IICA

RILSA

RED INTERAMERICANA DE LABORATORIOS DE SALUD ANIMAL

MÉTODOS PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

PROGRAMA V - SAÚDE ANIMAL E SANIDADE VEGETAL
IICA/BRASIL

Série Publicações Miscelaneas No. A4/BR-89-021
ISSN 0534-5391

RILSA

RED INTERAMERICANA DE LABORATÓRIOS DE SALUD ANIMAL

MÉTODOS PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

PROGRAMA V
SAÚDE ANIMAL E SANIDADE VEGETAL
IICA/BRASIL

A responsabilidade pelas opinioes emitidas nesta publicação cabe, exclusivamente, aos autores.

RESUMO

Letchworth, Geoffrey J. III, e Judith A. Appleton. 1984

Este manual inclui métodos de laboratório detalhados que irão servir como orientação aos pesquisadores, técnicos de laboratório e estudantes na sua primeira experiência de produção de anticorpos monoclonais. São apresentadas estratégias e métodos para imunização de camundongos, obtenção de linfócitos de camundongos, cultivo e preparação de células de mieloma murino, fusão desses dois tipos de células e produção de anticorpos dos hibridomas resultantes em meio padronizado de cultivo, em meios livres de soro e na cavidade peritoneal de camundongos. São descritos com detalhes, métodos de radioimunoensaio para testar a produção de anticorpos dos cultivos de hibridoma, incluindo a elaboração de todos os reagentes necessários. São fornecidos métodos para determinar o isotipo e a função dos anticorpos contra os antígenos de superfície. Também estão incluídos processos detalhados para preparação dos meios e das soluções para o cultivo celular e uma lista dos reagentes químicos, soros, material e equipamentos necessários.

PALAVRAS CHAVE: anticorpos, hibridação celular, hibridoma, monoclonal, anticorpos monoclonais, radioimunoensaio.

TÍTULO ORIGINAL:

Methods for Production of Monoclonal Antibodies
United States Departament of Agriculture
Agricultural Research Service, Agriculture Handbook No. 630

TRADUÇÃO E EDIÇÃO EM PORTUGUÊS

Gonçala Arita, M.V. Virologista	MA/SNAD/LARA(Campinas)
Michael Bedoya, M.V.Z.Ph.D Saúde Animal	IICA(Brasil)
Ricardo Medina, M.V. MSc Imunologista	IPVDF (R. G. do Sul)
Jurij Sobestiansky, M.V. DVM Pesquisador	EMBRAPA(Santa Catarina)
Rudi Weiblen, M.V. Ph.D. Professor	UFSM(R. G. do Sul)

DATILOGRAFIA: Beatriz Serafini

AGRADECIMENTOS

Muitos dos procedimentos descritos neste manual foram observados nos laboratórios de H. Koprowski no Instituto Wistar, em Filadélfia. Cabe agradecer aos membros desses laboratórios, Z. Steplewski, M. Herlyn, D. Herlyn, P. Fuhrer, K. Mitchell e T. Chang, bem como a seus técnicos laboratoristas pela ajuda prestada, ao nos ensinar tais procedimentos. Não devemos esquecer de homenagear, também, a T.C. Whyard do Laboratório de Doenças Animais de Plum Island (PIADC), em Nova York, pelas sugestões que possibilitaram melhorar as técnicas utilizadas. Nossos agradecimentos a G. Culhane, do PIADC, pela elaboração da Figura 1.

SUMÁRIO

MÉTODOS PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

Por Geoffrey J. Letchworth III e
Judith A. Appleton

INTRODUÇÃO

Os anticorpos monoclonais têm se destacado como ferramentas importantes no diagnóstico e na pesquisa, em várias disciplinas científicas. Informações técnicas detalhadas sobre a produção desses anticorpos nao são obtidas facilmente, apesar da publicação de várias revisões e de manuais de laboratório (ver pág. 63). Este manual de procedimentos detalhados foi compilado como referência para os pesquisadores do Plum Island Animal Disease Center (PIADC), de Nova York. Acreditamos que seja útil para os pesquisadores, laboratoristas e estudantes que iniciam trabalhos com anticorpos monoclonais.

Não foi nossa intenção abranger os numerosos usos dos anticorpos monoclonais; essa informação poderá ser encontrada na literatura especializada.

Também não tentamos incluir todas as técnicas usadas no PIADC, pois este assunto está constantemente sofrendo mudanças; numerosas técnicas estão sendo desenvolvidas e outras abandonadas. A maioria dos procedimentos foram modificados durante os anos 1980-83 no PIADC e estão ainda em evolução. Portanto, nada aqui deve ser considerado como definitivo. Entretanto, seguindo as técnicas básicas deste manual, estudantes de graduação, laboratoristas ou cientistas serão capazes de produzir e analisar anticorpos monoclonais.

Uma breve visão geral da produção de anticorpos monoclonais pode ajudar a melhor entender os procedimentos descritos neste manual (Figura 1). O anticorpo monoclonal é uma população homogênea de moléculas de anticorpos produzidos pelos descendentes de um único linfócito B. Os anticorpos monoclonais são produzidos pelo hibridoma do linfócito B, isto é, células híbridas obtidas da fusão de linfócitos B com células de mieloma.

Os linfócitos contribuem com genes específicos de produção de anticorpos ao hibridoma; o mieloma agrega ao hibridoma genes que permitem uma divisão permanente e contínua que expressam os genes de anticorpos.

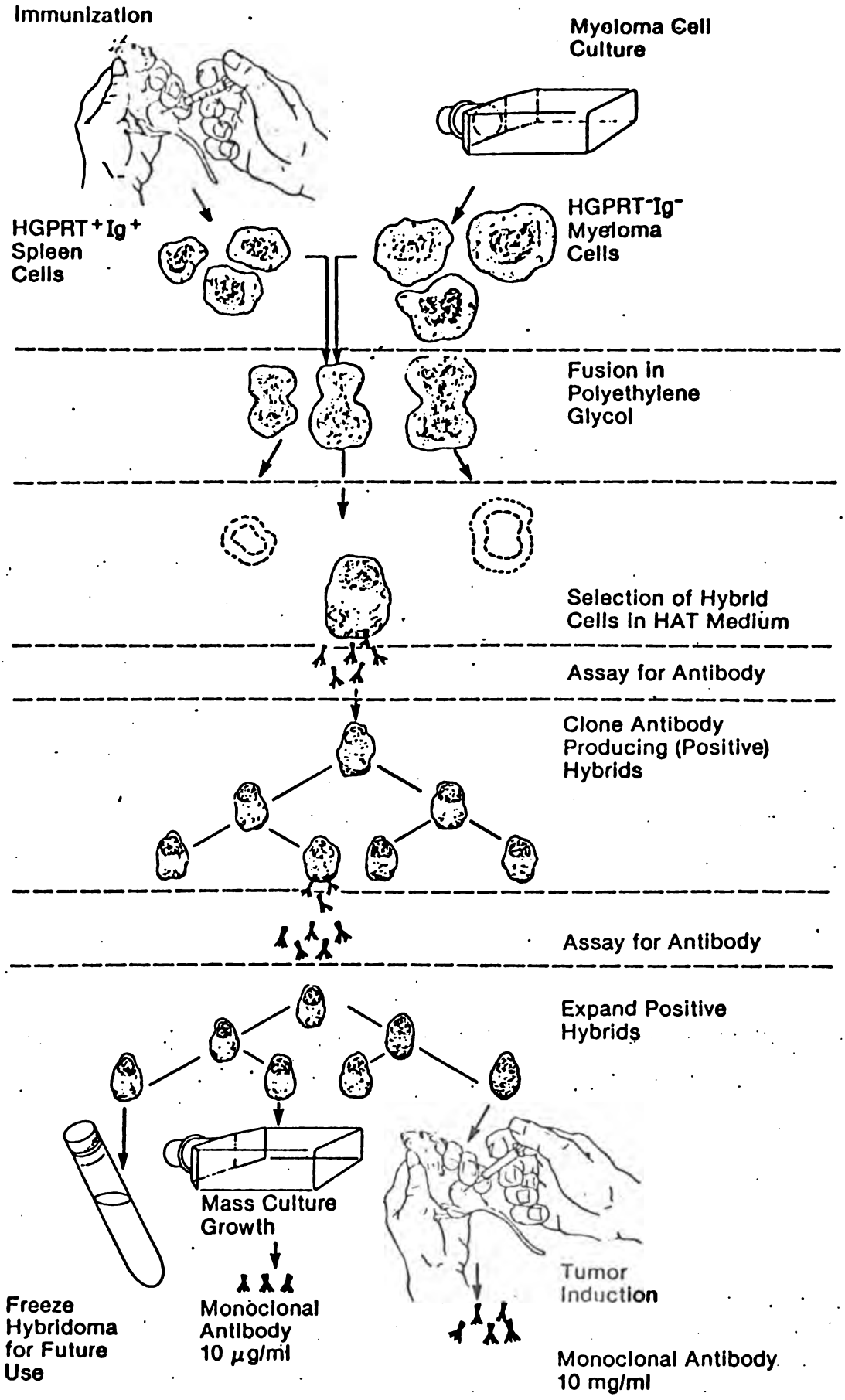

FIG 1. FLUXO PARA A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

Os linfócitos são obtidos de animais, normalmente camundongos, que foram imunizados com um antígeno específico. As células de mieloma de camundongo são obtidas indiretamente dos bancos dos técnicos que originalmente desenvolveram a técnica, G. Kohler e C. Milstein, do Medical Research Council's Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, Inglaterra.

A fusão de linfócitos e células de mieloma é realizada em meio contendo polietilenoglicol e semeados em placas de cultura de tecido contendo macrófagos peritoniais como células "alimentadoras". O meio seletivo hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) permite ao hibridoma multiplicar-se até a formação de colônias, visíveis a olho nu sobre um tapete de células alimentadoras, porém mata as células de mieloma que não estão fusionadas com os linfócitos. Em cada cultura é testada a presença do anticorpo específico. As culturas de hibridomas produtores de anticorpos específicos são expandidas para o congelamento e clonagem, e utilizadas para produzir quantidade suficiente de anticorpos para estudos de caracterização. Os clones de hibridomas produtores de anticorpos com as características desejáveis são igualmente expandidos para congelamento e produção de anticorpos. Os anticorpos podem ser produzidos por esses clones em cultura de células ou na cavidade peritoneal do mesmo tipo de camundongo e conservados sob congelamento. Muitos experimentos de pesquisa podem ser realizados com menos de 10 ml do líquido ascítico de cada clone produtor do anticorpo desejado. Portanto, os clones de hibridomas utilizados para a produção de anticorpos não são mantidos indefinidamente em cultivo contínuo, mas são congelados e recuperados somente quando se quer produzir uma grande quantidade de anticorpos

PRODUÇÃO DE LINFÓCITOS IMUNES

Os linfócitos que serão fusionados com células de mieloma resistentes a B-azaguanina devem estar comprometidos com a síntese de anticorpos, mas ainda não completamente diferenciados em células plasmáticas maduras. Portanto, eles devem ser coletados no tempo certo, apesar de nem sempre ser facilmente determinado, ocorrendo normalmente após a última inoculação do antígeno no animal doador. A aplicação deste princípio permite muitas variações nos esquemas de imunização, nas vias, nas adjuvantes e na escolha do local de coleta dos linfócitos para a fusão

ANIMAIS A SEREM IMUNIZADOS

Os linfócitos de vários mamíferos parecem ser capazes de fusão com células de mieloma do camundongo e de produzir anticorpos.

Se houver interesse em uma resposta imune, por exemplo, da foca contra a albumina do rato, seria razoável imunizar as focas com a albumina do rato e fusionar os linfócitos da foca com células do mieloma de camundongo. Seria provável que alguns hibridomas produzissem anticorpos contra a albumina do rato. Esta especificidade dos diferentes hibridomas iria, de acordo com a idéia corrente, refletir os determinantes antigênicos da albumina, que eram estranhos ao sistema imune da foca.

Obviamente, a foca iria responder melhor aos determinantes do que um animal que fosse filogeneticamente mais próximo do rato. Apesar de camundongos serem normalmente usados como fonte de linfócitos para assegurar compatibilidade com células de mieloma do camundongo, ele pode reagir contra os diferentes determinantes de um animal para o qual o antígeno específico tem significância prática. Portanto, a utilização de camundongo pode ser uma desvantagem. Células de mieloma de outras espécies (rato, homem) também estão se tornando viáveis, e mielomas de outros animais deverão ser desenvolvidos no futuro.

Contudo, o emprego do camundongo como fonte de linfócitos imunes oferece várias vantagens. São animais pequenos, de fácil manejo, baixo preço e podem ser esplenectomizados rapidamente. Um baço de camundongo contém o número certo de linfócitos para fazer uma fusão.

Hibridomas entre camundongos são mais fáceis de produzir e mais estáveis que hibridomas entre espécies. A maioria das fusões são feitas com células de mieloma P3, 653, NS1 ou SP2/0, sendo que todas transportam antígenos de histocompatibilidade BALB/c. Se os linfócitos imunizados forem também obtidos de um camundongo BALB/c, o hibridoma irá somente transportar o antígeno de histocompatibilidade BALB/c podendo ser cultivado na cavidade peritoneal do referido camundongo.

Os hibridomas cultivados na forma de tumor ascítico no camundongo irão produzir uma concentração 1000 vezes mais elevada de anticorpos do que os produzidos "in vitro". De cada camundongo pode-se coletar 1-20 ml do líquido ascítico contendo 0,1 a 8,0 por cento de anticorpos monoclonais que podem ser usados em numerosos estudos. Por exemplo, animais imunizados, passivamente, com anticorpos monoclonais anti-vírus podem ser usados para testes de proteção passiva, na qual o animal doador produz somente uma subclasse de anticorpos dirigidos, especificamente contra um determinante antigênico do vírus. Portanto, experimentos de especificidade sem precedentes podem ser realizados.

ANTÍGENO

Os antígenos usados para produção de anticorpos monoclonais não precisam ser puros. Misturas de diferentes antígenos irão resultar na produção de uma mistura de diferentes hibridomas, cada qual produzindo anticorpos dirigidos contra um determinante antigênico específico, ou epítope, presente na mistura antigênica. As técnicas para cultura dos hibridomas derivados de uma única fusão são planejadas para separar hibridomas produtores de anticorpos com diferentes especificidades. Portanto, os hibridomas é que são purificados,e não os antígenos utilizados para produzí-los. Entretanto, se forem necessários anticorpos monoclonais dirigidos contra um antígeno em particular, o uso de preparações contendo centenas de contaminações antigênicas irá requerer que milhares de hibridomas sejam testados para cada um que for selecionado. O método deve ser modificado para cada antígeno em particular.

É bem conhecido que a avidez dos anticorpos tende a aumentar de acordo com a exposição repetida ao antígeno. Este princípio é freqüentemente utilizado, inconscientemente, na produção dos anticorpos monoclonais. A maioria dos pesquisadores inoculam o antígeno duas ou mais vezes antes da coleta dos respectivos linfócitos imunologicamente comprometidos com o mesmo. Preparações cruas, proteínas purificadas, ou a combinação de cada uma pode ser usada.

Se a primeira inoculação contém muitos antígenos contaminantes e a segunda inoculação não, somente os linfócitos que memorizaram os determinantes antigênicos presentes na segunda inoculação deverão ser estimulados e fusionados com as células do mieloma para produzir hibridomas. Portanto, os virologistas podem achar mais conveniente administrar a primeira imunização sem muita pureza, ou seja, células ou tecidos infectados, e usar uma pequena quantidade de um antígeno vírico mais puro (quer dizer, purificado por ultracentrifugação em gradiente) para a última inoculação antes da fusão.

Alguns resultados confusos têm sido obtidos pelo uso de uma cepa de vírus para a primeira imunização e uma outra cepa do mesmo vírus para a segunda imunização. Esta situação também deve ser evitada ou estudada mais detalhadamente e não ser utilizada para a produção de hibridomas específicos. Os virologistas podem também achar útil cultivar seus vírus de imunização em camundongo BALB/c ou em culturas de células derivadas do mesmo. Quando as células BALB/c, contendo vírus, são inoculadas no camundongo BALB/c, o sistema imune deverá reconhecer somente antígenos estruturais e não-estruturais dos vírus estranhos e não os antígenos das células do doador. Se o vírus ou os outros antígenos não podem estar presentes no contexto das células BALB/c, os antígenos "normais" indesejáveis podem ser removidos em colunas de imunoafinidade. Outros meios de melhorar a especificidade da resposta imune do camundongo podem ser testados. O princípio básico é que uma imunização adequada produzirá um grande número de hibridomas que facilitarão o trabalho de seleção entre os hibridomas desejados e os indesejados.

A resposta do camundongo aos antígenos de vírus e muitos outros parece ser bastante melhorada pela mistura 50-50 com adjuvante completo de Freund. Normalmente 50 µl desta mistura são injetados subcutaneamente em cada um de quatro locais diferentes. Esta inoculação pode ser seguida por outras injeções dos antígenos com adjuvante incompleto de Freund ou sem adjuvante. Este antígeno não deve ser misturado com um estimulador de linfócito B policlonal (por exemplo, lipopolisacarídeo), pois, isto irá levar à produção de muitos hibridomas não específicos. A última dose do antígeno, dada antes da fusão, normalmente não é misturada com adjuvante e geralmente é dada endovenosamente.

PROCEDIMENTOS DE IMUNIZAÇÃO

Os pesquisadores que já testaram vários esquemas de imunização concordam que há o elemento "sorte" envolvido em cada fusão de sucesso. Dois camundongos, imunizados identicamente, normalmente produzem diferentes quantidades de hibridomas. Portanto, qualquer procedimento que já tenha sido bem sucedido pode eventualmente falhar.

É aconselhavel imunizar muitos animais, usar diferentes preparações de antígeno, usar diferentes esquemas de inoculação, testar o camundongo quanto à produção de anticorpos específicos antes da fusão, e esperar pelo sucesso.

O método "padrão" de imunização é inocular o antígeno, inicialmente via subcutânea ou intraperitoneal, seguido de uma segunda injeção endovenosa após 3 semanas. Os linfócitos do baço deverão ser coletados 3-4 dias após a segunda inoculação. Muitas variações deste método têm provado ser eficientes e alguns pesquisadores acreditam que pode-se optar por diferentes métodos de imunização para cada antígeno. Algumas dessas variações incluem: (1) duas ou mais injeções subcutâneas com 1-2 semanas de intervalo antes da inoculação endovenosa que precede a fusão; (2) combinar o antígeno com adjuvantes; (3) realizar fusões a 2, 3, 4, 5 e 6 dias após a última imunização; (4) injetar o antígeno até o animal apresentar anticorpos séricos ao imunógeno, inocular uma dose final e fusionar as células do baço; (5) injetar o antígeno repetidamente, via subcutânea ou intradérmica (planta do pé) seguido pela fusão dos linfócitos dos gânglios linfáticos regionais 3-5 dias após a última injeção; (6) dar uma dose única de antígeno seguida pela fusão das células do baço após 5 dias; e (7) administrar imunização secundária endovenosa diária durante uma semana antes da fusão.

Quando as variações dos métodos de imunização são combinadas com diferentes maneiras de preparar o antígeno, uma variedade infinita de possibilidades é gerada. Felizmente, a maioria das combinações possíveis podem resultar em exitosas fusões utilizando qualquer antígeno. Uma bem sucedida geração de anticorpos antivíricos resulta, freqüentemente, da combinação de antígenos víricos com o adjuvante completo de Freund, dividindo cada dose entre diversos pontos de inoculação subcutânea, administrando após o antígeno com o adjuvante incompleto de Freund a cada semana, por vários meses, antes da fusão. Uma boa resposta a antígenos solúveis tem sido obtida pela administração da dose inicial seguida, após 3 semanas, pela injeção endovenosa diária durante uma semana antes da fusão.

Um dos grandes problemas da imunização é o choque anafilático. Os métodos de imunização praticamente garantem a ocorrência de reações anafiláticas fatais em bases regulares. Portanto, é muito melhor iniciar a imunização com mais de um camundongo por antígeno. Uma regra prática e razoável é a de iniciar as imunizações com 10 camundongos para cada antígeno para o qual os hibridomas deverão ser elaborados.

Os níveis de anticorpos séricos devem ser testados antes da fusão e os melhores animais deverão ser selecionados para isso. Se algum camundongo morrer de choque anafilático, um número suficiente normalmente sobrevive permitindo algumas fusões.

Se todos sobreviverem após a segunda inoculação, as primeiras fusões poderão não ter êxito e os camundongos restantes poderão ser reinoculados para subseqüentes fusões. Camundongos imunizados raramente são perdidos. Os linfócitos estimulados possuem uma longa memoria. Se os camundongos com 6-10 semanas de vida tiverem uma boa imunização primária, eles deverão dar uma boa resposta a uma segunda inoculação durante os proximos 12-18 meses.

MANUTENÇÃO, CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO DAS CÉLULAS DO MIELOMA DO CAMUNDONGO

As células P3 X 63 Ag8 de mieloma de camundongo, freqüentemente chamadas simplesmente de P3, e as variantes de P3, isto é, 653, SP2/0, NS1, e outras, são deficientes em enzima hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HGPRT). Estas células não irão incorporar o antimetabólito 8-azaguanina em suas purinas sendo, portanto, resistentes a esta droga. Entretanto, esta deficiência enzimática as tornam sensíveis ao meio hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) (ver pág. 47) empregado nas técnicas de anticorpos monoclonais. As células de mieloma que perdem sua resistência à 8-azaguanina, serão capazes de crescer no meio de HAT. Se estas células que se recuperaram forem usadas para a fusão, elas irão crescer no meio HAT e mascarar a presença de qualquer hibridoma (também resistentes ao HAT) que for formado. Portanto, é prudente manter as células de mieloma de camundongo em meio 8-azaguanina determinando a morte das células revertidas se elas aparecerem.

As células de mieloma são normalmente mantidas em frascos para cultura de tecidos com 75 cm^2. Elas são semeadas a 5 X 10^4 células por mililitro em 25 ml de meio P3 (meio mínimo essencial-MEM, DULBECCO ou EAGLE, com 10% de soro fetal bovino - SFB - e 15 µg de 8 azaguanina por mililitro) (ver pág. 46). A incubação é feita a 37°C em câmara úmida com 5% de dióxido de carbono (CO^2) o que permite um rápido crescimento, de tal forma que as células deverão ser subculturadas a cada 2-3 dias. As subculturas são obtidas pela pipetagem vigorosa, individualizando as células, das quais metade ou 3/4 são desprezadas e posteriormente se adiciona meio P3 novo que irá repor o que foi retirado. As culturas deverão ser transferidas para frascos novos mensalmente.

As células do hibridoma e do mieloma de camundongo podem ser estocadas indefinidamente em nitrogênio líquido. O congelamento é realizado peletizando a cultura após 24 horas de crescimento celular em MEM com 20% de SFB, ressuspendendo-a em MEM fresco com 20% de SFB e 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) na concentração aproximada de 3 x 10^6 células por mililitro, e distribuindo-a em frascos de congelamento (NUNC, 1 ml por frasco). Um frasco de 25 cm^2 com células densamente crescidas, normalment contém células suficientes para um frasco de congelamento. Para alcançar um congelamento controlado, coloque os frascos em uma caixa de papelão padronizada para congelamento, previamente isolada com meia polegada de espuma em todas as paredes internas. Coloque a caixa no refrigerador a 4°C durante 1 -1,5 horas. Após transfira-a para o congelador - 70°C até o dia seguinte. Remova os frascos para o nitrogênio líquido dentro de alguns dias.

As células são descongeladas removendo-se os frascos do nitrogênio líquido e imergindo imediatamente suas metades inferiores em água a 37°C sem agitação. Quando descongelada, a suspensão de células é removida cuidadosamente com uma pipeta de 2 ml e ressuspendida em 10 ml de meio novo. As células são peletizadas a baixa rotação e ressuspendidas novamente, com cuidado, no meio, e após transferidas para 2 ou 3 orifícios de uma placa para cultura de tecidos com 24 poços. Estas células devem sofrer passagens a cada 1 ou 2 dias durante uma semana antes da fusão

As células de mieloma que serão usadas na fusão devem ser divididas em 1:2 cerca de 24 horas antes da fusão. Para repor o volume que foi retirado deve-se usar meio MEM com 20% de SFB.

PREPARAÇÃO DA CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONIAIS DE CAMUNDONGO

As culturas de macrófagos são preparadas 1 ou 2 dias antes da fusão. Os macrófagos servirão como células alimentadoras, retirando fragmentos de células, desintoxicando o meio e talvez providenciando fatores de crescimento, favorecendo o início da cultura do hibridoma em seu novo ambiente. Os macrófagos também são usados em placas de clonagem pelas mesmas razões.

Um camundongo adulto e saudável, de outra linhagem (não havendo necessidade de usar um camundongo de linhagem mais cara) é morto por deslocamento cervical, embebido em álcool etílico 70% contendo povidone-iodine, e inoculado, via intraperitoneal com 10 ml de meio MEM contendo 20% de SFB. O abdomem é pressionado e massageado suavemente, e após 5 minutos a pele é afastada da parede abdominal. Usando uma tesoura estéril, faça um pequeno corte na parede inserindo uma pipeta de Pasteur estéril. Remova o máximo de fluído possível sem risco de contaminação e transfira para um tubo de centrífuga estéril.

Conte os macrófagos e dilua a 40.000 células por mililitro no meio HAT. Coloque 50 µl de suspensão celular em cada orifício de uma microplaca de cultura com 96 poços, deixando vazios os orifícios das linhas externas da placa. Um camundongo geralmente fornece culturas suficientes para uma fusão. Incube as culturas a 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO_2 e examine minuciosamente para detectar contaminações antes de usá-las para fusão.

PROCEDIMENTOS DE HIBRIDAÇÃO

No dia anterior ao da fusão, ressuspenda as culturas de mieloma de camundongo que estiverem crescendo ativamente e divida 1:2. Adicione MEM com 20% de SFB para substituir o volume retirado. Isto deve assegurar que as células estarão saudáveis e crescendo ativamente no dia seguinte. Aproximadamente 50 ml de cultura de mieloma serão necessários para cada baço de camundongo.

No dia da fusão, coloque todos os meios necessários, o polietileno glicol (PEG) (veja pg.48), e a solução de cloreto de amônio (NH_4Cl) em banho maria a 37°C perto da capela de fluxo laminar na qual a fusão será realizada. Ajuste a centrífuga para a temperatura ambiente.

Uma vez que duas fusões podem ser feitas paralelamente, dois camundongos imunizados são trazidos ao laboratório e sacrificados por deslocamento cervical. Use álcool etílico 70% contendo iodo povidone para umedecer e desinfetar o pêlo.

O sangue pode ser colhido diretamente do coração para futuros estudos sorológicos. Faça um corte na pele da parte anterior da coxa esquerda com uma tesoura estéril. Segure o lado próximo da lesão com uma pinça e remova a pele do lado esquerdo do tronco. Utilizando instrumentos estéreis, rompa a parede abdominal, prenda o baço, separe-o do mesentério e coloque-o numa placa de petri que contenha diversas gotas de MEM com 10% de SFB.

Se o camundongo foi imunizado por injeções subcutâneas, os nódulos linfáticos podem ser colocados juntamente com o baço. Corte o baço em aproximadamente 10 pedaços com tesoura estéril e coloque numa peneira de metal com malha 60-100 (em um anel de apoio da largura de 35-50 mm, se conseguir encontrar um tão pequeno), na mesma placa de petri. Umedeça um filtro com o meio (MEM com 10% de SFB) e deixe gotejar mais meio sobre a tela enquanto for triturando vagarosamente o baço através da peneira com um êmbolo de uma seringa plástica de 5 ml. Lave o êmbolo da seringa e a peneira com o meio até gastar mais ou menos 10 ml do mesmo. Aproximadamente 95% do baço deve se desintegrar e passar através da peneira com o meio.

Transfira a suspensão das células para um tubo de centrífuga de 15 ml. Enxagüe a placa de petri com pequeno volume de meio e adicione este enxagüe ao tubo de centrífuga. Deixe o tubo em repouso por dois minutos para permitir que os pedaços maiores de baço sedimente. Pipete o sobrenadante em um segundo tubo de centrífuga de 15 ml onde a fusão das células será realizada.

Os 0,5 ml da suspensão de células de baço que permanecerem no primeiro tubo e a polpa do baço aderente a parte inferior da peneira podem ser tratados paralelamente, com linfócitos esplênicos e utilizados como células alimentadoras . Entretanto, as culturas de macrófagos peritonais tornam desnecessária a utilização de células esplênicas alimentadoras.

Com a pipeta de Pasteur, deposite cuidadosamente 2 ml de SFB na parte inferior do tubo de centrífuga que contem a suspensão de células de baço. O meio contendo as células irá subir e flutuar acima do SFB. Centrifugue o tubo a 300g, a temperatura ambiente, durante 6-10 minutos. As células irão cair através do SFB para formar um sedimento e os fragmentos das células serão retidos na interface do meio com o SFB.

Quando a centrifugação estiver completa, descarte o sobrenadante e ressuspenda o sedimento em 2 ml de sol. 0,83% de cloreto de amônio (NH_4Cl) que foi aquecido a 37°C. Após 60 segundos, adicione 5 ml do meio (MEM com 10% de SFB). Eleve as células de baço tratadas com NH_4Cl com 2 ml de SFB e coloque na centrífuga.

Colha as células de mieloma em dois frascos, de 75 cm^2 para cultura de tecidos, por baço, através de vigorosa pipetagem e coloque na mesma centrífuga que as células de baço tratadas com NH_4Cl. Centrifugue todas as células a 300g durante 6-10 minutos.

Enquanto estas células estiverem sendo centrifugadas, retire o frasco contendo 2 ml de PEG do banho-maria, adicione 3 ml de MEM sem soro com 0,01% de etilenodiaminotetra acetato de sódio (EDTA) aquecido e misture bem. Esterilize a mistura por filtração e coloque numa estufa a 37°C. Alguns pesquisadores também adicionam algumas gotas de sol. 75% de bicarbonato de sódio ao PEG para elevar o pH para aproximadamente 8.

Após as células terem sido centrifugadas, descarte todos os sobrenadantes. Se as células alimentadoras esplênicas forem para uso, ressuspenda-as em meio HAT e deixe em repouso a temperatura ambiente.

Compare o tamanho dos sedimentos das células de mieloma e do baço tratados com NH_4Cl. Algumas pessoas contam as células, porém bons resultados também podem ser obtidos misturando volumes iguais de células sedimentadas de baço e de mieloma. Um volume um pouco menor de células de mieloma é aceitável uma vez que a relação preferida é 1 célula de mieloma para cada 10 células de baço. A relação de volume um para um origina-se do tamanho grande das células de mieloma em comparação com os linfócitos esplênicos.

Ressuspenda os dois sedimentos de células em aproximadamente 5 ml de MEM sem soro com 0,01% de EDTA e combine as duas suspensões na proporção apropriada num tubo de centrífuga de 15 ml. Centrifugue as misturas de células e lave mais duas vezes com MEM sem soro contendo 0,1% de EDTA.

Drene as células do sedimento por sucção até que todo sobrenadante seja removido. Bata levemente no tubo para soltar o sedimento e lentamente misture 1 ml de PEG a 40% a 37°C com as células, aspirando e soltando a mistura diversas vezes numa pipeta de 2 ml. Após 60 segundos, injete com firmeza 1 ml de MEM sem soro com 0,01% de EDTA a 37°C, de cima da superfície do PEG até a parte inferior do tubo. Este meio se misturará parcialmente com as células e o PEG já no tubo. Não tente mais misturar por pipetagem. Após outros 60 segundos force a ejeção de 2 ml de MEM aquecido sem soro com 0,01% de EDTA para dentro do tubo.

Novamente, não tente misturar mais por pipetagem. Após mais 2 minutos, injete 4 ml de SFB a 20% e MEM com 0,01% de EDTA aquecidos, na parte inferior do tubo. A fusão celular pára neste ponto, porém as células são fragéis e estarão melhores se deixadas em repouso por 30 minutos ou mais.

As células fundidas podem ser combinadas com as células alimentadoras esplênicas do mesmo camundongo, em um frasco. Apesar das células alimentadoras de baços estimulados serem necessárias em placas de fusão que não possuem macrófagos peritoniais, elas não são necessárias em placas de fusão que contêm macrófagos peritoniais, elas não são prejudiciais. Adicione meio HAT aquecido para levar o volume até 50-100 ml e a concentração de células de baço até aproximadamente 10^6 ml. Distribua esta mistura em parcelas de 100 µl nos 60 poços internos das placas para cultura de tecido com 96 poços contendo culturas de macrófagos peritoniais com 1 a 2 dias de idade. Incube as placas a 37°C em câmara úmida com 5% de CO_2 automaticamente controlada. Adicione 100 µl de meio HAT nas culturas no dia seguinte ao da fusão. Faça isso com cuidado para impedir a transferência de bactérias de poços ocasionalmente contaminados para todos outros poços.

Verifique as culturas diariamente para detectar contaminação. Aspire até ficar seco qualquer poço que apresente contaminação microbiana, preencha com álcool etílico 70% e seque novamente. Se uma contaminação fúngica não for detectada até após a esporulação, descarte a placa inteira para prevenir dispersão dos esporos em toda estufa. Utilizando uma capela de fluxo laminar e esfregando todo equipamento e as mãos com álcool etílico 70% antes de entrar na capela, usualmente vai manter a contaminação sob controle.

As células alimentadoras esplênicas poderão ou não crescer ativamente em culturas de fusão. Quando elas crescem, geralmente formam colônias que num corte transversal se assemelham a um vulcão. As células do centro serão pequenas, redondas e densamente empilhadas juntas. Próximo às bordas, as células estarão esparsas, achatadas na superfície, alongadas no sentido de 1 raio da colônia e certamente pequenas.

Estas células esgotam o meio rapidamente, por isso, trocas freqüentes do meio (cada 2-3 dias) podem ser necessárias. Utilize o meio HAT para as primeiras duas semanas e MEM com 20% de SFB após. Substitua apenas a metade do meio a cada alimentação; 100% de meio fresco é letal para alguns hibridomas. Se as células esplênicas alimentadoras não forem usadas ou falharem para se multiplicar extensivamente, não serão necessárias mudanças de meio até 7-10 dias após a fusão. As mudanças de meio serão necessárias após este período.

Colônias microscópicas de hibridomas devem ser visíveis em aproximadamente 5 dias após a fusão. Primeiramente, um grupo de diversas células grandes, redondas e muito refráteis será visto entre os macrófagos achados, células mortas de mieloma e linfócitos. A medida que a colônia crescer, as células vão se empilhar no centro apresentando, num corte transversal a aparência da gema de um ovo frito.

As bordas das colônias são muito definidas em contraste com as bordas difusas das colônias de células alimentadoras. Inspeccionando-se as culturas pela parte inferior, as colônias brancas de hibridomas têm bordas definidas, enquanto que as colônias de células alimentadoras têm bordas difusas. Uma vez que é necessário alimentar as culturas, as colônias de hibridomas podem ser perturbadas e as células podem misturar-se com as de outras colônias.

Muitas colônias pequenas serão iniciadas dentro do poço. Uma vez que as células produtoras de anticorpos podem estar misturadas com células não-produtoras, a clonagem dos hibridomas é essencial neste ponto. Assim sendo, faça a clonagem imediatamente após ser determinado que o hibridoma tem valor.

ESQUEMA DE HIBRIDAÇÃO

- 24 a 48 horas antes da fusão:

Prepare a cultura de macrófagos peritoniais em placas para cultura de tecidos de 96 poços.

- 24 horas antes da fusão:

Divida as culturas de mielomas em 1:2 e alimente-as com MEM contendo 20% de SFB porém não 8-azaguanina.

- No dia da fusão:

Verifique cuidadosamente a presença de contaminação na cultura de macrófagos. Aqueça todos os meios e o PEG a 37°C.

Aqueça a centrífuga a temperatura ambiente. Remova o baço do camundongo e triture lentamente, através de uma peneira, juntamente com 5 ml de meio contendo 10% de SFB.

Transfira a polpa do baço para um tubo de centrífuga (tubo 1).

Lave a placa de petri com 5 ml de meio e adicione o lavado ao tubo 1 (o tubo 1 e a placa de petri podem ser descartados se forem usados alimentadores de macrófagos).

Coloque SFB no tubo 2 e centrifugue.

Adicione o meio livre de soro ao PEG (60:40), misture, esterilize por meio de filtração e incube a 37°C em estufa com 5% de CO_2.

Retire o tubo 2 da centrífuga e descarte o sobrenadante.

Trate o sedimento de células com 2 ml de solução 0,83% de NH_4Cl durante 60 segundos, adicione 5 ml de meio, coloque o SFB, e centrifugue.

Remova as células de mieloma e centrifugue ao mesmo tempo que as células em NH_4Cl.

Descarte todos sobrenadantes.

Ressuspenda as células do tubo 2 e os mielomas em MEM sem soro com 0,01% de EDTA.

Junte 1 volume das células centrifugadas do tubo 2 com 1 volume das células de mieloma centrifugadas.

Lave duas vezes em MEM livre de soro com 0,01% de EDTA.

Aspire todo meio e bata levemente na parte inferior do tubo.

Adicione 1 ml de sol. 40% de PEG e espere 60 segundos. Trabalhe com cuidado.

Adicione 1 ml de MEM sem soro com 0,01% de EDTA e espere 60 segundos.

Adicione 2 ml de MEM sem soro com 0,01% de EDTA e espere 2 minutos.

Adicione 4 ml de MEM com 0,01% de EDTA e 20% de SFB e espere 30 minutos.

Adicione 90 ml de HAT MEM com 20% de SFB.

Distribua 100 µl em cada orifício em 10 placas para cultura de tecidos com 96 orifícios.

- No dia seguinte ao da fusão:

Alimente as culturas com 100 µl de meio HAT por orifício.

NUMERAÇÃO DOS SISTEMAS DE HIBRIDOMAS

Um laboratório de anticorpos monoclonais é um pesadelo de controle de estoques. Todos os hibridomas se parecem, não importando que tipo de anticorpos eles estão produzindo, não importando de onde eles vem, não importando quantas vezes eles foram clonados. É essencial seguir um esquema de identificação compreensivo começando com a primeira fusão e nunca mudando. Nós achamos o seguinte esquema útil, obviamente outros podem ser também.

A FUSÃO

É empregada uma série de números e letras para indicar o antígeno usado na fusão, por exemplo, BTV 17 para bluetongue vírus tipo 17. Isto é seguido por um "X" e a identidade do mieloma usado, por exemplo, BTV 17 x 653 ou BTV 17 x P3.

COLÔNIAS DE HIBRIDOMAS

As placas para cultura de tecido com 96 poços nos quais as colônias estão crescendo, são numeradas pelo pesquisador; as filas e as colunas possuem letras e números impressos no plástico. Cada colônia pode ser identificada pelo número da placa, uma letra indicando a fila do poço, e um número para a coluna do poço, por exemplo, 2B4 (placa 2, fila B, coluna 4). A designação da colônia pode ser adicionada ao nome de fusão seguindo um traço, por exemplo, BTV 17 x 653 - 2B4.

CLONES DE HIBRIDOMAS

Os clones são numerados consecutivamente e os números adicionados à designação anteriormente deduzida após um ponto, por exemplo, BTV 17 x 653 - 2B4.12. Clones que forem reclonados recebem números logo após outro ponto, por exemplo, BTV 17 x 653 - 2B4.12.3.

PARA PUBLICAÇÃO

Se possível, os antígenos e as linhagens celulares utilizados devem ser definidas no item de materiais e métodos da publicação. Assim sendo, números laboratoriais abreviados (por exemplo, 2B4.12 e 4C1.3) são usados no texto. Se isso for muito confuso, um esquema pode ser feito, relacionando de um lado a designação laboratorial completa para todos hibridomas a serem publicados e do outro lado números simples consecutivos, por exemplo:

BTV 17 x 653 - 2B4.12 - 1
BTV 17 x 653 - 4C1.3 - 2
BTV 4 x P3 - 1A4.8 - 3

Estes números simples podem ser usados no texto.

PROPAGAÇÃO E SUBCULTURA DE COLÔNIAS DE HIBRIDOMAS

As culturas de hibridomas que crescem bem podem produzir uma camada única ou elas podem formar várias camadas superpostas visíveis macroscopicamente na superfície de crescimento. As células na parte inferior das camadas irão sufocar a não ser que as pilhas formadas sejam rompidas. As colônias devem ser agitadas quando estiverem aproximadamente do tamanho da ponta menor de uma pipeta de Pasteur (0,5 a 1,0 mm). As células ficam geralmente dispersas após reposição da metade do meio. Aspire meio recentemente preparado com um pipetador de 100 µl e force a ejeção para dentro do meio antigo. A maioria das culturas agitadas vão crescer rapidamente, algumas vão crescer muito lentamente e algumas irão morrer não importando qual o tratamento que receberam. As culturas que crescem lentamente ou que morrem devem ser perturbadas o mínimo possível.

Se puderem ser vistos grupos de 2 ou 4 células vivas, a cultura está crescendo e deve ocasionalmente receber meio fresco. Se somente puderem ser vistas células vivas isoladas, a cultura não está crescendo e deve receber apenas 1 ou 2 gotas de meio fresco semanalmente.

Teste as culturas em relação a atividade de anticorpos tão logo elas comecem a crescer bem e seu meio se tornar amarelo. Uma vez que alguns hibridomas produzem menos anticorpos em concentrações menores de soro, use um meio contendo 20% de SFB.

As culturas que estiverem produzindo os anticorpos desejados devem ser propagadas e as culturas repicadas devem ser congeladas, clonadas e utilizadas para produzir um pequeno estoque de anticorpos. (Geralmente 10 ml do meio gasto é suficiente).

Os hibridomas desejados são propagados para congelamento e produção de anticorpos através de subcultivo ou dividindo a cultura em 1,2 e após 4 poços de uma nova placa para cultura de tecido com 96 pocos.

Estas culturas são divididas 1:2 em 1 poço de uma placa de 24 poços. Quando esta cultura tiver crescido para cobrir aproximadamente metade da superfície de crescimento, é dividida em um outro poço. Isto, geralmente, leva apenas 24 horas. Após, estas duas culturas são divididas em mais dois poços. Estas quatro culturas são divididas 1:2 em uma garrafa de 25 cm^2 para cultura de tecidos. Elas podem geralmente ser divididas 1:2 após 2 dias, e as duas culturas das garrafas divididas 1:2 novamente após mais 2 dias. Desta forma, quatro garrafas de células podem ser obtidas em 1 semana.

Estas culturas nas garrafas são alimentadas com mudanças diárias de meio até haver uma camada única de células (na maioria das vezes em 48 horas). As células são removidas e congeladas (aproximadamente 1 ml por frasco para congelar) como descrito na manutenção de mieloma.

Os hibridomas não-clonados comumente perdem sua capacidade para produzir anticorpos. Uma vez que os hibridomas não-produtores podem crescer mais que os grupos produtores de anticorpos, os hibridomas devem ser clonados o mais cedo possível em 1-10 dias após eles serem identificados como sendo úteis. A placa com 96 pocos usada para subculturar as culturas originais é um bom lugar para se obter células para clonagem.

A placa com 24 poços da qual as células foram divididas para garrafas de 25 cm^2 é um lugar apropriado para a obtenção de anticorpos para estudos de caracterização preliminar. Todas as culturas replicadas são alimentadas o mais generosamente possível com MEM contendo 20% de SFB, de forma que todas elas contenham uma camada única de células vivas. Após isso, o meio não é mudado durante 3-4 dias. Quando este meio estiver amarelo, porém as células ainda estiverem vivas, ele é misturado, centrifugado, e armazenado em frascos com tampas de pressão a 4°C. Parcelas podem ser congeladas (-70°C) se assim for desejado. As culturas podem ser revigoradas pela remoção da maioria das células e por diversas mudanças de meio e uma segunda colheita pode ser realizada e misturada com a primeira. Se uma garrafa-teste das células congeladas provar ser viável no descongelamento e se os clones estiverem crescendo, as culturas de hibridomas não-clonadas crescendo ativamente podem ser descartadas.

MEIO CONDICIONADO

As células de hibridomas não crescem bem e muitas vezes morrem quando cultivadas em concentrações baixas. Aquelas que requerem cultivo em concentrações tão baixas que as células normalmente morreriam devem sobreviver durante o cultivo e a clonagem. Diversas técnicas foram desenvolvidas para permitir a sobrevivência dos hibridomas nestas condições. Células não-divisíveis compatíveis podem ser adicionadas às culturas. As células do baço, alimentadoras, adicionadas a fusões recentes são um exemplo. Outros exemplos incluem a utilização de timócitos ou células macrófagas peritoniais em culturas de hibridomas. Apesar de nós termos iniciado a utilização de culturas de macrófagos peritoniais para todas as clonagens e fusões, também utilizamos uma técnica alternativa. Isto inclui um meio condicionado para todas culturas de hibridomas onde as concentrações de células são baixas.

O meio é condicionado pelo crescimento, nele, de células de mieloma de camundongos por dois a três ciclos de divisão celular (24-36 horas). O melhor meio condicionado é aquele que estiver apenas iniciando a mudar a cor de vermelho para amarelo. Em muitos casos, uma única célula de hibridoma vai crescer em até 1 ml deste meio.

As células de mieloma de camundongos são mantidas, normalmente, em um meio contendo 8-azaguanina. Para produzir o meio condicionado, substitua inteiramente o meio de azaguanina numa cultura de células de mieloma, três vezes, com 2 dias de intervalo, com MEM recente contendo 10% de SFB porém não 8-azaguanina. Nós utilizamos frascos de Erlenmeyer de vidro de 125 ml para cultivar grandes volumes de células para o meio condicionado. Dois dias após a última mudança de meio, é usado MEM contendo 20% de SFB para substituir o meio gasto. Verta este após 24-36 horas, centrifugue se as células forem vistas macroscopicamente, e filtre através de uma membrana de 0,45 µm para remover as células que possam estar presentes. Adicione mais MEM com 20% de SFB à cultura e colha 24-36 horas mais tarde. Uma vez que algumas das células serão removidas em cada colheita e as células restantes continuem a replicar ativamente, estas colheitas podem continuar indefinidamente. É necessário apenas manter as células saudáveis e replicando ativamente.

Se o meio condicionado não for necessário por diversas semanas, as células podem ser mantidas com trocas de meio nas segundas, quartas e sextas-feiras com MEM contendo 10% de SFB ou soro bovino e, novamente, MEM com 20% de SFB e colheitas diárias quando houver necessidade. Culturas utilizadas para produzir meio condicionado não necessitam nunca serem postas de volta em meio de 8-azaguanina.

O meio condicionado é geralmente utilizado de preparação recente ou guardado por períodos curtos a temperatura ambiente ou a -20°C. As qualidades de conservação são desconhecidas.

TESTE DE SOBRENADANTES DE HIBRIDOMAS

Clones de hibridomas úteis crescidos "in vitro", produzem anticorpos de um único isótipo, dirigido contra um único determinante antigênico e usualmente numa concentração entre 0,1 e 10 µg por mililitro. Devido a um isótipo inadequado, especificidade contra um determinante antigênico não exposto ou não repetido ou uma concentração muito baixa tanto do antígeno como do anticorpo, estes anticorpos podem não ser ativos em alguns dos seguintes testes: vírus neutralização, imunodifusão em gel de agar, lise mediada por complemento, células mediando citólise dependente de anticorpo, anticorpo marcado com fluoresceína ou com peroxidase, fixação de complemento e outros. Conseqüentemente, a utilização de qualquer um destes testes para avaliar os hibridomas quanto a produção de anticorpos que úteis falhará na detecção de alguns anticorpos que reagiriam fortemente com o antígeno desejado porém, simplesmente falharam ao reagirem sob condições experimentais específicas ou ao mediarem a reatividade que está sendo medida.

Para evitar alguns destes problemas, muitos pesquisadores têm usado o radioimunoensaio indireto (RIA) ou ensaio imuno enzimatico (ELISA) como um método primario de triagem ("screening"). Estes testes medem somente um único ligante de anticorpo para antígeno. Apesar do teste de RIA ser mais difícil e caro para montar que muitos outros testes, ele oferece a vantagem combinada de sensibilidade e ampla reatividade, que permite a detecção de todas as concentrações significantes e todos os isótipos de anticorpos monoclonais. Além disso, o RIA apresenta resultados claros, quantitativos e reproduzíveis e que não dependem de tempo e temperatura. Os anticorpos detectados por RIA podem então ser confiavelmente testados para atividade em outros testes. Por exemplo, resultados negativos em vírus neutralização, em relação a resultados positivos no RIA, podem ser interpretados com confiança como indicadores da presença de um anticorpo ligante, ao vírus porém que realmente não reage em vírus neutralização. O conceito de que resultado negativo em vírus neutralização indica uma verdadeira ausência de anticorpo ligante pode ser falso é muito enganoso.

O teste RIA pode ser feito usando-se antígeno aderido ao plástico ou pelo uso de células vivas em suspensão, células vivas em monocamadas ou monocamadas fixadas. O uso das técnicas com fase sólida ou células em monocamadas fixadas presumivelmente permitem que os anticorpos reajam com determinantes antigênicos de todos os antígenos, no entanto, alguns epítopes podem ser destruídos durante a fixação. Técnicas usando células vivas em suspensão ou monocamadas vivas limitam a reação dos anticorpos aos determinantes antigênicos presentes na superfície da membrana celular.

RIA FASE SÓLIDA

O antígeno pode ser preparado de várias formas:

(1) Lavar as células em frascos plásticos 3 vezes com tampão salina (PBS) e congelar com 2 ml de PBS cobrindo as mesmas. A medida que o PBS descongela, agite vigorosamente os frascos para romper as células. Então sonique o fluído, centrifugue a alta velocidade para remover as partículas, titule contra antissoro convencional em RIA, e congele em alíquotas. Dilua o antígeno na concentração adequada, antes do uso.

(2) Prepare uma suspensão 10% de células em PBS contendo 1,5% de 1-O-n-octyl-ß-D-glicopiranosida e 2 mM de fluoreto de fenilmetil sulfonil. Agite por 45 minutos a temperatura ambiente, centrifugue a 400 g e descarte o sedimento. Centrifugue o sobrenadante a 150.000 g, diálise contra PBS durante a noite a 4°C, e ajuste a concentração protéica para 1 mg/ml para uso direto em RIA.

(3) Prepare uma suspensão 5-10% de células em PBS contendo 1% de Triton X-100 e 2 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil. Agite por 30 minutos a temperatura ambiente, centrifugue a 400 g e descarte o sedimento. Centrifugue o sobrenadante a 150.000 g, diálise contra PBS com 0,1% de Triton X-100 por 24 h, a 4° C, e centrifugue a 5.000g, por 1 hora a 4° C. Ajuste o conteúdo protéico para 1 mg/ml antes do uso em RIA.

(4) Vírus purificado, proteínas virais ou outros antígenos purificados podem ser usados diretamente.

O RIA é feito por incubação de 100 µl de solução, de antígeno nos orifícios de micro-placas de cloreto de polivinil de fundo em forma de V, a temperatura ambiente por meia hora ou mais. A lavagem das placas é feita uma vez por aspersão de tampão RIA (PBS com 10% de soro de cavalo inativado e 0,08% de azida sódica - NaN3) nas cavidades das mesmas e após agitação o tampão é desprezado. As placas são incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente com 200 µl de tampão RIA ou PBS contendo 5% de soro albumina bovina (BSA).

O tampão é retirado da placa e 25 µl de sobrenadante de hibridoma (diluído a 1:2 em tampao RIA) é incubado nas cavidades por 90 minutos a temperatura ambiente. As cavidades são lavadas após 3 vezes com tampão RIA.

As imunoglobulinas ^{125}I anti-camundongo (50 µl), diluídas em tampão RIA para 20.000 "counts" por minuto por 50 µl, são incubadas nos poços por 90 minutos a temperatura ambiente. Os poços são lavados 4 vezes com tampão RIA e secos a temperatura ambiente.

Cada placa flexível é então encaixada sobre uma microplaca dura, e os poços da placa flexível são pressionados dentro dos poços da placa dura. Um fio aquecido é passado entre as superfícies planas superiores das duas placas para separar os poços flexíveis da sua placa. Este processo gera vapores tóxicos e deve ser feito em uma capela de exaustão. O conteúdo de cada cavidade é transferido para um tubo de vidro e contado individualmente durante um minuto com um contador gamma.

RIA COM CÉLULAS EM MONOCAMADAS FIXADAS

As células são cultivadas em microplacas com fundo chato. Elas são lavadas uma vez com PBS e fixadas por cinco minutos a temperatura ambiente com 50 µl de glutaraldeido a 0,15%. Estoque o glutaraldeído a 25% em alíquotas de 0,1 ml a - 20° C. No dia de uso, 16,6 ml de tampão fosfato 0,15 M (pH 7,0) é adicionado; o pH é reajustado para 7,0 com hidróxido de sódio (NaOH) 5 N. (Tampão fosfato: solução 0,15 M de dihidrogênio fosfato de sódio (NaH_2PO_4) adicionado a solução 0,15 M de monohidrogênio fosfato de sódio (Na_2HPO_4) até o pH chegar a 7,0).

Vinte e cinco µl de glicina 0,1 M são adicionados aos poços. (1 parte de glicina 0,3 M em tampão fosfato 0,15 M, pH 6,8 mais 2 partes de PBS com pH ajustado para 6,8 com NaOH 0,3N ou HCl 0,3N com no máximo 1 mês após o preparo; para tampão fosfato, 0,15 M NaH_2PO_4 é adicionado a 0,15 M Na_2HPO_4 até o pH chegar a 6,8). Isto é incubado nas células por 5 minutos a temperatura ambiente. As células são lavadas 3 vezes com tampao RIA, e a última lavagem é deixada nas células. As placas seladas podem ser estocadas a 4° C. As placas são lavadas uma vez mais com tampão RIA, antes do uso.

Para o RIA, 25 µl de tampão e 25 µl de sobrenadante de hibridomas são adicionadas às cavidades úmidas e incubados por 90 minutos a temperatura ambiente. As células são lavadas 4 vezes com tampão RIA, incubadas por 90 minutos adicionais a temperatura ambiente, com 25 µl de imunoglobulina anticamundongo marcadas com ^{125}I diluída para 20.000 "counts" por minuto por 25 µl, e lavadas 4 vezes mais. Solução aquosa de NaOH (25 µl de 5 N) é então incubada sobre as células por 15 minutos a temperatura ambiente. Células solubilizadas são capturadas com um aplicador com ponteiras de algodão ("Q-tips") e contadas por 1 minuto em contador gamma.

Para nosso trabalho com o vírus da Blue Tongue (BTV), nós modificamos este procedimento de monocamadas fixadas como segue: Células (Vero ou BHK) em monocamadas sao tripsinizadas e semeadas com vírus em placas de 96 cavidades. Quando o efeito citopático é evidente, as monocamadas são lavadas uma vez com PBS (com 0,08% NaN_3), então 50 µl de PBS são adicionados para cada poço. Espaços entre os poços das placas são preenchidos com tampão para prevenir rachadura da placa plástica.

Duzentos µl de acetona a -70° C são adicionados por gotejamento sobre o PBS: se 80% da acetona for adicionada diretamente sobre a monocamada, o plástico poderá se dissolver. A fixação é praticamente imediata. A acetona-PBS é sacudida para fora da placa e as monocamadas são lavadas três vezes com tampão RIA. O lavado final é deixado e o resto do ensaio é realizado como descrito previamente. Todavia, nós encontramos que somente 15.000 "counts" por minuto de $F(ab')_2$ de coelho anticamundongo marcado com ^{125}I era suficiente para detectar anticorpo ligante. Acima de 30% dos "counts" totais (4.500 "counts"/minuto) adicionados eram ligados neste RIA.

RIA COM MONOCAMADAS VIVAS

Este ensaio é feito exatamente como o RIA com células em monocamadas fixadas, exceto os passos de fixação que são omitidos e o tampão MEM, 20 mM HEPES (veja pag. 51), 10% de soro de cavalo (HS), e 0,08% de NaN_3, é usado. O PBS com 2% de HS e a solução 0,08% de NaN_3 podem também ser usados. A incubação deverá ser a 4° C.

RIA COM CÉLULAS VIVAS EM SUSPENSÃO

As células são tripsinizadas na superfície de crescimento com o mínimo de tripsina possível. Elas são ressuspensas em MEM com 10% de SFB e deixadas repousar por 1 hora a temperatura ambiente. As células são contadas, peletizadas por centrifugação leve, ressuspensas em tampão RIA a 10^6 cels/ml. São então adicionadas 50 µl de células a cada poço em forma de U das microplacas duras, seguido pela adição de 50 µl de sobrenadante de hibridomas e incubação a 4° C por 60 minutos em agitador de placas com agitação suficiente para que as células permaneçam em suspensão.

As células são lavadas três vezes por centrifugação das placas para serem peletizadas em cada cavidade, retirando o fluído e ressuspendendo as mesmas em 100 µl de tampão RIA. Os sedimentos de células drenadas são, então, incubados a 4°C por 60 minutos em agitador de microplacas com 50 µl de Ig anticamundongo marcadas com ^{125}I (30.000 "counts" por minuto por 50 µl) e lavadas três vezes como antes. 25 µl de tampão RIA são adicionados a cada poço da placa; as células são captadas com ponteiras "Q-tips" e contadas por 1 minuto em contador gamma.

PREPARAÇÃO DO SEGUNDO ANTICORPO PARA RIA

O segundo anticorpo (radioativo) para RIA pode ser adquirido de fontes comerciais. A experiência do Instituto Wistar demonstrou que os anticorpos adquiridos comercialmente podem não ser suficientemente puros para dar uma pequena coloração de fundo de contagem necessário para trabalhos muito críticos com antígenos presentes em quantidades muito baixas. Por esta razão, nós temos feito nosso próprio anticorpo de coelho, purificado por afinidade, contra fragmentos F(ab')2 de gama globulina (IgG) de camundongo para uso em RIA. Uma única partida de soro de coelho dura por muitos anos uma vez que são usadas pequenas quantidades em cada ensaio. Em torno de 1mg de anticorpo purificado é necessário para 2 x 10^5 testes.

A imunoglobulina de camundongo é obtida de 10-20 camundongos BALB/c por precipitaçao de soro total com sulfato de amônio saturada vol./vol. a 4° C. A imunoglobulina é peletizada a 4.000 rpm por 20 minutos, ressuspensa em volume igual ao original do soro com água destilada, recentrifugada para remover proteínas insolúveis e reprecipitada pela adição de igual volume de solução saturada de sulfato de amônio. O precipitado é novamente peletizado por centrifugação a alta velocidade, redissolvido em uma quantidade mínima de água destilada, e centrifugado novamente para remover contaminantes insolúveis.

A IgG de camundongo é obtida pela passagem do soro 2 vezes precipitado através de coluna de Sephadex G-200 equilibrada com PBS-azida. O segundo pico contém a IgG com alguma IgM (traços no final do primeiro pico) e IgA (carregada no final do pico de IgG). A IgG é concentrada por diálise a vácuo para 20 mg/ml contra de tampão acetato de sódio 0,15M (pH 4,45).

Para cada 100 mg de IgG, 2 mg de pepsina são adicionadas. A mistura é incubada a 37° C durante a noite e centrifugada para remover o material precipitado. O pH do sobrenadante é ajustado a 7,4 para parar a ação da pepsina e o material é dialisado contra PBS.

A IgG digerida é passada através da mesma coluna de Sephadex G-200 equilibrada com PBS-azida. O $F(ab')_2$ deverá sair em um pico entre a IgG não digerida (pico 1) e as subfrações de IgG (pico 3). As frações contendo o pico 2 são misturadas, concentradas por diálise a vácuo, misturadas com igual volume de adjuvante completo de Freund e injetadas intradermicamente em coelhos (0,5 -1 mg de $F(ab')_2$ por animal). Uma segunda dose de $F(ab')_2$ é dada 20-30 dias após. O nível de anticorpos anticamundongo é verificado 7-14 dias após por imunodifusão contra anticorpos monoclonais de várias classes. Os coelhos são, então, sangrados ou reinoculados.

De cada coelho tendo atividade de antiglobulina, 50 ml de sangue pode ser retirado através de uma incisão feita com um bisturí ou cânula com uma agulha hipodérmica com diâmetro 20, na artéria média da orelha. Após um mes, os coelhos podem ser reinoculados ou sangrados novamente. O sangue poderá ser incubado a 37° C por algumas horas, o soro transferido com cuidado para tubos de centrífuga e centrifugados a 2.500 rpm/min, e congelados em alíquotas de 3 ml.

Vários pesquisadores divergem neste ponto. Estudos "rápidos e impuros" podem tolerar o nível de coloração de fundo significante relativo à presença da região Fc da molécula de imunoglobulina, a IgM e talvez outras proteínas presentes no soro do coelho. Estudos quantitativos críticos com anticorpos monoclonais podem requerer purificação do fragmento $F(ab')_2$ da IgG de coelho. O segundo anticorpo utilizado em muitos estudos no PIADC é a imunoglobulina anticamundongo purificada por afinidade. Muitos lotes dão uma especificidade muito boa com baixo nível de coloração de fundo.

A purificação das imunoglobulinas de coelhos anticamundongo por afinidade pode ser feita tanto pelo brometo de cianogênio adquirido comercialmente, sefarose 4B ativada ou bromoacetil celulose (BAC), como apresentado aqui. As fórmulas das soluções são dadas no apêndice (pag. 48).

1. Dois gramas de BAC são inchados por 24 h com três trocas de água destilada. São, então, lavados por 3 horas em tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 5,8), agitados e ressuspensos em 10 ml do mesmo tampão. A suspensão é sonicada para dispersar os grumos e peletizada a 4.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante é descartado e o sedimento é ressuspenso em 10 ml de tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 5,8).

2. A capacidade tamponante da suspensão de BAC é determinada pela adição de uma quantidade cuidadosamente medida tampão de bicarbonato de sódio 1 M (pH 10) para 2,5 ml da suspensão preparada no passo 1 até atingir o pH 9. Serão necessários aproximadamente 0,2 ml, ficando a concentração final de bicarbonato em torno de 0,1 M.

3. Em uma segunda alíquota de 2,5 ml de suspensão de BAC (preparada no passo 1), 10 mg de IgG de camundongo cromatograficamente puros são adicionados sob agitação. A IgG deve ser previamente dissolvida em 0,2 ml de tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 5,8). A mistura é agitada por 2 horas a temperatura ambiente.

4. A mesma quantidade de tampão bicarbonato de sódio 1 M (pH 10), tal como foi preparado para atingir o pH 9 no passo 2 é adicionada à mistura BAC-IgG. Isto pode ser em torno de 0,2 ml e deve resultar em uma concentração de 0,1 M de bicarbonato.
A mistura é agitada durante a noite a 4° C. Deste modo, a IgG é ligada ao BAC.

5. A mistura BAC-IgG é então centrifugada a 4.000 rpm por 20 minutos, ressuspensa em 15 ml de uma solução de 2 aminoetanol 0,05 M mais bicarbonato de sódio 0,1 M (pH 8,9), e agitada durante a noite a 4° C. Desta forma há bloqueio dos sítios remanescentes no BAC.

6. A mistura é novamente centrifugada a 4.000 rpm por 20 minutos e lavada 3 vezes com aproximadamente 40 ml de cloreto de sódio (NaCl) 0,15 M, até o sobrenadante apresentar uma $D.O._{280}$ igual a zero. O sobrenadante pode ter que ser centrifugado para uma leitura mais exata. Toda IgG livre deverá ter sido retirada.

7. O BAC-IgG é lavado com glicina-HCl 0,1 M, pH 2,8 (tampão de eluição) e a densidade ótica do sobrenadante é checada a 280nm. Uma $D.O._{280}$ de zero significa que a IgG está fortemente ligada ao BAC. A mistura BAC-IgG lavada com ácido é então lavada com PBS-azida e ressuspensa na proporção de 20% com PBS-azida tampão. Esta preparação pode ser estocada a 4° C por 2 a 3 meses.

8. O soro de coelho anticamundongo é preparado por centrifugação a 20.000 rpm por 1 hora. Assumindo que o antissoro contém em torno de 1 mg/ml de imunoglobulina (Ig) anticamundongo específica, e que 10 mg de IgG estavam acoplados ao BAC, em torno de 2,5 ml de soro poderia ser misturado a 2,5 ml de suspensão de BAC a 20% preparada no passo 7. A mistura é agitada por 2 horas a 4° C.

9. O BAC-IgG-antiIg é centrifugado a 4.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante é recolhido e testado em imunodifusão para demonstrar que toda a atividade anticamundongo foi removida pelo imuno-absorvente.

10. O sedimento é lavado duas vezes com 40 ml e uma terceira vez com 2,0 ml de PBS, e então ressuspenso em 1 ml de tampão glicina-HCl 0,1 M (pH 2,8) a temperatura ambiente. A suspensão levará em torno de 5 minutos.

11. A suspensão é centrifugada a 4.000 rpm por 10 minutos para separar o anticorpo anticamundongo purificado de imuno absorvente. O sobrenadante contendo a antiIg diluída poderá ser transferido para um outro recipiente e imediatamente neutralizado pela adição de tampão fosfato de sódio 0,3 M (pH 7,8) até o pH atingir 7,2. A concentração de anticorpos é medida em D.O.280 (usando $E^{280}{}_{1}cm/1,4 = 1$ mg/ml) e dializado a vácuo contra PBS para concentrar a 1 mg/ml. Então, alíquotas de 50 µl são distribuídas em frascos Nunc de 2 ml e congeladas a -70° C. O anti-soro é testado por imunodifusão contra anticorpo monoclonal de camundongo para demonstrar atividade contra várias classes e subclasses de anticorpos de camundongo.

RADIOIODINAÇÃO DE ANTICORPOS

As resinas de trocas iônicas usadas para separar o anticorpo marcado do ^{125}I não-ligado são preparadas em grandes lotes e estocadas a temperatura ambiente entre intervalos de uso. As três resinas Dowex-1, DEAE Sephadex e DE 52 - são todas tratadas antes do uso. O pré-tratamento com HCl-NaOH do DE 52 pode ser omitido, se desejar. As resinas são tratadas separadamente, mas de forma idêntica.

Em torno de 50 g de Dowex-1, 10 g de DEAE Sephadex e 20 g de DE 52 são embebidas, cada uma, em 15 volumes de HCl 0,5 N por 30 minutos. Cada resina é, então lavada com aproximadamente 10 trocas de água destilada até que o pH da água chegue a 4,0. O pH da água destilada, obviamente, deve ser mais alto que 4,0 antes do uso; isto pode requerer algum ajustamento. A lavagem do Dowex-1 pode ser feita pela aspiração do sobrenadante; DEAE Sephadex e DE 52 são melhor lavados em funil de Buchner.

Cada resina é, então, embebida em NaOH 0,5 N por 30 minutos seguida pela lavagem até que o pH seja reduzido a 8,0. O procedimento pode ser interrompido neste ponto.

O embebimento com HCl 0,5 N por 30 minutos é repetido e as resinas são lavadas até atingir pH 4,0. Elas são novamente embebidas em NaOH 0,5 N seguido por lavagem até o pH ser reduzido a 8,0. Este procedimento também pode ser interrompido neste ponto também.

O NaH_2PO_4 0,5 M é adicionado às resinas drenadas. O pH deve ser 4,5. O Dowex-1 é deixado durante a noite; o DEAE Sephadex e o DE 52 são estocados sob vácuo durante a noite.

O NaH_2PO_4 0,5 M é então succionado e o NaH_2PO_4 0,2 M é adicionado até o pH chegar a 7,0.

Um tampão é então preparado pela adição de NaH_2PO_4 0,2 M a Na_2HPO_4 0,2 M até que o pH caia a 7,0. Cada resina é lavada muitas vezes com este tampão, ressuspensa em torno de dois volumes de tampão, e empacotada em frascos de 100 ml. Para cada 100 ml de suspensão de resina, 1 ml de azida sódica a 2% é adicionada. Todas as resinas são estocadas a temperatura ambiente onde elas permanecem estáveis por anos. O tampão remanescente não usado é esterilizado por filtração e é estocado a temperatura ambiente.

Para preparar as colunas, corte e quebre duas pipetas Pasteur para remover as suas pontas finas. Coloque uma pequena quantidade de lã de vidro dentro da ponta grossa das pipetas e deixe-a correr para a ponta quebrada. Cuidados devem ser tomados para evitar perfurações nestes chumaços.

Coloque um tubo de borracha macia com comprimento de 2 polegadas sobre a ponta fina de cada pipeta e prenda-as verticalmente num suporte. Adicione tampão (fosfato 0,2 M) a cada coluna, o fluxo deve ser de 1 gota por segundo. Utilize uma pinça no tubo de borracha para evitar entrada de bolhas nas colunas. Remova toda a fibra perdida acima dos chumaços, encha as colunas até a metade mais ou menos com tampão, e adicione DEAE-Sephadex. Abra a pinça para empacotar o Sephadex a uma profundidade em torno de 5 mm. Então feche novamente os tubos. Adicione DE 52, abra a pinça e empacote o DE 52 também até 5 mm de profundidade. Feche os tubos novamente. Use uma pipeta Pasteur com a ponta fina removida para adicionar Dowex-1 até a altura do pescoço das colunas. Lave cada coluna com 10 ml de tampão e depois com 20 ml de tampão contendo 10% de soro eqüino. As colunas, agora prontas para a separação, são pinçadas.

Nós temos adotado o procedimento "Iodogen" de Fraker e Speck (Biochem. and Biophs. Res. Commun. 80: 849-857, 1978) para iodinação de anticorpos de coelho. Este procedimento é mais simples e mais rápido que o método da Cloramina T. O Iodogen (1, 3, 4, 6-Tetracloro-3,6-diphenilglicoluril) é insolúvel na água e pode ser adsorvido ao vidro. É solubilizado em clorofórmio, e 5 ou 10 µg são secos em tubos de vidro de 12 x 75 mm de acordo com indicação do fabricante. As reações de iodinação são realizadas nestes tubos. A remoção da proteína e do isótopo do frasco de reação interrompe a reação de iodinação, e o "Iodogen" permanece ligado ao vidro.

Os tubos são preparados em lotes e estocados indefinidamente, em local seco a temperatura ambiente. No dia da iodinação, um tubo coberto com "Iodogen" é lavado com tampão fosfato para retirar algum pedaço de "Iodogen" perdido. O tubo é drenado, e os itens abaixo são colocados próximos a uma capela de marcação:

1. Tubo com "Iodogen"
2. Luvas plásticas
3. Coluna de troca iônica (preparada como indicado acima).
4. Tampão RIA (10% de HS, 0.08% de azida sódica).
5. Tampão fosfato 0,2M, pH 7,0, 10 ml sem soro, 10 ml com 10% de HS.
6. Tubo de centrifugação com rosca para 15 ml, encapado com lâmina de chumbo.
7. Pipetas Pasteur, bulbo para pipetagem, tubos, micropipetador e ponteiras.
8. 0,25 mCi ^{125}I ($Na^{125}I$ em NaOH) num volume total de 10 µl ou menos.
9. Tubos de vidro de 12 x 75 mm contendo 100 µl de tampão fosfato mais 10% de HS.
10. Anticorpo, 50 µl em 50 µl de tampão fosfato.
11. Contador "geiger", protetor de chumbo.
12. Recipiente para resíduos radioativos.

O executor da iodinação deve usar luvas duplas. Todo o procedimento, incluindo a marcação e o trabalho nas colunas, deve ser realizado em capela adequada. O tubo de Iodogen, lavado e drenado, é colocado em cálice de chumbo e 50 µg de anticorpo é adicionado. Duzentos e cinqüenta µCi de ^{125}I são adicionados usando uma pipeta Eppendorf ou seringa de Hamilton. O tubo é agitado vagarosamente e a reação ocorre em 15 minutos. Uma pipeta Eppendorf é usada para transferir a mistura para a coluna. O tubo de Iodogen é lavado com 200 µl de tampão fosfato sem soro e este volume é também transferido para a coluna. A coluna de troca iônica é aberta e o anticorpo radioativo é passado através dela com tampão fosfato contendo 10% de HS. Quatro ml são coletados da coluna para dentro dos tubos de centrifugação, embrulhados em lâmina de chumbo. Estes 4 ml são diluídos com 4 ml de tampão RIA (10% HS e 0,08% de azida sódica). A coluna é deixada correr até secar e é descartada com os tubos de 12 x 75 mm, ponteiras Eppendorf e pipetas Pasteur.

Os anticorpos marcados e o tampão RIA são misturados, amostras de 25 µl são contadas por 0,1 minuto para determinar a atividade e os anticorpos são estocados dentro de chumbo a 4° C, aonde é estável por aproximadamente 2 meses. Anticorpos marcados por este procedimento geralmente têm 4-7 x 10^5 counts/minutos por 25 µl.

Verificar radioatividade do técnico e na área de trabalho após a execução do trabalho.

CLONAGEM DE HIBRIDOMAS

Hibridomas normalmente são linhas celulares instáveis, isto é, elas tendem a perder a habilidade de produzir anticorpos. As células que perderam esta capacidade rapidamente suplantam as que conservaram a habilidade de produção de anticorpos. Isto pode ocorrer, ainda, enquanto o nivel de anticorpos no meio de cultura é detectável. Desta forma, cultivos ainda viáveis estão invarialvelmente perdidos. Para que não aconteça esta perda, deve-se clonar os hibridomas aproveitáveis, para selecionar as células que têm capacidade de produzir anticorpos, separando-as das demais. Esta etapa deve ser realizada logo que seja determinada a viabilidade dos hibridomas. Após repetir a clonagem varias vezes a linha celular tende a estabelecer-se. No entanto, em muitos casos, quantidades suficientes de anticorpos podem ser produzidas para executar determinados projetos, a partir dos primeiros clones ainda não perfeitamente estabelecidos. Caso determinados clones forem congelados em nitrogênio líquido, estes podem ser descongelados e produzir grande quantidade de anticorpos necessários para projetos maiores.

Três métodos de clonagem têm sido empregados com sucesso. Pesquisadores, em vários laboratórios, fazem clonagens através de suspensão em agarose, ou pelo método de diluição. Outros descrevem a obtenção de bons resultados fazendo diluições em monocamadas de timócitos murinos ou em células do exsudato peritoneal. Uma vez que hibridomas específicos podem ser clonados facilmente por um ou outro método, deve-se tentar outra técnica de clonagem, caso não tenhamos sucesso com a primeira.

Todos os métodos requerem que se tenha hibridomas crescendo ativamente e que estejam em exelentes condições. Assim, a cultura a ser clonada, deve ser dividida, suplementada com meio novo, contendo 20% de soro fetal bovino (SFB) um dia antes da clonagem.

O primeiro dos métodos a seguir relacionados, foi usado inicialmente, no PIADC. No entanto, esse método foi abandonado em favor do segundo, pois este é mais eficiente, ou seja, o método de diluição, empregando cultivos de macrófagos peritoniais.

1) No dia da clonagem, as células são ressuspendidas, contadas e diluídas a 1.000, 100 e 10 em azul de tripan por milímetro de MEM com 20% de soro fetal bovino. Necessita-se de pelo menos 5 ml de cada diluição. Com uma pipeta de Pasteur na posição vertical, as células são colocadas em uma microplaca de fundo chato com 96 poços (1 gota por poço, 60 poços por diluiçao), nos quais, anteriormente, foram colocados 200 microlitros de meio contendo 20% de SFB. Após, 10 ml de agarose-MEM a 0,25% são colocados nos tubos contendo o restante das células diluídas. Esta agarose é colocada em 24 poços, que receberam previamente 1,5 ml de MEM com 0,5% de agarose, agora já solidificado. A camada superior de agarose, contendo as células, é colocada à temperatura ambiente para a solidificação do agar, e após incubada em estufa úmida a 37° C com 5% de CO_2.

A agarose a 0,5% é preparado pela combinação de:

25 ml de agarose a 2% em água destilada
25 ml de MEM 2X (sem glutamina e bicarbonato)
20 ml de SFB
1 ml de glutamina (200 mM)
2 ml de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) a 7,5%
27 ml de MEM com 20% de SFB

A agarose é dissolvida e esterilizada por autoclavação e resfriado a 42° C. Todos os outros componentes são aquecidos a 42°C antes de misturá-los à agarose.

A agarose 0,25% é preparada pela combinação de igual volume de MEM com 20% de SFB e MEM com 0,5% de agarose, descrita anteriormente.

Todas as culturas são examinadas, para observação de crescimento celular, 4-7 dias após. As culturas contendo mais de dez colônias por poço devem ser descartadas, pois clones individuais não poderão ser selecionados.

As culturas devem ser examinadas, para identificar os clones nos poços. Poços com mais de um clone devem ser identificados, para que não sejam selecionados. Placas com 10-30 clones são as melhores.

Os clones terão crescido o suficiente para serem subcultivados após 10-15 dias. Se a estufa apresentar uma boa umidade, provavelmente não há necessidade da troca de meio, durante esse período. No entanto, os clones devem ser observados periodicamente. Os clones limitantes de diluição são selecionados dos poços pela agitação do meio, retirando-se a metade do líquido e das células, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur.

Clones em agarose são fácilmente visíveis a olho nu, e podem ser aspirados com uma pipeta de Pasteur. Cada clone é então colocado em 0,1 ml de meio condicionado, num único poço, de uma placa com 96 poços. As células são, então, cultivadas como qualquer outro cultivo celular, e devem ser testadas para presença de anticorpos, o quanto antes possível.

Vários clones que crescem bem e que produzem quantidade máxima de anticorpos, são selecionados, multiplicados e congelados. Um único clone pode ser cultivado e produzir anticorpos para serem usados em estudos definitivos.

2) Nós preferimos o seguinte método de clonagem: macrófagos peritoniais são colhidos, conforme descrito anteriormente (página 14) e para cada clonagem, duas placas com 96 poços são utilizadas colocando 200 µl de MEM com 20% de SFB, contendo 10^4 células por mililitro em todos os poços com exeção dos mais externos. Dependendo da riqueza do SFB, nós constatamos que os hibridomas podem ser diluídos, até chegar a cinco células por mililitro, e mesmo assim, produzir inúmeras colônias isoladas. O procedimento adotado é o seguinte:

Ressuspenda os hibridomas que estejam crescendo ativamente em MEM com 20% de SFB a duas diluições de 50 e de 5 células por mililitro e 5 ml por diluição. Usando um pipetador multicanal, coloque 50 µl da suspensão celular, nos 60 poços mais internos de uma microplaca, contendo macrófagos peritoniais. Simplesmente adicione 50 µl aos 200 µl que já estavam no poço. Após isso envolva as placas em envoltório "saran" (plástico aderente transparente para preservação de alimentos frescos) e incube-as de 4 a 7 dias. Examinar então os poços, para identificar colônias isoladas, e marcá-las circundando o poço, na tampa da microplaca. Após 7 a 8 dias, as colônias devem estar de bom tamanho para serem separadas e alimentadas. Dez a doze dias após, devem estar prontas para serem testadas. Após a identificação de clones positivos, eles são subcultivados e congelados. Se as colônias isoladas forem todas negativas, os hibridomas positivos podem ser identificados de colônias múltiplas, das quais possam ser clonados facilmente.

TESTE PARA CLASSE E SUBCLASSE DE ANTICORPOS DE HIBRIDOMAS

A maioria dos hibridomas utilizáveis devem produzir imunoglobulinas suficientes para produzirem uma linha fraca, quando testados contra imunoglobulinas anticamundongo pelo método de imunodifusão em ágar de Ouchterlony. Comercialmente, existem soros de coelhos ou cabra anticamundongo com boa concentração e especificidade para este teste.

O teste para classe e subclasse dos anticorpos de hibridomas é realizado em placas de petri com 50 mm de diâmetro, contendo 3 ml de agarose a 1% em NaCl 0,1 M, e tampão Tris-HCl 0,02M, com pH 8,0. Várias placas de petri podem ser preparadas ao mesmo tempo. Os poços são perfurados e o ágar é aspirado; a porção inferior da placa é recoberta com parafilme, antes de ser recoberta com a porção superior da placa. As placas podem ficar estocadas durante meses a 4°C. Três grupos de 8 poços periféricos de 7 µl e um poço central de 7 µl podem ser cortados em uma placa. Os sobrenadantes normalmente são colocados nos poços periféricos, e o soro de coelho anticamundongo é colocado no poço central, uma vez que esse soro comprado é caro. A leitura dos resultados é realizada 24 a 48 horas após a incubação a temperatura ambiente. As linhas normalmente só podem ser observadas com uma luz intensa, por baixo da placa, de preferência em uma sala escura.

ENSAIO CITOTÓXICO MEDIADO POR COMPLEMENTO
MÉTODO DE EXCLUSÃO DO CORANTE

O método citotóxico mediado por complemento é usado para identificar anticorpos que combinam com antígenos presentes na superfície de células vivas, irão ativar o sistema complemento e desta forma romper a membrana celular.

1) Se forem usadas células normais ou tumorais, estas devem ser tripsinizadas e semeadas na mesma garrafa, um dia antes do ensaio.

2) No dia do teste, remova as células do frasco com tripsinização leve, dilua no meio (500 ml de RPMI 1640 contendo 5% de SFB, 2 ml de HEPES 1M, 1 ml de NaOH 0,03 M) para 4 x 10^5 células por mililitro e distribua então 0,05 ml por poço de uma microplaca de fundo redondo.

3) Acrescente diluições de 0,05 ml de anticorpo por poço. Como o complemento de camundongo não interfere com o teste, o líquido ascítico pode ser testado sem inativação prévia.

4) Agite as placas, para homogeneizar as células e incube por 90 minutos a temperatura ambiente.

5) Centrifugue as placas por 3 a 5 minutos a 1200 rpm para peletizar as células.

6) Retire o sobrenadante da placa e o excesso de fluído da superfície da placa.

7) Adicione diluições apropriadas de complemento resfriado de coelho na quantidade de 0,05 ml por poço. Várias diluições (1:2, 1:5, 1:10) do complemento devem ter sido testadas previamente. Somente alguns, talvez 1 de cada 25 coelhos, têm o complemento de que não causa lise inespecífica. Este teste serve para encontrar um coelho que combine com a célula, ou o sistema célula-vírus que está sendo testado. Coelhos diferentes são ótimos com células diferentes.

8) Agite as placas em um microagitador para ressuspender as células, coloque uma tampa e incube as placas por 45 minutos a 37°C em câmara úmida com 5% CO_2.

9) Coloque as placas no gelo após a incubação, adicione azul de tripan gelado, na quantidade de 0,05 ml por poço, e calcule a percentagem de células vivas (brancas) e mortas (azul).

10) Determine a diluição do anticorpo apresentando 50% de lise citotóxica comparando com gráficos ou resultados de computador.

11) Cada teste deve ter seus controles. Para o teste do soro use:

a) Só o complemento
b) Soro pré-sangria e complemento
c) Menor diluição do soro, sem o complemento
d) Soro sabidamente positivo.

Para o teste dos hibridomas use:

a) Só o complemento
b) Sobrenadante de mielomas apropriados, seguido de complemento
c) Menor diluição do sobrenadante, sem complemento
d) Sobrenadante positivo, com várias diluições.

MEIO DE "TONG CHANG" LIVRE DE SORO PARA HIBRIDOMAS

Os anticorpos monoclonais produzidos em meios livres de soro podem ser concentrados 1000 vezes através de diálise, ultracentrifugação, ou ainda podem ser purificados por cromatografia por afinidade ou em proteína-A-sepharose. A fórmula para o meio "Tong chang" sem soro está no anexo (veja pg. 48). Há trabalhos de outros laboratórios que recomendam a adição de 10 µM de 2 aminoetanol, 10 µM de 2 mercaptoetanol, 1×10^{-9} M de selenito de sódio, 4 µg por mililitro de ácido oléico em 1 mg por mililitro de soro albumina bovina e 1 - 2 µg por mililitro de lipoproteínas humanas de baixa densidade para melhorar este meio. Outros meios sem soros já existem disponíveis comercialmente.

Os hibridomas podem ser cultivados em frascos de Erlenmeyer de 250 ml, contendo 100 ml de meio com 20% de soro fetal bovino. As células são então lavadas em meio sem soro e alimentadas com 100 ml de meio sem soro. O meio deve ser trocado 2-3 vezes por semana. Algumas linhas celulares crescem bem nesse meio e outras simplesmente não.

PROPAGAÇÃO DE HIBRIDOMAS COMO ASCITE EM CAMUNDONGOS

Hibridomas cultivados "in vitro" produzem 0,1 - 10 µg de anticorpos por mililitro. Os mesmos hibridomas, quando cultivados na cavidade peritoneal de camundongos, podem produzir 5 a 80 mg de anticorpos por mililitro de fluído ascítico. Ambos os métodos possuem algumas vantagens. Os anticorpos, produzidos "in vitro" com um hibridoma devidamente clonado e cultivado em SFB realmente livre de imunoglobulinas ou meio sem soro, é realmente monoclonal e monoespecífico. A baixa concentração de anticorpos pode ser superada pelo cultivo dos hibridomas em meio livre de soro, concentrando após os anticorpos através de precipitação com sulfato de amônia, diálise, ultracentrifugação, ou cromatografia por afinidade com proteína A. Entretanto, isso é desnecessário para vários estudos. Quando grandes quantidades ou grandes concentrações de anticorpos são necessárias, os hibridomas podem ser cultivados na cavidade peritoneal de camundongos sem maiores problemas. Os anticorpos monoclonais produzidos em camundongos estarão contaminados com outros anticorpos que normalmente estão presentes. Assim sendo, os camundongos usados para a produção de líquido ascítico deverão estar protegidos contra os antígenos para os quais se deseja a produção de anticorpos e contra todos os antígenos que apresentam reação cruzada com o antígeno específico.

A técnica é simples. Usa-se camundongos BALB/c de 6 a 10 semanas de idade que recebem 0,5 ml de "pristane" (2, 6, 10, 14-tetrametilpentadecano) por via intraperitoneal com o auxílio de uma seringa de vidro (agulha de 23G - 3/4"). Alternativamente, a solução estéril de azul de tripan pode ser utilizada para sensibilização. Entre 3 - 21 dias, (preferencialmente 14), 1 x 10^6 hibridomas, com rápido crescimento e com poucas passagens, são injetados intraperitonealmente. A ascite deve aparecer dentro de 2 semanas e deve ser colhida assim que for identificada. Os hibridomas podem crescer na forma de tumores sólidos e produzir pequenas quantidades de anticorpos. Caso apareçam tumores sólidos em vez de ascite, a ascite pode ser produzida pelo uso de uma quantidade menor de hibridomas, em um outro grupo de camundongos.

O líquido ascítico é coletado por punção do camundongo com uma agulha Nº 20; com o líquido sendo coletado em um tubo de centrífuga de plástico com tampa. Parte do líquido vai coagular, e pode ser recuperado após retração do coágulo. Os camundongos coletados são devolvidos para as gaiolas e reexaminados diariamente para presença de ascite. Normalmente, são coletados em dias alternados e só são sacrificados após o aparecimento de grandes massas tumorais.

O líquido ascítico é centrifugado para remover as células, todos os fluídos que contenham anticorpos do mesmo hibridoma são misturados, o líquido resultante "pool" é dividido em alíquotas (geralmente de 100 µl, 1 ml e um frasco grande de estoque), e são congeladas a -70°C. Uma alíquota de cada "pool" deve ser testada para determinar a concentração de anticorpos.

ANEXO 1 - MEIOS E SOLUÇÕES PARA A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

A - SOLUÇÃO ESTOQUE PARA TODOS OS MEIOS

1) Soro fetal bovino (SFB) - Inativar o complemento, pelo aquecimento do soro, a 56°C, durante 30 minutos. Verifique a capacidade de crescimento clonado de mielomas.

2) Glutamina: 20 mM de glutamina preparada em água destilada deionizada: prepare e filtre, em membrana de 0,22 µm, ou compre pronto. Mantenha congelado.

3) Meio essencial mínimo (MEM): Dissolva o pó de MEM autoclavável adquirido no comércio em água destilada, deionizada, colocando 400 ml em frascos com capacidade de 500 ml, e autoclave de acordo com as recomendações do fabricante.(MEM, não autoclavável, MEM modificado por Dulbecco, RPMI 1640, MEM modificado por Iscove, e outros meios também podem ser utilizados.

4) Bicarbonato de sódio - Prepare solução 7,5% em água destilada deionizada. Filtre em membrana de 0,22 µm, e estoque a 4°C, nunca mais de duas semanas.

B - MEIO P3 (MEM COM 10% DO SFB, 15 µg POR MILILITRO DE 8-AZAGUANINA

1) Solução estoque de 8-azaguanina: adicione 0,769 g de 8-azaguanina a 25 gotas de água destilada. Acrescente 50% de hidróxido de sódio, gota a gota, agitando até a droga se dissolver completamente. Adicione água deionizada até a 500 ml, filtre com filtro de membrana de 0,22 µm, e estoque a 4°C em alíquota de 100 ml.

2) Preparação do meio: em 400 ml de MEM, adicione, (a) 50 ml de SFB, (b) 4,8 ml de solução estoque de 8-azaguanina, (c) 5 ml de glutamina 20 mM, e (d) 12 ml de bicarbonato de sódio a 7,5%. Teste a esterilidade para aeróbios e anaeróbios em tubos de tioglicolato. Estoque a 4° C. Use em 6 semanas ou adicione mais glutamina.

C - MEM SEM SORO COM 0,01% DE EDTA

1) Faça solução de EDTA com: (a) 8 g de cloreto de sódio, (b) 200 mg de cloreto de potássio, (c) 1:1g monohidrogêniofosfato de sódio (Na_2HPo_4), (d) 200 mg de fosfato de potássio ($K_{H2}Po_4$), (e) 29,8 ml de sol 0,1 M de etileno diaminotetraacetato de sódio, e (f) 2 ml de vermelho de fenol a 0,5%; e junte quantidade suficiente de água destilada para 1 litro, ajuste o pH para 7,2 com sol. 5 N de hidróxido de sódio, autoclave por 25 minutos a 121°C.

2) Adicione a 400 ml de MEM: (a) 35 ml de solução de EDTA, (b) 5 ml de sol. 200 mM de glutamina, e (c) 12 ml de bicarbonato de sódio a 7,5%.

D - MEM COM 0,01% DE EDTA E 20% DE SFB

1) Adicione a 400 ml de MEM: (a) 35 ml da solução de EDTA, (b) 5 ml de sol. 200 mM de glutamina, (c) 12 ml de bicarbonato de sódio a 7,5%, e (d) 100 ml de SFB.

E - MEIO HAT (HIPOXANTINA - AMINOPTERINA - TIMIDINA)

1) Solução estoque de hipoxantina: adicione 0,68g de hipoxantina a 500 ml de água destilada, dissolva por aquecimento sobre chama ou em banho-maria, esfrie a temperatura ambiente, filtre com uma membrana de 0,45 µm e congele em alíquotas de 10 ml.

2) Solução estoque de aminopterina : adicione 1,9 mg de aminopterina a 99 ml de água destilada, adicione 0,5 ml de hidróxido de sódio 1N para dissolver a droga, neutralize com 0,5 ml de ácido clorídrico 1 N, passe por um filtro de 0,45 µm, e congele em alíquotas de 10 ml. Obs: A aminopterina deve ser protegida da luz, deve ser guardada congelada e usada dentro de 6 meses, após a dissolução.

3) Solução estoque de timidina: dissolver 0,387 g de timidina em 200 ml de água destilada, próxima ao ponto de fervura adicione 0,0225 g de glicina, esfrie a temperatura ambiente, passe em um filtro de 0,45 µm, e congele em alíquotas de 10 ml.

4) Preparação do meio: adicione a 400 ml de MEM: (a) 1 ml da solução estoque de timidina, (b) 5 ml da solução estoque de aminopterina, (c) 5 ml da solução estoque de hipoxantina, (d) 5 ml de sol. de 200 mM glutamina, (e) 12 ml de bicarbonato de sódio a 7,5%, (e) 100 ml de SFB. Submeta a teste de esterilidade para aeróbios e anaeróbios. Estoque a 4°C, adicione mais glutamina se a estocagem for superior a 6 semanas.

F - SOLUÇÃO DE CLORETO DE AMÔNIO A 0,83%

1) Dissolva 0,83 g de cloreto de amônio em 100 ml de água destilada, filtre por uma membrana de 0,45 µm, e estoque a 4°C.

G - SOLUÇÃO DE POLIETILENO GLICOL (PEG)

1) Estoque PEG em alíquotas de 2 ml, em frascos com capacidade de 10 ml, a 4°C até utilização.

2) Para a fusão, adicione 3 ml de MEM sem soro com EDTA a 0,01%, agite bem, filtre por uma membrana de 0,45 µm e estoque a 37°C, com 5% de CO_2 até o uso. Algumas gotas de sol. de bicarbonato de sódio a 7,5% podem ser acrescidas para aumentar o pH para 8.

H - MEIO DE TONG CHANG SEM SORO PARA HIBRIDOMAS

1) Solução estoque de insulina: Reduza o pH de 100 ml de água destilada para 2,5 com ácido clorídrico. Dissolva 20 mg de insulina em 10 ml desta água destilada, filtre por uma membrana de 0,45 µm, e estoque a 4°C. Não use a solução com mais de duas semanas.

2) Solução estoque de transferina: Dissolva 20 mg de transferina em 10 ml de solução de salina tamponada com fosfato (PBS), filtre por uma membrana de 0,45 µm, e estoque a 4°C. Use em 2 semanas.

3) Adquira amino-ácidos não-essenciais 100X de uma fonte comercial.

4) Preparação do meio: adicione a 400 ml de MEM: (a) 2 ml de solução de insulina, (b) 2 ml de solução estoque de transferina, (c) 4 ml de amino-ácidos não-essenciais, (d) 5 ml de sol. 200 mM de glutamina, e (e) 12 ml de bicarbonato de sódio a 7,5%.

I - SOLUÇÕES PARA CROMATOGRAFIA POR AFINIDADE COM BROMOACETILCELULOSE

1) Sol. 0,05 M de 2-aminoetanol em sol. 0,1 M de bicarbonato de sódio (pH 8,9): adicione a 80 ml de água destilada: (a) 0,305 ml de 2-aminoetanol e (b) 0,84 g de bicarbonato de sódio. Adicione ácido clorídrico 1 N para ajustar o pH para 8,9 e adicione água destilada até o volume de 100 ml.

2) Solução tamponada de fosfato de sódio 0,05 M (pH 5,8): (a) Adicione 1,725 g de fosfato de sódio dihidrogenado (NaH_2PO_4) a 250 ml de água destilada, (b) adicione 1,775 g de fosfato de sódio monohidrogenado (Na_2HPO_4) a outros 250 ml de água destilada, e (c) adicione a solução de Na_2HPO_4 aos 250 ml de NaH_2PO_4 até essa ficar com o pH 5,8.

3) Solução salina-fosfatada-tamponada com azida: adicione 0,8 g de azida sódica em 1 litro de solução salina-fosfatada-tamponada.

4) Solução 0,15 M de cloreto de sódio: adicione 0,876 g de cloreto de sódio a 100 ml de água destilada.

5) Tampão 0,1 de glicina ácido clorídrico (HCl)(pH 2,8): Adicione 0,75 g de glicina a 42 ml de água destilada, e reduza o pH para 2,8 com HCl 1 N, e adicione quantidade suficiente de água destilada para 100 ml.

6) Tampão de bicarbonato de sódio 1,0 M (pH 10): (a) Adicione 2,861 g de carbonato de sódio decahidratado $Na_2CO_3.10H_2O$ em 10 ml de água destilada, (b) adicione 0,84 g de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) em outros 10 ml de água, e (c) adicione à solução de Na_2CO_3 até ela atingir o pH 10,0.

7) Solução 0,3 M de fosfato de sódio (pH 7,8): (a) adicione 4,14 g de NaH_2PO_4 em 100 ml de água destilada, (b) adicione 4,26 g Na_2HPO_4 em outros 100 ml de água destilada e (c) adicione a solução de NaH_2PO_4 aos 100 ml de Na_2HPO_4 até atingir o pH 7,8.

ANEXO II - LISTA E GLOSARIO DE PRODUTOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS[1]

NOME INGLÊS	NOME PORTUGUÊS	NOME ESPANHOL	QUANTIDADE REQUERIDA
-Acetone	Acetona	Acetona	1 gal.
-Agarose	Agarose	Agarosa	25 g.
-2-Aminoethanol	2-aminoetanol	2-aminoetanol	100 g.
-Aminopterin	Aminopterina	Aminopterina	25 g.
-Ammoniun chloride	Cloreto de amônio	Cloruro de amonio	100 g.
-Ammoniun sulfate	Sulfato de amônio	Sulfato de amonio	1 Kg.
-8-Azaguanine	8-azaguanina	8-azaguanina	1 g.
-Bovine serum	Soro bovino	Suero bovino	5 l.
-Bovine serum albumin	Albumina sérica bovina	Albumina sérica bovina	100 g.
-Bromoacetylcel-lulose-BAC	Bromo-acetil celulose	Bromo-acetil celulosa	2 g.
-Carbon dioxide	Dióxido de carbono	Dioxido de carbono	tanques
-Chloroform	Clorofórmio	Cloroformo	1 l.
-DE 52	DE 52	DE 52	500 g.
-DEAE Sephadex	DEAE Sephadex	DEAE Sephadex	50 g.
-Dimetyl sulfoxide	Dimetil sulfóxido	Dimetil sulfoxido	500 ml.
-Dowex-1 choride form	Dowex-1 cloreto	Dowex-1 cloruro	100 g.
-EDTA	EDTA	EDTA	0,1 M
-Ethyl alcohol	Álcool etílico	Alcohol etílico	5 gal.

1. Quantidades necessárias para a implantação de um laboratório de anticorpos monoclonais

-Freund's complete adjuvant	Adjuvante completo de Freund	Adyuvante completo de Freund	10 ml.
-Freund's incomplete adjuvant	Adjuvante incompleto de Freund	Adyuvante incompleto de Freund	10 ml.
-Glutamine	Glutamina	Glutamina	500 g.
-Glutaraldehyde	Glutaraldeído	Glutaraldehído	10 ml.
-Glycine	Glicina	Glicina	1 Kg.
-HEPES	HEPES	HEPES	100 g.
-Horse serum HS	soro de cavalo	suero de caballo	1 l.
-Hydrochloric acid	Acido clorídrico	Acido clorhídrico	1 gal.
-Hypoxantine	Hipoxantina	Hipoxantina	1 g.
-Insulin	Insulina	Insulina	100 mg.
-Iodine 125	Iodo-125	Iodo-125	1 mCi
-Iodogen	Iodogeno	Iodogeno	25 g.
-2-Mercaptoethanol	2-mercaptoetanol	2-mercaptoetanol	100 ml.
-MEM, bicarbonate buffered	MEM tamponado com bicarbonato	MEM buferado con bicarbonato	100 l
-Mouse IgG	IgG de camundongo	IgG de ratón	20 mg.
-Nitrogen liquid	Nitrogênio líquido	Nitrógeno líquido	
-Amino acids 100x (non-essential)	Aminoácidos 100x não-essenciais	Aminoácidos 100x no esenciales	100 ml
-1-O-n-Octyl-ß-D glucopyranoside	1-O-n-Octil-ß-D glicopiranosida	1-O-n-Octil-ß-D glucopiranosida	1 g.
-Oleic acid	ácido oléico	ácido oléico	10 g.
-Pepsin	Pepsina	Pepsina	100 mg.
-Phenol red	Vermelho de fenol	Rojo de fenol	10 g.
-Phenylmethy-	Fluoreto fenilmetil	Fluoruro fenilmetil	

-Phenylmethy-sulfonyl fluoride	Fluoreto fenilmetil sulfonil	Fluoruro fenilmetil sulfonil	1 g.
-Polyethylene glycol-PEG	Polietileno glicol-PEG	Propietilenglicol PEG	20 g.
-Potassium chloride	Cloreto de potássio	Cloruro de potasio	500 g.
-Potassium phosphate	Fosfato de potássio	Fosfato de potasio	500 g.
-Povidone iodine	Iodo povidone	Ioduro povidone	1 gal.
-Rabbit antimouse	Soro de coelho anticamundongo	Suero de conejo anti-raton	
IgA	IgA	IgA	2 ml.
IgG1	IgG1	IgG1	2 ml.
IgG2a	IgG2a	IgG2a	2 ml.
IgG2b	IgG2a	IgG	2 ml.
IgG3	IgG3	IgG3	2 ml.
IgM sera	IgM	IgM	2 ml.
-Rabbit serum	Soro de coelho	Suero de conejo	500 ml.
-Sephadex G-75 or G-200	Sephadex G-75 ou G-200	Sephadex G-75 o G-200	100 g.
-Sodium acetate	Acetato de sódio	Acetato de sódio	100 g.
-Sodium azide	Azida de sódio	Azida de sódio	100 g.
-Sodium bicarbonate	Bicarbonato de de sódio	Bicarbonato de sódio	100 g.
-Sodium carbonate	Carbonato de sódio	Carbonato de sódio	100 g.
-Sodium chloride	Cloreto de sódio	Cloruro de sódio	500 g.
-Sodium dihydrogen phosphate	Fosfato de sódio dihidrogenado	Fosfato de sódio dihidrogenado	1 Kg.
-Sodium hydroxide	Hidróxido de sódio	Hidróxido de sódio	500 g.
-Sodium monohydro-gen phosphate	Fosfato de sódio monohidrogenado	Fosfato de sódio monohidrogenado	1 Kg.

-2,6,10,14-Tetra-methylpentadecane	2,6,10,14 tetra metil pentadecano	2,6,10,14 tetra metilpenta decano	100ml.
-Thioglycolate culture medium	Meio de cultivo de tioglicolato	Medio de cultivo de tioglicolato	
-Thymidine	Timidina	Timidina	1 g.
-Transferrin	Transferina	Transferina	100 mg.
-Tris	Tris	Tris	1 Kg.
-Triton X-100	Triton X-100	Triton X-100	100 ml.
-Trypan blue 4%	Azul de tripam 4%	Azul de tripan 4%	100 ml.

ANEXO III - LISTA E GLOSÁRIO DE EQUIPAMENTOS E MATERIAIS REQUERIDOS PARA A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

INGLÊS: Applicators, cotton-tipped
ESPANHOL: Aplicadores con punta de algodón
PORTUGUÊS: Aplicadores com ponta de algodao

INGLÊS: Barrier paper for radioactive work
ESPANHOL: Papel barrera para trabajo radioactivo
PORTUGUÊS: Papel barreira para trabalho radioativo

INGLÊS: Centrifuge, low speed with refrigeration
ESPANHOL: Centrífuga de baja velocidad con refrigeración
PORTUGUÊS: Centrífuga de baixa velocidade com refrigeração

INGLÊS: Centrifugue tubes, 15 and 50 ml, conical, plastic, srew-cap
ESPANHOL: Tubos cônicos para centrífuga, de 15 y 50 ml, de plásticos, con tapon de rosca
PORTUGUÊS: Tubos para centrífuga, 15 e 50 ml, cônicos, de plástico, com tampa de rosca

INGLÊS: Columns for gel and ion exchange chromatography
ESPANHOL: Columnas para cromatografia en gel y de intercambio iônico
PORTUGUÊS: Colunas para cromatografia em gel e de troca ionica

INGLÊS: Equipment, standard assortment of laboratory hardware
ESPANHOL: Equipo usual de laboratório
PORTUGUÊS: Equipamento, aparelhos usuais de laborátorio

INGLÊS: Freezer box, cardboard
ESPANHOL: Caja de cartón para congelar
PORTUGUÊS: Caixa para congelar de papelão

INGLÊS: Freezer, liquid nitrogen, 600 vials per fusion
ESPANHOL: Congelador, nitrógeno líquido, 600 viales por fusion
PORTUGUÊS: Botijão, nitrogênio líquido, 600 garrafas por fusão

INGLÊS: Freezer tubes, 1 ml, plastic, for liquid nitrogen freezer
ESPANHOL: Tubos plásticos de 1 ml, para congelador de nitrógeno líquido
PORTUGUÊS: Tubos para congelamento, 1 ml, de plástico, para botijão de nitrogênio

INGLÊS: Freezers, low and ultra-low temperature
ESPANHOL: Congeladores de temperatura baja y ultra baja
PORTUGUÊS: Congeladores, com temperaturas baixas e ultra baixas

INGLÊS: Fume hood for radioactive iodine work
ESPANHOL: Campana de extracción para trabajar com iodos radiactivos
PORTUGUÊS: Capela de exaustão para trabalho com iodo radioativo

INGLÊS: Gamma counter
ESPANHOL: Contador gamma
PORTUGUÊS: Contador gamma

INGLÊS: Geiger counter
ESPANHOL: Contador Geiger
PORTUGUÊS: Contador Geiger

INGLÊS: Glassware, standard assortment including beakers, flasks, and graduated columns
ESPANHOL: Cristaleria usual de laboratórios incluyendo matraces y cilindros graduados
PORTUGUÊS: Vidraria, estoque usual incluindo copos de Becker, frascos de Erlenmeyer e provetas

INGLÊS: Glass wool
ESPANHOL: Lana de vidrio
PORTUGUÊS: Lã de vidro

INGLÊS: Hamilton syringe, 10 µl
ESPANHOL: Jeringa Hamilton, 10 µl
PORTUGUÊS: Seringa Hamilton, 10 µl

INGLÊS: Heating stir plate
ESPANHOL: Agitador magnético térmico
PORTUGUÊS: Agitador magnético com placa de aquecimento

INGLÊS: Incubators, humidified, automatic CO_2, 2 ft^3 per fusion
ESPANHOL: Incubadoras de CO_2 humidificadas con inyección de 2 pies cúbicos por fusión
PORTUGUÊS: Incubadoras, úmidas, CO_2 automático, 2 pés cúbicos por fusão

INGLÊS: Laminar flow cabinets with aspirator bottle
ESPANHOL: Campanas de flujo laminar con matraz de aspiracion
PORTUGUÊS: Capelas de fluxo laminar com aspirador

INGLÊS: Lead bricks for radioactive shielding
ESPANHOL: Blocks de plomo para protección radioactiva
PORTUGUÊS: Tijolos de chumbo para proteção de radioatividade

INGLÊS: Lead cup from old ^{125}I container
ESPANHOL: Vaso de plomo de un recipiente usado de ^{125}I
PORTUGUÊS: Copo de chumbo de um recipiente usado com ^{125}I

INGLÊS: Manifold, 8 tip, for washing microtiter plates
ESPANHOL: Manifold de 8 salidas para lavar placas de microtitulación
PORTUGUÊS: Manifold de 8 pontas para lavar placas de microtitulação

INGLÊS: Membrane filters, 0.22 and 0.45 µm, 115 and 250 ml, disposable
ESPANHOL: Filtros de membrana de 0.22 y 0.45 µm, 115 y 250 ml, descartábles
PORTUGUÊS: Filtros de membrana, 0.22 e 0.45 µm, 115 e 250 ml, descartáveis

INGLÊS: Mice, BALB/c
ESPANHOL: Ratones, BALB/c
PORTUGUÊS: Camundongos, BALB/c

INGLÊS: Microscope, inverted tissue culture model
ESPANHOL: Microscopio, invertido para cultivo celular
PORTUGUÊS: Microscópio, modelo invertido para cultivo celular

INGLÊS: Microtiter plate shaker
ESPANHOL: Agitador de placas para microtitulación
PORTUGUÊS: Agitador de placas para microtitulação

INGLÊS: Microtiter plates, V - botton, polyvinylniny chloride
ESPANHOL: Placas microtiter, fondo en V de cloruro de polivinilo
PORTUGUÊS: Placas para microtitulação, fundo V, em cloreto de polivinil

INGLÊS: Parafilm
ESPANHOL: Parafilm
PORTUGUÊS: Parafilme

INGLÊS: Pasteur pipets, plugged and unplugged
ESPANHOL: Pipetas de Pasteur, conectables y no conectables
PORTUGUÊS: Pipetas de Pasteur, com conexão e sem

INGLÊS: Petri dishes, 50 and 100 mm
ESPANHOL: Cajas de Petri, 50 y 100 mm
PORTUGUÊS: Placas de Petri, 50 e 100 mm

INGLÊS: pH meter
ESPANHOL: Medidor de pH o potenciometro
PORTUGUÊS: Potenciômetro

INGLÊS: Pipets bulbs, 1/2 oz, 2, 5, 50 ml
ESPANHOL: Bulbos para pipeta, de 1/2 oz, 2, 5, y 50 ml
PORTUGUÊS: Bulbos para pipetas, 1/2 oz, 2, 5, 50 ml

INGLÊS: Pipets tips for pipetter
ESPANHOL: Puntas de pipetas para pipetador
PORTUGUÊS: Ponteiras para pipetador

INGLÊS: Pipets, 1, 2, 5, 10, and 25 ml, all in large quantity in metal cans
ESPANHOL: Grandes cantidades de pipetas de 1, 2, 5, 10, y de 25 ml, en cilindros de metal
PORTUGUÊS: Grandes quantidades de pipetas de 1, 2, 5, 10 e de 25 ml, em cilindros de metal

INGLÊS: Pipetter, adjustable microliter, 0-200 µl, single and 8 channel
ESPANHOL: Pipetero ajustable de 0-200 µl, simple y de 8 canales
PORTUGUÊS: Pipetador ajustavél, de 0-200 microlitros, simples e de 8 canais

INGLÊS: Platic gloves
ESPANHOL: Guantes de plástico
PORTUGUÊS: Luvas de plástico

INGLÊS: Plastic wrap
ESPANHOL: Envoltura plástica
PORTUGUÊS: Envoltório plástico

INGLÊS: Rabbits
ESPANHOL: Conejos
PORTUGUÊS: Coelhos

INGLÊS: Rubber tubing
ESPANHOL: Tubos de caucho o hule
PORTUGUÊS: Tubos de borracha

INGLÊS: Serum bottles, 100 and 500 ml
ESPANHOL: Botellas de suero, 100 y 500 ml
PORTUGUÊS: Frascos para soro, 100 e 500 ml

INGLÊS: Sonicator
ESPANHOL: Sonificador
PORTUGUÊS: Sonicador

INGLÊS: Surgical instruments, scissors and forceps
ESPANHOL: Instrumentos quirúrgicos, tijeras y forceps
PORTUGUÊS: Instrumentos cirúrgicos, tesouras e pinças

INGLÊS: Syringe needles, 20, 23 and 27 gauge
ESPANHOL: Agujas de jeringa, tamano 20, 23 y 27
PORTUGUÊS: Agulhas de seringa, tamanhos 20, 23 e 27

INGLÊS: Tissue culture flasks, 25 cm^2 and 75 cm^2
ESPANHOL: Matraces para cultivo celular de 25 cm^2 y 75 cm^2
PORTUGUÊS: Garrafas para cultivo celular, 25 cm^2 e 75 cm^2

INGLÊS: Tissue culture plates, 24- and 96-well
ESPANHOL: Placas para cultivo celular con 24 y 96 huecos
PORTUGUÊS: Placas para cultivo de células com 24 e 96 poços

INGLÊS: Tube clamps
ESPANHOL: Abrazadera de tubos
PORTUGUÊS: Pinças de Mohr

INGLÊS: Waste container for radioactive materials
ESPANHOL: Recipiente para desecho de materiales radioactivos
PORTUGUÊS: Recipientes para lixo de materiais radioativos

INGLÊS: Water bath
ESPANHOL: Baño maria
PORTUGUÊS: Banho maria

INGLÊS: Wire sieves in metal support rings, 60-100 mesh
ESPANHOL: Tamices de alambre en anillos metálicos con malla de 60 a 100
PORTUGUÊS: Peneiras de arame em suporte de anéis metálicos, com rede 60 a 100

ANEXO IV - LISTA DE EMPRESAS DEDICADAS A COMERCIALIZAR ANTICORPOS E PRODUTOS BIOLOGICOS

Antibodies . . .

biocompatibility equipment

biocompatibility equipment
Anal Lab Accessories (516) 536-6846

biocompatibility supplies
Accurate Chem & Sci Corp (516) 433-4900
Anal Lab Accessories (516) 536-6846
Botesi Diags Corp (201) 575-4500
Cedarlane Labs Ltd. (416) 878-8891

immunoglobulins
Accurate Chem & Sci. Corp. (516) 433-4900
Amersham Corp (312) 583-6300, (800) 323-9750
Bio-Rad Labs.-Chem. Div. (415) 233-7000
BIODESIGN Inc (207) 967-4173
Bioproducts for Science, Inc (317) 894-7536
Boehringer Mannheim Corp. (317) 849-8360, (800) 428-5433
CALTAG Labs (415) 873-6106
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4060
Cambridge Res. Biochems., Inc. (516) 825-1322
Cedarlane Labs. Ltd. (416) 878-8891
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2451, (800) 437-7500
DAKO Corp. (805) 963-9881
Granbio, Inc. (714) 676-0049
Helix Biotech Ltd. (604) 270-7468
ICN Chem. & Radioisotopes
Jackson ImmunoRes. Labs., Inc. (215) 869-4024, (800) 367-5296
Kallestad Diags. (512) 329-5555
Kent Labs. Inc. (206) 868-6200
Novo BioLabs (203) 790-2770
Organon Teknika-Cappel (215) 251-2000, (800) 523-7630; in PA (800) 662-2440
S Prime 3 Prime Inc. (215) 644-4710
Scripps Labs (619) 576-3506
Serotec Ltd. 08675 79941
Tago Inc.
V.M.R.D. Inc (509) 334-5815
Vector Labs., Inc (415) 697-3600
Wellcu Intl Biosciences (416) 781-4089
Wielgene R & D Labs., Inc (818) 445-3083
York Biologicals Intl (516) 751-6553

monoclonal antibodies, custom synthesis of
Amer. Bio-Technols., Inc. (617) 647-5636, (800) 542 2281
Berkeley Antibody Co. (BAbCo) (415) 222 4840
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Biotech Res. Labs Inc (301) 251-0800
CALTAG Labs (415) 873-6106
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935 4060
Cambridge Res. Biochems., Inc. (516) 825 1322
Diagnostic Inc (312) 583-3134
Epitope Inc (503) 641-6115
Genetic Diags. Corp (516) 487-4711
Granbio, Inc (714) 676-0049
Molecular Biology Resources, Inc. (414) 871-7199
Novabiochem AG (062) 66 18 22
Oncogene Science, Inc. (516) 365-9300, (800) ONC-2916

monoclonal antibodies to antibiotics
Accurate Chem & Sci Corp (516) 433-4900
BIODESIGN Inc (207) 967-4173
Cambridge Medical Technols Corp. (617) 935-4060
Chemicon Intl Inc (213) 322-2451, (800) 437 7500
Genetic Diags Corp (516) 487-4711
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Inter Sci Diags (213) 677-3322
Scantibodies Lab (619) 258-93
York Biologicals Intl (516) 751-6553

monoclonal antibodies to blood groups
Accurate Chem & Sci. Corp. (516) 433-4900
Amer. Diagnostica Inc
Baxter Healthcare Corp.-Dade Div. (305) 592-2311
BIODESIGN Inc (207) 967-4173
BioGenex Labs (415) 831-9191
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Botesi Diags Corp (201) 575-4500
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935 4060
DAKO Corp (805) 963-9881
Epitope Inc (503) 641-6115
ICN Chem & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Inter Sci Diags (213) 677-3322
Janssen Life Sciences Prods.
Novo BioLabs (203) 790-2770
Scantibodies Lab (619) 258-93
Serotec Ltd 08675 79941
York Biologicals Intl (516) 751-6553

monoclonal antibodies to cell surface receptors
Accurate Chem. & Sci Corp (516) 433-4900
Amersham Corp (312) 583-6300, (800) 323 9750
BIODESIGN Inc (207) 967-4173
BioGenex Labs (415) 831-9191
Biomed Technols Inc (617) 344-0942
Bioproducts for Science, Inc (317) 894-7536
Botesi Diags Corp (201) 575-4500
Boehringer Mannheim Corp. (317) 849-8360, (800) 428-5433
Coulter Immunology (305) 883-6550
DAKO Corp (805) 963-9881
Euro Biochem Inc (212) 741-3638
Epitope Inc (503) 641-6115
ICN Chem & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9647
Inter Sci. Diags (213) 677-3322
Interferon Sciences Inc. (201) 249-3250, (800) 255-1500
Janssen Life Sciences Prods.
Olympus Corp.-Clinical Instrs. Div. (516) 488-3323
Oncogene Science, Inc. (516) 365-9300, (800) ONC-2916
Serotec Ltd. 08675 79941
T Cell Sciences, Inc. (617) 484-2160
V.M.R.D. Inc. (509) 334-5815
York Biologicals Intl (516) 751-6553

monoclonal antibodies to coagulation factors
Accurate Chem. & Sci Corp. (516) 433-4900
Amer. Diagnostica Inc
BIODESIGN Inc (207) 967-4173
BioGenex Labs (415) 831-9191
Bioproducts for Science, Inc (317) 894-7536
Boehringer Mannheim Corp. (317) 849-8360, (800) 428-5433
Cedarlane Labs. Ltd. (416) 878-8891
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2451, (800) 437-7500
DAKO Corp. (805) 963-9881
Genzyme Corp (617) 491-1923
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Inter-Medico (416) 491-8926
Inter Sci. Diags (213) 677-3322
Kallestad Diags. (512) 329-5666
Novo BioLabs (203) 790-2770
Serotec Ltd 08675 79941
York Biologicals Intl (516) 751-6553

monoclonal antibodies to complement components and receptors
Accurate Chem & Sci Corp. (516) 433-4900
Amer. Diagnostica Inc
BIODESIGN Inc (207) 967-4173
BioGenex Labs (415) 831-9191
Bioproducts for Science, Inc (317) 894-7536
Boehringer Mannheim Corp. (317) 849-8360, (800) 428-5433
Chemicon Intl Inc. (213) 322-2451, (800) 437-7500
Cytotech, Inc (619) 452-1556
DAKO Corp (805) 963 9881
Genzyme Corp (617) 491-1923
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Inter-Medico (416) 491-8926
Inter Sci. Diags (213) 677-3322
Kallestad Diags. (512) 329-5666
Novo BioLabs (203) 790-2770
Serotec Ltd 08675 79941
York Biologicals Intl (516) 751 6553

monoclonal antibodies to DNA
Accurate Chem & Sci Corp (516) 433-4900
Boehringer Mannheim Corp. (317) 849-8360, (800) 428 5433
Chemicon Intl Inc. (213) 322-2451, (800) 437-7500
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Inter Sci. Diags (213) 677-3322
Oncor Inc. (301) 963-3500
Promega Corp (608) 274 4330
York Biologicals Intl (516) 751-6553

monoclonal antibodies to enzymes
Accurate Chem & Sci Corp. (516) 433-4900
Amer. Diagnostica Inc
BIODESIGN Inc (207) 967-4173
Biomed Technols. Inc (617) 344-0942
Bioproducts for Science Inc (317) 894-7536
Boehringer Mannheim Corp. (317) 849-8360, (800) 428-5433
Cambridge Medical Technols Corp (617) 935-4060
Cedarlane Labs Ltd (416) 878-8891
Chemicon Intl Inc (213) 322-2451, (800) 437-7500
DAKO Corp (805) 963 9881
Genetic Diags Corp (516) 487-4711
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Inter Sci Diags (213) 677-3322
Interferon Sciences Inc. (201) 249-3250, (800) 255-1500
Promega Corp. (608) 274-4330
Scantibodies Lab (619) 258-93
Serotec Ltd 08675 79941
Ventrex Labs. (207) 773-7231
Zymed Labs Inc (415) 871-4494

monoclonal antibodies to homeostasis antigens
Accurate Chem & Sci Corp (516) 433-4900
BIODESIGN Inc (207) 967-4173
Boehringer Mannheim Corp. (317) 849-8360, (800) 428-5433
DAKO Corp (805) 963 9881
Ingram and Bell Sci (416) 443-9647

monoclonal antibodies to histocompatibility antigens, human
Accurate Chem & Sci Corp (516) 433-4900
Atlantic Antibodies, An Inostar Co. (207) 883-4154
BIODESIGN Inc (207) 967-4173
BioGenex Labs (415) 831-9191
Bioproducts for Science, Inc (317) 894-7536
Botesi Diags Corp (201) 575 4500
Boehringer Mannheim Corp (317) 849-8360, (800) 428-5433
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4060
Cedarlane Labs. Ltd. (416) 878-8891
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2451, (800) 437-7500
DAKO Corp. (805) 963-9881
Epitope Inc. (503) 641-6115
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Inter Sci. Diags. (213) 677-3322
Olympus Corp.-Clinical Instrs. Div. (516) 488-3323
One Lambda, Inc. (213) 478-1001
Technicions Intl. (714) 557-5813
V.M.R.D. Inc. (509) 334-5815
York Biologicals Intl. (516) 751-6553

monoclonal antibodies to histocompatibility antigens, mouse
Accurate Chem & Sci Corp. (516) 433-4900
Bucon, Inc (301) 762-3202
Bioproducts for Science, Inc (317) 894-7536
Boehringer Mannheim Corp. (317) 849-8360, (800) 428-5433
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4060
Cedarlane Labs. Ltd. (416) 878-8891
Chemicon Intl. Inc (213) 322-2451, (800) 437-7500
DYNAL, Inc (516) 829-0039
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Inter Sci. Diags. (213) 677-3322
Organon Teknika-Cappel (215) 251-2000, (800) 523-7630; in PA (800) 662-2440
Serotec Ltd. 08675 79941
V.M.R.D. Inc (509) 334-5815

monoclonal antibodies to histocompatibility antigens, rat
Accurate Chem & Sci Corp (516) 433-4900
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Inter Sci. Diags (213) 677-3322
Serotec Ltd. 08675 79941

monoclonal antibodies to hormones
Accurate Chem. & Sci Corp. (516) 433-4900
Alleis Inc. (416) 677-0831
Amer. Diagnostica Inc
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
BioGenex Labs (415) 831-9191
Biomed Technols. Inc (617) 344-0942
Bioproducts for Science, Inc (317) 894-7536
Boehringer Mannheim Corp. (317) 849-8360, (800) 428-5433
Boots-Celltech Diags., Inc. (201) 428-8777
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4060
Cedarlane Labs. Ltd. (416) 878-8891
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2451, (800) 437-7500
Genetic Diags. Corp (516) 487-4711
ICN Chem. & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9647
Inter-Medico (416) 491-8926
Inter Sci. Diags (213) 677-3322
J C L Clinical Res. (615) 548-0654
Kallestad Diags (512) 329-5555
Nichols Institute Diags. (714) 661-6000
Novo BioLabs (203) 790-2770
Pacific Biotech Inc (619) 695-2088
Scantibodies Lab. (619) 258-93
Serotec Ltd. 08675 79941
Ventrex Labs. (207) 773-7231
York Biologicals Intl. (516) 751-6553
Zymed Labs Inc. (415) 871-4494

monoclonal antibodies to immunoglobulins, cow
Accurate Chem. & Sci. Corp (516) 433-4900
Cedarlane Labs Ltd (416) 878 8891
Chemicon Intl Inc (213) 322-2451, (800) 437-7500
Hyclone Labs., Inc (801) 783-4684
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Inter Sci Diags (213) 677 3322
V.M.R.D. Inc (509) 334-5815

monoclonal antibodies to immunoglobulins, human
Accurate Chem & Sci. Corp. (516) 433-4900
Amer. Diagnostica Inc
Atlantic Antibodies, An Inostar Co. (207) 883-4154
BIODESIGN Inc (207) 967-4173
BioGenex Labs (415) 831-9191
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Biotech Res. Labs. Inc (301) 251-0800
Botesi Diags Corp (201) 575-4500
Boehringer Mannheim Corp. (317) 849-8360, (800) 428-5433
CALTAG Labs (415) 873-6106
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4060
Cedarlane Labs. Ltd (416) 878-8891
Chemicon Intl Inc (213) 322-2451, (800) 437-7500
Coulter Elec. Inc (305) 886-0131
Coulter Immunology (305) 883-6550
DAKO Corp. (805) 963 9881
ICN Chem & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci (416) 443-9647
Inter-Medico (416) 491-8926
Inter Sci. Diags (213) 677-3322
Jackson ImmunoRes Labs., Inc. (215) 869-4024, (800) 367-5296
Janssen Life Sciences Prods.

monoclonal antibodies to infectious agents
Kallestad Diags (512) 329-5666
Nichols Institute Diags (714) 661-6000
Olympus Corp.-Clinical Instrs. Div. (516) 488-3323
One Lambda, Inc. (213) 478-1001
Promega Corp. (608) 274-4330
Scantibodies Lab (619) 258-93
Serotec Ltd. 08675 79941
Ventrex Labs (207) 773-7231
York Biologicals Intl (516) 751-6553
Zymed Labs. Inc. (415) 871-4494

monoclonal antibodies to immunoglobulins, mouse
Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Bioproducts for Science, Inc (317) 894-7536
Biotech Res. Labs Inc (301) 251-0800
Boehringer Mannheim Corp. (317) 849-8360, (800) 428-5433
CALTAG Labs (415) 873-6106
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci (416) 443-9647
Inter Sci. Diags. (213) 677-3322
Janssen Life Sciences Prods.
Molecular Probes, Inc (503) 344-3097
Nordic Immunological Labs. (USA) (714) 661-1188
Olympus Corp.-Clinical Instrs. Div. (516) 488-3323
Organon Teknika-Cappel (215) 251-2000, (800) 523-7630; in PA (800) 662-2440
Promega Corp. (608) 274-4330
Scantibodies Lab (619) 258-93
Serotec Ltd 08675 79941
Zymed Labs. Inc. (415) 871-4494

monoclonal antibodies to immunoglobulins, rabbit
Accurate Chem. & Sci Corp (516) 433-4900
Cedarlane Labs Ltd (416) 878-8891
DAKO Corp (805) 963-9881
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci (416) 443-9647
Inter Sci. Diags. (213) 677-3322
Janssen Life Sciences Prods
Nordic Immunological Labs. (USA) (714) 661-1188
Promega Corp (608) 274-4330
Scantibodies Lab (619) 258-93

monoclonal antibodies to immunoglobulins, rat
Accurate Chem. & Sci. Corp (516) 433-4900
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Boehringer Mannheim Corp. (317) 849-8360, (800) 428-5433
CALTAG Labs. (415) 873-6106
Cedarlane Labs Ltd (416) 878-8891
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci (416) 443-9647
Inter Sci Diags (213) 677-3322
Janssen Life Sciences Prods
Olympus Corp.-Clinical Instrs. Div. (516) 488-3323
Scantibodies Lab (619) 258-93
Serotec Ltd 08675 79941
Zymed Labs Inc (415) 871-4494

monoclonal antibodies to immunoglobulins, other
Accurate Chem. & Sci Corp (516) 433-4900
BioGenex Labs. (415) 831-9191
Biotech Res. Labs Inc (301) 251-0800
Boehringer Mannheim Corp. (317) 849-8360, (800) 428-5433
Cedarlane Labs. Ltd (416) 878-8891
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2451, (800) 437-7500
DAKO Corp (805) 963-9881
DYNAL, Inc. (516) 829 0039
Janssen Life Sciences Prods.
Kallestad Diags (512) 329-5666
Novo BioLabs (203) 790-2770
Olympus Corp.-Clinical Instrs. Div. (516) 488-3323
Organon Teknika-Cappel (215) 251-2000, (800) 523-7630; in PA (800) 662-2440
Serotec Ltd. 08675 79941
V.M.R.D. Inc (509) 334-5815
York Biologicals Intl. (516) 751-6553

monoclonal antibodies to infectious agents
Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Alleis Inc (416) 677-0831
Baxter Healthcare Corp.-Dade Div. (305) 592-2311
BIODESIGN Inc (207) 967-4173
BioGenex Labs (415) 831-9191
Bioproducts for Science, Inc (317) 894-7536
Boehringer Mannheim Corp. (317) 849-8360, (800) 428-5433
Boots-Celltech Diags., Inc. (201) 428-8777
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4060
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2451, (800) 437-7500
Genetic Diags. Corp. (516) 487-4711
ICN Chem. & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9647
Inter Sci. Diags (213) 677-3322
Olympus Corp.-Clinical Instrs. Div. (516) 488-3323
Scantibodies Lab. (619) 258-93
Serotec Ltd. 08675 79941

Antibodies . . .

antibodies to infectious agents

Atlantic Antibodies, An Inostar Co.
(207) 883-4154
Beckman Instrs., Inc. (714) 871-4848
Bethesda Res. Labs (301) 840-8000
Bethyl Labs Inc (409) 597-6111
Bio-Rad Labs.-Chem. Div. (415) 233-7000
BIODESIGN Inc (207) 967-4173
BioGenex Labs (415) 831-9191
Biomed Technis Inc (617) 344-0942
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Biotest Diags Corp (201) 575-4500
CALTAG Labs (415) 873-8106
Cambridge Medical Technols. Corp.
(617) 935-4050
Cambridge Res. Biochems., Inc.
(516) 825-1322
Cedarlane Labs. Ltd (416) 878-8891
Chemicon Intl Inc. (213) 322-2481,
(800) 437-7500
Coulter Elec., Inc. (305) 885-0131
Coulter Immunology (305) 883-8880
DAKO Corp. (805) 963-9881
DYNAL, Inc. (516) 829-0039
E-Y Labs Inc (415) 342-3298
East-Acres Biologicals (617) 765-9580
Grenbio, Inc. (714) 676-0049
Hycione Labs., Inc. (801) 753-4584
ICN Chem. & Radiosotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9847
Integrated Separation Sys. (517) 665-2901
Inter Medico (416) 491-8926
Jackson ImmunoRes. Labs., Inc
(215) 869-4024, (800) 367-5298
Janssen Life Sciences Prods.
JR Sci (916) 866-9835
Kalleslad Diags (512) 329-5555
Kent Labs Inc (206) 868-6200
Kirkegaard & Perry Labs., Inc (301) 948-7755
Manuel Sci Co Ltd (519) 856-9466
Molecular Probes, Inc (503) 344-3007
Nichols Institute Diags (714) 661-8000
Nordic Immunological Labs. (USA)
(714) 661-1188
Olympus Corp.-Clinical Instrs. Div.
(516) 488-3323
Organon Teknika-Cappel (215) 251-2000,
(800) 323-7620; in PA (800) 663-2440
Pantax (213) 828-7423
Polysciences Inc. (215) 343-6484
Promega Corp (608) 274-4330
Res. Plus, Inc (201) 823-3592
Res. Prods. Intl Corp (312) 836-7330
Rockland, Inc (215) 369-1008
Scantibodies Lab (619) 258-93
Serotec Ltd 08675 79941
Syva Co (415) 493-2200
Tago Inc
V M R D Inc. (509) 334-5815
Vector Labs., Inc (415) 697-3600
Ventrex Labs (207) 773-7231
Walgene R & D Labs., Inc (818) 445-3093
York Biologicals Intl (516) 751-6553
Zymed Labs Inc (415) 871-4494

antibodies to infectious agents

Accurate Chem & Sci Corp (516) 433-4900
Atlantic Antibodies, An Inostar Co.
(207) 883-4154
Beckman Instrs., Inc. (714) 871-4848
BIODESIGN Inc (207) 967-4173
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Biotech Res Labs Inc (301) 251-0808
Cambridge Medical Technols. Corp.
(617) 935-4050
Cedarlane Labs. Ltd (416) 878-8891
Chemicon Intl Inc. (213) 322-2481,
(800) 437-7500
Cytotech, Inc. (619) 452-1556
DAKO Corp. (805) 963-9881
Deco Labs. (313) 961-0800
E-Y Labs Inc (415) 342-3298
East-Acres Biologicals (617) 765-9580
Electro Nucleonics Inc. (301) 622-4218
Genetic Sys Corp (206) 728-4900
Grenbio, Inc. (714) 676-0049
ICN Chem. & Radiosotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Immuno-Mycologics, Inc (405) 288-2468
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9847
Inter Medico (416) 491-8926
Kalleslad Diags (512) 329-5555
Kirkegaard & Perry Labs., Inc (301) 948-7755
Manuel Sci Co Ltd (519) 856-9466
Scantibodies Lab (619) 258-93
Serotec Ltd 08675 79941
Syva Co (415) 493-2200
V M R D Inc (509) 334-5815
Ventrex Labs (207) 773-7231
York Biologicals Intl (516) 751-6553

antibodies to intermediate filaments

Accurate Chem & Sci Corp (516) 433-4900
Amersham Corp (312) 593-6300,
(800) 323-9750
BIODESIGN Inc (207) 967-4173
BioGenex Labs (415) 831-9191
Biomed Technis Inc (617) 344-0942
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Chemicon Intl Inc. (213) 322-2481,
(800) 437-7500
DAKO Corp. (805) 963-9881
East-Acres Biologicals (617) 765-9580
Electro Nucleonics Inc. (301) 622-4218
Genetic Sys Corp (206) 728-4900
Grenbio, Inc. (714) 676-0049
ICN Chem. & Radiosotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Immuno-Mycologics, Inc (405) 288-2468
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9847
Inter Medico (416) 491-8926
Kalleslad Diags (512) 329-5555
Kirkegaard & Perry Labs., Inc (301) 948-7755
Manuel Sci Co Ltd (519) 856-9466
Scantibodies Lab (619) 258-93
Serotec Ltd 08675 79941
Syva Co (415) 493-2200
V M R D Inc (509) 334-5815
Ventrex Labs (207) 773-7231
York Biologicals Intl (516) 751-6553

antibodies to intermediate filaments

Accurate Chem & Sci Corp (516) 433-4900
Amersham Corp (312) 593-6300,
(800) 323-9750
BIODESIGN Inc (207) 967-4173
BioGenex Labs (415) 831-9191
Biomed Technis Inc (617) 344-0942
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Biotest Diags Corp (201) 575-4500
Cambridge Medical Technols. Corp.
(617) 935-4050
Cedarlane Labs Ltd (416) 878-8891
Chemicon Intl Inc. (213) 322-2481,
(800) 437-7500
Collaborative Res. Inc (617) 276-0004
DAKO Corp. (805) 963-9881
East Acres Biologicals (617) 765-9580
Enzo Biochem Inc (212) 741-3838
ICN Chem. & Radiosotopes
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9847
Oncor Inc. (301) 963-3500
Res. Plus, Inc (201) 823-3592
Scantibodies Lab (619) 258-93
Serotec Ltd. 08675 79941
Un. States Biochem Corp (216) 765-5000
York Biologicals Intl (516) 751-6553

antibodies to peptides

Accurate Chem & Sci Corp. (516) 433-4900
Amer. Diagnostica Inc
Amersham Corp (312) 593-6300,
(800) 323-9750
BIODESIGN Inc (207) 967-4173
Biomed Technis Inc (617) 344-0942
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Bulecx Lab., Inc. (713) 482-2672
BIOTOPE (206) 281-8600
Cambridge Medical Technols. Corp.
(617) 935-4050
Cambridge Res. Biochems., Inc.
(516) 825-1322
Cedarlane Labs. Ltd (416) 878-8891
Chemicon Intl Inc. (213) 322-2481,
(800) 437-7500
DAKO Corp. (805) 963-9881
East-Acres Biologicals (617) 765-9580
Endocrine Sciences Prods. (818) 345-8603
Fairing Labs., Inc (914) 369-2244
Genetic Diags. Corp. (516) 487-4711
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Inter Medico (416) 491-8926
Inter Sci Diags (213) 877-3322
Nichols Institute Diags. (714) 661-8000
Novabiochem AG (062) 89 19 22
Novo BioLabs (203) 790-2770
Pacific Biotech Inc. (619) 695-2668
Panmouia Labs., Inc (415) 592-5392
Res. Plus, Inc. (201) 823-3592
Scantibodies Lab. (619) 258-93
Serotec Ltd 08675 79941
Ventrex Labs. (207) 773-7231
York Biologicals Intl. (516) 751-6553

Labsystems Inc. (312) 967-6220,
(800) 572-6270
Serotec Ltd 08675 79941
York Biologicals Intl (516) 751-6553
Zymed Labs Inc (415) 871-4494

antibodies to lectins

Accurate Chem & Sci Corp (516) 433-4900
BIODESIGN Inc (207) 967-4173
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
DAKO Corp. (805) 963-9881
E-Y Labs. Inc (415) 342-3298
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Polysciences Inc. (215) 343-6484
Scantibodies Lab (619) 258-93
Serotec Ltd 08675 79941
Un States Biochem Corp (216) 765-5000
Vector Labs., Inc (415) 697-3600
York Biologicals Intl (516) 751-6553

antibodies to lymphokines and monokines

Accurate Chem & Sci Corp (516) 433-4900
BIODESIGN Inc (207) 967-4173
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Biotest Diags Corp (201) 575-4500
Genzyme Corp (617) 491-1923
Inotech Biosystems Intl., Inc. (603) 532-4236
Inter-Medico (416) 491-8926
Interferon Sciences Inc (201) 249-3260,
(800) 255-1500
Janssen Life Sciences Prods.
Olympus Corp.-Clinical Instrs. Div.
(516) 488-3323
York Biologicals Intl (516) 751-6553

antibodies to major histocompatibility complex antigens

Accurate Chem & Sci Corp (516) 433-4900
BIODESIGN Inc (207) 967-4173
BioGenex Labs (415) 831-9191
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Biotest Diags Corp (201) 575-4500
Cambridge Medical Technols. Corp.
(617) 935-4050
Cedarlane Labs Ltd (416) 878-8891
DAKO Corp. (805) 963-9881
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Nordic Immunological Labs. (USA)
(714) 661-1188
Olympus Corp.-Clinical Instrs. Div.
(516) 488-3323
Ore Lambda, Inc (213) 478-1001
Scantibodies Lab. (619) 258-93
Serotec Ltd 08675 79941
V M R D Inc (509) 334-5815
York Biologicals Intl. (516) 751-6553

antibodies to muscle proteins

Accurate Chem & Sci Corp (516) 433-4900
Amersham Corp. (312) 593-6300,
(800) 323-9750
Beckman Instrs., Inc. (714) 871-4848
BIODESIGN Inc (207) 967-4173
BioGenex Labs (415) 831-9191
Biomed Technis Inc (617) 344-0942
Bioproducts for Science Inc (317) 894-7536
Chemicon Intl Inc. (213) 322-2481,
(800) 437-7500
Collaborative Res. Inc (617) 276-0004
DAKO Corp. (805) 963-9881
East Acres Biologicals (617) 765-9580
Enzo Biochem Inc (212) 741-3838
ICN Chem. & Radiosotopes
Ingram and Bell Sci (416) 443-9847
Oncor Inc. (301) 963-3500
Res. Plus, Inc (201) 823-3592
Scantibodies Lab (619) 258-93
Serotec Ltd. 08675 79941
Un States Biochem Corp (216) 765-5000
Ventrex Labs (207) 773-7231
Wien Labs Inc (201) 584-7019
York Biologicals Intl (516) 751-6553

antibodies to tumor antigens

Accurate Chem & Sci Corp. (516) 433-4900
Amer. Diagnostica Inc
BIODESIGN Inc (207) 967-4173
BioGenex Labs (415) 831-9191
Biomed Technis Inc (617) 344-0942
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Bulecx Lab., Inc (713) 482-2672
Biotest Diags Corp (201) 575-4500
Cambridge Medical Technols. Corp.
(617) 935-4050
Cedarlane Labs. Ltd (416) 878-8891
Chemicon Intl Inc (213) 322-2481,
(800) 437-7500
Coulter Elec., Inc (305) 885-0131
Coulter Immunology (305) 883-8880
DAKO Corp. (805) 963-9881
Dianon Sys., Inc (203) 381-4000
Enzo Biochem Inc (212) 741-3838
Ingram and Bell Sci (416) 443-9847
Inter-Medico (416) 491-8926
Kalleslad Diags (512) 329-5555
Res. Plus, Inc (201) 823-3592
Rockland, Inc (215) 369-1008
Scantibodies Lab (619) 258-93
Scripps Labs (619) 566-3505
Serotec Ltd 08675 79941
Summa Medical Corp. (505) 346-8881
Ventrex Labs (207) 773-7231
York Biologicals Intl (516) 751-6553
Zymed Labs, Inc. (415) 871-4494

antibodies to retroviruses

Accurate Chem & Sci Corp (516) 433-4900
BIODESIGN Inc (207) 967-4173
Cellular Prods Inc (718) 842-6270
Chemicon Intl Inc. (213) 322-2481,
(800) 437-7500
Cytotech, Inc (619) 452-1556
Electro Nucleonics, Inc (301) 622-4218
Epitope Inc (503) 641-4115
Ingram and Bell Sci (416) 443-9847
V M R D Inc (509) 334-5815

antibodies to serum proteins

Accurate Chem. & Sci Corp (516) 433-4900
Atlantic Antibodies, An Inostar Co.
(207) 883-4154
Beckman Instrs., Inc. (714) 871-4848
Bethyl Labs Inc (409) 597-6111
BIODESIGN Inc (207) 967-4173
BioGenex Labs (415) 831-9191
Biomed Technis Inc (617) 344-0942
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
CALTAG Labs (415) 873-8106
Cambridge Medical Technols. Corp.
(617) 935-4050
Chemicon Intl Inc. (213) 322-2481,
(800) 437-7500
Cytotech, Inc (619) 452-1556
DAKO Corp. (805) 963-9881
Dianon Sys., Inc. (203) 381-4000
E-Y Labs Inc (415) 342-3298
East-Acres Biologicals (617) 765-9580
ICN Chem. & Radiosotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9847
Interferon Sciences Inc. (201) 249-3260,
(800) 255-1500
Jackson ImmunoRes. Labs., Inc.
(215) 869-4024, (800) 367-5298
Janssen Life Sciences Prods.
Kalleslad Diags (512) 329-5555
Kent Labs. Inc. (206) 868-6200
George King Bio-Medical, Inc. (913) 469-5494
Kirkegaard & Perry Labs., Inc. (301) 948-7755
Organon Teknika-Cappel (215) 251-2000,
(800) 323-7620; in PA (800) 663-2440
Res. Plus, Inc. (201) 823-3592
Rockland, Inc. (215) 369-1008
Scantibodies Lab. (619) 258-93
Serotec Ltd. 08675 79941
Syva Co. (415) 493-2200
Tago Inc
Un. States Biochem. Corp. (216) 765-5000
V M R D Inc. (509) 334-5815
Ventrex Labs. (207) 773-7231
Walgene R & D Labs., Inc. (818) 445-3093
York Biologicals Intl (516) 751-6553
Zymed Labs. Inc (415) 871-4494

antibodies to steroids

Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
Biomed Technis Inc (617) 344-0942
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Bulecx Lab. Inc (713) 482-2672
Cambridge Medical Technols. Corp.
(617) 935-4050
Cedarlane Labs. Ltd (416) 878-8891
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2481,
(800) 437-7500
DAKO Corp. (805) 963-9881
Endocrine Sciences Prods. (818) 345-8603
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9847
Inter Medico (416) 491-8926
Inter Sci. Diags (213) 877-3322
Kalleslad Diags. (512) 329-5555
Nichols Institute Diags. (714) 661-8000
Pantax (213) 828-7423
Res. Plus, Inc (201) 823-3592
Scantibodies Lab. (619) 258-93
Serotec Ltd. 08675 79941
Un. States Biochem. Corp. (216) 765-5000
Ventrex Labs. (207) 773-7231
Wien Labs Inc. (201) 584-7019
York Biologicals Intl. (516) 751-6553

antibodies to tumor antigens

Accurate Chem & Sci Corp. (516) 433-4900
Amer. Diagnostica Inc
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
BioGenex Labs (415) 831-9191
Biomed Technis. Inc. (617) 344-0942
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Bulecx Lab., Inc. (713) 482-2672
Biotest Diags. Corp. (201) 575-4500
Cambridge Medical Technols. Corp.
(617) 935-4050
Cedarlane Labs. Ltd (416) 878-8891
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2481,
(800) 437-7500
Coulter Elec., Inc. (305) 885-0131
Coulter Immunology (305) 883-8880
DAKO Corp. (805) 963-9881
Dianon Sys., Inc. (203) 381-4000
Enzo Biochem Inc. (212) 741-3838
Ingram and Bell Sci (416) 443-9847
Inter-Medico (416) 491-8926
Kalleslad Diags. (512) 329-5555
Res. Plus, Inc. (201) 823-3592
Rockland, Inc. (215) 369-1008
Scantibodies Lab. (619) 258-93
Scripps Labs. (619) 566-3505
Serotec Ltd. 08675 79941
Summa Medical Corp. (505) 346-8881
Ventrex Labs. (207) 773-7231
York Biologicals Intl. (516) 751-6553
Zymed Labs. Inc. (415) 871-4494

complement fixation test reagents

antibodies, immobilized

Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Adv. Magnetics, Inc. (617) 497-2070
Americal Corp. (201) 852-1122
Amer. Diagnostica Inc
Bio-Rad Labs.-Chem. Div. (415) 233-7000
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
CALTAG Labs. (415) 873-8106
Cambridge Medical Technols. Corp.
(617) 935-4050
Cedarlane Labs. Ltd (416) 878-8891
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2481,
(800) 437-7500
DYNAL, Inc. (516) 829-0039
E-Y Labs. Inc. (415) 342-3298
Flow Cytometry Standards Corp.
(919) 967-9345
ICN Chem. & Radiosotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Kent Labs. Inc. (206) 868-6200
Kirkegaard & Perry Labs., Inc. (301) 948-7755
Nordic Immunological Labs. (USA)
(714) 661-1188
Organon Teknika-Cappel (215) 251-2000,
(800) 323-7620; in PA (800) 663-2440
Pantax (213) 828-7423
Polymer Labs. Inc (413) 253-9584
Promega Corp. (608) 274-4330
Richard Sci., Inc. (415) 583-2688
Rockland, Inc. (215) 369-1008
Scantibodies Lab. (619) 258-93
Zymed Labs. Inc (415) 871-4494

antibody-enhancement media

Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Chemicon Intl Inc. (213) 322-2481,
(800) 437-7500
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Peninsula Labs., Inc (415) 592-5392

antibody-enzyme conjugates

Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Adv. Magnetics, Inc. (617) 497-2070
Amersham Corp. (312) 593-6300,
(800) 323-9750
Bethyl Labs Inc. (409) 597-6111
Bio-Rad Labs.-Chem. Div. (415) 233-7000
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
BioGenex Labs. (415) 831-9191
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Cambridge Medical Technols. Corp.
(617) 935-4050
Cambridge Res. Biochems., Inc.
(516) 825-1322
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2481,
(800) 437-7500
DAKO Corp. (805) 963-9881
E-Y Labs. Inc. (415) 342-3298
ICN Chem. & Radiosotopes
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9847
Jackson ImmunoRes. Labs., Inc.
(215) 869-4024, (800) 367-5298
Janssen Life Sciences Prods.
Kalleslad Diags. (512) 329-5555
Kent Labs. Inc. (206) 868-6200
Kirkegaard & Perry Labs., Inc. (301) 948-7755
Labsystems Inc. (312) 967-6220,
(800) 572-6270
Olympus Corp.-Clinical Instrs. Div.
(516) 488-3323
Organon Teknika-Cappel (215) 251-2000,
(800) 323-7620; in PA (800) 663-2440
Promega Corp. (608) 274-4330
Rockland, Inc. (215) 369-1008
Serotec Ltd. 08675 79941
T Cell Sciences, Inc. (617) 864-2160
Tago Inc.
Vector Labs., Inc. (415) 697-3600
Zymed Labs. Inc. (415) 871-4494

carcinoembryonic antigen (CEA)

Baxter Healthcare Corp.-Dade Div.
(305) 592-2311
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
Cambridge Medical Technols. Corp.
(617) 935-4050
Cedarlane Labs. Ltd (416) 878-8891
Dianon Sys., Inc. (203) 381-4000
Helix Biotech Ltd. (604) 270-7468
Pacific Biotech Inc. (619) 695-2668
Scantibodies Lab. (619) 258-93
Scripps Labs. (619) 566-3505
Summa Medical Corp. (505) 346-8881
Ventrex Labs. (207) 773-7231
York Biologicals Intl. (516) 751-6553

complement components

Amersham Corp. (312) 593-6300,
(800) 323-9750
Cytotech, Inc. (619) 452-1556
Diamedix Corp. (305) 324-2300
Grenbio, Inc. (714) 676-0049

complement-deficient serum

Cytotech, Inc. (619) 452-1556
Diamedix Corp. (305) 324-2300
Organon Teknika-Cappel (215) 251-2000,
(800) 323-7620; in PA (800) 663-2440

complement fixation test reagents

Baxter Healthcare Corp.-Dade Div.
(305) 592-2311
Diamedix Corp. (305) 324-2300
GIBCO Labs. (716) 773-0700
Grenbio, Inc. (714) 676-0049
Immuno-Mycologics, Inc. (405) 288-2468
Rockland, Inc. (215) 369-1008

alkaline phosphatase antibody conjugates
Amersham Corp. (312) 593-6300, (800) 323-9750
Atlantic Antibodies, An Incstar Co. (207) 883-4154
Bethesda Res. Labs. (301) 840-8000
Bio-Rad Labs.-Chem. Div. (415) 233-7000
BioGenex Labs (415) 831-9191
CALTAG Labs (415) 873-6106
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4050
DAKO Corp. (805) 963-9681
Damedix Corp. (305) 324-2300
E-Y Labs. Inc. (415) 342-3296
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9647
Integrated Separation Sys. (617) 965-2901
Jackson ImmunoRes. Labs., Inc. (215) 869-4024, (800) 367-5298
Kirkegaard & Perry Labs., Inc. (301) 948-7755
Labsystems Inc. (312) 967-6220, (800) 572-8270
Molecular Biology Resources, Inc. (414) 671-7199
Organon Teknika-Cappel (215) 251-2000, (800) 523-7620; In PA (800) 662-2440
Pharmacia LKB Biotechnology AB 011 46 18 18 3000
Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (201) 457-8000, (800) 526-3818
Polysciences Inc. (215) 343-6484
Promega Corp. (608) 274-4330
Serotec Ltd. 08675 79941
Stratagene Inc. (619) 535-5400
Tago Inc.
Vector Labs. Inc. (415) 697-3600
Zymed Labs Inc (415) 871-4484

antibodies, affinity-purified
Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Amersham Corp. (312) 593-6300, (800) 323-9750
Behring Labs. Inc. (409) 597-6111
Bio-Rad Labs.-Chem. Div. (415) 233-7000
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
BioGenex Labs (415) 831-9191
Biomed. Technols. Inc. (617) 344-9942
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Biotech Res. Labs. Inc. (301) 251-0800
CALTAG Labs. (415) 873-6106
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4050
Cambridge Res. Biochems., Inc. (516) 825-1322
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2451, (800) 437-7500
Collaborative Res., Inc. (617) 275-0004
DAKO Corp. (805) 963-9681
E-Y Labs. Inc. (415) 342-3296
East-Acres Biologicals (617) 765-9580
ICN Chem. & Radioisotopes
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9647
Jackson ImmunoRes. Labs., Inc. (215) 869-4024, (800) 367-5298
Janssen Life Sciences Prods.
JR Sci. (916) 666-9835
Kallestad Diags. (512) 329-5555
Kent Labs. Inc. (206) 868-6200
Kirkegaard & Perry Labs., Inc. (301) 948-7755
Labsystems Inc. (312) 967-6220, (800) 572-8270
Meridel Sci. Co. Ltd. (519) 666-9568
Oncor Inc. (301) 963-3500
Organon Teknika-Cappel (215) 251-2000, (800) 523-7620; In PA (800) 662-2440
Pacific Biotech Inc. (619) 695-2658
S Prime 3 Prime, Inc. (215) 644-4710
Promega Corp. (608) 274-4330
R&D Sys., Inc. (612) 379-2956
Rockland, Inc. (215) 369-1008
Serotec Ltd. 08675 79941
Sumra Medical Corp. (505) 345-8891
T Cell Sciences, Inc. (617) 864-2160
Tago Inc.
V M R D Inc (509) 334-5815
Vector Labs., Inc (415) 697-3600
Wakefield R & D Labs., Inc (818) 445-3093
York Biologicals Intl (516) 751-6553
Zymed Labs Inc (415) 871-4484

antibodies to cell surface markers
Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
BioGenex Labs. (415) 831-9191
Biomed. Technols. Inc. (617) 344-9942
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Biotech Res. Labs. Inc. (301) 251-0800
Biotest Diags. Corp. (201) 575-4500
CALTAG Labs. (415) 873-6106
Cedarlane Labs. Ltd. (416) 878-8891
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2451, (800) 437-7500
Coulter Elec., Inc. (305) 885-0131
Coulter Immunology (305) 883-8880
DAKO Corp. (805) 963-9681
DYNAL, Inc. (516) 629-0039
East-Acres Biologicals (617) 765-9580
Genetic Sys. Corp. (206) 720-4000
ICN Chem. & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9647
Interferon Sciences Inc. (201) 249-3250, (800) 255-1500
Jackson ImmunoRes. Labs., Inc. (215) 869-4024, (800) 367-5298
JR Sci. (916) 666-9835
List Biol. Labs. Inc. (408) 866-6363
Molecular Probes Inc. (503) 344-3007
Olympus Corp.-Clinical Instrs. Div. (516) 488-3323
Organon Teknika-Cappel (215) 251-2000, (800) 523-7620; In PA (800) 662-2440
Serotec Ltd. 08675 79941
T Cell Sciences, Inc. (617) 864-2160
York Biologicals Intl (516) 751-6553

antibodies to cell surface receptors
Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Amersham Corp. (312) 593-6300, (800) 323-9750
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
BioGenex Labs. (415) 831-9191
Biomed. Technols. Inc. (617) 344-9942
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Biotech Res. Labs. Inc. (301) 251-0800
Biotest Diags. Corp. (201) 575-4500
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2451, (800) 437-7500
Coulter Elec., Inc. (305) 885-0131
Coulter Immunology (305) 883-8880
DAKO Corp. (805) 963-9681
DYNAL, Inc. (516) 629-0039
ICN Chem. & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9647
Interferon Sciences Inc. (201) 249-3250, (800) 255-1500
Janssen Life Sciences Prods.
JR Sci. (916) 666-9835
Molecular Probes, Inc. (503) 344-3007
Serotec Ltd. 08675 79941
York Biologicals Intl (516) 751-6553

antibodies to chemicals
Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
Biomed. Technols. Inc. (617) 344-9942
BIOMOL Res. Labs., Inc. (215) 941-0430
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4050
East-Acres Biologicals (617) 765-9580
ICN Chem. & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Janssen Life Sciences Prods.
JR Sci. (916) 666-9835
Res. Plus, Inc. (201) 823-3592
Serotec Ltd. 08675 79941
Un. States Biochem Corp. (216) 765-5000
York Biologicals Intl (516) 751-6553

antibodies to complement components
Accurate Chem & Sci. Corp. (516) 433-4900
Amer. Diagnostica Inc.
Amersham Corp. (312) 593-6300, (800) 323-9750
Atlantic Antibodies, An Incstar Co.
Behring Labs. Inc. (409) 597-6111
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
BioGenex Labs. (415) 831-9191
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Biotech Res. Labs. Inc. (301) 251-0800
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4050
Cedarlane Labs. Ltd. (416) 878-8891
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2451, (800) 437-7500
Cytotech, Inc. (619) 452-1558
DAKO Corp. (805) 963-9681
Diamedix Corp. (305) 324-2300
Genzyme Corp. (617) 451-1022
Gradipo, Inc. (714) 878-0049
ICN Chem. & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Inter-Medico (416) 491-8928
Jackson ImmunoRes. Labs., Inc. (215) 869-4024, (800) 367-5298
Janssen Life Sciences Prods.
JR Sci. (916) 666-9835
Kallestad Diags. (512) 329-5555
Kent Labs. Inc. (206) 868-6200
Novo BioLabs (203) 790-2770
Organon Teknika-Cappel (215) 251-2000, (800) 523-7620; In PA (800) 662-2440
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4050
Cedarlane Labs. Ltd. (416) 878-8891
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2451, (800) 437-7500
DAKO Corp. (805) 963-9681
Diamedix Corp. (305) 324-2300
Genzyme Corp. (617) 451-1022
Gradipo, Inc. (714) 878-0049
ICN Chem. & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Inter-Medico (416) 491-8928
Jackson ImmunoRes. Labs., Inc. (215) 869-4024, (800) 367-5298
Janssen Life Sciences Prods.
JR Sci. (916) 666-9835
Kallestad Diags. (512) 329-5555
Kent Labs. Inc. (206) 868-6200
Molecular Biology Resources, Inc. (414) 671-7199
Organon Teknika-Cappel (215) 251-2000, (800) 523-7620; In PA (800) 662-2440
Pharmacia LKB Biotechnology AB 011 46 18 18 3000
Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (201) 457-8000, (800) 526-3818
S Prime 3 Prime, Inc. (215) 644-4710
Res. Plus, Inc. (201) 823-3592
Rockland, Inc. (215) 369-1008
Scantibodies Lab. (619) 258-93
Serotec Ltd. 08675 79941
Ventrex Labs. (207) 773-7231
York Biologicals Intl (516) 751-6553
Zymed Labs Inc (415) 871-4484

antibodies to growth factors
Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Amersham Corp. (312) 593-6300, (800) 323-9750
Bachman Instrs., Inc. (714) 671-4848
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
BioGenex Labs. (415) 831-9191
Biomed. Technols. Inc. (617) 344-9942
Biotest Diags. Corp. (201) 575-4500
BIOTOPE (206) 251-9600
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4050
Cedarlane Labs. Ltd. (416) 878-8891
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2451, (800) 437-7500
Collaborative Res., Inc. (617) 275-0004
Genzyme Corp. (617) 451-1022
BioGenex Labs. (415) 831-9191
Biomed. Technols. Inc. (617) 344-9942
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Cedarlane Labs. Ltd. (416) 878-8891
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2451, (800) 437-7500
DAKO Corp. (805) 963-9681
East-Acres Biologicals (617) 765-9580
Enzo Biochem Inc. (212) 741-3636
ICN Chem. & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9647
Inter Sci. Diags. (213) 677-3322
Labsystems Inc. (312) 967-6220, (800) 572-8270
Oncor Inc. (301) 963-3500
Res. Plus, Inc. (201) 823-3592
Serotec Ltd. 08675 79941
York Biologicals Intl. (516) 751-6553

antibodies to drugs
Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Beckman Instrs., Inc. (714) 871-4848
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
Biotech Lab., Inc. (713) 482-2872
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4050
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2451, (800) 437-7500
East-Acres Biologicals (617) 765-9580
Genetic Diags. Corp. (516) 487-4711
ICN Chem. & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9647
Inter Sci. Diags. (213) 677-3322
Janssen Life Sciences Prods.
Kallestad Diags. (512) 329-5555
Kent Labs. Inc. (206) 868-6200
Paninx (213) 828-7423
Res. Plus, Inc. (201) 823-3592
Res. Prods. Intl. Corp. (312) 635-7330
Rockland, Inc. (215) 369-1008
Scantibodies Lab. (619) 258-93
Serotec Ltd. 08675 79941
Syva Co. (415) 493-2200
Technicolne Intl. (714) 557-5913
Ventrex Labs. (207) 773-7231
Wien Labs. Inc. (201) 564-7019
York Biologicals Intl. (516) 751-6553
Zymed Labs Inc. (415) 871-4484

antibodies to enzymes
Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Amer. Diagnostica Inc.
Atlantic Antibodies, An Incstar Co. (207) 883-4154
Beckman Instrs., Inc. (714) 871-4848
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
Biomed. Technols. Inc. (617) 344-9942
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4050
Cedarlane Labs. Ltd. (416) 878-8891
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2451, (800) 437-7500
DAKO Corp. (805) 963-9681
Diamon Sys., Inc. (203) 381-4000
ICN Chem. & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9647
Jackson ImmunoRes. Labs., Inc. (215) 869-4024, (800) 367-5298
Kallestad Diags. (512) 329-5555
Kent Labs. Inc. (206) 868-6200
Molecular Biology Resources, Inc. (414) 671-7199
Organon Teknika-Cappel (215) 251-2000, (800) 523-7620; In PA (800) 662-2440
Pharmacia LKB Biotechnology AB 011 46 18 18 3000
Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (201) 457-8000, (800) 526-3818
S Prime 3 Prime, Inc. (215) 644-4710
Res. Plus, Inc. (201) 823-3592
Rockland, Inc. (215) 369-1008
Scantibodies Lab. (619) 258-93
Serotec Ltd. 08675 79941
Ventrex Labs. (207) 773-7231
York Biologicals Intl (516) 751-6553
Zymed Labs Inc. (415) 871-4484

antibodies to human blood-group antigens
Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Amer. Diagnostica Inc.
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
BioGenex Labs. (415) 831-9191
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Biotech Res. Labs. Inc. (301) 251-0800
Biotest Diags. Corp. (201) 575-4500
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4050
DAKO Corp. (805) 963-9681
ICN Chem. & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9647
Janssen Life Sciences Prods.
JR Sci. (916) 666-9835
Nordic Immunological Labs. (USA) (714) 661-1186
One Lambda, Inc. (213) 478-1001
Organon Teknika-Cappel (215) 251-2000, (800) 523-7620; In PA (800) 662-2440
Res. Plus, Inc. (201) 823-3592
Rockland, Inc. (215) 369-1008
Scantibodies Lab. (619) 258-93
Serotec Ltd. 08675 79941
Un. States Biochem Corp. (216) 765-5000
York Biologicals Intl (516) 751-6553

antibodies to immunoglobulins
Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Adv. Magnetics, Inc. (617) 497-2070
Alleles Inc. (416) 677-0831
Amer. Diagnostica Inc.
Amersham Corp. (312) 593-6300, (800) 323-9750

monoclonal antibodies to lymphokines and monokines

Technicione Intl. (714) 557-5913
Ventrex Labs. (207) 773-7231
York Biologicals Intl. (516) 751-6553

monoclonal antibodies to lymphokines and monokines

Accurate Chem. & Sci Corp. (516) 433-4900
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Biotest Diags Corp. (201) 575-4500
Boehringer Mannheim Corp. (317) 849-9350, (800) 428-5433
Genzyme Corp (617) 451-1923
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Inter Sci. Diags. (213) 677-3322
Interferon Sciences Inc. (201) 249-3250, (800) 255-1500
Janssen Life Sciences Prods.
Olympus Corp.–Clinical Instrs. Div. (516) 488-3323
T Cell Sciences, Inc. (617) 864-2160

monoclonal antibodies to miscellaneous blood proteins

Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Amer. Diagnostica Inc.
Baxter Healthcare Corp.–Dade Div. (305) 592-2311
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
BioGenex Labs (415) 831-9191
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Boehringer Mannheim Corp. (317) 849-9350, (800) 428-5433
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4050
Cedarlane Labs. Ltd. (416) 876-8891
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2451, (800) 437-7500
DAKO Corp (805) 963-9881
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci (416) 443-9647
Inter Sci Diags. (213) 677-3322
Kallestad Diags. (512) 329-5555
Scantibodies Lab. (619) 258-93
Serotec Ltd 08675 79941
Ventrex Labs. (207) 773-7231
York Biologicals Intl (516) 751-6553
Zymed Labs. Inc. (415) 871-4494

monoclonal antibodies to normal cell markers, human

Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Baxter Healthcare Corp.–Dade Div. (305) 592-2311
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
BioGenex Labs. (415) 831-9191
Biomed. Technols. Inc. (617) 344-9942
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Biotest Diags Corp. (201) 575-4500
Boehringer Mannheim Corp. (317) 849-9350, (800) 428-5433
Cedarlane Labs. Ltd. (416) 876-8891
Coulter Elec., Inc. (305) 885-0131
Coulter Immunology (305) 883-6880
DAKO Corp. (805) 963-9881
Enzo Biochem Inc. (212) 741-3838
ICN Chem. & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci (416) 443-9647
Inter Sci. Diags (213) 677-3322
Interferon Sciences Inc. (201) 249-3250, (800) 255-1500
Janssen Life Sciences Prods.
Nordic Immunological Labs. (USA) (714) 661-1188
Olympus Corp.–Clinical Instrs. Div. (516) 488-3323
Serotec Ltd. 08675 79941
T Cell Sciences, Inc. (617) 864-2160
York Biologicals Intl. (516) 751-6553

monoclonal antibodies to normal cell markers, mouse

Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Baxter Healthcare Corp.–Dade Div. (305) 592-2311
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Boehringer Mannheim Corp. (317) 849-9350, (800) 428-5433
CALTAG Labs (415) 873-6106
Cedarlane Labs. Ltd. (416) 876-8891
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2451, (800) 437-7500
Enzo Biochem Inc. (212) 741-3838
ICN Chem & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Inter Sci Diags (213) 677-3322
Janssen Life Sciences Prods.
Nordic Immunological Labs. (USA) (714) 661-1188
Serotec Ltd. 08675 79941.

monoclonal antibodies to normal cell markers, rabbit

Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Baxter Healthcare Corp.–Dade Div. (305) 592-2311
Biomed. Technols. Inc. (617) 344-9942
Cedarlane Labs. Ltd. (416) 876-8891
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Inter Sci. Diags. (213) 677-3322

monoclonal antibodies to oncogene-encoded proteins

Cambridge Res Biochems., Inc. (516) 825-1322
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9647
Oncogene Science, Inc. (516) 365-9300, (800) ONC-2616

monoclonal antibodies to retroviruses

Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
Biotech Res Labs. Inc (301) 251-0800
Cellular Prods. Inc. (716) 842-6270
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2451, (800) 437-7500
Epitope Inc. (503) 641-6116
Olympus Corp.–Clinical Instrs. Div. (516) 488-3323

monoclonal antibodies to tumor-associated antigens

Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
BioGenex Labs. (415) 831-9191
Biomed. Technols. Inc. (617) 344-9942
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Boehringer Mannheim Corp. (317) 849-9350, (800) 428-5433
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4050
Cedarlane Labs. Ltd. (416) 876-8891
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2451, (800) 437-7500
Earl Clay Labs., Inc. (415) 892-8512
Coulter Elec., Inc. (305) 885-0131
Coulter Immunology (305) 883-6880
DAKO Corp. (805) 963-9881
Dianon Sys., Inc. (203) 381-4000
Enzo Biochem Inc. (212) 741-3838
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Inter Sci. Diags. (213) 677-3322
J C L Clinical Res. (615) 546-0654
Olympus Corp.–Clinical Instrs. Div. (516) 488-3323
Oncogene Science, Inc. (516) 365-9300, (800) ONC-2616
Scantibodies Lab. (619) 258-93
Serotec Ltd 08675 79941
Summa Medical Corp. (505) 345-8891
Ventrex Labs. (207) 773-7231
York Biologicals Intl. (516) 751-6553
Zymed Labs. Inc. (415) 871-4494

monoclonal antibodies, other

Amersham Corp. (312) 593-6300, (800) 323-9750
Biocon, Inc (301) 762-3202
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
Biotest Diags. Corp. (201) 575-4500
CALTAG Labs (415) 873-6106
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4050
Diagnostic Chems. Ltd. (902) 566-1396
E-Y Labs Inc. (415) 342-3296
Genetic Diags. Corp. (516) 487-4711
ICN Chem. & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9647
Integrated Separation Sys (617) 965-2901
Novabiochem AG (062) 69 19 22
Un. States Biochem. Corp (216) 765-5000
York Biologicals Intl. (516) 751-6553

polyclonal antibodies

Adv. Magnetics, Inc. (617) 497-2070
Berkeley Antibody Co. (BAbCo) (415) 222-4940
Bethesda Res Labs (301) 840-8000
Bethyl Labs Inc. (409) 597-6111
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
BIOMOL Res Labs., Inc. (215) 941-0430
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4050
Cambridge Res. Biochems., Inc. (516) 825-1322
Collaborative Res., Inc (617) 275-0004
DYNAL, Inc. (516) 829-0039
East-Acres Biologicals (617) 765-9580
Granbio, Inc. (714) 676-0049
ICN Chem. & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9647
J C L Clinical Res (615) 546-0654
Jackson ImmunoRes Labs., Inc. (215) 889-4024, (800) 367-5296
Novabiochem AG (062) 69 19 22
Novo BioLabs (203) 790-2770
Organon Teknika–Cappel (215) 251-2000, (800) 523-7620; in PA (800) 662-2440
Rockland, Inc. (215) 369-1008

prostate specific antigen

Accurate Chem. & Sci. Corp (516) 433-4900
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2451, (800) 437-7500
Helix Biotech Ltd. (604) 270-7468

viral antigens

BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
Biotech Res. Labs. Inc (301) 251-0800
Cytotech, Inc (619) 452-1556
Diamedix Corp. (305) 324-2300
Electro-Nucleonics, Inc (301) 622-4218
Granbio, Inc. (714) 676-0049
Inter-Medico (416) 491-8926
Olympus Corp.–Clinical Instrs. Div. (516) 488-3323

FONTE: Guide to Biotechnology Products and Instruments, Science 239(II) G29-G33. 1988.

alkaline phosphatase antibody conjugates
Amersham Corp. (312) 593-6300, (800) 323-9750
Atlantic Antibodies, An Inostar Co. (207) 883-4154
Behesda Res. Labs. (301) 840-8000
Bio-Rad Labs.-Chem. Div. (415) 232-7900
BioGenex Labs (415) 831-9191
CALTAG Labs (415) 873-6106
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4050
DAKO Corp. (805) 983-9881
Diamedix Corp. (305) 324-2300
E-Y Labs. Inc. (415) 342-3296
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9647
Integrated Separation Sys. (617) 966-2901
Jackson ImmunoRes. Labs., Inc. (215) 869-4024, (800) 367-5296
Kirkegaard & Perry Labs., Inc. (301) 948-7755
Labsystems Inc. (312) 967-6220, (800) 572-8270
Molecular Biology Resources, Inc. (414) 871-7199
Organon Teknika-Cappel (215) 251-2000, (800) 523-7620; In PA (800) 662-2440
Pharmacia LKB Biotechnology AB 011 46 18 18 3000
Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (201) 467-8000, (800) 526-3818
Polysciences Inc. (215) 343-6484
Promega Corp. (608) 274-4330
Serotec Ltd. 08675 79941
Stratagene Inc. (619) 535-5400
Tago Inc
Vector Labs. Inc. (415) 697-3600
Zymed Labs Inc (415) 871-4494

antibodies, affinity-purified
Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Amersham Corp. (312) 593-6300, (800) 323-9750
Bethyl Labs. Inc. (409) 597-6111
Bio-Rad Labs.-Chem. Div. (415) 232-7900
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
BioGenex Labs (415) 831-9191
Biomed. Technols. Inc. (617) 344-9942
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Biotech Res. Labs. Inc. (301) 251-0800
CALTAG Labs. (415) 873-6106
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4050
Cambridge Res. Biochems., Inc. (516) 625-1322
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2461, (800) 437-7500
Collaborative Res., Inc. (617) 275-0004
DAKO Corp. (805) 983-9881
E-Y Labs. Inc. (415) 342-3296
East-Acres Biologicals (617) 765-9580
ICN Chem. & Radioisotopes
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9647
Jackson ImmunoRes. Labs., Inc. (215) 869-4024, (800) 367-5296
Janssen Life Sciences Prods.
JR Sci. (916) 666-9835
Kallestad Diags. (512) 329-5555
Kent Labs. Inc. (206) 868-6200
Kirkegaard & Perry Labs., Inc. (301) 948-7755
Labsystems Inc. (312) 967-6220, (800) 572-8270
Marshall Sci. Co. Ltd. (519) 856-9568
Oncor Inc. (301) 963-3500
Organon Teknika-Cappel (215) 251-2000, (800) 523-7620; In PA (800) 662-2440
Pacific Biotech Inc. (619) 695-2888
S Prime 3 Prime, Inc. (215) 644-4710
Promega Corp. (608) 274-4330
R&D Sys. Inc. (612) 379-2956
Rockland Inc. (215) 369-1008
Serotec Ltd. 08675 79941
Summa Medical Corp. (505) 345-8891
T Cell Sciences, Inc. (617) 864-2180
Tago Inc
V M R D Inc (509) 334-5816
Vector Labs. Inc. (415) 697-3600
Walgene R & D Labs., Inc. (818) 445-3083
York Biologicals Intl. (516) 751-6553
Zymed Labs Inc (415) 871-4494

antibodies to cell surface markers
Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
BioGenex Labs (415) 831-9191
Biomed. Technols. Inc. (617) 344-9942
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Biotech Res. Labs. Inc. (301) 251-0800
Biotest Diags. Corp. (201) 575-4500
Cedarlane Labs. Ltd. (416) 878-8881
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2461, (800) 437-7500
Coulter Elec., Inc. (305) 885-0131
Coulter Immunology (305) 883-8880
DAKO Corp. (805) 983-9881
DYNAL, Inc. (516) 629-0039
East-Acres Biologicals (617) 765-9580
Genetic Sys. Corp. (206) 720-4000
ICN Chem. & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9647
Interferon Sciences Inc. (201) 249-3250, (800) 255-1500
JR Sci. (916) 666-9835
Lisi Biol. Labs. Inc. (408) 866-6363
Molecular Probes Inc. (503) 344-3007
Olympus Corp.-Clinical Instrs. Div. (516) 488-3323
Organon Teknika-Cappel (215) 251-2000, (800) 523-7620; In PA (800) 662-2440
Serotec Ltd. 08675 79941
T Cell Sciences, Inc. (617) 864-2180
York Biologicals Intl. (516) 751-6553

antibodies to cell surface receptors
Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Amersham Corp. (312) 593-6300, (800) 323-9750
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
BioGenex Labs (415) 831-9191
Biomed. Technols. Inc. (617) 344-9942
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Biotech Res. Labs. Inc. (301) 251-0800
Biotest Diags. Corp. (201) 575-4500
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2461, (800) 437-7500
Coulter Elec., Inc. (305) 885-0131
Coulter Immunology (305) 883-8880
DAKO Corp. (805) 983-9881
DYNAL, Inc. (516) 629-0039
ICN Chem. & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9647
Interferon Sciences Inc. (201) 249-3250, (800) 255-1500
Janssen Life Sciences Prods.
JR Sci. (916) 666-9835
Molecular Probes, Inc. (503) 344-3007
Serotec Ltd. 08675 79941
York Biologicals Intl. (516) 751-6553

antibodies to chemicals
Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
Biomed. Technols. Inc. (617) 344-9942
BIOMOL Res. Labs., Inc. (215) 941-0430
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4050
East-Acres Biologicals (617) 765-9580
ICN Chem. & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Janssen Life Sciences Prods.
JR Sci. (916) 666-9835
Res. Plus, Inc. (201) 823-3592
Serotec Ltd. 08675 79941
Un. States Biochem. Corp. (216) 765-5000
York Biologicals Intl. (516) 751-6553

antibodies to complement components
Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Amer. Diagnostica Inc
Amersham Corp. (312) 593-6300, (800) 323-9750
Atlantic Antibodies, An Inostar Co. (207) 883-4154
Bethyl Labs. Inc. (409) 597-6111
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
BioGenex Labs. (415) 831-9191
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Biotech Res. Labs. Inc. (301) 251-0800
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4050
Cedarlane Labs. Ltd. (416) 878-8881
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2461, (800) 437-7500
Cytotech, Inc. (619) 452-1556
DAKO Corp. (805) 983-9881
Diamedix Corp. (305) 324-2300
Genzyme Corp. (617) 451-1923
Granbio, Inc. (714) 876-0049
ICN Chem. & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Inter-Medico (416) 491-8926
Jackson ImmunoRes. Labs., Inc. (215) 869-4024, (800) 367-5296
Janssen Life Sciences Prods.
JR Sci. (916) 666-9835
Kallestad Diags. (512) 329-5555
Kent Labs. Inc. (206) 868-6200
Nova BioLabs (203) 790-2770
Organon Teknika-Cappel (215) 251-2000, (800) 523-7620; In PA (800) 662-2440
Res. Plus, Inc. (201) 823-3592
Res. Prods. Intl. Corp. (312) 635-7330
Serotec Ltd. 08675 79941
Tago Inc
York Biologicals Intl. (516) 751-6553

antibodies to cytoskeletal proteins
Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Amersham Corp. (312) 593-6300, (800) 323-9750
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
BioGenex Labs (415) 831-9191
Biomed. Technols. Inc. (617) 344-9942
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Cedarlane Labs. Ltd. (416) 878-8881
ICN Chem. & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9647
Inter Sci. Diags. (213) 677-3322
Janssen Life Sciences Prods.
JR Sci. (916) 666-9835
Kallestad Diags. (512) 329-5555
Kent Labs. Inc. (206) 868-6200
Nichols Institute Diags. (714) 661-8000
Nova BioLabs (203) 790-2770
Organon Teknika-Cappel (215) 251-2000, (800) 523-7620; In PA (800) 662-2440
Pacific Biotech Inc. (619) 695-2888
Pentex (213) 828-7423
Pennsuke Labs., Inc. (415) 592-6388
Res. Plus, Inc. (201) 823-3592
Res. Prods. Intl. Corp. (312) 635-7330
Scantibodies Lab. (619) 258-93
Serotec Ltd. 08675 79941
Syva Co. (415) 493-2200
Ventrex Labs. (207) 773-7231
Wien Labs. Inc. (201) 564-7019
York Biologicals Intl. (516) 751-6553
Zymed Labs Inc. (415) 871-4494

antibodies to enzymes
Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Amer. Diagnostica Inc
Atlantic Antibodies, An Inostar Co. (207) 883-4154
Beckman Instrs., Inc. (714) 871-4848
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
Biomed. Technols. Inc. (617) 344-9942
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4050
Cedarlane Labs. Ltd. (416) 878-8881
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2461, (800) 437-7500
DAKO Corp. (805) 983-9881
Diagnostic Sys., Inc. (617) 481-1923
ICN Chem. & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9647
Jackson ImmunoRes. Labs., Inc. (215) 869-4024, (800) 367-5296
Kallestad Diags. (512) 329-5555
Kent Labs. Inc. (206) 868-6200
Molecular Biology Resources, Inc. (414) 871-7199
Organon Teknika-Cappel (215) 251-2000, (800) 523-7620; In PA (800) 662-2440
Pharmacia LKB Biotechnology AB 011 46 18 18 3000
Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (201) 467-8000, (800) 526-3818
S Prime 3 Prime, Inc. (215) 644-4710
Res. Plus, Inc. (201) 823-3592
Rockland, Inc. (215) 369-1008
Scantibodies Lab. (619) 258-93
Serotec Ltd. 08675 79941
Ventrex Labs. (207) 773-7231
York Biologicals Intl. (516) 751-6553
Zymed Labs Inc. (415) 871-4494

antibodies to growth factors
Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Amersham Corp. (312) 593-6300, (800) 323-9750
Beckman Instrs., Inc. (714) 871-4848
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
BioGenex Labs (415) 831-9191
Biomed. Technols. Inc. (617) 344-9942
Biotest Diags. Corp. (201) 575-4500
BIOTOPE (206) 281-9600
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4050
Cedarlane Labs. Ltd. (416) 878-8881
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2461, (800) 437-7500
Collaborative Res., Inc. (617) 275-0004
Genzyme Corp. (617) 481-1923
ICN Chem. & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9647
Inter Medico (416) 491-8926
Inter Sci. Diags. (213) 677-3322
Janssen Life Sciences Prods.
JR Sci. (916) 666-9835
Kallestad Diags. (512) 329-5555
Nichols Institute Diags. (714) 661-8000
Olympus Corp.-Clinical Instrs. Div. (516) 488-3323
Oncor Inc. (301) 963-3500
Peninsula Labs., Inc. (415) 592-6388
Res. Plus, Inc. (201) 823-3592
Scantibodies Lab. (619) 258-93
Serotec Ltd. 08675 79941
Un. States Biochem. Corp. (216) 765-5000
Ventrex Labs. (207) 773-7231
York Biologicals Intl. (516) 751-6553

antibodies to hormones
Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Adv. Magnetics, Inc. (617) 497-2070
Allelix Inc. (416) 677-0831
Amer. Diagnostica Inc
Amersham Corp. (312) 593-6300, (800) 323-9750
Beckman Instrs., Inc. (714) 871-4848
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
BioGenex Labs (415) 831-9191
Biomed. Technols. Inc. (617) 344-9942
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Biotech Lab., Inc. (713) 482-2672
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4050
Cambridge Res. Biochems., Inc. (516) 625-1322
Cayman Chem. Co. Inc. (313) 662-8766
Cedarlane Labs. Ltd. (416) 878-8881
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2461, (800) 437-7500
DAKO Corp. (805) 983-9881
E-Y Labs. Inc. (415) 342-3296
East-Acres Biologicals (617) 765-9580
Endocrine Sciences Prods. (818) 345-8589
Fermig Labs., Inc. (914) 368-2244
ICN Chem. & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9647
Inter-Medico (416) 491-8926
Inter Sci. Diags. (213) 677-3322
JR Sci. (916) 666-9835
Kallestad Diags. (512) 329-5555
Kent Labs. Inc. (206) 868-6200
Nichols Institute Diags. (714) 661-8000
Nova BioLabs (203) 790-2770
Organon Teknika-Cappel (215) 251-2000, (800) 523-7620; In PA (800) 662-2440
Pacific Biotech Inc. (619) 695-2888
Pentex (213) 828-7423
Pennsuke Labs., Inc. (415) 592-6388
Res. Plus, Inc. (201) 823-3592
Res. Prods. Intl. Corp. (312) 635-7330
Scantibodies Lab. (619) 258-93
Serotec Ltd. 08675 79941
Syva Co. (415) 493-2200
Ventrex Labs. (207) 773-7231
Wien Labs. Inc. (201) 564-7019
York Biologicals Intl. (516) 751-6553
Zymed Labs Inc. (415) 871-4494

antibodies to human blood-group antigens
Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Amer. Diagnostica Inc
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
BioGenex Labs. (415) 831-9191
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Biotech Res. Labs. Inc. (301) 251-0800
Biotest Diags. Corp. (201) 575-4500
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4050
DAKO Corp. (805) 983-9881
ICN Chem. & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9647
Janssen Life Sciences Prods.
JR Sci. (916) 666-9835
Nordic Immunological Labs. (USA) (714) 661-1188
One Lambda, Inc. (213) 478-1001
Organon Teknika-Cappel (215) 251-2000, (800) 523-7620; In PA (800) 662-2440
Res. Plus, Inc. (201) 823-3592
Rockland, Inc. (215) 369-1008
Scantibodies Lab. (619) 258-93
Serotec Ltd. 08675 79941
Un. States Biochem. Corp. (216) 765-5000
York Biologicals Intl. (516) 751-6553

antibodies to immunoglobulins
Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Adv. Magnetics, Inc. (617) 497-2070
Allelix Inc. (416) 677-0831
Amer. Diagnostica Inc
Amersham Corp. (312) 593-6300, (800) 323-9750

Technicione Intl. (714) 557-5913
Ventrex Labs. (207) 773-7231
York Biologicals Intl. (516) 751-6553

monoclonal antibodies to lymphokines and monokines

Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Biotest Diags. Corp. (201) 575-4500
Boehringer Mannheim Corp. (317) 849-9350, (800) 428-5433
Genzyme Corp. (617) 451-1923
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Inter Sci. Diags. (213) 677-3322
Interferon Sciences Inc. (201) 249-3250, (800) 255-1500
Janssen Life Sciences Prods.
Olympus Corp.–Clinical Instrs. Div. (516) 488-3323
T Cell Sciences, Inc. (617) 864-2160

monoclonal antibodies to miscellaneous blood proteins

Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Amer. Diagnostica Inc.
Baxter Healthcare Corp.–Dade Div. (305) 592-2311
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
BioGenex Labs. (415) 831-9191
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Boehringer Mannheim Corp. (317) 849-9350, (800) 428-5433
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4050
Cedarlane Labs. Ltd. (416) 676-8891
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2451, (800) 437-7500
DAKO Corp. (805) 963-9881
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9647
Inter Sci. Diags. (213) 677-3322
Kallestad Diags. (512) 329-5555
Scantibodies Lab. (619) 258-93
Serotec Ltd. 08675 79941
Ventrex Labs. (207) 773-7231
York Biologicals Intl. (516) 751-6553
Zymed Labs. Inc. (415) 871-4494

monoclonal antibodies to normal cell markers, human

Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Baxter Healthcare Corp.–Dade Div. (305) 592-2311
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
BioGenex Labs. (415) 831-9191
Biomed. Technols. Inc. (617) 344-9942
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Biotest Diags. Corp. (201) 575-4500
Boehringer Mannheim Corp. (317) 849-9350, (800) 428-5433
Cedarlane Labs. Ltd. (416) 676-8891
Coulter Elec., Inc. (305) 885-0131
Coulter Immunology (305) 883-6880
DAKO Corp. (805) 963-9881
Enzo Biochem Inc. (212) 741-3838
ICN Chem. & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9647
Inter Sci. Diags. (213) 677-3322
Interferon Sciences Inc. (201) 249-3250, (800) 255-1500
Janssen Life Sciences Prods.
Nordic Immunological Labs. (USA) (714) 661-1188
Olympus Corp.–Clinical Instrs. Div. (516) 488-3323
Serotec Ltd. 08675 79941
T Cell Sciences, Inc. (617) 864-2160
York Biologicals Intl. (516) 751-6553

monoclonal antibodies to normal cell markers, mouse

Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Baxter Healthcare Corp.–Dade Div. (305) 592-2311
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Boehringer Mannheim Corp. (317) 849-9350, (800) 428-5433
CALTAG Labs. (415) 873-6106
Cedarlane Labs. Ltd. (416) 676-8891
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2451, (800) 437-7500
Enzo Biochem Inc. (212) 741-3838
ICN Chem. & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Inter Sci. Diags. (213) 677-3322
Janssen Life Sciences Prods.
Nordic Immunological Labs. (USA) (714) 661-1188
Serotec Ltd. 08675 79941

monoclonal antibodies to normal cell markers, rabbit

Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Baxter Healthcare Corp.–Dade Div. (305) 592-2311
Biomed. Technols. Inc. (617) 344-9942
Cedarlane Labs. Ltd. (416) 676-8891
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Inter Sci. Diags. (213) 677-3322

monoclonal antibodies to oncogene-encoded proteins

Cambridge Res. Biochems., Inc. (516) 825-1322
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9647
Oncogene Science, Inc. (516) 385-9300, (800) ONC-2616

monoclonal antibodies to retroviruses

Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
Biotech Res. Labs. Inc. (301) 251-0600
Cellular Prods. Inc. (716) 842-6270
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2451, (800) 437-7500
Epitope Inc. (503) 641-6116
Olympus Corp.–Clinical Instrs. Div. (516) 488-3323

monoclonal antibodies to tumor-associated antigens

Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
BioGenex Labs. (415) 831-9191
Biomed. Technols. Inc. (617) 344-9942
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Boehringer Mannheim Corp. (317) 849-9350, (800) 428-5433
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4050
Cedarlane Labs. Ltd. (416) 676-8891
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2451, (800) 437-7500
Earl Clay Labs., Inc. (415) 892-8512
Coulter Elec., Inc. (305) 885-0131
Coulter Immunology (305) 883-6880
DAKO Corp. (805) 963-9881
Dianon Sys., Inc. (203) 381-4000
Enzo Biochem Inc. (212) 741-3838
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Inter Sci. Diags. (213) 677-3322
J C L Clinical Res. (615) 546-0654
Olympus Corp.–Clinical Instrs. Div. (516) 488-3323
Oncogene Science, Inc. (516) 385-9300, (800) ONC-2616
Scantibodies Lab. (619) 258-93
Serotec Ltd. 08675 79941
Summa Medical Corp. (505) 345-8891
Ventrex Labs. (207) 773-7231
York Biologicals Intl. (516) 751-6553
Zymed Labs. Inc. (415) 871-4494

monoclonal antibodies, other

Amersham Corp. (312) 593-6300, (800) 323-9750
Biocon, Inc. (301) 762-3202
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
Biotest Diags. Corp. (201) 575-4500
CALTAG Labs. (415) 873-6106
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4050
Diagnostic Chems. Ltd. (902) 566-1396
E-Y Labs. Inc. (415) 342-3296
Genetic Diags. Corp. (516) 487-4711
ICN Chem. & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9647
Integrated Separation Sys. (617) 965-2901
Novabiochem AG (062) 89 19 22
Un. States Biochem. Corp. (216) 765-5000
York Biologicals Intl. (516) 751-6553

polyclonal antibodies

Adv. Magnetics, Inc. (617) 497-2070
Berkeley Antibody Co. (BAbCo) (415) 222-4940
Bethesda Res. Labs. (301) 840-8000
Bethyl Labs. Inc. (409) 597-6111
BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
BIOMOL Res. Labs., Inc. (215) 941-0430
Bioproducts for Science, Inc. (317) 894-7536
Cambridge Medical Technols. Corp. (617) 935-4050
Cambridge Res. Biochems., Inc. (516) 825-1322
Collaborative Res., Inc. (617) 275-0004
DYNAL, Inc. (516) 829-0039
East-Acres Biologicals (617) 765-9560
Granbio, Inc. (714) 676-0049
ICN Chem. & Radioisotopes
ICN ImmunoBiologicals (312) 852-5900
Ingram and Bell Sci. (416) 443-9647
J C L Clinical Res. (615) 546-0654
Jackson ImmunoRes. Labs., Inc. (215) 889-4024, (800) 367-5296
Novabiochem AG (062) 89 19 22
Novo BioLabs (203) 790-2770
Organon Teknika–Cappel (215) 251-2000, (800) 523-7620; in PA (800) 662-2440
Rockland, Inc. (215) 369-1008

prostate specific antigen

Accurate Chem. & Sci. Corp. (516) 433-4900
Chemicon Intl. Inc. (213) 322-2451, (800) 437-7500
Helix Biotech Ltd. (604) 270-7468

viral antigens

BIODESIGN Inc. (207) 967-4173
Biotech Res. Labs. Inc. (301) 251-0600
Cytotech, Inc. (619) 452-1556
Diamedix Corp. (305) 324-2300
Electro-Nucleonics, Inc. (301) 622-4218
Granbio, Inc. (714) 676-0049
Inter-Medico (416) 491-8926
Olympus Corp.–Clinical Instrs. Div. (516) 488-3323

FONTE: Guide to Biotechnology Products and Instruments, Science 239(II) G29-G33. 1988.

ANEXO V - FONTES ADICIONAIS DE INFORMAÇÃO

Cold Spring Harbor Laboratory. Hybridoma techniques. EMBO, SKMB Course, 1980, Basel. 65 p. Cold Spring Harbor, N.Y.

Galfre, G., and C. Milstein. 1981. Preparation of monoclonal antibodies: Strategies and procedures. In Langone, J.J., and H. Van.Vunakis, eds., Methods in enzymology, v. 73, Imunchemical techniques, pt. B, p. 1-45 Academic Press, New York.

Goding, J. W. 1980. Antibody production by hybridomas. J. Immunol. Methods 39: 285-308

Houba, V., and S. H. Chan, eds. 1982. Properties of the monoclonal antibodies produced by hybridoma technology and UNDP/World Bank/World Health Organization, Geneva

Kennt, R. H., T. J. McKearn, and K. B. Bechtol, eds. 1980. Monoclonal antibodies. 423 p. Plenum Press, New York.

FECHA DE DEVOLUCION			

Autor

Título Métodos para producao de antícorpos monoclonais

Fecha Devolución	Nombre del solicitante

INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERAÇÃO PARA A AGRICULTURA
SHIS QI 5, Conj. 9, Bl. D, Comercial Local, Caixa Postal 09-1070, Brasília, D.F., Brasil
Tel.: (061) 248-5477 - Telex 611959 INAG-BR - Correio Eletrônico 1536 - Fac-Símile: (061) 248-5807