

Procedimentos

Preparar câmara úmida;

Escolher lâminas a serem processadas e marcá-las;

Lavar lâminas, com PBS 1x, por 5 minutos;

Se necessário antigenic retrieval

Deixar lâminas por 1 minuto em solução de antigênic retrieval no microondas;

3.2 Lavar lâminas em tampão fosfato 3 vezes por 5 minutos cada;

Incubar 10 minutos em triton 0.5% em PBS1x;

Lavar lâminas, com PBS 1x, 3 vezes por 5 minutos cada;

Incubar com soro (NGS, NDS ou NRS) por 30 minutos;

Diluir em concentração específica anticorpo primário em soro;

Utilizar 100 µL por lâmina, se a área a coberta for pequena, utilize 50 µL por lâmina.

Incubar com anticorpo primário overnight 4 °C – geladeira da área nova;

Lavar lâminas, com tampão fosfato, 3 vezes por 5 minutos cada;

Diluir anticorpo secundário biotilado (VECTOR) 1:500 no mesmo soro que o primário foi diluído (NGS, NRS ou NDS);

Incubar com anticorpo secundário por 1h;

Logo após colocar o anticorpo secundário:

Preparar ABC - 2 µL A + 96 µL PBS 1x ou tampão fosfato (vortexar) + 2 µL B (vortexar), por lâmina. Obs: trocar de tip a cada nova solução utilizada.

Deixar ABC pelo menos 30 minutos no gelo antes de aplicar sobre as lâminas;

Lavar lâminas, com tampão fosfato, 3 vezes por 5 minutos cada;

Incubar em ABC por 30 minutos;

Lavar lâminas, com tampão fosfato, 3 vezes por 5 minutos cada;

Anticorpos

Cristalinas, pH3, PCNA, pERK e todas as de tipo celular de retina.

Material

Lâminas escolhidas;
Esmalte – segunda gaveta da bancada 2;
Tampão Fosfato 0,1M – bancada 2;
Triton 0.5% – bancada 2;
Soros (NGS, NRS ou NDS) – geladeira da área nova;
Anticorpo – geladeira ou freezer 2 da área nova;
Anticorpo secundário anti-espécie do primário – geladeira da área nova;
Soluções A e B – geladeira da área nova;
Meio de Montagem X.P.D. – armário da área nova.

Soluções

Triton 0,5%

Misture 1 mL de triton 100% em 199 mL de PBS 1x

Soro

Coloque 20mL de tampão fosfato em um falcon.
Pese 0,4g de BSA e misture ao tampão – concentração final será 1%.
A seguir, misture 0,16 mL de Triton 100% - concentração final 0,4%.
Adicione 2mL de soro (NGS, NRS ou NDS) – concentração final 5%
Por fim, complete com tampão fosfato até 40 mL.

Tampão Fosfato 0,1M

Misture 810 mL de solução B (NaH₂PO₄ – fosfato dibásico) 0,2 M com 190 mL de solução A (Na₂HPO₄ – fosfato monobásico) 0,2 M para 1L de tampão fosfato 0,1M.

Lavar lâminas em tampão fosfato, 3 vezes por 10 minutos cada;

Diluir tiramida líquida em Q (1:150);

Incubar com tiramida no escuro por 10 minutos a temperatura ambiente;

Lavar lâminas tampão fosfato, 3 vezes por 10 minutos cada, no escuro

Incubar com Sytox Green 1:15000 por 10 minutos no escuro;

Lavar lâminas, com PBS 1x, 3 vezes por 10 minutos cada, no escuro.

Triton X100	Sigma X100
NGS	Sigma A2153
NDS	Reagentes
NRS	Fonte
Anticorpo Secundário	Vector
Tiramida	Perkin Elmer
Sytox Green	Mol. Probes
ABC	Vector PK6100