

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 017
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 1/5
Assunto: Microscopia Eletrônica Hibridização <i>in situ</i> (HIS) com sonda ARCH 915 marcada com ouro coloidal 10 nm/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 030; 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 017
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 2/5
Assunto: Microscopia Eletrônica Hibridização <i>in situ</i> (HIS) com sonda ARCH 915 marcada com ouro coloidal 10 nm/Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

1. OBJETIVO

- 1.1 Estabelecer normas para o preparo de materiais biológicos, para a reação de Hibridização *in situ*, com sonda ARCH 915 marcadas ouro coloidal de 10 nm em tela de Níquel 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 Hibridização *in situ*

4. DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

- 4.1 Não aplicável

5. DEFINIÇÕES

- 5.1 A Técnica de Hibridização *in situ*, 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 localização da Hibridização, 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 Hibridização *in situ*.

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, Proteinase K; NaOH 0,5N; Kit Avidina-Biotina; sonda para DNA de Archaea 915; solução de hibridização e solução de estringencia.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 017
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 3/5
Assunto: Microscopia Eletrônica Hibridização <i>in situ</i> (HIS) com sonda ARCH 915 marcada com ouro coloidal 10 nm/Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

- 6.1.1.2 Geladeira nº 1 = Streptavidina marcada com ouro coloidal 10nm
- 6.1.1.3 Freezer - 20°C ,nº 10 = PBS pH 7,3 + 1% BSA, PBS pH 8,2 + 1% BSA e PBS pH 7,3
- 6.1.1.4 Sala de Imunohistoquímica = Água de injeção,
- 6.1.1.5 Geladeira nº1 = Streptavidina marcada com ouro coloidal 10nm
- 6.1.1.6 Estufa nº20 e 21 :Incubação sonda e solução de estrigência
- 6.1.2 Soluções usadas na Reação de Hibridização *in situ*
- 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

Figura 01



Figura 02

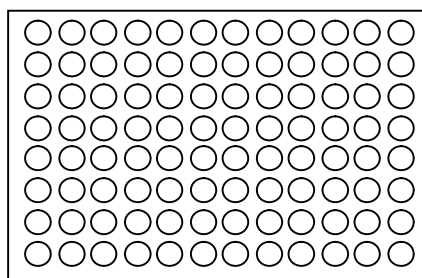
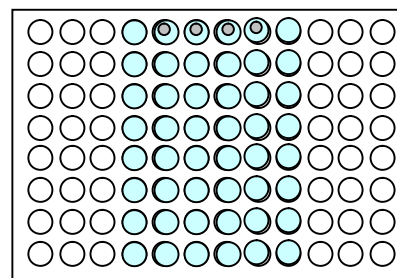


Figura 03

1-2 3 4

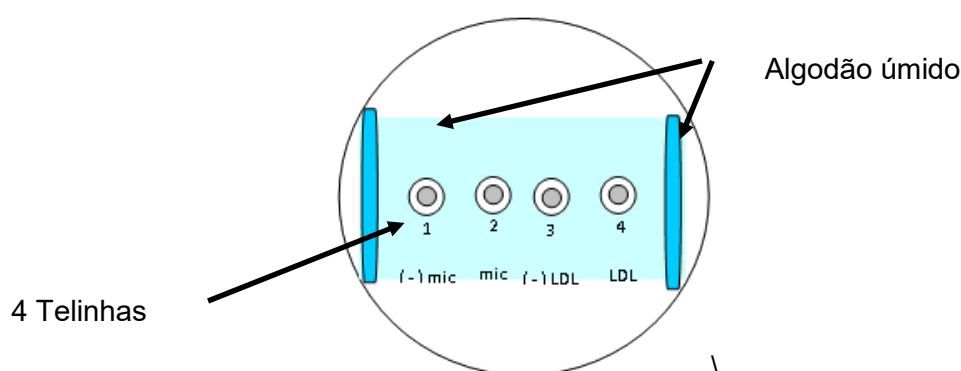


- 6.1.3 As telinhas de Níquel revestida com Parlódio (Fig 01), são hidratadas com água de injeção, e colocadas nos poços (Fig 03), com o lado brilhante para cima, em contato com as soluções
- 6.1.3.1 Pipetar 20 µl da solução de Uso, Metaperiodato de Sódio1/5, filtrado, durante 30 segundos em Temperatura Ambiente. Lavar as telinhas em água de injeção 4 vezes por 5 minutos sob agitação constante (Agitador de microplacas nº27).

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 017
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 4/5
Assunto: Microscopia Eletrônica Hibridização <i>in situ</i> (HIS) com sonda ARCH 915 marcada com ouro coloidal 10 nm/Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

- 6.1.3.2. Incubar em solução de Proteinase K 1/10.000 – 0,5µl Proteinase K + 5000µl PBS pH 7,3 por 1 minutos. Tirar rapidamente após esse tempo; Colocar as telas em gotas de água da farmácia ultrafiltrada 3 vezes por 1 minuto agitando. Lavar cada telinha com um jato de água da farmácia ultrafiltrada por 30 segundos;
- 6.1.3.3 Lavar as telinhas em solução de NaOH 0,5N por 1 minutos. Tirar rapidamente após esse tempo;
- 6.1.3.4 Lavar as telinhas em PBS pH 7,3 por ± 2 minuto. Lavar cada telinha com um jato de água da farmácia ultrafiltrada por 30 segundos. Lavar as telinhas em PBS pH 7,3 por ± 2 minuto;
- 6.1.3.5 Bloqueio com Kit Avidina-Biotina – Deixar 2 minutos em cada solução. Lavar as telinhas em PBS pH 7,3 por ± 2 minuto; Incubar as telinhas em Protein Block por 1 hora a temperatura ambiente. Escorrer o Protein Block das telinhas e secar o excesso, com papel de filtro, deixando a telinha úmida
- 6.1.3.6 Incubar em câmara úmida (Fig 04), com a Sonda para DNA de Archaea 915 (40ng/µl) por 16 horas a 45°C (Estufa n° 20) de acordo com uma padronização prévia. Para as telas Controle Negativo, a tela será incubada na Solução de Hibridização

Figura 04



6.2 No 2º dia de Hibridização

- 6.2.1 Retirar câmara úmida e colocar em cima da bancada e aquecer a estufa n°20 a 50°C

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 017
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 5/5
Assunto: Microscopia Eletrônica Hibridização <i>in situ</i> (HIS) com sonda ARCH 915 marcada com ouro coloidal 10 nm/Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

- 6.2.2 Colocar as telas em Solução de Estingência (Diluir 1/20, a solução Estoque 20x concentrada),, incubar por 3 minutos. Lavar as Telas 2 vezes em PBS pH7,3, 2 minutos cada uma, com agitação constante
- 6.2.3 Incubar as Telas com Streptavidina marcada com Ouro Coloidal 10 nm dil. 1/10 em PBS pH 7,3 por 1 hora, a temperatura Ambiente ao abrigo da Luz. Lavar as Telas 2 vezes em PBS pH7,3, 2 minutos cada uma, com agitação constante
- 6.2.4 Deixar as telinhas secando de um dia para o outro em uma Placa de Petri revestida com papel de filtro. 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