

PADRONIZAÇÃO DE ANTICORPOS

Os anticorpos são comercializados na forma concentrada ou pré-diluída. Otimizar esta diluição é fundamental, pois a diluição correta de um anticorpo é o fator que mais contribui para a qualidade de uma lâmina de imuno-histoquímica. Eles são utilizados em quantidades muito reduzidas como microlitros que é a unidade de volume equivalente à milionésima parte de um litro, representada pelo símbolo μL . Para manusear essas pequenas quantidades de reagente de forma precisa, utilizam-se micropipetas, que medem um volume exato e facilmente sugam e dispensam líquidos. Há vários tipos de classificação de micropipetas, bem como pipetas de volume fixo e variável, e é de extrema importância que o usuário examine as especificações de cada tipo, antes de adquiri-la, já que há modelos que não são indicados para alguns tipos de aplicações.

Seguem abaixo instruções para o uso deste instrumento:

- ✓ Por regra, utiliza-se o polegar para controlar cuidadosamente o pistão da micropipeta, pois este é, para a maioria dos indivíduos, o dedo com melhor motricidade fina;
- ✓ Ao utilizar a micropipeta primeiramente encaixe uma ponteira na extremidade inferior;
- ✓ Antes de colocar a ponteira dentro do líquido pressione o pistão da micropipeta até sentir o primeiro estágio de pressão e mantenha essa posição. Obs.: não ultrapasse o primeiro estágio de pressão ou irá pipetar um volume incorreto;
- ✓ Introduza a ponta da ponteira no líquido a pipetar, libere lentamente o pistão da micropipeta permitindo que o líquido seja sugado e em seguida tampe o tubo ou frasco que contém o líquido pipetado;
- ✓ Segure a micropipeta numa posição vertical com uma das mãos e segure o tubo ou frasco de destino com a outra, ambos deverão estar ao nível dos olhos;
- ✓ Toque a parede interior do tubo de destino com a ponta da ponteira, isto criará uma pequena tensão superficial que irá auxiliar a expulsão do líquido da ponta da ponteira.

Como titular os anticorpos:

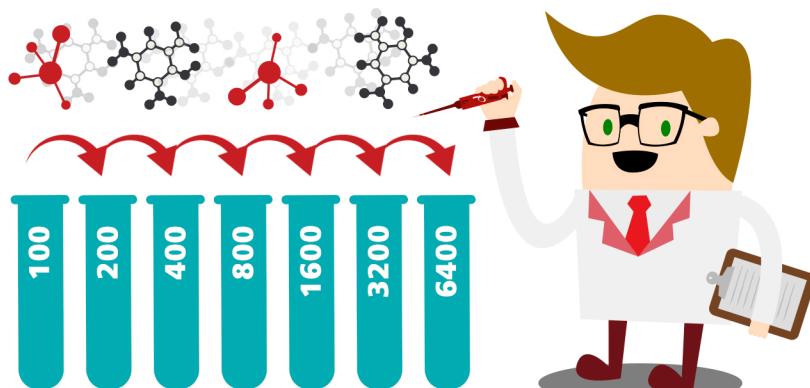
Geralmente, junto com o anticorpo, o fabricante envia uma folha com as especificações do produto onde há informações gerais e a faixa de diluição recomendada que deve ser utilizada como referência. Para uma boa padronização, deve-se, entretanto realizar uma diluição seriada, com no mínimo sete faixas.

Uma diluição seriada é basicamente uma série de diluições simples que amplificam o fator de diluição. A fonte da amostra para diluição de cada etapa vem da diluição anterior e todas as diluições na série têm o mesmo fator de diluição.

Exemplo:

Partindo do exemplo em que a faixa recomendada inicia com o valor de 1:100, monta-se uma grade com sete tubos de ensaio, marcando em cada tubo os valores 100, 200, 400, 800, 1600, 3200 e 6400 como na figura abaixo, e dispensando $100\mu\text{L}$ de diluente em cada tubo, sendo que somente no primeiro será dispensado $200\mu\text{L}$ e este será chamado de solução mãe.

COMO FAZER DILUIÇÃO SERIADA?



✓ No primeiro tubo “*solução mãe*” adicione $2.0\mu\text{L}$ de anticorpo nos $200\mu\text{L}$ de diluente que já estará depositado no tubo, misture bem a cada pipetagem.

✓ A partir desta diluição inicial, retirar $100\mu\text{L}$ e depositar no tubo seguinte, misturando com os $100\mu\text{L}$ de diluente que já esta no frasco, repita este procedimento até o último tubo,

✓ Separe sete lâminas com cortes feitos a partir do mesmo bloco de tecido controle, identifique cada uma delas com sua respectiva diluição e o Anticorpo em teste e incube o volume de cada tubo na sua respectiva lâmina controle.

A escolha da diluição ideal deverá seguir o critério de maior especificidade com a menor coloração inespecífica de fundo. Se nesta grade, a maior diluição realizada ainda apresentar reação inespecífica, será necessário montar outra série de diluição, repetindo a ultima, até que em uma das lâminas a marcação específica comece a ficar ligeiramente mais fraca, definindo assim que a diluição anterior será a de uso na rotina. É considerada diluição ideal aquela que permite maior intensidade de marcação específica com a menor coloração inespecífica de fundo possível.