

Protocolo de Imunohistoquímica por Sistemas de Detecção de Polímero Novolink (Leica) – Material incluído em parafina

1º Dia

1. Monte os cortes em lâminas “silanizadas”.
2. Desparafinar em **2 banhos de 10 min cada** de xileno.
3. Reidratar em álcoois graduados: **Álcool 100º, 90º, 70º, 2 min cada**.
4. Lavar em **água corrente**.
5. Lavar em **água destilada**.
6. **Recuperação antigênica: solução Leica 10x diluída 1:10 em água destilada**.
7. Lava em **água desionizada** (água do Milli-Q).
8. **Circular o tecido com caneta de barreira hidrofóbica** (após esta etapa os procedimentos devem ser feitos com pipeta Pasteur na bandeja de incubação IHQ).
9. Neutralizar a peroxidase endógena usando **Peroxidase Block por 6 min**.
10. Lavar em **TBS por 2 x 5 min**.
11. Incubar com **Protein Block por 5 min**.
12. Lavar em **TBS por 2 x 5 min**.
13. Incubar com anticorpo primário diluído de forma otimizada (ver Recomendações de uso para anticorpo primário), **2 h em bancada após overnight**.

2º Dia

14. No dia seguinte retirar da geladeira e deixar **à temperatura ambiente por 10 min**,
15. Lavar em **TBS por 2 x 5 min**.
16. Incubar com **Post Primary por 30 min**.
17. Lavar em **TBS por 2 x 5 min**.
18. Incubar com **Novolink Polymer por 30 min**.
19. Lavar em **TBS por 2 x 5 min** com movimentos suaves.
20. **Solução de trabalho DAB 1:1000** (adicione num frasco 50 µl de DAB Chromogen a 1 mL de Novolink DAB Substrate Buffer -Polymer) **por 3 min**.
21. Lavar em **água corrente**.
22. Contrastar com **Hematoxilina de Harris por 12 seg**.
23. Lavar em **água corrente por 5 min** (torneira deve ficar aberta durante o procedimento).
24. Desidratar em **Álcool 100º, 90º, 70º, 1 min cada**.
25. Xileno **2 banhos de 5 min cada**.
26. Limpar e montar com Entelan.

Observações:

- Podem ser usados para a visualização de anticorpos primários de camundongo e coelho.
- A menos que indicado, usar temperatura ambiente (25 °C).
- Em tecido congelado (use recomendações para anticorpo primário), **comece na etapa 13**.
- Após preparar o DAB utilizar em até 6 h.
- As lâminas devem permanecer o **MESMO TEMPO** no DAB (**cronometrar**), para evitar diferença na intensidade da coloração.

(Thatiany Marinho / 2023)