

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 011
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 1/5
Assunto: Hibridização <i>in situ</i> /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 018; 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 011
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 2/5
Assunto: Hibridização <i>in situ</i> /Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

1. OBJETIVO

- 1.1 Estabelecer normas para o preparo de materiais biológicos parafinados, para a reação de Hibridização *in situ*

2. ABRANGÊNCIA

- 2.1 Todos os colaboradores, alunos e estagiário.

3. RESPONSABILIDADES

- 3.1 Todos os profissionais que realizarem, as Reações de Hibridização *in situ*, para a marcação de agentes infecciosos.

4. DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

- 4.1 .Não aplicável

5. DEFINIÇÕES

- 5.1 A hibridização *in situ* é uma técnica que permite a detecção de sequências específicas de DNA, ou de RNA, em um corte de tecido fixados em formol e parafinados, utilizando-se sequências complementares de DNA ou RNA, em fita única, marcadas, constituindo-se as “sondas,” que podem ser de DNA ou RNA clonados, ou de oligonucleotídeos sintéticos. As sondas A hibridização *in situ* é útil na detecção de genoma dos agentes infecciosos t

6. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

- 6.1 **Preparação da Lâmina com material biológico.**
 - 6.1.1 Para cada sonda que será marcado pela reação de Hibridização *in situ*, terá uma lâmina com a amostra do material biológico, fixado em formol, processado e parafinado e uma lâmina com o material biológico positivo, para a sonda, que será pesquisada
 - 6.1.2 Desparafinação:
 - 6.1.2.1 Seguir orientações do POP TEC 01
 - 6.1.3 Permeabilização da Membrana Celular

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 011
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 3/5
Assunto: Hibridização <i>in situ</i> /Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

- 6.1.3.1 A Hibridização *in situ* precisa de permeabilização celular, seguir o processo recomendado pela padronização da sonda realizada pelo laboratório 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 A permeabilização celular, 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 TBS pH 7,6+ Tween 0,1% (POP TEC 12)
- 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 Sondas::
- 6.1.6.1 Escorrer o CAS Block, secar em volta dos cortes .
- 6.1.6.2 Pingar as Sondas, diluidas com o diluidor próprio, de acordo com a reação de padronização realizada previamente,
- 6.1.7 Denaturação
- 6.1.7.1 Cobrir com uma lâminula, o material biológico com a sonda, incubando por 12 minutos em câmara seca à 95°C ± 1°C.
- 6.1.7.2 Em seguida retirar as lâminas da câmara seca ,colocar em uma câmara úmida e incubar na temperatura e no tempo, que já foram padronizados previamente.
- 6.1.7.3 Retirar as lâminulas de cima do material biológico e lavar bem em Tampão TBS pH 7,6 + Tween 0,1%

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 011
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 4/5
Assunto: Hibridização <i>in situ</i> /Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

- 6.1.8 Solução de Estringência 1xSSC (GenPoint DakoCytomation- California/ Code Nº K0620 -
 - 6.1.8.1 Preparar na diluição 1/50. Aquecer a 50°C em B.M .
 - 6.1.8.2 Mergulhar as lâminas e manter por 10 minutos.
 - 6.1.8.3 Lavar bem em Tampão TBS pH 7,6 + Tween 0,1%(POP 12)
 - 6.1.8.4 Obs: A solução Estringência acabou, no momento está sendo usada a Estringência in House 25X. Preparo no POP 012
- 6.1.9 Detecção das Sondas positivas
 - 6.1.9.1 Genpoint-Tyramide Signal Sistem for Biotinilated Probes K0620, guardado na geladeira
 - 6.1.9.2 Streptoavidina 1^{ária} diluída 1:100 (GenPoint DakoCytomation- California/ Code Nº K0620)
 - 6.1.9.2.1 Pingar em cima dos cortes de tecido, manter 15 min a Temperatura Ambiente.
 - 6.1.9.2.2 Lavar bem em Tampão TBS pH 7,6 + Tween 0,1%
 - 6.1.9.2 Biotinyl Tyramide
 - 6.1.9.2.1 Pingar em cima dos cortes de tecido, manter 15 min a Temperatura Ambiente.
 - 6.1.9.2.2 Lavar bem em Tampão TBS pH 7,6 + Tween 0,1%
 - 6.1.9.3 Streptoavidina 2^{ária}
 - 6.1.9.3.1 Pingar em cima dos cortes de tecido, manter 15 min a Temperatura Ambiente.
 - 6.1.9.3.2 Lavar bem em Tampão TBS pH 7,6 + Tween 0,1%
- 6.1.10 Revelação da Reação:
 - 6.1.10.1 Todos os anticorpos após a incubação serão lavados em Tampão TBS pH 7,6 + Tween 0,1% e secados em volta dos cortes
 - 6.1.10.2 Pingar em cima o DAB - Kit K3468 - DAKO, em uma diluição 1/50, durante 1 minuto a Temperatura Ambiente e lavados em água corrente
- 6.1.11 Contra coloração:
 - 6.1.11.1 Mergulhar as lâminas na Hematoxilina durante 40 segundos
 - 6.1.11.2 Lavar bem em água corrente
 - 6.1.11.3 Mergulhar durante 10 segundos em Água Amoniacal
- 6.1.12 Montagem das lâminas

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 011
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 5/5
Assunto: Hibridização <i>in situ</i> /Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

6.1.12.1 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.

7. **FLUXOGRAMAS**

7.1 Não aplicável.

8. **ANEXOS**

8.1 Não aplicável.

9. **REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA**

9.1 McNICOL, AM E FRAQUHARSON, MA. In situ hybridization and its diagnostic applications in pathology. J Pathol. 1997.

9,.2 Validação das reações de hibridização in situ cromogênica para detecção de DNA e RNA em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina, Raquel L. Monteiro, et col,2019