

## Monoclonal Mouse Anti-Human Mast Cell Tryptase

Clone AA1

**Code No./ Code/ Code-Nr. M 7052**

Edition/ Ausgabe 18.12.02

ENGLISH
---------

### Intended use

For in vitro diagnostic use.

Monoclonal Mouse Anti-Human Mast Cell Tryptase, Clone AA1, is intended for use in immunocytochemistry. The antibody labels human mast cells and is a useful tool for the recognition of very atypical or immature mast cells (MC) in mast cell leukaemia, and for the detection of small, even minute, dense focal MC infiltrates in staging procedures in patients with known cutaneous mastocytosis (1). 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

Human mast cell tryptases (EC 3.4.21.59) comprise a family of trypsin-like neutral serine proteases that are predominantly expressed in mast cells (2). In its enzymatically active form, mast cell tryptase exists as a non-covalently linked tetramer of 132 kDa (2, 3). Mast cell tryptase is capable of degrading vasoactive intestinal peptide and activating prekallikrein as well as generating kinins, all important mediators involved in bronchoconstriction and airway hyperresponsiveness, which are major contributors to allergic airway disease (2). Mast cell tryptase also exhibits mitogenic effect on human airway smooth muscle cells, and human lung and dermal fibroblasts. Both smooth muscle hyperplasia and fibrotic changes can lead to thickening of the airway wall and a permanent reduction in airway calibre (2). Mast cells are activated by a number of stimuli, including antigen, superoxides, complement protein, neuropeptides and lipoproteins, resulting in activation and degranulation. Mast cell degranulation and thereby release of mast cell tryptase as well as histamine, leukotrienes and cytokines into the surrounding tissue is a pivotal event in an inflammatory response and seems to play an important role in host defense against pathogens (4). Mast cells play an active role in such diverse diseases as atherosclerosis, asthma, arthritis, bile duct fibrosis, malignancy and pulmonary fibrosis (4, 5).

Identification of mast cells through staining of tissues with antibodies specific for human mast cell tryptase has been useful in identification of focal and diffuse MC infiltrates in primary MC disease and mastocytosis. Demonstration of mast cell tryptase is essential for the identification of highly atypical, hypogranulated or even non-metachromatic MCs, especially in MC leukaemia, and for the detection of small or minute MC infiltrates (1).

### 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:** AA1 (3). **Isotype:** IgG1, kappa.

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

### Immunogen

Mast cell tryptase isolated from human lung (3).

### Specificity

In Western blotting of a tryptase-rich extract of human lung under reducing conditions, the antibody labels a band of approximately 32.5 kDa corresponding to human mast cell tryptase (3).

In indirect ELISA the antibody reacts with purified human mast cell tryptase (3).

Antibody-binding to the mast cell tryptase does not affect enzyme activity (3).

Periodate treatment of mast cell tryptase has no effect on antibody labelling, indicating that carbohydrate epitopes are not involved in antibody recognition. Nor is antibody recognition affected by the presence of heparin (3).

### 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.

### 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

**Paraffin sections:** The antibody can be used for labelling paraffin-embedded tissue sections fixed in formalin or Carnoy's reagent, although the structural integrity of the mast cells is better preserved with formalin fixation (6). Pre-treatment of tissues with heat-induced epitope retrieval is required. For tissues fixed in formalin, optimal results are obtained with DakoCytomation Target Retrieval Solution, code No. S 1700, DakoCytomation Target Retrieval Solution, High pH, code No. S 3308, 10 mmol/L citrate buffer, pH 6.0, or 10 mmol/L Tris buffer, 1 mmol/L EDTA, pH 9.0. Pre-treatment of tissues with proteinase K or trypsin (6) was found less efficient. The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunocytochemical staining procedure.

**Frozen sections and cell preparations:** The antibody can be used for labelling Carnoy's or acetone/methanol fixed, frozen sections and cell preparations (3).

### Staining procedure

**Dilution:** Monoclonal Mouse Anti-Human Mast Cell Tryptase, code No. M 7052, may be used at a dilution range of 1:100-1:200 when applied on formalin-fixed, paraffin-embedded sections of human tonsil and using 20 minutes heat-induced epitope retrieval in DakoCytomation Target Retrieval Solution, code No. S 1700, 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 Cytomation Mouse IgG1, code No. X 0931, 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. For frozen sections and cell preparations, the DakoCytomation APAAP kit, code No. K 0670, is a good alternative if endogenous peroxidase staining is a concern. Follow the procedure enclosed with the selected visualization kit.

### Product-specific limitations

In specimens fixed in Carnoy's reagent, non-specific labelling of collagen has been reported in one study (7) but was not observed in another (6).

### Performance characteristics

Cells labelled by the antibody dispay a highly specific granular cytoplasmic staining pattern, corresponding to the secretory granules of mast cells (3).

**Normal tissues:** The antibody specifically labels mast cells (MC) in a number of human tissues, including lung, tonsil, colon, gastric mucosa and skin, whereas only a few MCs are detectable in the pituitary gland (6). The antibody does not label basophils, eosinophils, neutrophils, monocytes or lymphocytes and, likewise, no labelling has been observed in keratinocytes (3).

**Abnormal tissues:** In a study of more than 150 cases of different MC disorders, it was demonstrated that <4 MCs/mm<sup>2</sup> were labelled in bone marrow in most normal and reactive states, whereas >5 but <100 were labelled in myelodysplastic syndromes. More than 100 MCs/mm<sup>2</sup> were detected in MC neoplasias, and cases with a much higher number (maximum 2655 MCs/mm<sup>2</sup>) were often observed (1). In a study of 7 patients with seasonal allergic conjunctivitis, the antibody demonstrated an average MC density within the conjunctival stroma of 106/mm<sup>2</sup> compared to 57.4/mm<sup>2</sup> in 8 normal subjects. Intraepithelial tryptase positive cells were also demonstrated in the allergic subjects, whereas no intraepithelial cells were detected in the normal counterparts (7). In the area around the septal bile ducts of the liver, the number of MCs labelled by the antibody in 45 cirrhotic livers averaged 59.0 MCs/mm<sup>2</sup>, a number that was significantly higher than in 71 normal livers, in which only an average density of 39.4 MCs/mm<sup>2</sup> was found (5).

FRANÇAIS
----------

### Intérêt

Pour diagnostic *in vitro*.

Monoclonal Mouse Anti-Human Mast Cell Tryptase, Clone AA1, est destiné pour un usage en immunocytochimie. L'anticorps marque les mastocytes humains et constitue un moyen très utile dans la détermination des mastocytes immatures ou très atypiques lors des leucémies à mastocytes, ainsi que pour la détection de petits, voire infimes infiltrats focaux et denses de mastocytes, dans les procédures de stadification chez les patients atteints de mastocytose cutanée (1) 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 par un professionnel certifié.

### Introduction

Les tryptases à mastocytes humains (EC 3.4.21.59) incluent une famille de protéases à sérine neutres et de type trypsine, exprimées principalement dans les mastocytes (2). Dans sa forme enzymatiquement active, la tryptase à mastocytes existe sous forme d'un tétramère lié de façon non-covalente de 132 kDa (2, 3). La tryptase à mastocytes est capable de dégrader le peptide intestinal vasoactif et d'activer la prékallikréine, ainsi que de générer les kinines, d'importants médiateurs impliqués dans la bronchoconstriction et dans l'hyperréactivité bronchique, principaux facteurs des maladies allergiques des voies aériennes (2). La tryptase à mastocytes induit également un effet mitogénique au niveau des cellules des muscles lisses des voies respiratoires humaines, des poumons et des fibroblastes dermiques humains. L'hyperplasie et l'évolution fibrosante des muscles lisses peuvent entraîner l'épaississement de la paroi des voies respiratoires et une réduction définitive du diamètre de celles-ci (2). Les mastocytes sont activés par un certain nombre de stimuli, dont les antigènes, les superoxydes, le complément, les neuropeptides et les lipoprotéines, résultant en une activation et en une dégranulation. La dégranulation des mastocytes, et, par voie de conséquence, la libération de tryptase à mastocytes ainsi que de l'histamine, des leucotriènes et des cytokines dans le tissu environnant, est un événement déterminant dans la réaction inflammatoire et semble jouer un rôle décisif dans la défense de l'hôte contre les agents pathogènes (4). Les mastocytes jouent un rôle actif dans des affections telles que l'athérosclérose, l'asthme, l'arthrite, la fibrose du canal cholédoque, de la tumeur maligne et de la fibrose pulmonaire (4, 5).

L'identification des mastocytes par l'intermédiaire du marquage des tissus avec des anticorps spécifiques de la tryptase à mastocytes humains s'est avérée utile dans l'identification des infiltrats de mastocytes focaux et diffus dans les affections primaires des mastocytes et la mastocytose. La démonstration de la tryptase à mastocytes est essentielle pour l'identification des mastocytes hautement atypiques, contenant peu, voir pas de granules métachromatiques, particulièrement dans la leucémie à mastocytes, et pour la détection de petits ou infimes infiltrats de mastocytes (1).

### Réactif fourni

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

**Clone:** AA1 (3). **Isotype:** IgG1, kappa.

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

### Immunogène

Tryptase à mastocytes isolée du poumon humain (3).

### Spécificité

En transfert de type Western d'un extrait de poumon riche en tryptase en conditions réductrices, l'anticorps marque une bande d'environ 32,5 kDa correspondant à la tryptase à mastocytes humaine (3)

En ELISA indirecte, l'anticorps montre une réaction à la tryptase à mastocytes humaine purifiée (3).

La fixation de l'anticorps sur la tryptase à mastocytes n'affecte pas l'activité de cette enzyme (3).

Le traitement au périodate de la tryptase à mastocytes n'a pas d'effet sur le marquage de l'anticorps, ce qui indique que les épitopes de l'hydrate de carbone ne sont pas impliqués dans la détermination des anticorps. En outre, la détermination des anticorps n'est pas affectée par la présence de l'héparine (3).

### 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.

### Stockage

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 le marquage de coupes de tissus incluses en paraffine, fixées dans du formol ou dans du Carnoy, bien que l'intégrité structurelle des mastocytes soit mieux préservée par la fixation au formol (6). Le prétraitement des tissus par démasquage de l'épitope induite par la chaleur est requis Pour les tissus fixés au formol, des résultats optimaux sont obtenus avec DakoCytomation Target Retrieval Solution, pH Elevé, code S 3308, ou 10 mmol/L tampon citrate, pH 6.0.ou 10 mmol/L tampon tris, 1 mmol/L EDTA, pH 9.0. Le prétraitement des tissus avec la protéinase K ou la trypsine (6) s'est avéré moins efficace. Les coupes de tissus ne doivent pas sécher pendant le traitement ou la procédure d'immunomarquage immunocytochimique suivante.

**Coupes congelées et préparations cellulaires:** L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes congelées et préparations de cellules fixées dans le Carnoy ou l'acétone/méthanol (3).

