

## 18. Imunoperoxidase em cultivo celular

1. Remover o meio que está cobrindo o tapete celular com o auxílio de uma pipeta.
2. Lavar 2x o tapete celular com 2mL de PBS estéril, cuidando para não danificar a monocamada de células.
3. Fixar as células com metanol/acetona (50:50):  
 Placa de 6 cavidades: 1mL/cavidade;  
 Placa de 24 cavidades: 500µL/cavidade;  
 Placa de 96 cavidades: 100µL/cavidade;
4. Incubar em temperatura ambiente durante 20 minutos. Opcionalmente, pode-se fixar com acetona/PBS (30:70).
5. Lavar 2x o tapete celular com 2mL de PBS estéril, cuidando para não danificar a monocamada de células.
6. Adicionar o anticorpo primário (monoclonal ou soro policlonal) na diluição escolhida, utilizando 300µL/cavidade. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora e agitar a cada 15 minutos. A incubação pode ser realizada a 37°C, porém existe a possibilidade do *background* ser alto, principalmente quando for usado um policlonal (soro).
7. Lavar 2x o tapete celular com 2mL de PBS estéril, cuidando para não danificar a monocamada de células.
8. Diluir o anticorpo secundário marcado com a enzima peroxidase. Utilizar 300µL/cavidade e incubar a temperatura ambiente (ou 37°C) durante 1 hora, agitando a cada 15 minutos. Opcionalmente, pode-se diluir o Ac em PBS + 0,05% Tween 20.
9. Lavar 2x o tapete celular com 2mL de PBS estéril, cuidando para não danificar a monocamada de células.
10. Preparar o substrato: AEC + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 50mM Tampão Acetato.
11. Adicionar 1mL de substrato em cada cavidade e incubar durante alguns minutos até o desenvolvimento da coloração desejada. Quando a intensidade da

cor desejada for obtida, a reação deve pode interrompida através da remoção do substrato e adição de PBS.

**Tabela-** Anticorpos primários e secundários utilizados para a realização da Imunoperoxidase.

<b>PRIMÁRIO</b>	<b>SECUNDÁRIO</b>
Monoclonal	Anti-mouse/Camundongo
Coelho (soro)	Anti-Rabbit/ Coelho
Cobaia (soro)	Anti-Guinea Pig
Ovelha	Anti-Sheep/ Ovelha
Bovino	Anti-Bovine/ Bovino
Equino	Anti-Horse/ Equino
<b>HRPO</b>	Peroxidase
<b>FITC</b>	Fluorescência

**Reagentes e Soluções:**

1. PBS estéril
2. PBS + 0,05% Tween 20
3. AEC – Solução de estoque. Guardar em um frasco escuro e a 4°C.

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
AEC	0,05g
Dimethylformamide	10 mL

4. 50mM Tampão de Acetato (pH 5,2)

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Acetato de Sódio	1,02g
Ácido Acético Glacial	2,9mL
Água	qsp 250mL

5. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 volumes

6. AEC – Solução de uso

Reagente	Quantidade
50mM Tampão de Acetato	2,375mL
AEC – Solução de estoque	125µL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10 volumes	20µL

7. PBS + 0,05% Tween 20: