

Anticorpos

Ciclina D1, p27, pH3 e PCNA.

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 fluorescente anti-espécie do primário – geladeira LaNCE
Gelvatol – geladeira 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.

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 recuperação antigênica 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;

Incubar com anti-corpo secundário alexa (segundo diluição sugerida – dados na frente da lista em frente a geladeira da bioquímica)

Lavar com Tampão Fosfato 0,1M 3 vezes, por 5 minutos cada.

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

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

Montar lâmina com gelvatol

Reagentes

Fonte