

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL</b>	Número: <b>POP TEC 15</b>
		Edição: 05
<b>Área:</b> Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 1/5
<b>Assunto:</b> Imunoeletrônica Reação com Ouro Coloidal / 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 028; com data de vigência de 27/07/2015.</i>

Elaborado por: <b>Suely Aparecida Pinheiro Palomino</b> <b>Joyce Kawakami</b>  Biologistas	27/07/2015	Aprovado por:  <b>Prof.Dra Maria Lourdes Higuchi</b> Pesquisadora	15/03/21
--	------------	--	----------

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL</b>	Número: <b>POP TEC 15</b>
		Edição: 05
<b>Área:</b> Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 2/5
<b>Assunto:</b> Imunoeletrônica Reação com Ouro Coloidal / Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

## 1. OBJETIVO

- 1.1 Estabelecer normas para o preparo de materiais biológicos, para a reação de Imunoeletrônica, com ouro coloidal em tela de Niquel revestidas com películas de Parlódio

## 2. ABRANGÊNCIA

- 2.1 Todos os colaboradores, alunos e estagiário.

## 3. RESPONSABILIDADES

- 3.1 Todos os profissionais que realizarem, as Reações de Imunoeletrônica

## 4. DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

- 4.1 Não aplicável

## 5. DEFINIÇÕES

- 5.1 A Técnica de Imunoeletrônica,, que utiliza ouro coloidal, para a marcação de agentes infecciosos e matrix celular, visualizados com o auxílio do microscópio eletrônico de transmissão (MET), vem acrescentar um grande potencial de informações, já que congrega o elevado poder de resolução do MET e a fácil visualização e precisão da imunolocalização, utilizando partículas de ouro como marcador eletro opaco  
Como o Ouro possui diversos tamanhos, facilitará ,marcações múltiplas de vários componentes, em uma mesma amostra, através da Imunoeletrônica

## 6. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

- 6.1 **No 1º dia,**

- 6.1.1 Verificar material estocado e armazenado:

6.1.1.1 Geladeira nº 7 = Protein Block

6.1.1.2 Freezer - 20°C ,nº 10 = PBS pH 7,3 + 1% BSA, PBS pH 8,2 + 1% BSA e PBS pH 7,3

6.1.1.3 Sala de Imunohistoquímica = Água de injeção,

6.1.1.4 Geladeira nº1 = Anticorpo secundário marcado com ouro coloidal

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL</b>	Número: <b>POP TEC 15</b>
		Edição: 05
<b>Área:</b> Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 3/5
<b>Assunto:</b> Imunoeletrônica Reação com Ouro Coloidal / Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

- 6.1.1.5 Geladeira nº 6 = Incubação da reação com o anticorpo primário
- 6.1.1.6 Estocado dentro do armário de sais para Imunohistoquímica e Microscopia Eletrônica = Metaperiodato de sódio (INaO<sub>4</sub>) PM=213.89
- 6.1.2 Soluções usadas na Reação de Imunoeletrônica
- 6.1.2.1 Solução Estoque de Metaperiodato de Sódio
- 6.1.2.1.1 Solução Estoque : 0,2g de Metaperiodato + 1,6 ml de água destilada). A solução só poderá ser utilizada 2 horas após o preparo, neste tempo a solução deve ficar a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.
- 6.1.2.2 Solução de Uso Metaperiodato de Sódio
- 6.1.2.2.1 Diluir a Solução Estoque 1/5 em água de injeção Estoque de Metaperiodato, 1 parte + 4 partes de água de injeção. Filtrar a solução em filtro de seringa 0,22 µm.
- 6.1.3 Desenvolvimento da Reação de Imunoeletrônica
- 6.1.3.1 Telinhas revestidas com Parlódio (Fig 01), Caixa de ponteira de 10 µl ( Fig 02), servindo de base para a realização da reação e Caixa de ponteira 10 µl, revestida com parafilme e telinhas revestidas de Parlódio ( Fig 03)

Figura 01



Figura 02

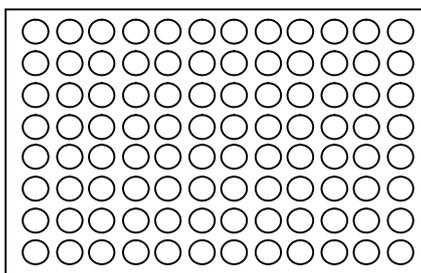
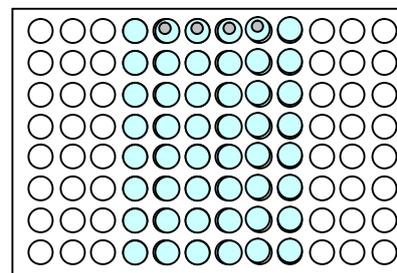


Figura 03

1-2 3 4

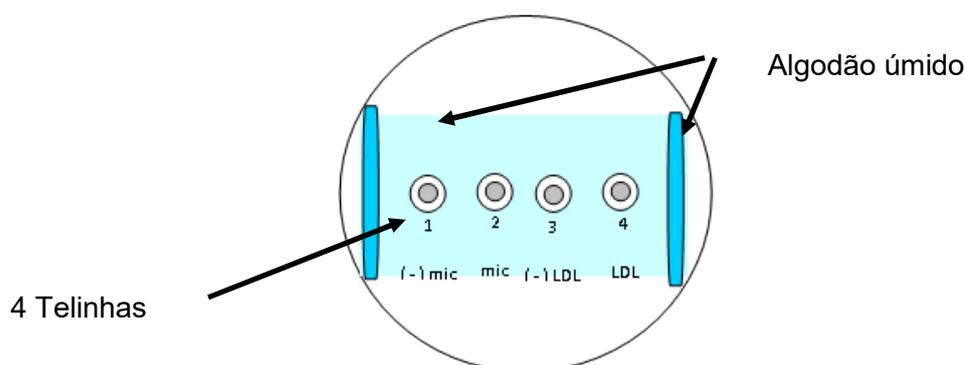


- 6.1.3.2 As telinhas de Níquel revestida com Parlódio ( Fig 01), são hidratadas com água de injeção, e colocadas nos poços (Fig 03), com o lado brilhante para cima, em contato com as soluções
- 6.1.3.3 Pipetar 20 µl da solução de Uso, Metaperiodato de Sódio 1/5, filtrado, durante 1 minuto em Temperatura Ambiente

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL</b>	Número: <b>POP TEC 15</b>
		Edição: 05
<b>Área:</b> Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 4/5
<b>Assunto:</b> Imunoeletrônica Reação com Ouro Coloidal / Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

- 6.1.3.4 Lavar as telinhas em água de injeção 4 vezes por 5 minutos sob agitação constante (Agitador de microplacas nº27).
- 6.1.3.5 Fazer uma pré-gota com Protein Block, e incubar as telinhas por 5 minutos a temperatura ambiente;
- 6.1.3.6 Incubar as telinhas em Protein Block por 1 hora a temperatura ambiente;
- 6.1.3.7 Escorrer o Protein Block das telinhas e secar o excesso, com papel de filtro, deixando a telinha úmida
- 6.1.3.8 Incubar em câmara úmida ( Fig 04), com o Anticorpo Primário por 16 horas a 4°C (Geladeira 6) de acordo com uma padronização prévia.
- 6.1.3.9 Para as telas Controle Negativo, será omitido o Anticorpo Primário.

Figura 04



- 6.2 **No 2º dia, após a Incubação de 16 horas a 4º C**
- 6.2.1 Retirar as telas da incubação, com o Anticorpo Primário a 4 °C
- 6.2.2 Lavar as telinhas 4 vezes em PBS pH 7,3 + 1% BSA por 5 minutos sobe agitação constante,
- 6.2.3 Lavar as telinhas 4 vezes em PBS pH 8,2 + 1% BSA por 5 minutos sob agitação constante;
- 6.2.4 Incubar as telinhas no Anticorpo Secundário marcado com Ouro (como o ouro, tem diferentes tamanhos, escolher o tamanho usado na padronização prévia,), por 1 hora temperatura ambiente, toda a reação deverá estar em local ao abrigo da Luz
- 6.2.5 Lavar as telinhas 4 vezes em PBS + BSA 1% pH 7,3 por 5 minutos, sobe agitação constante;
- 6.2.6 Deixar as telinhas secando de um dia para o outro em uma Placa de Petri revestida com papel de filtro;

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL</b>	Número: <b>POP TEC 15</b>
		Edição: 05
<b>Área:</b> Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 5/5
<b>Assunto:</b> Imunoeletrônica Reação com Ouro Coloidal / Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

6.2.7 No dia seguinte corar as telinhas em solução de Nitrato de Chumbo por 5 minutos e deixar secar a Temperatura Ambiente

### 6.3 **Limpeza**

6.3.1 O local, deverá ser limpo antes e após o uso com gazes embebidas com Álcool 70°C , descartar o material usado. Deixar o local limpo e organizado

### 6.4 **EPIs:**

6.4.1 Utilizar luvas nitrílicas e avental

## 7. **FLUXOGRAMAS**

7.1 Não aplicável

## 8. **ANEXOS**

8.1 Não aplicável.

## 9 **REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA**

9.1 Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas, Antonio Haddad et al, 1998

9.2 Manual sobre Técnicas Básicas em Microscopia Eletrônica, Antonio Haddad et al, 1989