

**Monoclonal Mouse  
Anti-Human  
Caldesmon  
Clone h-CD**

---

**ENGLISH**  
**Code M3557**

**Intended use**

For In Vitro Diagnostic Use.

**Summary and explanation**

Caldesmon is a developmentally regulated protein involved in smooth muscle and non-muscle contraction.<sup>2,3</sup>

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* or the detection system instructions of IHC procedures for: 1) Principle of Procedure, 2) Materials Required, Not Supplied, 3) Storage, 4) Specimen Preparation, 5) Staining Procedure, 6) Quality Control, 7) Troubleshooting, 8) Interpretation of Staining, 9) General Limitations.

**Reagent provided**

Anti-human caldesmon, h-CD is a mouse monoclonal antibody supplied in liquid form as tissue culture supernatant (containing fetal bovine serum) dialyzed against 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.2 and 0.015 mol/L sodium azide.

Clone: h-CD<sup>1</sup> Isotype: IgG<sub>1</sub>, kappa  
Mouse IgG concentration mg/L: See label on vial.

Anti-caldesmon, h-CD may be used at a dilution of 1:50 to 1:100 in the LSAB method determined on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. These are guidelines only; optimal dilutions should be determined by the individual laboratory.

**Immunogen**

Crude human uterus extract<sup>1</sup>

**Specificity**

Two closely related variants of human caldesmon have been identified which differ in their electrophoretic mobility and cellular distribution. The *h*-caldesmon variant (120–150 kD) is predominantly expressed in smooth muscle whereas *l*-caldesmon (70–80 kD) is found in non-muscle tissue and cells. Neither of the two variants have been detected in skeletal muscle.<sup>2</sup> Monoclonal anti-caldesmon, h-CD, recognizes only the 150 kD variant (*h*-caldesmon) in Western blots of human aortic media extracts and is unreactive with fibroblast extracts from cultivated human foreskin.<sup>1</sup>

**Materials required, but not supplied**

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* and/or the detection system instructions.

**Precautions**

1. For professional users.
2. This product contains sodium azide (NaN<sub>3</sub>), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, NaN<sub>3</sub> 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.
4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
5. Unused reagents 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 Support.

**Specimen preparation**

*Paraffin Sections*

Anti-caldesmon, h-CD can be used on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections.

Prior to the IHC staining procedure, the deparaffinized tissue sections must be treated with a proteolytic enzyme followed by target retrieval. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of Silanized Slides (code S3003) is recommended. Deparaffinized tissue sections must first be treated for 5 to 10 minutes with a mild enzyme solution. A recommended proteolytic enzyme is Proteinase K (code S3004) which must be further diluted 1:500 in 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.6 to give a final concentration of 0.04 mg/mL.

Following proteolytic digestion, tissue sections must be treated with heat. When using the water bath method, preheat a Coplin jar containing 0.01 mol/L citrate buffer, pH 6.0 as well as a water bath to 95–99 °C. When the temperature has stabilized, place tissue sections into the Coplin jar containing the preheated buffer. Heat the tissue sections for 40 minutes. For improved staining results and a shorter incubation time, Target Retrieval Solution (code S1700) can be used in place of the 0.01 mol/L citrate buffer. Under these conditions the incubation time in the water bath may be reduced to 20 minutes. After thermal treatment, allow the jar with buffer and slides to cool for 20 minutes at room temperature. Rinse well with distilled water and place slides into buffer.

#### *Cryostat Sections and Cell Smears*

Anti-caldesmon, h-CD can also be used to label cryostat sections or cell smears.

#### **Staining procedure**

Follow the recommended procedure for the detection system selected.

#### **Staining interpretation**

The staining pattern for anti-caldesmon is cytoplasmic.

#### **Performance characteristics**

##### *Normal Cells*

Monoclonal anti-caldesmon was found to localize *h*-caldesmon in cryostat sections of human tissues including developing visceral smooth muscle from 10–20 week-old fetal trachea, esophagus, jejunum and uterus. Aortic smooth muscle cells from 10 and 20 week-old fetuses were unreactive with anti-caldesmon.<sup>1</sup> In the adult, caldesmon expression was demonstrated in vascular and visceral smooth muscle cells but not epithelial cells, endothelial cells or connective tissue fibroblasts. Cells of the tunica media and a subpopulation of smooth muscle cells of the sub-endothelial intima of the adult aorta were shown to stain positively with anti-caldesmon.<sup>1</sup> In immunohistochemical (IHC) studies on cryostat sections of normal human breast, monoclonal anti-caldesmon labeled the smooth muscle cells of blood vessels and a subset of myoepithelial cells in the galactophorous sinuses. Myoepithelial cells of the lobules, ducts and luminal epithelial cells of normal breast did not react positively.<sup>4</sup>

##### *Tumor Cells*

In IHC studies on breast carcinoma, monoclonal anti-caldesmon has been demonstrated to label a subpopulation of myoepithelial cells but is unreactive with myofibroblasts and tumor cells.<sup>5</sup>

---

#### **FRANÇAIS**

**Code M3557**

#### **Intérêt**

Pour diagnostic in vitro.

#### **Résumé et explication du test**

La caldesmone est une protéine à régulation embryonnaire impliquée dans les contractions musculaires lisses et non musculaires.<sup>2,3</sup>

Se référer aux *Instructions générales de coloration immunohistochimique* de Dako ou aux instructions du système de détection concernant les procédures IHC pour : 1) Principe de procédure, 2) Matériaux requis mais non fournis, 3) Conservation, 4) Préparation des échantillons, 5) Procédure de coloration, 6) Contrôle qualité, 7) Dépannage, 8) Interprétation de la coloration, 9) Limites générales.

#### **Réactif fourni**

Anti-human caldesmon, h-CD est un anticorps monoclonal de souris liquide fourni sous forme de surnageant de culture cellulaire (contenant du sérum de veau fœtal) dialysé contre une solution Tris/HCl à 0,05 mol/L, à pH 7,2 et de l'azide de sodium à 0,015 mol/L.

Clone: h-CD<sup>1</sup> Isotype: IgG<sub>1</sub>, kappa

Concentration en IgG de souris, en mg/L : Se reporter à l'étiquette du flacon.

Anti-caldesmon, h-CD peut être dilué de 1:50 à 1:100 pour les déterminations par méthodes LSAB sur des coupes de tissus incluses en paraffine, fixées par le formol. Il ne s'agit que de recommandations ; les dilutions optimales doivent être déterminées par chaque laboratoire.

#### **Immunogène**

Extrait brut d'utérus humain<sup>1</sup>

#### **Spécificité**

Deux variants très proches de la caldesmone humaine ont été identifiés ; ils diffèrent par leur mobilité électrophorétique et leur distribution cellulaire. Le variant *h*-caldesmone (120-150 kDa) est exprimé essentiellement dans le muscle lisse, tandis que la *l*-caldesmone (70-80 kDa) est présente dans les tissus et cellules non musculaires. Aucun des deux variants n'a été détecté dans le muscle squelettique.<sup>2</sup> L'anticorps monoclonal anti-caldesmon, h-CD, ne reconnaît que le variant de 150 kDa (*h*-caldesmone) dans les transferts de type Western d'extraits de média d'aorte humaine et il ne réagit pas avec les extraits de fibroblastes isolés à partir de prépuce humain cultivé.<sup>1</sup>

#### **Matériel nécessaire mais non fourni**

Se référer aux Dako's *Instructions Générales relatives à la procédure de Marquage Immunohistochimique* et/ou aux instructions du système de détection.

## Précautions

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, le NaN<sub>3</sub> peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations pour former des azides métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
3. Comme avec tout produit d'origine biologique, respecter les procédures de manipulation appropriées.
4. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.
5. Les réactifs non utilisés doivent être éliminés conformément aux réglementations locales et nationales.

## Conservation

Conservé entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'y a aucun signe évident indiquant l'instabilité de ce produit. Par conséquent, les contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que des échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par un changement des procédures du laboratoire, et en cas de suspicion d'un problème lié à l'anticorps, contacter l'assistance technique de Dako.

## Préparation de l'échantillon

Coupes en paraffine

Anti-caldesmon, h-CD peut être utilisé sur des coupes de tissus incluses en paraffine, fixées par le formol.

Avant la procédure d'immunomarquage, les coupes de tissu déparaffinisées doivent être traitées avec une enzyme protéolytique, puis par restauration de l'épitope. Il est recommandé d'utiliser les lames silanisées (code S3003) pour une meilleure adhérence des coupes de tissu sur les lames en verre. Les coupes de tissu déparaffinisées doivent d'abord être traitées pendant 5 à 10 minutes avec une solution enzymatique légère. Une enzyme protéolytique recommandée est la Proteinase K (code S3004) qui doit être diluée à 1:500 dans une solution Tris-HCl à 0,05 mol/L, pH 7,6, pour obtenir une concentration finale de 0,04 mg/mL.

Après la digestion protéolytique, les coupes de tissu peuvent être traitées par la chaleur. Si l'on utilise un bain-marie, préchauffer un tube de Coplin contenant un tampon citrate à 0,01 mol/L, pH 6,0 et un bain-marie à 95-99 °C. Lorsque la température est stabilisée, placer les coupes de tissu dans le tube de Coplin contenant le tampon préchauffé. Chauffer les coupes de tissu pendant 40 minutes. Pour de meilleurs résultats du marquage et une durée d'incubation plus courte, Target Retrieval Solution (code S1700) peut être utilisée à la place du tampon citrate à 0,01 mol/L. Dans ce cas, la durée d'incubation au bain-marie peut être réduite à 20 minutes. Après le traitement par la chaleur, laisser refroidir le tube contenant le tampon et les lames pendant 20 minutes à température ambiante. Bien rincer à l'eau distillée et placer les lames dans un tampon.

## Sections de cryostat et frottis cellulaires

Anti-caldesmon, h-CD peut également être utilisé pour marquer des sections de cryostat et des frottis cellulaires.

## Procédure d'immunomarquage

Suivre la procédure recommandée pour le système de détection choisi.

## Interprétation de la coloration

Le profil de coloration cellulaire pour anti-caldesmon est cytoplasmique.

## Performances

### Cellules normales

L'anticorps monoclonal anti-caldesmon a détecté la h-caldesmone dans des sections de cryostats de tissus humains, incluant le muscle lisse viscéral en développement de la trachée, du jéjunum, de l'œsophage et de l'utérus de fœtus de 10 à 20 semaines. Les cellules musculaires lisses aortiques de fœtus de 10 et 20 semaines n'ont pas réagi avec anti-caldesmon.<sup>1</sup> Chez l'adulte, la caldesmone a été exprimée dans les cellules de muscle lisse viscéral et vasculaire, mais pas dans les cellules épithéliales, les cellules endothéliales ou les fibroblastes du tissu conjonctif. Les cellules de la média et une sous-population de cellules musculaires lisses de l'intima sous-endothéliale de l'aorte adulte ont été marquées positivement avec anti-caldesmon.<sup>1</sup> Dans les analyses immunohistochimiques (IHC) de sections de cryostats de sein humain normal, l'anticorps monoclonal anti-caldesmon a marqué les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins et un sous-ensemble de cellules myoépithéliales dans les sinus galactophores. Les cellules myoépithéliales des lobules, de canaux et les cellules épithéliales luminales du sein normal n'ont pas réagi positivement.<sup>4</sup>

### Cellules tumorales

Dans les analyses IHC de cancer du sein, l'anticorps monoclonal anti-caldesmon marque une sous-population de cellules myoépithéliales mais il ne réagit pas avec les myofibroblastes et les cellules tumorales.<sup>5</sup>

---

## DEUTSCH

Code M3557

## Zweckbestimmung

Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.

## Zusammenfassung und Erläuterung

Caldesmon ist ein entwicklungsabhängig reguliertes Protein, das bei der Kontraktion von glatten Muskeln und bei nicht-muskulärer Kontraktion eine Rolle spielt.<sup>2,3</sup>

Folgende Angaben bitte den *Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* von Dako bzw. den Anweisungen des Detektionssystems für IHC-Verfahren entnehmen: 1) Verfahrensprinzipien, 2) Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien, 3) Aufbewahrung, 4) Vorbereitung der Probe, 5) Färbeverfahren, 6) Qualitätskontrolle, 7) Fehlerbehebung, 8) Auswertung der Färbung, 9) Allgemeine Beschränkungen.

### Geliefertes Reagenz

Anti-Human-Caldesmon, h-CD, ist ein monoklonaler Mausantikörper und wird in flüssiger Form als Gewebekulturüberstand (mit fetalem bovines Serum) geliefert, der gegen 0,05 mol/L Tris-HCl, pH-Wert 7,2, dialysiert wurde und 0,015 mol/L NaN<sub>3</sub> enthält.

Klon: h-CD<sup>1</sup> Isotyp: IgG<sub>1</sub>, Kappa  
Maus-IgG-Konzentration mg/L: Siehe Produktetikett.

Anti-Caldesmon, h-CD, kann mit der LSAB-Methode in einer Verdünnung von 1:50 bis 1:100 für formalinfixierte, paraffineingebettete Gewebeschnitte verwendet werden. Bei diesem Verdünnungswert handelt es sich lediglich um eine Richtlinie; die optimalen Verdünnungen sollten von jedem einzelnen Labor bestimmt werden.

### Immunogen

Rohextrakt aus menschlichem Uterus<sup>1</sup>

### Spezifität

Es wurden zwei nahe verwandte Varianten menschlichen Caldesmons identifiziert, die sich in ihrer elektrophoretischen Mobilität und zellulären Verteilung unterscheiden. Die h-Caldesmon-Variante (120–150 kD) wird vornehmlich in glattem Muskel exprimiert, während l-Caldesmon (70–80 kD) in nicht-muskulärem Gewebe und Zellen anwesend ist. Im Skelettmuskel wurde keine der beiden Varianten nachgewiesen.<sup>2</sup> Beim Western Blotting von Media-Extrakten menschlicher Aorta zeigte sich, dass monoklonales Anti-Caldesmon, h-CD, nur die 150 kD-Variante (h-Caldesmon) erkennt und gegenüber Fibroblastenextrakten aus kultivierter menschlicher Vorhaut unreaktiv ist.<sup>1</sup>

### Benötigtes Material, welches nicht mitgeliefert wird

Siehe *Allgemeine Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* von Dako und/oder Anweisungen des Detektionssystems.

### Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur für Fachpersonal bestimmt.
2. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN<sub>3</sub>), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Ansammlungen von NaN<sub>3</sub> können auch in Konzentrationen, die nicht als gefährlich klassifiziert sind, mit Blei- und Kupferabflussrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Azidansammlungen in den Leitungen vorzubeugen.
3. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.
4. Entsprechende Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
5. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.

### Aufbewahrung

Bei 2–8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Fläschchen aufgedruckten Verfallsdatums 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 es zu einer unerwarteten Färbung kommt, 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

Anti-Caldesmon, h-CD, kann auf formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten genutzt werden.

Vor der Durchführung der IHC Färbeprozedur müssen die entparaffinierten Gewebeschnitte einer Behandlung mit proteolytischem Enzym und anschließender Antigendemaskierung unterworfen werden. Um eine bessere Haftung der Gewebeschnitte an den Objektträgern zu gewährleisten, werden Silanized Slides (Code S3003) (*silanierte Objektträger*) empfohlen. Entparaffinierte Gewebeschnitte müssen zunächst 5 bis 10 Minuten lang mit einer milden Enzymlösung behandelt werden. Als proteolytisches Enzym wird Proteinase K (Code S3004) empfohlen, das weiter 1:500 in 0,05 mol/L Tris-HCl, pH 7,6, zu verdünnen ist, so dass eine Endkonzentration von 0,04 mg/mL resultiert.

Im Anschluss an die proteolytische Verdauung müssen die Gewebeschnitte einer Hitzebehandlung unterworfen werden. Beim Einsatz der Wasserbadmethode eine Glasküvette mit 0,01 mol/L Citratpuffer, pH 6,0, ebenso wie das Wasserbad auf 95–99 °C erhitzen. Sobald sich die Temperatur stabilisiert hat, die Gewebeschnitte in die Glasküvette mit dem vorgewärmten Puffer einsetzen.

Die Gewebeschnitte 40 Minuten erhitzen. Zur Verbesserung der Färberegebnisse und Verkürzung der Inkubationszeit kann anstelle des 0,01 mol/L Citratpuffers Antigendemaskierungslösung (Code S1700) verwendet werden. Unter diesen Umständen kann die Inkubationszeit im Wasserbad bis auf 20 Minuten reduziert werden. Nach der Hitzebehandlung die Küvette mit dem Puffer und die Objektträger 20 Minuten lang bei Raumtemperatur abkühlen lassen. Mit destilliertem Wasser gut abspülen und die Objektträger in den Puffer einsetzen.

#### Kryostatschnitte und Zellabstriche

Anti-Caldesmon, h-CD, kann ebenfalls zur Färbung von Kryostatschnitten oder Zellabstrichen verwendet werden.

### Färbeprozedur

Es ist dem dem für das ausgewählte Detektionssystem empfohlenen Verfahren zu folgen..

### Interpretation des Färberegebnisses

Anti-Caldesmon ergibt ein zytoplasmatisches Färbemuster.

## Leistungseigenschaften

### Normale Zellen

Es wurde gezeigt, dass h-Caldesmon in Kryostatschnitten menschlicher Gewebe, darunter viszeraler glatter Muskel aus der Trachea, dem Ösophagus, Jejunum und Uterus von 10-20 Wochen alten Föten, von monoklonalem Anti-Caldesmon lokalisiert wird. Anti-Caldesmon reagierte mit glatten Muskelzellen der Aorta von 10 und 20 Wochen alten Föten nicht positiv.<sup>1</sup> Beim Erwachsenen wurde die Expression von Caldesmon in glatten Muskelzellen der Gefäße und Viszera nachgewiesen, nicht jedoch in Epithelzellen, Endothelialzellen oder in Fibroblasten des Bindegewebes. In der Aorta Erwachsener tritt in den Zellen der Tunica media sowie in einer Untergruppe glatter Muskelzellen der subendothelialen Intima eine positive Färbung mit Anti-Caldesmon auf.<sup>1</sup> In immunhistochemischen (IHC) Studien mit Kryostatschnitten aus normalem menschlichem Brustgewebe färbte das monoklonale Anti-Caldesmon die glatten Muskelzellen von Blutgefäßen sowie eine Untergruppe von Myoepithelzellen in den Milchsäckchen. Myoepithelzellen der Lobuli und Milchgänge und die luminalen Epithelzellen von normalem Brustgewebe reagierten nicht positiv.<sup>4</sup>

### Tumorzellen





In IHC-Studien an Brustkarzinomen zeigte sich, dass monoklonales Anti-Caldesmon eine Untergruppe myoepithelialer Zellen färbt, mit Myofibroblasten und Tumorzellen jedoch nicht-reaktiv ist.<sup>5</sup>

## References

### Références

#### Literatur

1. Frid MG, et al. Phenotypic changes of human smooth muscle cells during development: Late expression of heavy caldesmon and calponin. Dev Biol 1992; 153:185
2. Sobue K and Sellers JR. Caldesmon, a novel regulatory protein in smooth muscle and nonmuscle actomyosin systems. J Biol Chem 1991; 266(19):12115
3. Glukhova MA, et al. Developmental changes in expression of contractile and cytoskeletal proteins in human aortic smooth muscle. J Biol Chem 1990; 265(22):13042
4. Lazard D, et al. Expression of smooth muscle-specific proteins in myoepithelium and stromal myofibroblasts of normal and malignant human breast tissue. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90:999
5. Wang NP, et al. Monoclonal antibodies (MAbs) to novel myoepithelium-associated proteins can distinguish between benign and malignant lesions of the breast. US Canad Acad Pathol Abstr 1996; 26A:135

|   |   |  |
|---|---|--|
| <b>REF</b><br>Catalogue number<br>Référence du catalogue<br>Bestellnummer   |  Temperature limitation<br>Limites de température<br>Zulässiger Temperaturbereich |  Consult instructions for use<br>Consulter les instructions d'utilisation<br>Gebrauchsanweisung beachten |
|  Manufacturer<br>Fabricant<br>Hersteller   | <b>LOT</b><br>Batch code<br>Code du lot<br>Chargenbezeichnung   |  Use by<br>Utiliser jusque<br>Verwendbar bis  |
| <b>EC REP</b><br>Authorized representative in the European Community<br>Représentant Autorisé dans la Communauté Européenne<br>Autorisierter Repräsentant in der EU | <b>IVD</b><br>In vitro diagnostic medical device<br>Dispositif médical de diagnostic in vitro<br>In-vitro-Diagnostikum  |  |



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