

**Atenção que numeração da solução dos problemas pode não ser a mesma que os enunciados dos problemas**

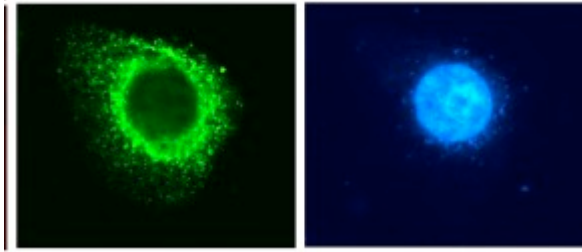
## Problema prático 1

Objectivo: Detetar calnexina (apenas no citoplasma) na linha celular HEC através de imunofluorescência

Lista de materiais disponíveis no laboratório:

- *Fixação:*
  - Paraformaldeído
  - Metanol
- Antigen retrieval (recuperação de epitopos):
  - Proteinase K
  - Tampão citrato para recuperação por calor (heat retrieval)
- *Permeabilização:*
  - **Saponina**
  - Triton X100
- *Agente de bloqueio:*
  - **Albumina de soro de bovino**
  - Agente bloqueador para receptores Fc
  - Agente bloqueador de actividade peroxidase
- *Anticorpo primário:*
  - **anti-calnexina (IgG1; gerado em ratinho)**
  - **anti-calnexina (IgG2; gerado em coelho)**
  - anti-actina (IgG; gerado em ratinho)
  - anti-catepsina L (IgG, gerado em cabra)
  - anti-TF (IgG; gerado em ratinho)
  - Fragmento Fab anti-TF TRITC (IgG)
  - anti-Laminin  $\alpha$ 1 (IgG1; gerado em coelho)
  - anti-Ki67 (IgG; gerado em ratinho)
- *Anticorpo secundário:*
  - Cabra anti-coelho IgG HRP
  - Burro anti-cabra IgG HRP
  - **Cabra anti-ratinho IgG GFP pre-adsorvido**
  - Cabra anti-coelho IgG TRITC pre-adsorvido
  - **Cabra anti-coelho IgG GFP**
  - Burro anti-cabra IgG GFP
- *Controlo de isotipo:*
  - **Controlo de isotipo IgG1**
  - **Controlo de isotipo IgG2**
  - Controlo de isotipo IgG
- *Coloração de contraste:*
  - **DAPI**
  - **Faloidina**
  - Eosina e hematoxilina
- *Meio de montagem:*
  - **Mowiol com DABCO**
  - Glicerol

Coloração final



doi:10.1128/JVI.01968-09

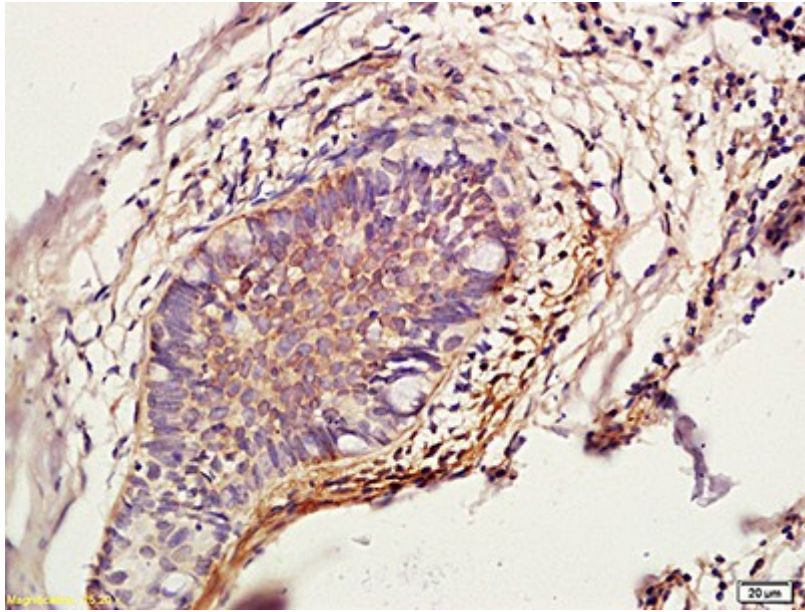
## Problema prático 2

Objectivo: Detetar catepsina L em secções de parafina de pele de ratinho através de microscopia de campo claro

Lista de materiais disponíveis no laboratório:

- *Fixação:*
  - **Paraformaldeído**
  - Metanol
- Antigen retrieval (recuperação de epitopos):
  - Proteinase K
  - Tampão citrato para recuperação por calor (heat retrieval) Deve ser testado qual o melhor metodo
- *Permeabilização:*
  - Saponina
  - **Triton X100**
- *Agente de bloqueio:*
  - **Albumina de soro de bovino**
  - Agente bloqueador para receptores Fc
  - **Agente bloqueador de actividade peroxidase**
- *Anticorpo primário:*
  - anti-calnexina (IgG1; gerado em ratinho)
  - anti-calnexina (IgG2; gerado em coelho)
  - anti-actina (IgG; gerado em ratinho)
  - **anti-catepsina L (IgG, gerado em cabra)**
  - anti-TF (IgG; gerado em ratinho)
  - Fragmento Fab anti-TF TRITC (IgG)
  - anti-Laminin  $\alpha$ 1 (IgG1; gerado em coelho)
  - anti-Ki67 (IgG; gerado em ratinho)
- *Anticorpo secundário:*
  - Cabra anti-coelho IgG HRP
  - **Burro anti-cabra IgG HRP**
  - Cabra anti-ratinho IgG GFP pre-adsorvido
  - Cabra anti-coelho IgG TRITC pre-adsorvido
  - Cabra anti-coelho IgG GFP
  - Burro anti-cabra IgG GFP
- *Controlo de isotipo:*
  - Controlo de isotipo IgG1
  - Controlo de isotipo IgG2
  - **Controlo de isotipo IgG**
- *Coloração de contraste:*
  - DAPI
  - Faloidina
  - **Eosina e hematoxilina**
- *Meio de montagem:*
  - Mowiol com DABCO
  - **Glicerol**

Coloração final



Abcam

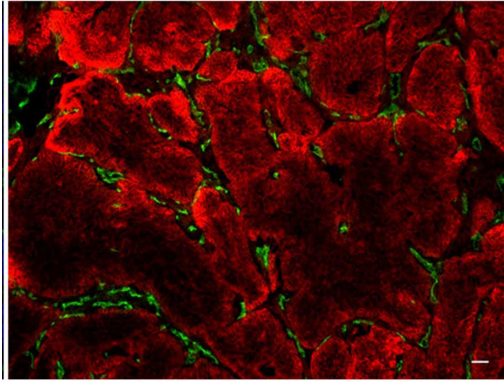
## Problema prático 3

Objectivo: Detetar *Tissue Factor* (TF) utilizando um sistema de deteção com maior eficácia de permeabilidade celular para visualização em tecidos tumorais por imunofluorescência

Lista de materiais disponíveis no laboratório:

- *Fixação:*
  - **Paraformaldeído**
  - Metanol
- Antigen retrieval (recuperação de epitopos):
  - Proteinase K
  - Tampão citrato para recuperação por calor (heat retrieval) Deve ser testado qual o melhor metodo
- *Permeabilização:*
  - Saponina
  - **Triton X100**
- *Agente de bloqueio:*
  - **Albumina de soro de bovino**
  - Agente bloqueador para receptores Fc
  - Agente bloqueador de actividade peroxidase
- *Anticorpo primário:*
  - anti-calnexina (IgG1; gerado em ratinho)
  - anti-calnexina (IgG2; gerado em coelho)
  - anti-actina (IgG; gerado em ratinho)
  - anti-catepsina L (IgG, gerado em cabra)
  - anti-TF (IgG; gerado em ratinho)
  - **Fragmento Fab anti-TF TRITC (IgG)**
  - anti-Laminin  $\alpha$ 1 (IgG1; gerado em coelho)
  - anti-Ki67 (IgG; gerado em ratinho)
- *Anticorpo secundário:*
  - Cabra anti-coelho IgG HRP
  - Burro anti-cabra IgG HRP
  - Cabra anti-ratinho IgG GFP pre-adsorvido
  - Cabra anti-coelho IgG TRITC pre-adsorvido
  - Cabra anti-coelho IgG GFP
  - Burro anti-cabra IgG GFP
- *Controlo de isotipo:*
  - Controlo de isotipo IgG1
  - Controlo de isotipo IgG2
  - **Controlo de isotipo IgG**
- *Coloração de contraste:*
  - **DAPI**
  - **Faloidina**
  - Eosina e hematoxilina
- *Meio de montagem:*
  - **Mowiol com DABCO**
  - Glicerol

Coloração final



doi: 10.3892/ijo.2015.3210

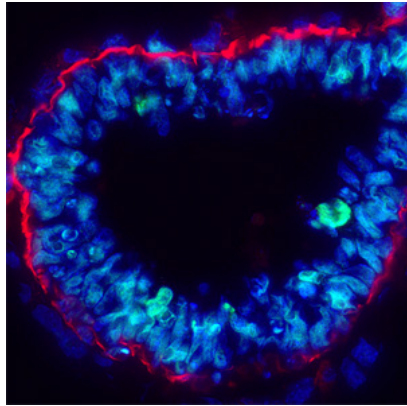
## Problema prático 4

Objectivo: Detetar Laminina e Ki67 em secções de criostato de células estaminais de ratinho através de imunofluorescência

Lista de materiais disponíveis no laboratório:

- *Fixação:*
  - Paraformaldeído
  - Metanol
- Antigen retrieval (recuperação de epitopos):
  - Proteinase K
  - Tampão citrato para recuperação por calor (heat retrieval)
- *Permeabilização:*
  - Saponina
  - **Triton X100**
- *Agente de bloqueio:*
  - **Albumina de soro de bovino**
  - Agente bloqueador para receptores Fc
  - Agente bloqueador de actividade peroxidase
- *Anticorpo primário:*
  - anti-calnexina (IgG1; gerado em ratinho)
  - anti-calnexina (IgG2; gerado em coelho)
  - anti-actina (IgG; gerado em ratinho)
  - anti-catepsina L (IgG, gerado em cabra)
  - anti-TF (IgG; gerado em ratinho)
  - Fragmento Fab anti-TF TRITC (IgG)
  - **anti-Laminin  $\alpha$ 1 (IgG1; gerado em coelho)**
  - **anti-Ki67 (IgG; gerado em ratinho)**
- *Anticorpo secundário:*
  - Cabra anti-coelho IgG HRP
  - Burro anti-cabra IgG HRP
  - **Cabra anti-ratinho IgG GFP pre-adsorvido**
  - **Cabra anti-coelho IgG TRITC pre-adsorvido**
  - Cabra anti-coelho IgG GFP
  - Burro anti-cabra IgG GFP
- *Controlo de isotipo:*
  - Controlo de isotipo IgG1
  - Controlo de isotipo IgG2
  - **Controlo de isotipo IgG**
- *Coloração de contraste:*
  - **DAPI**
  - Faloidina
  - Eosina e hematoxilina
- *Meio de montagem:*
  - **Mowiol com DABCO**
  - Glicerol

Coloração final



Abcam



## Problema prático 5

Objectivo: Detectar o receptor CD4 presente na superfície de linfócitos numa amostra de sangue através de imunofluorescência

Lista de materiais disponíveis no laboratório:

- *Preparação da amostra:*
  - Não requiere preparação
  - cytopsin
  - esfregaço

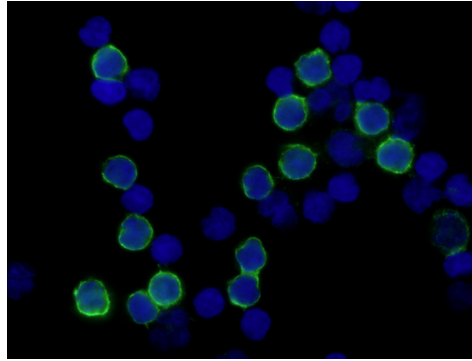
Tanto o cytopsin como o esfregaço permitem que as células adiram à superfície. Cytopsin permite preservar melhor os epitopos.
- *Fixação:*
  - Paraformaldeído
  - Metanol

Deve ser testado qual o melhor metodo
- *Antigen retrieval (recuperação de epitopos):*
  - Proteinase K
  - Tampão citrato para recuperação por calor (heat retrieval)

Não se aplica
- *Permeabilização:*
  - Saponina
  - Triton X100

Não se aplica, marcador de superficie
- *Agente de bloqueio:*
  - Albumina de soro de bovino
  - **Agente bloqueador para receptores Fc**
  - Agente bloqueador de actividade peroxidase
- *Anticorpo primário:*
  - anti-calnexina (IgG1; gerado em ratinho)
  - anti-CD8 (IgG2; gerado em coelho)
  - anti-CD45 (IgG; gerado em ratinho)
  - anti-catepsina L (IgG, gerado em cabra)
  - anti-TF (IgG; gerado em ratinho)
  - Fragmento Fab anti-TF TRITC (IgG)
  - anti-Laminin  $\alpha$ 1 (IgG1; gerado em coelho)
  - **anti-CD4 (IgG; gerado em ratinho)**
- *Anticorpo secundário:*
  - Cabra anti-coelho IgG HRP
  - Burro anti-cabra IgG HRP
  - **Cabra anti-ratinho IgG GFP pre-adsorvido**
  - Cabra anti-coelho IgG TRITC pre-adsorvido
  - Cabra anti-coelho IgG GFP
  - Burro anti-cabra IgG GFP
- *Controlo de isotipo:*
  - Controlo de isotipo IgG1
  - Controlo de isotipo IgG2
  - **Controlo de isotipo IgG**
- *Coloração de contraste:*
  - **DAPI**
  - Faloidina
  - Eosina e hematoxilina
- *Meio de montagem:*
  - **Mowiol com DABCO**
  - Glicerol

Coloração final



R&D systems