**PASSO-A-PASSO PARA O PROCESSO DE IMUNO**

1. Sempre fazer primeiro uma lista das reações que serão realizadas no dia

[W:\IMUNO\REGISTROS DAS REAÇÕES.xlsx](file:///W:\IMUNO\REGISTROS%20DAS%20REAÇÕES.xlsx) <<**NESTE LINK VOCÊ CONSEGUE ACESSO AO ARQUIVO NECESSÁRIO;**

1. Após fazer a lista das reações, ver as diluições necessárias

[W:\IMUNO\REGISTROS DOS ANTICORPOS.xlsx](file:///W:\IMUNO\REGISTROS%20DOS%20ANTICORPOS.xlsx)<<**NESTE LINK VOCÊ ENCONTRA AS DILUIÇÕES E DEMAIS INFORMAÇÕES SOBRE OS ANTICORPOS;**

1. Identificar lâminas de acordo com o que fora escrito na lista de reações (**EM ORDEM NUMÉRICA PARA QUE NÃO SEJA CONFUNDIDO NENHUMA LÂMINA E MANTENHA A ORDEM ATÉ O FIM DO PROCESSO PARA FACILITAR O MESMO**);
2. Agora coloque as lâminas identificadas para começar o processo de **RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA.** Para a realização deste processo você precisará do aparelho de banho maria, após liga-lo, configure-o para que este esteja a 130ºC (botões da esquerda) e ajuste-o para 40 minutos (botões da direita), agora prepare o **TRILOGY** (solução que fará o processo de recuperação). Para preparar o **TRILOGY**, pegue um frasco azul que se encontra na panela e adicione 150ml de água destilada e 1,5ml de **TRILOGY** (faça isso com os dois frascos azuis que deverão estar dentro da panela). Com os recipientes cheios mergulhe as lâminas e tampe-as com o papel alumínio, ao término dos primeiros 40 minutos, acrescente mais 30 minutos na configuração do aparelho e faça a troca de recipiente.
3. Separe os frascos que armazenarão as diluições e identifique-os também;
4. Agora que já sabe quais reações serão feitas e tudo está identificado, coloque o diluente **DIAMOND** (**frasco com líquido azul**, que deve estar na geladeira) nos frascos de acordo com a quantidade de lâminas que irá precisar, lembrando sempre que cada lâmina utiliza 100ul (microlitros) de reagente, que é a quantidade necessária para cobrir todo o corte nela contido;
5. Depois que o **DIAMOND** estiver nos tubos acrescente o anticorpo de acordo com a necessidade de cada reação e a quantidade de lâminas. Agora deixe este material preparado em um canto, logo ele será utilizado;
6. Assim que as lâminas saírem da recuperação antigênica e repousarem em temperatura ambiente por 5 minutos deverão passar pelo **BLOQUEIO DE PEROXIDASE**;
   1. Observação: O recipiente que ficou dentro da panela pode ter seu líquido descartado normalmente na pia. Já o segundo frasco voltará para panela e será utilizado na próxima vez como primeira parte do processo.
   2. Continuando o processo de **BLOQUEIO DE PEROXIDASE**, tire as lâminas do suporte e coloque-as na bandeja rapidamente (e em ordem numérica). Agora é só acrescentar o Bloqueio com uma Pepeta de 1000ul (ponteira azul), derrame uma quantidade de líquido necessário para cobrir o corte e deixe agir por 10 minutos. Apenas verifique de vez em quando se o líquido não está escorrendo do corte.
7. Ao término do Bloqueio lave em água corrente para retirar o bloqueio (não deixe a água cair diretamente nas lâminas);
8. Agora o material deverá passar por **TAMPÃO PBS**, será realizado 2 banhos de 5 minutos com troca de reagente entre cada banho;

**10.2.** Observação: Para preparo do **TAMPÃO PBS**, despeje 950ml de água destilada e 50ml de **IMUNNO/DNA WASHER** (TAMPÃO DE LAVAGEM). Misture-o e pronto.

1. Finalizado o banho os anticorpos serão adicionados as lâminas de acordo com cada identificação e ficarão em estado de incubação até o dia seguinte (*OVERNIGHT*).

**PASSO-A-PASSO APÓS A INCUBAÇÃO**

1. Lave as lâminas em **TAMPÃO PBS**, realizando 2 banhos de 5 minutos (após cada banho troque o tampão);
2. Depois da lavagem deixe as lâminas mergulhadas no tampão e tire-as aos poucos, seque-as e acrescente o **AMPLIFICADOR** (frasco com tampa amarela que se encontra na geladeira). Para aplicar o amplificador pingue 2 gotas em cada lâmina e deixe agir por 10 minutos, assim que o tempo terminar repita o processo de lavagem com tampão pbs (2 banhos de 5 minutos);
3. Volte a geladeira e pegue agora o **POLÍMERO** (frasco com tampa vermelha que se encontra no mesmo lugar onde estava o frasco anterior). O polímero deve ser aplicado da mesma forma do reagente anterior e lavado da mesma forma;
4. Agora começa o processo de revelação, neste processo tire os cortes do tampão seque-os rapidamente e acrescente o **DAB** por 10 minutos;

**4.1.** Observação: Para preparo do **DAB** pegue o frasco com regulação conta gotas e acrescente a quantidade necessária de **DAB Buffer** (frasco grande) de acordo com a quantidade de lâminas que tiver e então adicione o **DAB Cromógeno** (frasco menor), lembrando que a diluição é de 1/50 (1 para 50), ou seja, a cada 50ul de Buffer adicione 1ul de Cromógeno.

1. Incubado o **DAB** lave as lâminas em água corrente até tirar o mesmo e faça uma contra coloração com Hematoxilina no tempo normal de HE, lave normalmente em água e desidrate em álcool limpo (separado para Imuno) e monte as lâminas.