

IMUNO-HISTOQUÍMICA

Antes de iniciar o processo de imuno-histoquímica vale avisar que todo o processo deve ser realizado com muita cautela para que os cortes não descolem das lâminas. Assim, os mergulhos e movimentos das lâminas devem ser realizados de forma gentil, sem movimentos bruscos.

1. **Preparo das lâminas**

- Corte o material e fixe ele em uma lâmina silanizada ou uma lâmina com carga positiva;
- Coloque as lâminas dentro da estufa por 1 hora a 98°C;
- Depois mergulhe as lâminas em Xilol (novo) por 30 minutos;
- Após o xilol, mergulhe as lâminas em álcool absoluto por 5 minutos;
- Deixe-as imersas em álcool 95% por 4 minutos;
- E por último deixe-as imersas em álcool 75% por 3 minutos;

A panela precisa aquecer com *Trilogy* (diluição - 1500ul), com 150ml de água destilada por 15min a 250°C, faltando 15min para terminar o banho de xilol. Vale ressaltar que é importante cobrir o frasco de *trilogy* com papel alumínio por todo o processo até a retirada da panela.

2. Leve as lâminas para dentro do *trilogy* (na panela) com a panela **ligada** – para recuperação antigênica – por 20 minutos a 130°C;
3. Mantenha as lâminas por mais 20 minutos dentro do *trilogy* com a panela **desligada**;
4. Retire o recipiente com *trilogy* e as lâminas de dentro da panela e deixe esfriar por 5 minutos (sem o papel alumínio);
5. Coloque lâminas em tampão por 10 minutos (vide preparo do tampão no final das instruções);

Observação: Se começar o processo de imuno-histoquímica pela manhã, pode-se utilizar o mesmo tampão durante todo o processo, senão, se começar no final do dia, deve-se trocar o tampão antes de continuar o processo no próximo dia.

6. Seque o produto em volta do corte (**e faça isso todas as próximas vezes que houver aplicação de novo reagente**) e aplique o bloqueador de peroxidase (*Peroxide Block*), por 10 minutos;
7. Leve as lâminas para o tampão por 10 minutos;
8. Seque o produto em volta do corte e aplique o bloqueador de fundo (*Background Block*) por 10 minutos;
9. Leve ao tampão por mais 10 minutos;
10. Seque e aplique o anticorpo (**vide manual para diluição do anticorpo**) de 1 a 2 horas ou *Overnight* (caso o processo de imuno-histoquímica tenha sido iniciado no fim do dia);
11. Leve as lâminas ao tampão por 10 minutos;
12. Seque e aplique o amplificador (*Amplifier* – frasco contém tampa amarela) por 35 minutos;
13. Leve ao tampão por 10 minutos;

14. Seque e aplique o polímero (*Polymer* – frasco contém tampa vermelha) por 25 minutos;
15. Tampão por 10 minutos;
16. Após tirar lâminas do tampão leve-o ao DAB² (DAB Buffer – **vide diluição no final das instruções**) por 15 minutos;
17. Lave em tampão (mergulhe e tire por alguns segundos);
18. Após o último tampão deixe 3min. na hematoxilina (ou seguindo a padronização do momento) e lave em água corrente (da torneira mesmo, mas **sem deixar a água bater nas lâminas**) para tirar excesso da coloração.
19. Passar em 3 potes com álcool absoluto (mergulhando), e fechar lâminas.

Diluição do tampão – preparo

Misturar 950ml de água deionizada com 50ml de TBS pH 7,5 (tampão).
Proporção de 1/50.

DAB – diluição:

- 10uL/500ml = 5 lâminas
- 20uL/1000 = 10 lâminas
- 30uL/1500 = 15 lâminas

- 500uL = 0,5 uL
- 1000uL = 1,0 uL
- 1500 = 1,5 uL

Diluição do *trilogy*

1500ul em 150ml de destilada.