

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 004
		Edição: 05
Área: : Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 1/5
Assunto: Reações Imunohistoquímica Picture Max Polymer Detection System - INVITROGEN/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

*ÍNDICE

1. OBJETIVO
2. ABRANGÊNCIA
3. RESPONSABILIDADES
4. DOCUMENTOS COMPLEMENTARES
5. DEFINIÇÕES
6. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS
7. FLUXOGRAMAS
8. ANEXOS
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Edição	Alteração
01	Emissão inicial do documento em 27/07/2015. <i>Nota: inicialmente o conteúdo deste documento estava disponível no ONADOCS , POP 013; com data de vigência de 27/07/2015.</i>

Elaborado por: Suely Aparecida Pinheiro Palomino Biologista	27/07/2015	Aprovado por: Prof.Dra Maria Lourdes Higuchi Pesquisadora	15/03/21
--	------------	--	----------

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 004
		Edição: 05
Área: : Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 2/5
Assunto: Reações Imunohistoquímica Picture Max Polymer Dectetion System - INVITROGEN/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

1. OBJETIVO

- 1.1 Estabelecer normas para o preparo de materiais biológicos parafinados, utilizando o Kit Picture Max Polymer Dectetion System - INVITROGEN, nas Reações de Imunoperoxidase, para a marcação de Antígenos

2. ABRANGÊNCIA

- 2.1 Todos os colaboradores, alunos e estagiário.

3. RESPONSABILIDADES

- 3.1 Todos os profissionais que realizarem, as Reações de Imunoperoxidase, utilizando o Kit Picture Max Polymer Dectetion System - INVITROGEN, para a marcação de Antígenos

4. DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

- 4.1 Não aplicável.

5. DEFINIÇÕES

- 5.1 O kit de Detecção Polímero Picture™-Max, utilizado nas reações de Imunoperoxidase em material biológico parafinado, possui a tecnologia de polímero HRP da Invitrogen para gerar sensibilidade excelente e alta especificidade. A tecnologia de polímero da Invitrogen permite intensa marcação de antígenos nucleares, citoplasmáticos e de membrana. As desvantagens de outros sistemas de polímeros, está na perda da penetração celular, resultando em uma fraca sensibilidade. O polímero conjugado da Invitrogen contém possui múltiplos HRPs, o que gera excelente sensibilidade. O kit de Detecção Polímero Picture™-Max não contém biotina ou estreptavidina, dessa forma a reação de fundo inespecífico devido a atividade de biotina endógena é completamente evitada

6. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

- 6.1 **Preparação da Lâmina com material biológico**

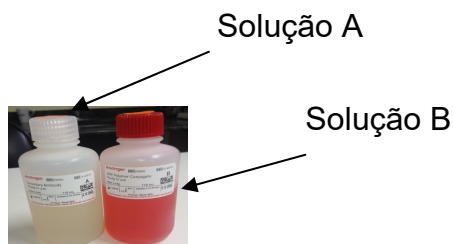
	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 004
		Edição: 05
Área: : Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 3/5
Assunto: Reações Imunohistoquímica Picture Max Polymer Detection System - INVITROGEN/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

- 6.1.1 Para cada anticorpo que será marcado pela reação de Imunoperoxidase, terá uma lâmina com a amostra do material biológico, fixado em formol, processado e parafinado e uma lâmina com o material biológico positivo, para o anticorpo específico, que será pesquisado
- 6.1.2 Desparafinação:
 - 6.1.2.1 Seguir orientações do POP TEC 001
- 6.1.3 Recuperação
 - 6.1.3.1 O anticorpo que necessitar de recuperação, seguir o processo recomendado na bula e escolher um dos Tampões, TRIS/EDTA pH9 (POP TEC nº 7), Citrato pH 6 (POP TEC nº 8), Tripsina Sigma 0,15% (POP TEC nº9) e Trilogy™ (POP TEC nº3).
 - 6.1.3.2 Após a recuperação, quando feita na Pascal e deixar a cuba em repouso sobre a pia por 5 minutos. Lavar várias vezes de água corrente. .(POP TEC 14). Com a Tripsina é só lavar varias vezes na água corrente.
- 6.1.4 Bloqueio da Peroxidase endógena do tecido:
 - 6.1.4.1 As lâminas são mergulhadas em peróxido de hidrogênio 6% (água oxigenada 20v) diluída em água injetável, em dois banhos de 8 minutos.
 - 6.1.4.2 Lavar bem em água corrente (leve).
 - 6.1.4.3 Secar as lâminas suavemente e circundar, os cortes com Pap-pen. Mergulhar as lâminas em tampão Tampão PBS pH 7,4+ Tween 0,1% (POP 10)
- 6.1.5 Bloqueio de Proteínas Inespecíficas do tecido:
 - 6.1.5.1 Secar ao redor do Pap-Pen, pingar CAS Block (Invitrogen 00-8120) sobre os cortes
 - 6.1.5.2 Incubar em câmara úmida durante 10 minutos à 26°C± 5°C
- 6.1.6 Anticorpo primário:
 - 6.1.6.1 Escorrer o CAS Block (Invitrogen 00-8120), secar em volta dos cortes e pingar o Anticorpo Primário, diluído com o Antibody Diluent Solution (Invitrogen 00-3218), de acordo com a padronização prévia realizada.
 - 6.1.6.2 Incubar das lâminas por 1h em câmara úmida à 26°C± 5°C.
 - 6.1.6.3 Lavar em Tampão PBS pH 7,4+ Tween 0,1%(POP 10)

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 004
		Edição: 05
Área: : Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 4/5
Assunto: Reações Imunohistoquímica Picture Max Polymer Detection System - INVITROGEN/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

6.1.7 Detecção do Antígeno

6.1.7.1 Invitrogen Picture Max Polymer Detection System 87-8983/ mouse, rabbit, guinea pig and rat primary



6.1.7.2 Solução **A** / Polímero Picture Max:

6.1.7.2.1 Após a incubação, escorrer o excesso de anticorpo e lavar as lâminas em Tampão PBS pH 7,4+ Tween 0,1%(POP 10) e secar em volta dos cortes. Pingar a Solução **A** e incubar as lâminas por 30 minutos em câmara úmida à 26° C $\pm$ 5°C.

6.1.7.3 Solução **B** / Polímero Picture Max:

6.1.7.3.1 Após a incubação, escorrer o excesso da solução **A** e lavar as lâminas em Tampão PBS pH 7,4+ Tween 0,1% , secar em volta dos cortes. Pingar a Solução **B** e incubar as lâminas por 30 minutos em câmara úmida à 26° C $\pm$ 5°C.

6.1.8 Revelação da Reação:

6.1.8.1 Após a incubação lavar as lâminas em Tampão PBS pH 7,4 + Tween 0,1% e secar em volta dos cortes.

6.1.8.2 Pingar o DAB - Kit K3468 - DAKO, em uma diluição 1/50, durante 1 minuto a temperatura ambiente e lavados em água corrente

6.1.8.3 Verificar no microscópio a intensidade da reação revelada

6.1.9 Contra coloração:

6.1.9.1 As lâminas depois de lavadas em água corrente são mergulhadas em uma cuba com Hematoxilina durante 40 segundos

6.1.9.2 Lavar bem em água corrente retirando todo o excesso da Hematoxilina

6.1.9.3 Mergulhar durante 10 segundos em água amoniacal (Água de Scott)

6.1.10 Montagem das lâminas:

6.1.10.1 Seguir orientações do POP TEC 02

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 004
		Edição: 05
Área: : Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 5/5
Assunto: Reações Imunohistoquímica Picture Max Polymer Dectetion System - INVITROGEN/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

6.2 **Limpeza,**

6.2.1 Após o término da reação, o local deverá ser limpo com uma gaze com álcool 70°C, guardar todo material utilizado. Conservar o local limpo e organizado

6.3 **EPIs:**

6.3.1 Utilizar luvas nitrílicas e avental.

7. **FLUXOGRAMAS**

7.1 Não aplicável.

8. **ANEXOS**

8.1 Não aplicável.

9. **REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA**

9.1 Catalogo 2010/2011 - IHC- Histofine Polymer Detection System - Nichirei Biosciences INC.