

## Monoclonal Mouse Anti-Human BCL6 Protein

Clone PG-B6p  
Code M7211

ENGLISH
<p><b>Intended use</b> For in vitro diagnostic use.</p>

Monoclonal Mouse Anti-Human BCL6 Protein, Clone PG-B6p, is intended for use in immunohistochemistry. The antibody labels cells expressing BCL6 protein and is a useful tool for differentiating proliferating centres in B-cell chronic lymphocytic lymphomas (BCL2+/BCL6-) from trapped germinal centres in mantle cell lymphomas (BCL2-/BCL6+), and for identifying neoplastic cells in cases of nodular, lymphocyte-predominance Hodgkin's disease (1). The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

### Summary and explanation

The proto-oncogene *BCL6* encodes a 92-98 kDa POZ/zinc finger protein. Through its six C-terminal zinc-finger motifs, the BCL6 protein binds to specific DNA sequences of target genes, where it acts as a transcriptional repressor (2, 3).

*BCL6* expression may be ubiquitous, as low levels are detected in many tissues. However, high levels of *BCL6* expression are limited to cells of the B-lymphoid lineage and skeletal muscle. In the B-lymphoid cell lineage, *BCL6* expression seems to be tightly regulated during differentiation, and strong expression is observed preferentially in germinal centre (GC) B cells, but not in plasma cells, and precursor, mantle zone, and memory B cells. Neoplastic counterparts of GC B cells, including Burkitt's, follicular, and diffuse large cell lymphomas, also display high levels of *BCL6* expression (3).

*BCL6* may be implicated in chromosomal translocations where the regulatory region of the *BCL6* gene is replaced by a heterologous reciprocal partner such as the immunoglobulin (IG) genes. Promotor substitution leads to deregulation of the *BCL6* expression, which may be associated with lymphomagenesis (3). *BCL6* rearrangement is one of the most common genetic abnormalities in B-cell non-Hodgkin's lymphoma, with an especially high frequency (28-40%) in diffuse large cell lymphoma (2).

### Reagent provided

Monoclonal mouse antibody provided in liquid form as cell culture supernatant dialysed against 0.05 mol/L Tris/HCl, pH 7.2, and containing 15 mmol/L NaN<sub>3</sub>.

**Clone:** PG-B6p (1). **Isotype:** IgG1, kappa.

**Mouse IgG concentration:** see label on vial.

The protein concentration between lots may vary without influencing the optimal dilution. The titer of each individual lot is compared and adjusted to a reference lot to ensure a consistent immunohistochemical staining performance from lot-to-lot.

### Immunogen

Recombinant glutathione S-transferase (GST)-BCL6 protein corresponding to amino acids 3-484 of the human BCL6 protein (1).

### Specificity

SDS-PAGE analysis of immunoprecipitates formed between the antibody and total lysates of Bjab cells (BCL6+) and BCL6 transfected EB3 cells, shows reaction with a ~95 kDa fragment corresponding to BCL6. No reaction is observed with Rd cells (BCL6-) and EB3 cells transfected with a control plasmid (1).

In Western blotting of total lysates of Bjab cells and BCL6 transfected EB3 cells, or control transfected EB3 cells, the antibody did not label any bands, suggesting lack of reactivity with denatured BCL6 protein (1).

As demonstrated by immunocytochemistry, the antibody cross-reacts with the BCL6-equivalent protein in various mammals, including cow, rabbit, rat, sheep, and swine. No cross-reactivity was observed in chicken and pigeon (1).

### Precautions

- For professional users.
- This product contains sodium azide (NaN<sub>3</sub>), 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.
- As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
- Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
- Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

### 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 conditions must be verified by the user. 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 Dako Technical Services.

### Specimen preparation

**Paraffin sections:** 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 Dako Target Retrieval Solution, High pH, code S3308, or 10 mmol/L Tris buffer, 1 mmol/L EDTA, pH 9.0. However, Dako Target Retrieval Solution, code S1700, or 10 mmol/L citrate buffer, pH 6.0 and pre-treatment of tissues with proteinase K were found inefficient. The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohistochemical staining procedure.

**Frozen sections and cell preparations:** The antibody can be used for labelling acetone fixed, frozen sections.

### Staining procedure

**Dilution:** Monoclonal Mouse Anti-Human BCL6 Protein, code M7211, may be used at a dilution range of 1:10-1:20 when applied on formalin-fixed, paraffin-embedded sections of human tonsil and using 20 minutes heat-induced epitope retrieval in Dako Target Retrieval Solution, High pH, code S3308, 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 Dako Mouse IgG1, code X0931, 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 Dako Antibody Diluent, code S0809. Positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimen.

**Visualization:** Dako LSAB™+/HRP kit, code K0679, and Dako EnVision™+/HRP kits, code K4004 and K4006, are recommended. For frozen sections and cell preparations, the Dako APAAP kit, code K0670, is a good alternative if endogenous peroxidase staining is a concern. Follow the procedure enclosed with the selected visualization kit.

**Automation:** The antibody is well-suited for immunohistochemical staining using automated platforms.

### Performance characteristics

Cells labelled by the antibody show a diffuse/microgranular staining confined to the nucleus. Intense cytoplasmic staining unassociated with metaphase chromosomes is noted only in mitotic figures (1).

**Normal tissues:** In tonsil, the antibody strongly labels the nuclei of centroblasts in the dark zone and centrocytes in the basal and apical light zones of germinal centres. In addition the antibody labels approximately 10% of germinal centre T cells. No labelling was observed in plasma cells, macrophages, follicular dendritic cells, and IgD+/IgM+ follicular mantle lymphocytes. In spleen, the staining pattern was similar to that of tonsil, but in addition the antibody labelled a few scattered lymphoid-like cells of undefined phenotype. In extra-lymphoid tissues, the antibody faintly labelled squamous epithelia in the tonsil, thymus, and skin. No labelling was observed in liver, thyroid, striated muscle, or kidney (1).

**Abnormal tissues:** 173 cases of human lymphoid neoplasms were tested with the antibody. Of B-cell lymphomas or leukaemias, 24/24 follicle centre lymphomas, 29/30 diffuse large cell lymphomas, and 13/13 Burkitt's lymphomas, were positive. No labelling was observed in 7/7 pre-B acute lymphoblastic leukaemias, 16/16 small lymphocytic/B-CLL, 6/6 hairy cell leukaemias, 22/22 mantle cell leukaemias, and 14/14 marginal zone lymphomas. Of T-cell lymphomas or leukaemias, 4/8 anaplastic large cell lymphomas were positive, whereas no labelling was observed in 10/10 acute lymphoblastic lymphomas, 3/3 mycosis fungoides, 6/6 peripheral T-cell lymphomas, and 2/2 peripheral T-cell (AILD-like) lymphomas. In Hodgkin's disease, 5/5 nodular, lymphocyte predominance, 1/4 nodular sclerosis, and 1/3 mixed cellularity types were positive (1).

In systemic AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma, the antibody labelled 11/11 small noncleaved cell lymphomas, 7/7 large noncleaved cell lymphomas (LNCCL), and 2/9 large cell immunoblastic lymphoma plasmacytoid (IBLP). In AIDS-primary central nervous system lymphomas, the antibody labelled 4/4 LNCCL and none of 4 cases of IBLP. No labelling was observed in 5 cases of primary effusion lymphoma (PEL) and in 6 AIDS-PEL cell lines (4)

FRANÇAIS
----------

### Intérêt

Pour diagnostic in vitro.

Monoclonal Mouse Anti-Human BCL6 Protein, Clone PG-B6p, est destiné pour un usage en immunohistochimie. L'anticorps marque les cellules qui expriment la protéine BCL6 et constitue un instrument pratique permettant de différencier les centres de prolifération au cours des lymphomes lymphocytaires chroniques à cellules B (BCL2+/BCL6-) des centres germinatifs bloqués dans les cas de lymphomes à cellules du manteau (BCL2-/BCL6+), et d'identifier les cellules néoplasiques dans les cas de maladie de Hodgkin nodulaire, à prédominance lymphocytaire (1). L'interprétation clinique de toute coloration ou son absence doit être complétée par des études morphologiques en utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée en fonction des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié.

### Résumé et explication

Le proto-oncogène BCL6 code une protéine doigt de zinc/POZ de 92-98 kDa. Par l'intermédiaire de ses six motifs doigt de zinc C terminaux, la protéine BCL6 se lie à des séquences spécifiques de l'ADN des gènes cibles, où elle joue un rôle de répresseur transcriptionnel (2,3).

L'expression de la *BCL6* pourrait être ubiquiste car elle est détectée dans de nombreux tissus à de faibles niveaux. Cependant, l'expression élevée de la *BCL6* à des niveaux élevés se limite aux cellules de la lignée lymphoïde de type B et aux cellules des muscles squelettiques. Dans les cellules de la lignée lymphoïde de type B, l'expression de la *BCL6* semble être fermement régulée au cours de la différenciation, une forte expression étant observée de façon préférentielle dans les cellules B du centre germinatif (GC), mais ni dans les plasmocytes, ni dans les précurseurs, les cellules du manteau et les cellules mémoires de type B. Les homologues néoplasiques des cellules B du GC, y compris les lymphomes de Burkitt, folliculaires et lymphomes diffus à grandes cellules, présentent également des niveaux élevés d'expression de la *BCL6* (3).

La *BCL6* pourrait être impliquée dans les translocations chromosomiques où la région régulatrice du gène *BCL6* est remplacée par un partenaire réciproque hétérologue tel qu'un gène des immunoglobulines (IG). La substitution du promoteur conduit à la dérégulation de l'expression de la *BCL6*, qui pourrait être associée à la lymphomagénèse (3). Le réarrangement de la *BCL6* est l'une des anomalies génétiques les plus courantes dans les lymphomes non-hodgkiniens à cellules B, avec une fréquence tout particulièrement élevée (28-40 %) dans les lymphomes diffus à grandes cellules (2).

### Réactif fourni

L'anticorps de souris monoclonale fourni à l'état liquide comme culture cellulaire surnageante dialysée contre 0,05 mol/L Tris/HCl, pH 7.2, et contenant 15 mmol/L NaN<sub>3</sub>.

**Clone:** PG-B6p (1). **Isotype:** IgG1, kappa.

**Concentration IgG de Souris:** Voir l'étiquette sur le flacon de l'échantillon.

La concentration en protéines peut varier d'un lot à l'autre sans que cela influence la dilution optimale. Le titre de chaque lot est comparé et ajusté par rapport à un lot de référence pour assurer des performances de coloration immunohistochimiques cohérentes d'un lot à l'autre.

### Immunogène

Protéine BCL6 glutathion S-transférase (GST) correspondant aux acides aminés 3-484 de la protéine BCL6 humaine (1).

### Spécificité

L'analyse SDS-PAGE des immunoprécipités formés entre l'anticorps et des lysats totaux de cellules Bjab (BCL6+) et des cellules EB3 transfectées par la BCL6, montre une réaction avec un fragment de ~95 kDa qui correspond à la BCL6. Aucune réaction n'a été observée avec les cellules Rd (BCL6-) et les cellules EB3 transfectées avec un plasmide de contrôle (1).

Lors de transfert de type Western des lysats totaux de cellules Bjab et des cellules EB3 transfectées par la BCL6, ou des cellules EB3 transfectées de contrôle, l'anticorps n'a marqué aucune strie, ce qui laisse penser à une absence de réactivité avec la protéine BCL6 dénaturée (1).

Ainsi que le montre l'immunocytochimie, l'anticorps montre une réaction croisée aux protéines équivalentes à la BCL6 chez divers mammifères dont la vache, le lapin, le rat, le mouton et le porc. Aucune réactivité croisée n'a été observée chez le poulet et le pigeon (1).

### Précautions d'emploi

- Pour utilisateurs professionnels.
- Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>), 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.
- Comme pour tout dérivé biologique dangereux à manipuler, une précision s'impose.
- Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.
- Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.

### Conservation

Stocker entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption 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

**Coupes en paraffine:** 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 Dako Target Retrieval Solution, à pH élevé, code S3308, ou en tampon Tris 10 mmol/L, 1 mmol/L EDTA, à 9,0 de pH. Cependant, Dako Target Retrieval Solution, code S1700, ou 10 mmol/L tampon citrate, pH 6.0 et le prétraitement des tissus avec de la protéinase K se sont avérés inefficaces. Les coupes de tissus ne doivent pas sécher pendant le traitement ou la procédure d'immunomarquage immunohistochimique suivante.

**Coupes congelées et préparations cellulaires:** L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissus congelées, fixées à l'acétone.

### Procédure d'immunomarquage

**Dilution:** L'anticorps monoclonal de souris anti-BCL6 humaine, code M7211, peut être dilué entre 1:10 et 1:20 pour application sur des coupes incluses en paraffine, fixées au formol de l'amygdale humaine et par démasquage de l'épitope induite par la chaleur pendant 20 minutes dans Dako Target Retrieval Solutionla, à pH élevé, code S3308, 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 Dako Mouse IgG1, code X0931, dilué à la même concentration de l'IgG de souris que celle de l'anticorps primaire. A moins que la stabilité de l'anticorps dilué et du contrôle négatif ait été établie dans la procédure d'immunomarquage, il est recommandé de diluer ces réactifs juste avant leur emploi, ou de les diluer dans Dako Antibody Diluent, code S0809. Les contrôles positifs et négatifs doivent être opérés simultanément avec l'échantillon du patient.

**Révélation:** Dako LSAB™+/HRP kit, code K0679, et Dako EnVision™+/HRP kits, codes K4004 et K4006, sont requis. Pour les coupes en congélation et préparations cellulaires, Dako APAAP kit, code K0670, est une alternative valable si le marquage endogène péroxydasique est à craindre. Suivre la procédure incluse avec le kit de révélation choisi.

**Automatisation:** L'anticorps est bien adapté à l'immunomarquage immunohistochimique sur plates-formes automatisées.

#### Performances

Les cellules marquées par l'anticorps montrent un marquage diffus/microgranulaire confiné au noyau. Un marquage cytoplasmique intense, non-associé aux chromosomes en métaphase, peut être remarqué uniquement sur les images mitotiques (1).

**Tissus normaux:** Au niveau des amygdales, l'anticorps marque fortement les noyaux des centroblastes de la zone sombre et ceux des centrocytes des zones claires, basale et apicale, des centres germinatifs. De plus, l'anticorps marque environ 10 % des cellules T des centres germinatifs. Aucun marquage n'est observé dans les plasmocytes, les macrophages, les cellules dendritiques folliculaires et les lymphocytes folliculaires du manteau IgD+/IgM+. Dans la rate, le modèle de marquage est similaire à celui des amygdales, mais l'anticorps marque également quelques cellules de type lymphoïde dispersées de phénotype non défini. Dans les tissus extra-lymphoïdes, l'anticorps marque faiblement les épithéliums pavimenteux des amygdales, du thymus et de la peau. Aucun marquage n'a été observé dans le foie, la thyroïde, les muscles striés ou les reins (1).

**Tissus anormaux:** L'anticorps a été testé sur 173 cas de néoplasmes lymphoïdes humains. Parmi les lymphomes à cellules B, 24 lymphomes centraux folliculaires sur 24, 29 lymphomes diffus à grandes cellules sur 30, et 13 lymphomes de Burkitt sur 13 ont été positifs. Aucun marquage n'a été observé sur 7 leucémies lymphoblastiques aiguës pré-B sur 7, 16 leucémies lymphocytaires/B-CLL sur 16, 6 leucémies à tricholeucocytes sur 6, 22 leucémies à cellules du manteau sur 22 et 14 lymphomes de la zone marginale sur 14. Parmi les lymphomes ou leucémies à cellules T, 4 lymphomes à grandes cellules anaplasiques sur 8 ont été positifs, tandis qu'aucun marquage n'a été observé dans 10 lymphomes lymphoblastiques aigus sur 10, 3 mycosis fongoides sur 3, 6 lymphomes à cellules T périphériques sur 6, et 2 lymphomes à cellules T (type ALLD) périphériques sur 2. Pour la maladie de Hodgkin, 5 types nodulaires à prédominance lymphocytaire sur 5, 1 type à sclérose nodulaire sur 4 et 1 type à cellularité mixte sur 3 ont été positifs (1).

Parmi les lymphomes non-hodgkiniens liés au SIDA, l'anticorps a marqué 11 lymphomes à petites cellules non clivées sur 11, 7 lymphomes à grandes cellules non clivées (LNCCL) sur 7 et 2 lymphomes plasmocytoïdes à grandes cellules immunoblastiques (IBLP) sur 9. Parmi les lymphomes primitifs du système nerveux central du SIDA, l'anticorps a marqué 4 LNCCL sur 4 et aucun des 4 cas de IBLP. Aucun marquage n'a été observé dans 5 cas de lymphomes des cavités (PEL) et dans 6 lignées cellulaires de PEL du SIDA (4).

## DEUTSCH

#### Zweckbestimmung

Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.

Monoclonal Mouse Anti-Human BCL6 Protein, Clone PG-B6p, ist für den immunhistochemischen Gebrauch bestimmt. Der Antikörper markiert BCL6-Protein exprimierende Zellen und ist nützlich für die Abgrenzung von proliferierenden Zentren bei B-Zell-CLL (BCL2+/BCL6-) von „trapped“ Keimzentren bei Mantelzell-Lymphomen (BCL2-/BCL6+) sowie für die Identifizierung neoplastischer Zellen in Fällen des nodulären, durch Prädomanz von Lymphozyten gekennzeichnetem Hodgkin-Lymphom (1). Die differentielle Identifizierung wird durch die mit einem Antikörper-Panel erhaltenen Resultate unterstützt. Die klinische Auswertung einer eventuell eintretenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit geeigneten Kontrollen ergänzt werden und von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer diagnostischer Tests des Patienten vorgenommen werden.

#### Zusammenfassung und Erklärung

Das proto-Onkogen *BCL6* kodiert ein 92-98 kDa POZ/Zinkfingerprotein. Über seine sechs C-terminalen Zinkfinger-Motive erfolgt die Bindung des BCL6-Proteins an spezifische DNA-Sequenzen der Zielgene, wo es als die Transkription verhemderer Repressor fungiert (2, 3).

Die *BCL6*-Expression ist potentiell ubiquitär, da niedrige Level in vielen Geweben nachgewiesen werden. Hochgradige *BCL6*-Expressionen sind allerdings auf Zellen der B-Lymphzelllinie und der Skelettmuskulatur begrenzt. Bei der B-Lymphoidzelllinie scheint die *BCL6*-Expression während der Differenzierung unter strikter Regulierung zu stehen und starke Expression wird vorzugsweise in dem Keimzentrum (GC) entstammenden B-Zellen, nicht jedoch in Plasmazellen, Vorläuferzellen, Mantelzonenzellen und B-Gedächtniszellen beobachtet. Neoplastische Gegenstücke der GC-B-Zellen, einschließlich von Burkitt-Lymphom, follikulärem Lymphom und diffusem großzelligem Lymphom, zeigen ebenfalls hochgradige *BCL6*-Expression (3).

*BCL6* ist möglicherweise an chromosomalen Translokationen beteiligt, bei denen die regulatorische Region des *BCL6*-Gens durch einen heterologen reziproken Partner - wie beispielsweise die Immunglobulin-Gene (IG) – ersetzt wird. Die Promotor-Substitution führt zur Derugulierung der *BCL6*-Expression, die mit der Lymphom-Entstehung in Zusammenhang stehen könnte (3). Beim *BCL6*-Rearrangement handelt es sich um eine der häufigsten genetischen Anomalien bei B-Zell-Lymphomen vom Non-Hodgkin-Typ mit einer besonders stark ausgeprägten Auftrittshäufigkeit (28-40 %) beim diffusen großzelligen Lymphom (2).

#### Geliefertes Reagenz

Der monoklonale Mausantikörper wird in flüssiger Form als Zellkulturüberstand geliefert, wurde gegen 0,05 mol/L Tris/HCl, pH-Wert 7,2 dialysiert und enthält 15 mmol/L Na<sub>3</sub>.

**Klon:** PG-B6p (1). **Isotyp:** IgG1, Kappa.

**Maus-IgG-Konzentration:** Siehe Produktetikett.

Die Proteinkonzentration kann bei den Chargen verschieden ausfallen, ohne die optimale Verdünnung zu beeinflussen. Der Titer wird bei jeder einzelnen Charge mit einer Referenzcharge verglichen und dieser angeglichen, um konstante immunhistochemische Färbeergebnisse zwischen den Chargen zu gewährleisten.

#### Immunogen

Rekombinantes Glutathion-S-Transferase (GST)-BCL6-Protein, entsprechend den Aminosäuren 3-484 des humanen BCL6-Proteins (1).

#### Spezifität

Die SDS-PAGE-Analyse der Immunpräzipitate, die zwischen dem Antikörper und den Gesamtlysaten der Bjab-Zellen (BCL6+) und BCL6-transfizierten EB3-Zellen gebildet wurden, zeigen eine Reaktion mit dem BCL6 entsprechenden Fragment von ~95 kDa. Bei mit Kontroll-Plasmid transfizierten Rd-Zellen (BCL6-) und EB3-Zellen wird keine Reaktion beobachtet (1).

Beim Western-Blot der Gesamtlysate von Bjab-Zellen und mit BCL6 transfizierten EB3-Zellen oder mit Kontrollpräparat transfizierten EB3-Zellen markierte der Antikörper keinerlei Banden. Hierdurch wird eine mangelnde Reaktivität mit denaturiertem BCL6-Protein nahe gelegt (1).

Es wurde der immunzytochemische Nachweis erbracht, dass der Antikörper bei verschiedenen Säugetieren wie Kuh, Kaninchen, Ratte, Schaf und Schwein eine Kreuzreaktion mit dem BCL6-äquivalenten Protein eingeht. Für Huhn und Taube wurde keine Kreuzreaktivität festgestellt (1).

#### Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Für geschultes Fachpersonal.
- Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN<sub>3</sub>), 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.
- Wie bei allen aus biologischen Materialien gewonnenen Produkten müssen die ordnungsgemäßen Handhabungsverfahren eingehalten werden.
- Geeignete Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
- Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.

(102305-002)

M7211/EFG/KRM/2008.09.30 p. 3/4

Dako 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

#### Lagerung

Bei 2–8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Fläschchen aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien nicht entsprechend den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen die Bedingungen vom Anwender geprüft werden. Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für eine eventuelle Produktinstabilität. Positiv- und Negativkontrollen sollten daher zur gleichen Zeit wie die Patientenproben getestet werden. Falls eine unerwartete Färbung auftritt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Antikörper hindeutet, ist der technische Kundendienst von Dako zu verständigen.

#### 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 Dako Target Retrieval Solution, pH 9,9, Code-Nr. S3308, oder mit 10 mmol/L Tris-Puffer, 1 mmol/L EDTA, pH 9,0. Die Nutzung von Dako Target Retrieval Solution, Code-Nr. S1700 oder 10 mmol/L Citratpuffer, pH 6,0 und die Gewebevorbehandlung mit Proteinase K haben sich als ineffizient erwiesen. Während der Gewebevorbehandlung oder während der sich anschließenden immunhistochemischen Färbeprozedur dürfen die Gewebeschnitte nicht austrocknen.

**Gefrierschnitte und zytologische Präparate:** Der Antikörper kann für die Markierung acetonfixierter Gefrierschnitte genutzt werden.

#### Färbeprozedur

**Verdünnung:** Monoclonal Mouse Anti-Human BCL6 Protein, Code-Nr. M7211, kann bei einem Verdünnungsbereich von 1:10-1:20 eingesetzt werden, wenn es für formalinfixierte, paraffineingebettete Schnitte der menschlichen Tonsille genutzt wird und wenn 20 Minuten lang die hitzeinduzierte Epitopdemaskierung mit Dako Target Retrieval Solution, pH 9,9, Code-Nr. S3308, 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 Dako Mouse IgG1, Code-Nr. X0931, 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 Dako Antibody Diluent, Code-Nr. S0809, vorzunehmen. Es sollten die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientenproben mitgeführt werden.

**Visualisierung:** Folgende Kits werden empfohlen: Dako LSAB™+/HRP-Kit, Code-Nr. K0679 und Dako EnVision™+/HRP-Kits, Code-Nr. K4004 und K4006. Falls bei Gefrierschnitten und Zellpräparaten Probleme mit endogener Peroxidasefärbung auftreten, bietet der Dako APAAP Kit, Code-Nr. K0670, eine gute Alternative. 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 immunhistochemische Färben unter Nutzung automatisierter Plattformen geeignet.

#### Leistungseigenschaften





Durch den Antikörper markierte Zellen zeigen ein diffuses/mikrogranuläres und auf den Nukleus begrenztes Färbemuster. Nur bei mitotischen Konfigurationen wird eine intensive zytoplasmatische Färbung festgestellt, die nicht mit Metaphasechromosomen assoziiert ist (1).

**Normalgewebe:** Bei der Tonsille markiert der Antikörper in starkem Ausmaß die Zentroblasten-Nuklei der dunklen Zone sowie die Zentrozyten der basalen und apikalen hellen Zonen. Zudem markiert der Antikörper circa 10 % der Keimzentrum-T-Zellen. Keine Markierung wurde festgestellt für: Plasmazellen, Makrophagen, follikulär-dendritische Zellen und IgD+/IgM+ follikuläre Mantellymphozyten. Für die Milz verlief das Färbungsmuster ähnlich wie bei der Tonsille, der Antikörper markierte jedoch darüber hinaus einige wenige verstreute Lymphoid-artigen Zellen eines nicht definierten Phänotyps. Bei Geweben außerhalb des Lymphsystems erbrachte der Antikörper schwache Färbung squamöser Ehpithelien von Tonsille, Thymus und Haut. Für Leber, Schilddrüse, gestreiften Muskel oder Niere wurde keine Markierung beobachtet (1).

**Anomales Gewebe:** Mit dem Antikörper wurden 173 Fälle lymphoider Neoplasmen des Menschen getestet. Von den B-Zell-Lymphomen oder –Leukämien wurden positive Resultate erhalten für 24/24 follikuläre Lymphome (zentroblastisch-zentrozytisch, FCL), 29/30 diffuse großzellige Lymphome und 13/13 Burkitt-Lymphome. Keine Markierung erbrachten: 7/7 Akute Lymphatische Leukämien vom prä-B-Typ, 16/16 kleinzellig-lymphozytische /B-CLL, 6/6 Haarzell-Leukämien, 22/22 Mantelzell-Leukämien und 14/14 Marginalzonen-Lymphome. Von den T-Zell-Lymphomen oder Leukämien testeten 4/8 anaplastische großzellige Lymphome positiv, wohingegen keine Markierung beobachtet wurde bei: 10/10 Akuten Lymphatischen Lymphomen, 3/3 Mycosis fungoides, 6/6 peripheren T-Zell-Lymphomen und 2/2 peripheren T-Zell-Lymphomen (vom AILD-Typ; angioimmunoblastische Lymphadenopathie mit Dysproteinämie) Für das Hodkin-Lymphom wurden positive Resultate erhalten für: 5/5 nodulärer Typ, Prädomanz der Lymphozyten, 1/4 nodulär-sklerosierender Typ und 1/3 Typen gemischter Zellularität (1).

Beim systemischen AIDS-assoziierten Non-Hodgkin-Lymphom markierte der Antikörper 11/11 kleinzellige nicht zentrozytische Lymphome (small noncleaved cell lymphomas, SNCCCL), 7/7 großzellige nicht zentrozytische Lymphome (large noncleaved cell lymphomas, LNCCL) und 2/9 großzellige immunoblastische lymphoplasmazytoide Lymphome (large cell immunoblastic lymphoma plasmacytoid, IBLP). Beim AIDS-assoziierten primären Lymphom des Zentralnervensystems (PCNSL) markierte der Antikörper 4/4 LNCCL und keinen der vier Fälle von IBLP. Keine Markierung ergab sich in 5 Fällen eines primären Erguss-Lymphoms (primary effusion lymphoma, PEL) und bei 6 AIDS-assoziierten PEL-Zelllinien (4).

<b>References/ Références/ Literatur</b>			
<ol style="list-style-type: none"><li>Flengli L, Bigerna B, Fizzotti M, Venturi S, Pasqualucci L, Pileri S, et al. Monoclonal antibodies PG-B6a and PG-B6p recognize, respectively, a highly conserved and a formol-resistant epitope on the human BCL-6 protein amino-terminal region. Am J Pathol 1996;148:1543-55.</li> <li>Ye BH. BCL-6 in the pathogenesis of non-Hodgkin’s lymphoma. Cancer Invest 2000;18:356-65.</li> <li>Nakamura Y. Internal deletions within the <i>BCL6</i> gene in B-cell non-Hodgkin’s lymphoma. Leuk Lymphoma 2000;38:505-12.</li> <li>Carbone A, Gaidano G, Ghoghini A, Larocca LM, Capello D, Canzonieri V, et al. Differential expression of BCL-6, CD138/syndecan-1, and Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 identifies distinct histogenetic subsets of acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin’s lymphomas. Blood 1998;91:747-55.</li></ol>			

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

<b>Explanation of symbols/ Légende des symboles/ Erläuterung der Symbole</b>			
(102305-002)			M7211/EFG/KRM/2008.09.30 p. 4/4

(102305-002)

Dako 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