischen Gebrauch bestimmt. Der Antikörper markiert in den sekretorischen Granula endokriner Zellen vorliegendes Chromogranin A. Chromogranin A ist ein Marker der neuroendokrinen Differenzierung und Antikörper gegen Chromogranin A haben sich bei der Identifizierung neuroendokriner Tumoren als nützlich erwiesen. Die differentielle Identifizierung wird durch die mit einem Antikörper-Panel erhaltenen Resultate unterstützt. Die Interpretation muss unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren durch einen erfahrenen Pathologen erfolgen.

Einleitung Chromogranin A ist ein Protein-Prohormon mit einer Molekülmasse von 48 kDa. Das die 439 Aminosäuren umfassende Protein kodierende Gen ist auf dem Chromosom 14 lokalisiert (1-3). Zu den potentiell biologisch aktiven, von Chromogranin A abgeleiteten Peptiden gehören: Vasostatine (aa 1-17/113), Chromostatin (aa 124-143), Chromacine (aa 173-194), Pancreastatin (aa 243-294), WE-14 (aa 316-329), Catestatin (aa 344-364), Parastatin (aa 347-419) und GE-25 (aa 367-391) (1). Chromogranin A wurde zuerst aus chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks isoliert. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde jedoch sein Vorhandensein in den sekretorischen Granula der Zellen der meisten neuroendokrinen Organe nachgewiesen. Seitdem wurde der Antikörper als wichtiger histochemischer „Breitband“-Marker für die Identifizierung neuroendokriner Zellen und Tumore genutzt (1, 4, 5).

Geliefertes Reagenz Der monoklonale Mausantikörper wird in flüssiger Form als Zellkulturüberstand geliefert, wurde gegen 50 mmol/l Tris/HCl, pH-Wert 7,2 dialysiert und enthält 15 mmol/l NaN₃.

Klon: DAK-A3. Isotyp: IgG2b, Kappa.

Maus-IgG-Konzentration: Siehe Produktetikett.

Immunogen Das C-terminale, 20 kDa-Fragment des humanen Chromogranin A entspricht den Aminosäuren 210-439. Das Fragment wurde aus dem Urin von Patienten mit Karzinoid-Syndrom isoliert und der Reinheitsnachweis wurde anhand der N-terminalen Aminosäureanalyse erbracht.

Spezifität Im ELISA reagiert der Antikörper mit dem für die Immunisierung genutzten reinen Chromogranin A-Fragment.

Bei der immunzytochemischen Untersuchung von 84 verschiedenen Tumoren und 30 unterschiedlichen Normalgeweben zeigt der Antikörper ein Färbemuster, das grundlegend demjenigen eines etablierten polyklonalen Antikörpers gegen Chromogranin A, DakoCytomation Code-Nr. A 0430, gleicht. Die Markierung entspricht der bekannten Verteilung von Chromogranin A. Nach der Demaskierung des Antigens mit Citratpuffer wurde zudem die Markierung von Melanin- und Lipofuchsin-Pigment sowohl mit beiden Antikörpern als auch mit einem hiermit nicht zusammenhängenden monoklonalen Antikörper gegen Chromogranin A, Klon LK2H10, beobachtet.

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen 1. Für geschultes Fachpersonal.
2. Dieses Produkt enthält Natrium-Azid (NaN₃), eine in reiner Form hochtoxische chemische Verbindung. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann Natrium-Azid, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Wasserleitungen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metall-Azid-Anreicherungen führen. Nach der Entsorgung muss mit reichlich Wasser nachgespült werden, um Metall-Azid-Anreicherung zu vermeiden.

3. Wie bei allen aus biologischen Materialien gewonnenen Produkten müssen die ordnungsgemäßen Handhabungsverfahren eingehalten werden.

Lagerung Bei 2–8 °C lagern. Nicht nach dem auf dem Fläschchen angegebenen Verfallsdatum verwenden. Sollten die Reagenzien unter anderen Bedingungen als den beschriebenen aufbewahrt worden sein, so müssen diese vom Anwender verifiziert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anhaltspunkte für die mögliche Instabilität dieses Produktes. Es sollten daher die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientenproben mitgeführt werden. Wenn unerwartete Verfärbung beobachtet wird, welche durch Änderungen in den Labormethoden nicht erklärt werden kann

(102297-001) M 0869/EFG/COS/19.12.02 p. 3/4

DakoCytomation Denmark A/S · Produktionsvej 42 · DK-2600 Glostrup · Denmark · Tel. +45 44 85 95 00 · Fax +45 44 85 95 95 · CVR No. 33 21 13 17

und falls Verdacht auf ein Problem mit dem Antikörper besteht, ist bitte Kontakt mit unserem technischen Kundendienst aufzunehmen.

Probenvorbereitung

Paraffinschnitte: Der Antikörper kann für die Markierung von paraffineingebetteten, formalinfixierten histologischen Schnitten genutzt werden. Eine Vorbehandlung der Gewebe mit hitzeinduzierter Epitopdemaskierung ist erforderlich. Optimale Resultate werden erzielt mit DakoCytomation Target Retrieval Solution, pH 9,9, Code-Nr. S 3308, oder mit 10 mmol/l Tris-Puffer, 1 mmol/l EDTA, pH 9,0 Die Nutzung von DakoCytomation Target Retrieval Solution, pH 6,1, Code-Nr. S 1700 oder 10 mmol/l Citratpuffer, pH 6,0, erbringt weniger optimale Resultate. Die Vorbehandlung der Gewebe mit Proteinase K hat sich als ineffizient erwiesen. Während der Gewebevorbehandlung oder während der sich anschließenden immunzytochemischen Färbeprozedur dürfen die Gewebeschnitte nicht austrocknen.

Gefrierschnitte: Der Antikörper kann für die Markierung acetoxifizierter Gefrierschnitte genutzt werden.

Färbeprozedur

Verdünnung: Monoclonal Mouse Anti-Human Chromogranin A, Code-Nr. M 0869, kann bei einem Verdünnungsbereich von 1:100-1:200 eingesetzt werden, wenn es für formalinfixierte paraffineingebettete Schnitte der menschlichen Tonsillen genutzt wird und wenn 20 Minuten lang die hitzeinduzierte Epitopdemaskierung mit DakoCytomation Target Retrieval solution, pH 9,9, Code-Nr. S 3308, gefolgt von 30 Minuten Inkubation mit dem primären Antikörper bei Raumtemperatur, durchgeführt wird. Die optimalen Bedingungen schwanken je nach Probe und Methode der Probenvorbereitung und sollten von jedem einzelnen Labor bestimmt werden. Die empfohlene Negativkontrolle ist DakoCytomation Mouse IgG2b, Code-Nr. X 0944, das auf dieselbe murine IgG-Konzentration wie der primäre Antikörper verdünnt wurde. Solange mit dem eigentlichen Testsystem die Stabilität des verdünnten Antikörpers und der Negativkontrolle nicht sichergestellt ist, wird empfohlen, diese Reagenzien unmittelbar vor Gebrauch zu verdünnen oder die Verdünnung mit DakoCytomation Antibody Diluent, Code-Nr. S 0809, vorzunehmen. Es sollten die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientenproben mitgeführt werden.

Visualisierung: Folgende Kits werden empfohlen: DAKO LSAB™+/HRP-Kit, Code-Nr. K 0679 und DAKO EnVision™+/HRP-Kits, Code-Nr. K 4004 und K 4006. Es ist dem Verfahren zu folgen, das in den Anleitungen des genutzten Kits für die Visualisierung erläutert wird.

Automatisierung: Der Antikörper ist gut für das immunzytochemische Färben unter Nutzung automatisierter Plattformen wie beispielsweise des „Autostainer“ von DakoCytomation geeignet.

Produktspezifische Beschränkungen

Der Antikörper markiert Melanin- und Lipofuchsin- Pigment nach der hitzeinduzierten Epitopdemaskierung in 10 mmol/l Citratpuffer, pH 6,0.

Leistungseigenschaften








Durch den Antikörper markierte Zellen zeigen ein zytoplasmatisches granuläres Färbemuster.

Anomales Gewebe: Der Antikörper markierte 13/18 neuroendokriner Tumoren unterschiedlicher Typen. Keine Markierung erfolgte bei: 39 Karzinomen, 7 Sarkomen, 4 Melanomen, 6 Lymphomen, 2 Seminomen, 2 Mesotheliomen sowie jeweils 1 Meningiom, Astrozytom und Warthin-Tumour.

References/ Références/ Literatur

- Portela-Gomes GM. Chromogranin A immunoreactivity in neuroendocrine cells in the human gastrointestinal tract and pancreas. Adv Exp Med Biol 2000;482:193-203.
- Konecki DS, Benedum UM, Gerdes H-H, Huttner WB. The primary structure of human chromogranin A and pancreastatin. J Biol Chem 1987;262:17026-30.
- Murray SS, Deaven LL, Burton DW, O'Connor DT, Mellon PL, Deftos LJ. The gene for human chromogranin A (CgA) is located on chromosome 14. Biochem Biophys Res Comm 1987;42:141-6.
- Lloyd RV, Cano M, Rosa P, Hille A, Huttner WB. Distribution of chromogranin A and secretogranin I (chromogranin B) in neuroendocrine cells and tumors. Am J Pathol 1988;130:296-304.
- Degorce F. Assessment of chromogranin A using two-site immunoassay. Selection of a monoclonal antibody pair unaffected by human chromogranin A processing. Adv Exp Med Biol 2000;482:339-50.

Explanation of symbols/ Légende des symboles/ Erläuterung der Symbole

 Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	 2 °C – 8 °C Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	 Manufacturer Fabricant Hersteller
 In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-Vitro-Diagnostikum	 Batch code Code du Lot Chargenbezeichnung	
 Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	 Use by Utiliser jusque Verwendbar bis	

(102297-001) M 0869/EFG/COS/19.12.02 p. 4/4

DakoCytomation Denmark A/S · Produktionsvej 42 · DK-2600 Glostrup · Denmark · Tel. +45 44 85 95 00 · Fax +45 44 85 95 95 · CVR No. 33 21 13 17