

21. Processamento de tecidos para imuno-histoquímica

1. Fixar os tecidos que serão futuramente processados para IHC, utilizando Solução Tamponada de Formol a 10% ou Metarcam;
2. O emblocamento do material em parafina deve ser feito em até 48 horas após a fixação;
3. Os blocos de tecidos podem ser armazenados indefinidamente para utilização em IHC.

Reagentes e Soluções:

1. Solução Tamponada de Formol a 10%:

Reagente	Quantidade
Formol (37 ou 40%)	100mL
Fosfato de sódio anidro dibásico (Na_2HPO_4)	6,5g
Fosfato ácido monobásico de potássio (KH_2PO_4)	4,0g
Água Destilada qsp	1L

2. Metarcam:

- a) Fixar o tecido por 24 horas.

Reagente	Quantidade
Álcool metílico	60 ml
Clorofórmio	30 ml
Ácido Acético	10 ml

22. Imuno-histoquímica

1. Desparafinização:

- Colocar lâminas em um suporte e depois mergulhá-las em Xilol (100%) para retirar a parafina. Incubar em estufa à 60°C por 30 minutos ou à temperatura ambiente por 1h;
- Incubar as lâminas em Xilol a temperatura ambiente por 1 minuto fazendo movimentos leves,

2. Hidratação:

- Incubar em álcool 96° temperatura ambiente por 1 minuto com movimentos leves;
- Incubar em álcool 90° temperatura ambiente por 1 minuto com movimentos leves;
- Incubar em álcool 80° temperatura ambiente por 1 minuto com movimentos leves;
- Incubar em álcool 70° temperatura ambiente por 1 minuto com movimentos leves;
- Lavar em água corrente por 3 minutos e após em água destilada por 1 minuto.

3 Inativação das peroxidases endógenas:

- Incubar as lâminas em recipiente com H₂O₂ (10V ou 3%) por 10 minutos, trocar a H₂O₂ e deixar por mais 10 minutos;
- Lavar em água corrente por 5 minutos.

4. Recuperação antigênica:

- Transferir as lâminas para um suporte (berço) e lavá-las com água destilada durante 1 minuto;
- Incubar com Proteinase K 0,05% em PBS (pH 7,8 – 8,0), adicionar uma gota sobre o tecido, incubar por 25 minutos em estufa 37°C;
- Lavar as lâminas em água corrente por 5 minutos.

5. Bloqueio da avidina e biotina endógena:

- Incubar com soro equino 5% em água destilada por 15 minutos,

- Lavar as lâminas em água corrente por 5 minutos. Após, lavar com água destilada durante 1 minuto;
- Incubar com 5% leite em pó desnatado em água destilada por 30 minutos à temperatura ambiente;
- Lavar em água corrente por 5 minutos;
- Lavar com água destilada durante 1 minuto;
- Lavar 2X com PBS por 5 minutos, após a última lavagem secar cuidadosamente as lâminas com papel toalha (cuidado para não remover o tecido).

6. Incubação com o anticorpo primário:

- Incubar com o anticorpo primário em uma câmara úmida por 18h à 4°C,
 - a) BHV-5 – mAb 2F9 (1:1000),
 - b) BVDV - mAb 15C5;
- Remover o anticorpo e lavar com água corrente;
- Lavar 2x com PBS por 5 minutos.

7. Incubação com anticorpo secundário:

- Secar as lâminas com papel toalha;
- Diluir o anticorpo secundário (1:100) em PBS pH 7,2 e incubar por 30 minutos à 30°C;
- Preparar a solução ABC. A solução ABC deve ser preparada 30 minutos antes do momento da utilização. Fazer isso logo após incubar as lâminas com o anticorpo secundário
- Lavar as lâminas em água corrente;
- Lavar 2X com PBS por 5 minutos;
- Secar as lâminas com papel toalha e adicionar a Solução ABC.
- Incubar por 30 minutos à 30°C;
- Lavar as lâminas em água corrente por 3 minutos;
- Lavar 2x com PBS por 5 minutos;
- Transferir as lâminas para a mola.

8. Adição do substrato:

- Incubar as lâminas na solução de DAB por 3 minutos (em câmara escura);
- Lavar as lâminas em água corrente por 3 minutos.

9. Coloração com hematoxilina, desidratação e montagem da lâmina:

- Corar as lâminas com hematoxilina por 1 minuto;
- Lavar em água corrente por 2 minutos;
- Incubar em álcool absoluto por 2 minutos;
- Incubar novamente com álcool absoluto por mais 1 minuto. (utilizar um segundo recipiente);
- Incubar novamente com álcool absoluto por mais 1 minuto. (utilizar um terceiro recipiente);
- Incubar em xilol por 2 minutos à temperatura ambiente;
- Remover o xilol, secar as lâminas com papel toalha;
- Adicionar uma gota de bálsamo do Canadá e montar com a lamínula, fechar as bordas com esmalte.

Reagentes e Soluções:
1. PBS (pH 7,2):

Reagentes	Quantidades
Na ₂ HPO ₄	1,48g
KH ₂ PO ₄	0,43g
NaCl	7,2g
KCl	0,2g
Água Destilada qsp	1L

2. Solução de DAB:

Reagente	Quantidade
PBS	100 ml
H ₂ O ₂	1 ml
DAB	60mg

3. Solução ABC:

Reagentes	Quantidades
Componente A	1 gota
Componente B	1 gota
Componente C	1 gota
PBS (pH 7,2)	1mL

4. Proteinase K

5. Álcool:

- Álcool 96%
- Álcool 90%
- Álcool 80%
- Álcool 70%

6. Informações do Kit:

7. Informações DAB

8. Hematoxilina/ Methyl Green: Informações e Concentrações

OBS.: O DAB é tóxico e carcinogênico, sempre use luvas. Para inativá-lo adicione hipoclorito de sódio.

23. Imunoistoquímica para β -galactosidase em cultivo celular

(Sambrook, 2001 Molecular Cloning)

1. Utilizar células transfectadas/infectadas que estejam expressando β -galactosidase
2. Lavar as células 2 X com 2mL de PBS pH 7,4.
3. Fixar as células com 5mL da solução de Fixação.
4. Lavar as células 1 X com PBS pH 7,4.
5. Adicionar 3mL da solução de coloração.
6. Incubar à 37°C as células até o aparecimento da coloração azul (monitorar por 2-24 horas).

Reagentes e Soluções:

1. Solução de Fixação:

Reagentes	Quantidades
Formaldeído	2% (v/v)
Glutaraldeído	0,2% (v/v)

2. PBS (pH 7,4):
3. Solução de Coloração (Sal Inorgânico + X-Gal.) – 10mL:

Reagentes	Quantidades
Ferricianeto de potássio ($K_3Fe[CN]_6$) - MW – 329,2	5mM - 0,01646g
Ferrocianeto de potássio ($K_4Fe[CN]_6$) - MW – 422,4	5mM - 0,02112g
Cloreto de magnésio ($MgCl_2$) - MW – 95,21	2mM - 0,00190g
PBS 1X (pH 7,4)	10mL
X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactosidase)	1mg/mL - 0,01g

OBS.: - Prepare uma solução estoque de X-gal à 20mg/mL diluída em dimetilformamida, estoque -20°C. Use esta solução estoque para preparar a solução de trabalho 1mg/mL, que será usada para corar as células;

- Prepare a solução sem X-Gal., armazene à 4°C e em recipiente escuro (validade 30 dias),
- Adicione o X-Gal. imediatamente antes de utilizar a solução de coloração,
- Solução de PBS, ajuste o pH 7,4 e armazene em temperatura ambiente.