

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 016
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 1/6
Assunto: Imunoeletrônica Dupla Marcação 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

Edição	Alteração
01	Emissão inicial do documento em 27/07/2015. <i>Nota: inicialmente o conteúdo deste documento estava disponível no ONADOCS , POP 029; com data de vigência de 27/07/2015.</i>

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

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 016
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 2/6
Assunto: Imunoeletrônica Dupla Marcação 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 dupla marcação, com ouro coloidal de dois tamanhos diferentes, 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 com tamanhos diferentes, para a dupla 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 imuno-localização, de dois componentes em um mesmo material, utilizando partículas de ouro com tamanhos diferentes como marcador eletro opaco
Como o Ouro possui diversos tamanhos, facilita ,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

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 016
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 3/6
Assunto: Imunoeletrônica Dupla Marcação com Ouro Coloidal/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

- 6.1.1.3 Sala de Imunohistoquímica = Água de injeção,
- 6.1.1.4 Geladeira nº1 = Anticorpo secundário marcado com ouro coloidal
- 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 (INaO₄) 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

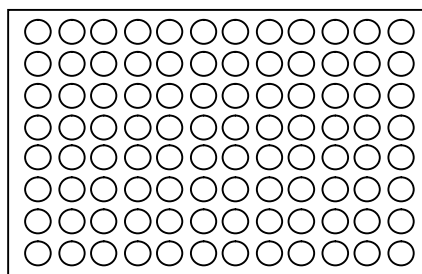
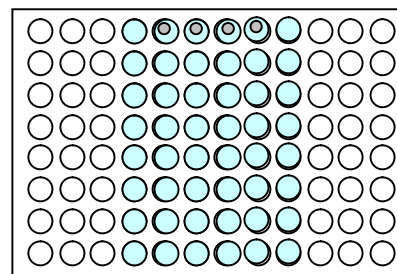


Figura 03

1-2 3 4

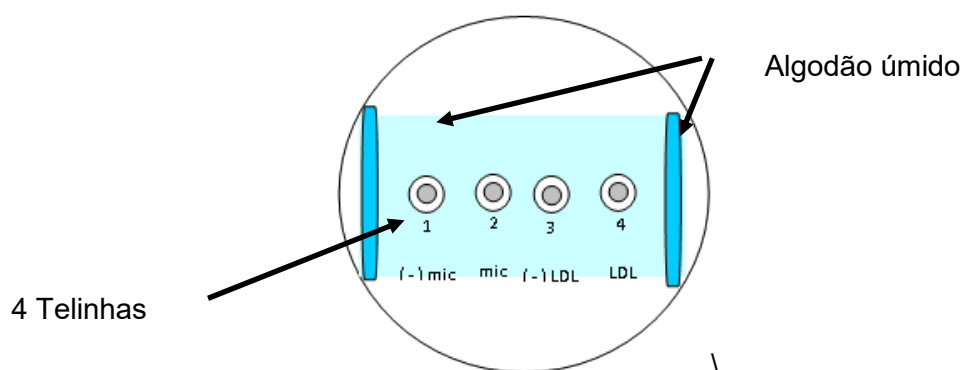


- 6.1.3.2 As telinhas de Níquel revestida com Parlódio (Fig 01), são hidratadas com água de injeção, e colocadas nos poços (Fig 03), com o lado brilhante para cima, em contato com as soluções

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 016
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 4/6
Assunto: Imunoeletrônica Dupla Marcação com Ouro Coloidal/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

- 6.1.3.3 Pipetar 20 µl da solução de Uso, Metaperiodato de Sódio 1/5, filtrado, durante 1 minuto em Temperatura Ambiente
- 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 4° 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 sob 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, com agitação constante;

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 016
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 5/6
Assunto: Imunoeletrônica Dupla Marcação com Ouro Coloidal/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

- 6.2.6 . Incubar as telinhas em Protein Block por 1 hora a temperatura ambiente;
- 6.2.7 Escorrer o Protein Block das telinhas e secar o excesso, com papel de filtro, deixando a telinha úmida
- 6.2.8 Incubar em câmara úmida (Fig 04), com outro, Anticorpo Primário por 16 horas a 4°C (Geladeira 6) de acordo com uma padronização prévia.
- 6.2.9 Para as telas Controle Negativo, será omitido o Anticorpo Primário

6.3 **No 3º dia, após a Incubação de 16 horas a 4º C**

- 6.3.1 Retirar as telas da incubação, com o Anticorpo Primário a 4 °C
- 6.3.2 Lavar as telinhas 4 vezes em PBS pH 7,3 + 1% BSA por 5 minutos sobe agitação constante,
- 6.3.3 Lavar as telinhas 4 vezes em PBS pH 8,2 + 1% BSA por 5 minutos sob agitação constante;
- 6.3.4 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
- 6.3.5 Lavar as telinhas 4 vezes em PBS + BSA 1% pH 7,3 por 5 minutos, sobe agitação constante;
- 6.3.6 Deixar as telinhas secando de um dia para o outro em uma Placa de Petri revestida com papel de filtro
- 6.2.7 No dia seguinte corar as telinhas em solução de Nitrato de Chumbo por 5 minutos e deixar secar a Temperatura Ambiente

6.4 **Limpeza**

- 6.4.1 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

6.5 **EPIs:**

- 6.5.1 Utilizar luvas nitrílicas e avental

7. **FLUXOGRAMAS**

- 7.1 Não aplicável

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 016
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 6/6
Assunto: Imunoeletrônica Dupla Marcação com Ouro Coloidal/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

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