

Número de catálogo:	BRR 4056K G, H
Descripción:	6,0: 25 ml

**Uso previsto:**

Para uso exclusivo en investigación. No debe utilizarse en procedimientos diagnósticos.

**Resumen y explicación:**

Los anticuerpos humanizados son un tipo de tratamiento cada vez más eficaz y más numeroso para las enfermedades humanas. Su eficacia depende, en gran medida, de la especificidad y sensibilidad para el antígeno diana deseado. Por consiguiente, los estudios preclínicos de posibles tratamientos con anticuerpos humanos (y humanizados) incluyen pruebas de detección inmunohistoquímicas (IHC). Sin embargo, la tinción inespecífica debido a la unión de IgG humana endógena constituye un problema técnico en la detección de anticuerpos humanos. El kit Human-on-Human HRP-Polymer ofrece una solución a este problema al proporcionar reactivos para marcar el anticuerpo primario humano de interés con digoxigenina, incluso en presencia de otras proteínas que no son IgG, y detectarlo en tejido humano con un sistema de polímero HRP. Este sistema de detección permite detectar los anticuerpos humanos unidos al tejido humano con gran especificidad y sensibilidad, a la vez que reduce significativamente o elimina la tinción de fondo. Además, el kit Human-on-Human HRP-Polymer no requiere pasos de incubación durante la noche, lo que permite la detección rápida de numerosos clones de anticuerpos primarios humanos.

**Aplicaciones conocidas:**

Tejidos fijados en formol e incluidos en parafina (FFPE)

**Suministrado en forma de:**

**Kit de 6 ml**

Ligador de digoxigenina anti-humano (BRR4053B) 0,5 ml  
Reactivo de absorción humano (BRR4054B) 0,5 ml  
Anticuerpo secundario de ratón anti-digoxigenina (BRR4055G) 6 ml  
Polímero HRP de ratón MACH 2 (MHRP520G) 6 ml

**Kit de 25 ml**

Ligador de digoxigenina anti-humano (BRR4053D) 2,1 ml  
Reactivo de absorción humano (BRR4054D) 2,1 ml  
Anticuerpo secundario de ratón anti-digoxigenina (BRR4055H) 25 ml  
Polímero HRP de ratón MACH 2 (MHRP520H) 25 ml

**Materiales y reactivos necesarios no suministrados:**

Portaobjetos para microscopio, con carga positiva  
Desert Chamber\* (estufa secadora)  
Controles histológicos positivos y negativos  
Xileno (puede reemplazarse por un sustituto del xileno\*)  
Etanol o alcohol reactivo  
Cámara de recuperación antigénica Decloaking chamber\* (olla a presión)  
Agua desionizada o destilada  
Tampón de lavado\*  
Reactivos de pretratamiento\*  
Digestión enzimática\*  
Bloqueo de peroxidasa\*  
Bloqueo proteínico\*  
Anticuerpo primario\*  
Reactivos de control negativo\*  
Cromógenos\*

Hematoxilina\*  
Reactivo azulante\*  
Medio de montaje\*

\*Para obtener información sobre los números de catálogo y pedidos, consultar el sitio web de Biocare Medical en <http://biocare.net>.

**Reactividad de las especies:**

Cadenas ligeras y pesadas de IgG humana

**Almacenamiento y estabilidad:**

Almacenar el kit entre 2 °C y 8 °C. El producto es estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta si se almacena en estas condiciones. No utilizar después de la fecha de caducidad.

**Recomendaciones del protocolo de tinción:**

**Preparación del anticuerpo marcado con digoxigenina (1 ml) (Figura 1):**

1. Combinar 80 µl de ligador de digoxigenina anti-humano con el anticuerpo primario (0,1-0,5 µg en 200-400 µl de diluyente) y mezclar en agitadora vorticial durante 5 segundos.
2. Incubar la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente.
3. Añadir 80 µl de reactivo de absorción humano a la mezcla, mezclar en agitadora vorticial durante 5 segundos, e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Añadir el diluyente de anticuerpo deseado hasta un volumen final de 1 ml. Ahora, el anticuerpo primario está marcado con digoxigenina y listo para utilizar. El periodo de validez puede variar y debe determinarlo cada investigador de manera individual.

Nota: las instrucciones son para 1 ml de anticuerpo marcado. La preparación se puede escalar de forma lineal (es decir, para 0,5 ml de anticuerpo marcado, dividir todas las cantidades entre 2).

**Procedimiento de tinción:**

1. Desparafinar los cortes de tejido en Slide Brite o xileno. Hidratar los portaobjetos en una serie graduada de alcohol en agua.
2. Aplicar Peroxidized 1 durante 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Aclarar los portaobjetos en agua desionizada.
4. Solución de pretratamiento/protocolo:  
Recuperación por calor (opcional): Calentar los portaobjetos en Diva Decloaker, Reveal Decloaker o Borg Decloaker de Biocare con el uso de la cámara de recuperación antigénica Decloaking Chamber de Biocare.  
Digestión proteolítica (opcional): digerir el tejido con tripsina o pepsina.
5. Aclarar los portaobjetos con dos cambios de tampón de lavado TBS.
6. Bloqueo proteínico (opcional): Aplicar Background Punisher de Biocare durante 10 minutos a temperatura ambiente.
7. Enjuagar los portaobjetos con tampón de lavado TBS.
8. Aplicar anticuerpo primario marcado con digoxigenina al tejido e incubar entre 30 minutos y 1 hora a temperatura ambiente.
9. Enjuagar los portaobjetos con tampón de lavado TBS.
10. Aplicar anticuerpo secundario de ratón anti-digoxigenina al tejido e incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
11. Enjuagar los portaobjetos con tampón de lavado TBS.
12. Aplicar Polímero HRP de ratón MACH 2 al tejido e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
13. Enjuagar los portaobjetos con tampón de lavado TBS durante 5 minutos.

14. Aplicar DAB durante 5 minutos a temperatura ambiente. Lavar con agua desionizada.
15. Aplicar hematoxilina CAT entre 30 segundos y 1 minuto o hematoxilina automatizada de Tacha durante 5 minutos. Lavar con agua desionizada.
16. Aplicar solución azulante de Tacha durante 1-2 minutos. Lavar con agua desionizada.
17. Deshidratar, aclarar y cubrir con un cubreobjetos.

**Recomendaciones del protocolo de tinción (equipo automatizado de tinción de portaobjetos VALENT<sup>®</sup>):**

Human-on-Human HRP-Polymer es compatible para el uso con VALENT. Consultar el Manual del usuario para obtener instrucciones de uso específicas. Los parámetros del protocolo del Administrador de protocolos deben programarse de la siguiente manera:

1. **Desparafinación:** desparafinar durante 8 minutos con Val DePar.
2. **Pretratamiento:** realizar la recuperación por calor a 98 °C durante 60 minutos con Val AR-Lo pH, 5X (uso en 1X).
3. **Bloqueo de peroxidasa:** bloquear durante 5 minutos con Val Peroxidase Block.
4. **Bloqueo proteínico:** incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente con Val Background Block.
5. **Anticuerpo primario:** incubar durante 45 minutos con anticuerpo primario marcado con digoxigenina.
6. **Secundario:** incubar durante 30 minutos con anticuerpo secundario de ratón anti-digoxigenina.
7. **Polímero:** incubar durante 45 minutos con Polímero HRP de ratón MACH 2.

**Recomendaciones del protocolo de tinción (equipo automatizado de tinción de portaobjetos VALENT<sup>®</sup>) (continuación):**

8. **Cromógeno:** incubar durante 5 minutos con Val DAB.
9. **Contratinción:** realizar una contratinción durante 5 minutos con Val Hematoxylin.

**Nota técnica:**

Este kit se ha probado con Renaissance Background Reducing Diluent de Biocare. El diluyente óptimo depende del anticuerpo primario y debe determinarlo el investigador.

**Limitaciones:**

Este producto está previsto para uso exclusivo en investigación y no debe utilizarse en procedimientos diagnósticos. La idoneidad para aplicaciones específicas puede variar y es responsabilidad del usuario final determinar la aplicación adecuada para su uso.

**Precauciones:**

1. El material incluido en este kit contiene material biológico humano no peligroso. Al manipularlo, utilice un equipo de protección personal adecuado.
2. Este producto no está clasificado como peligroso. El conservante utilizado en los reactivos del kit es Proclin 950. La concentración de Proclin 950 (menos del 0,25 %) no cumple los criterios de la OSHA para ser considerada una sustancia peligrosa. La sobreexposición a Proclin puede causar irritación en la piel, los ojos, las mucosas y las vías respiratorias altas. Usar guantes desechables al manipular los reactivos.
3. Las muestras, antes y después de su fijación, así como todos los materiales expuestos a ellas, deben tratarse como posibles agentes transmisores de infecciones y desecharse siguiendo las precauciones adecuadas. No pipetear nunca aspirando con la boca, ni dejar que los reactivos o las muestras entren en contacto con la piel y las mucosas. Si los reactivos o las muestras entran en contacto con zonas sensibles, lavar con agua abundante.

4. La contaminación microbiana de los reactivos puede dar lugar a un aumento de la tinción no específica.
5. Los tiempos o las temperaturas de incubación que difieran de los especificados pueden generar resultados erróneos. El usuario debe validar cualquiera de estos cambios.
6. No utilizar el reactivo después de la fecha de caducidad impresa en el frasco.
7. La ficha de datos de seguridad está disponible previa solicitud y se encuentra en <http://biocare.net>.
8. Consultar las normativas de la OSHA y las normativas locales, estatales y federales para la eliminación de sustancias tóxicas.
9. Proclin™ es una marca comercial de la empresa Rohm and Haas o de sus filiales.

**Servicio técnico:**

En caso de dudas o preguntas relacionadas con el producto, contactar con el servicio técnico de Biocare llamando al teléfono 1-800-542-2002 (Estados Unidos).

**Guía de resolución de problemas:**

**Ausencia de tinción**

1. Se ha omitido un reactivo esencial (como el anticuerpo primario).
2. Los pasos de tinción se han realizado incorrectamente o en el orden equivocado.
3. El paso de recuperación de epítipo inducida por calor (HIER) se ha llevado a cabo incorrectamente con el tiempo erróneo, el orden equivocado o el pretratamiento incorrecto.
4. Cantidad insuficiente de antígeno.
5. Periodo de incubación del anticuerpo primario demasiado corto.
6. Sustrato o solución de cromógeno mal mezclados.

**Tinción débil**

1. La fijación del tejido es insuficiente o excesiva.
2. Incubación del anticuerpo primario demasiado corta.
3. Expresión baja de antígeno.
4. Los pasos de recuperación de epítipo inducida por calor (HIER) se han llevado a cabo incorrectamente con el tiempo erróneo, el orden equivocado o el pretratamiento incorrecto.
5. Desarrollo excesivo del sustrato.
6. Aclarado excesivo durante los pasos de lavado.
7. Omisión de reactivo esencial.
8. Procedimiento incorrecto en la preparación del reactivo.
9. Procedimiento incorrecto en los pasos de la prueba.

**Tinción inespecífica o tinción de fondo elevada**

1. La fijación del tejido es insuficiente o excesiva.
2. Uso de reactivo de bloqueo incorrecto; el bloqueante debe proceder de la misma especie de la que se ha obtenido el anticuerpo secundario.
3. Puede que el tejido necesite un bloqueo proteínico más largo o más específico.
4. El sustrato se ha desarrollado en exceso.
5. El tejido no se ha aclarado suficientemente bien.
6. Desparafinación incompleta.
7. Tejido dañado o necrótico.

**Desprendimiento del tejido**

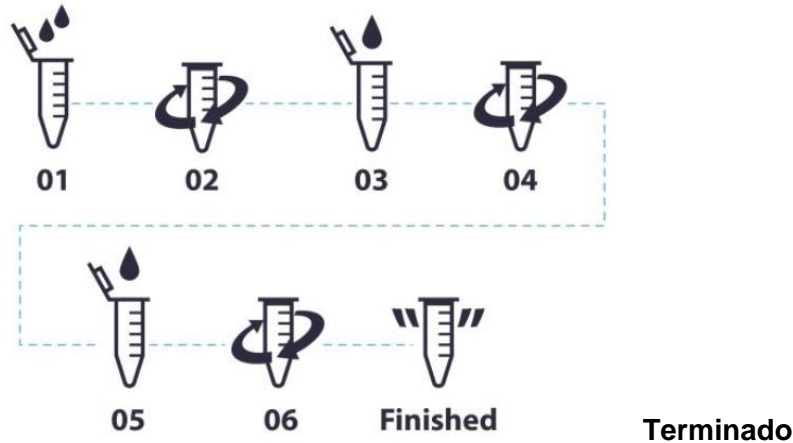
1. Los portaobjetos no estaban cargados positivamente.
2. Se ha utilizado un adhesivo para portaobjetos en el baño de agua.
3. El tejido no se ha secado bien.
4. El tejido contenía demasiada grasa.

**Tinción específica demasiado oscura**

1. Anticuerpo concentrado sin diluir correctamente (se ha utilizado a una concentración demasiado elevada).
2. Incubación o detección demasiado largas del anticuerpo primario.

**Figura 1:**

Preparación de 1 ml de anticuerpo humano marcado con digoxigenina



**01. Añadir anticuerpo y ligador**

Añadir 200-400  $\mu$ l de diluyente de anticuerpo  
Añadir 80  $\mu$ l de ligador de digoxigenina anti-humano  
Añadir ~0,1 a 1,0  $\mu$ g de anticuerpo por 1 ml

**02. Mezclar en agitadora vorticial**

Mezclar en agitadora vorticial 5 segundos  
Dejar reposar 60 minutos

**03. Anticuerpo marcado y lavado**

Añadir 80  $\mu$ l de reactivo de absorción humano

**04. Mezclar en agitadora vorticial**

Mezclar en agitadora vorticial 5 segundos  
Dejar reposar 30 minutos

**05. Añadir diluyente**

Añadir el diluyente deseado hasta un volumen total de 1 ml

**06. Mezclar en agitadora vorticial**

Mezclar en agitadora vorticial 5 segundos

**Terminado – 1 ml de anticuerpo final**

Anticuerpo marcado con digoxigenina listo para utilizar  
Incubar en tejido durante 60 minutos