

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 006
		Edição: 05
Área: : Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 1/5
Assunto: : Reações Imunohistoquímica N-HISTOFINE Universal Immunoperoxidase Poymer Anti mouse HRP - Nichirei Biosciences /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

<i>Edição</i>	<i>Alteração</i>
01	Emissão inicial do documento em 27/07/2015. <i>Nota: inicialmente o conteúdo deste documento estava disponível no ONADOCS , POP 013B; 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 006
		Edição: 05
Área: : Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 2/5
Assunto: : Reações Imunohistoquímica N-HISTOFINE Universal Immunoperoxidase Poymer Anti mouse HRP - Nichirei Biosciences /Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

1. OBJETIVO

- 1.1 Estabelecer normas para o preparo de materiais biológicos parafinados, utilizando o Kit N-HISTOFINE- Universal Immuno-peroxidase Polymer Anti mouse HRP , da marca Nichirei Biosciences, 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 Immunoperoxidase, utilizando o Kit N-HISTOFINE- Universal Immuno-peroxidase Polymer Anti mouse HRP , da marca Nichirei Biosciences, para a marcação de Antígenos .

4. DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

- 4.1 Não aplicável.

5. DEFINIÇÕES

- 5.1 O N-HISTOFINE- Universal Immuno-peroxidase Polymer Anti mouse HRP , da marca Nichirei Biosciences é um Kit de detecção desenvolvido especificamente para permitir a coloração imunohistoquímica em seções de tecido humano fixadas em formalina e embebidas em parafina. É um polímero marcado preparado pela combinação de polímeros de aminoácidos com peroxidase (PO) e anticorpo secundário, que é reduzido a fragmento Fab '. Para eliminar a coloração de fundo, a absorção em fase sólida do anticorpo secundário é realizada com soro humano..

6. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

6.1 Preparação da Lâmina com material biológico.

- 6.1.1 Para cada anticorpo que será marcado pela reação de Immunoperoxidase, 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

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 006
		Edição: 05
Área: : Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 3/5
Assunto: : Reações Imunohistoquímica N-HISTOFINE Universal Immunoperoxidase Poymer Anti mouse HRP - Nichirei Biosciences /Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

- 6.1.2 Desparafinação:
- 6.1.2.1 Seguir orientações do POP TEC 01
- .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 n° 7), Citrato pH 6 (POP TEC n° 8), Tripsina Sigma 0,15% (POP TEC n°9) e Trilogy™ (POP TEC n°3).
- 6.1.3.2 Após a recuperação, quando feita na Pascal,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 TEC 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 TEC 10).
- 6.1.7 Detecção do Antígeno
- 6.1.7.1 N-HISTOFINE- Universal Immuno-peroxidase Polymer Anti mouse HRP, da marca Nichirei Biosciences, guardado na geladeira

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 006
		Edição: 05
Área: : Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 4/5
Assunto: : Reações Imunohistoquímica N-HISTOFINE Universal Immunoperoxidase Poymer Anti mouse HRP - Nichirei Biosciences /Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021



- 6.1.7.2 Pingar nas lâminas deixando 30 minutos a temperatura ambiente. Lavar em Tampão PBS pH 7,4+ Tween 0,1% (POP TEC 10)
- 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
- 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.



PROCEDIMENTO OPERACIONAL

Número:
POP TEC 006

Edição: 05

Área: : Laboratório de Patologia Cardíaca

Página: 5/5

Assunto: : Reações Imunohistoquímica
N-HISTOFINE Universal Immunoperoxidase Poymer Anti
mouse HRP - Nichirei Biosciences /Limpeza do Local

Vigência: 08/03/2021

7. FLUXOGRAMAS

7.1 Não aplicável.

8. ANEXOS

8.1 Não aplicável.

9. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

9.1 Principle and Protocol - Nichirei Bioscience.