



UNIVERSIDADE
DE ÉVORA

IMUNOLOGIA

Manual de apoio às
Sessões Laboratoriais

Fevereiro, 2018

Carlos Sinogas



ÍNDICE

PROCEDIMENTOS DE SEGURANÇA.....	3
Risco químico / radiológico / biológico.....	3
Regras e Planeamento.....	4
Procedimentos gerais.....	5
REGISTOS E RELATÓRIOS	6
ANTICORPOS MONOCLONAIS.....	7
Introdução.....	7
Imunização.....	7
Fusão Celular.....	8
Seleção Metabólica e Seleção Imunológica	8
Clonagem e Preservação das Células Produtoras.....	9
Caraterização e Purificação de Anticorpos Monoclonais	9
Esquema geral para a obtenção de Anticorpos Monoclonais	10
PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	11
1. PIPETAGENS, SOLUÇÕES E DILUIÇÕES.....	11
2. CALIBRAÇÃO DE MICROPIPETAS.....	16
3. TESTE À IMUNIDADE NATURAL	19
4. IMUNIZAÇÃO ARTIFICIAL.....	22
5. RECOLHA DE SANGUE.....	23
Preparação do Soro.....	23
Preparação de Eritrócitos.....	24
6. OBSERVAÇÃO DE CÉLULAS SANGUÍNEAS (Humanas).....	25
7. PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS - Precipitação diferencial	26
8. IMUNOPRECIPITAÇÃO - Qualitativa.....	27
Teste do anel.....	27
Teste em lâmina.....	28
Nefelometria.....	29
9. IMUNOPRECIPITAÇÃO - Quantitativa	30
Curva de precipitação	30
10. IMUNODIFUSÃO	31
Imunodifusão simples.....	31
Imunodifusão dupla (Ouchterlony).....	32
11. HEMAGLUTINAÇÃO.....	33
12. TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO (Rápido).....	34
13. IMUNOELECTROFORESE.....	35
14. ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)	36
"Checker board"	36
Teste.....	39
Representação esquemática de uma ELISA.....	42



PROCEDIMENTOS DE SEGURANÇA

O trabalho laboratorial em Imunologia envolve três tipos principais de risco que importa considerar. O risco químico, o risco biológico e o risco radiológico. Quase todos os países têm regras próprias para abordar este tipo de questões que se colocam à experimentação laboratorial. Também os laboratórios onde o trabalho se desenvolve adoptam práticas apropriadas ao tipo de trabalho que aí se desenvolve.

Não se pretendendo discutir em detalhe os procedimentos de segurança legalmente exigíveis, apontam-se apenas algumas regras gerais e práticas laboratoriais a ser adoptadas.

Apesar de qualquer dos três riscos indicados colocarem problemas especiais, que requerem precauções de tipo diferente, existe um conjunto de precauções e procedimentos de segurança aplicáveis a todos e que deverão ser observados no trabalho laboratorial do âmbito da imunologia.

As regras que adiante se listam constituem um quadro geral no qual os procedimentos especializados, decorrentes das situações particulares que se indicam, deverão ser enquadrados.

Risco químico / radiológico / biológico

Os produtos químicos empregues nos ensaios imunológicos distribuem-se por diversos tipos associados a diferentes riscos para o operador. Quando apropriado, os riscos conhecidos dos reagentes a empregar serão indicados, devendo então ser adoptadas as regras específicas mais aconselhadas, como seja o uso de luvas ou óculos, trabalho em hotte, etc.

As práticas previstas no âmbito desta disciplina não farão uso generalizado de reagentes perigosos ou de grande risco conhecido para a Saúde Humana.

De todos os riscos associados com os trabalhos de imunologia, o mais emotivo, que não necessariamente o mais sério, é a radioatividade. Ao contrário dos outros reagentes químicos, os compostos radioativos, por este fato, não podem ser vistos e são isentos de cheiro, não se manifestando os seus efeitos no imediato. As regras para a manipulação de produtos radioativos são bastante mais rigorosas e tornam-se muito mais restritivas ao trabalho a desenvolver. Às exigências para manipulação destes produtos no trabalho, acrescem procedimentos particulares para a eliminação dos resíduos e monitorização das pessoas e ambientes envolvidos.

Os trabalhos a executar no âmbito desta disciplina não farão uso de reagentes ou outros compostos radioativos.

Todas as amostras de produtos biológicos devem ser consideradas potencialmente infecciosas, em particular as que são provenientes do Homem, em que uma eventual barreira de espécie na transmissão dos agentes infecciosos não existe. As outras espécies animais mais usadas em trabalhos de imunologia, os coelhos, os caprinos e os roedores, são mamíferos afastados do Homem que não representam qualquer ameaça significativa para as pessoas que trabalham nos laboratórios de imunologia.

Em qualquer dos casos convém ter presente que as principais vias de transmissão de infecções ocorrem em golpes abertos ou outras soluções de continuidade na pele das mãos do operador, por picada com agulhas contaminadas ou por inalação de aerossóis. É por isto que é fortemente recomendado que, quando se trate de trabalho direto com amostras biológicas, não existam golpes nas mãos do operador que não tenham sido previamente protegidos e convenientemente impermeabilizados.

O trabalho a desenvolver nas práticas da disciplina não farão uso de soros ou outros materiais biológicos de origem humana, caso em que precauções especiais teriam de ser tomadas para minimizar o risco de associado aos agentes infecciosos transmissíveis pelo sangue humano, como os agentes da SIDA ou das Hepatites. Em todo o caso é sempre aconselhável considerar todos os materiais biológicos a empregar como potencialmente infecciosos para o operador e adoptar as práticas mais adequadas ao cenário do "pior caso".



Adicionalmente há que considerar que o trabalho prático decorrerá no laboratório de Microbiologia, onde microrganismos de diferentes tipos são manipulados por outras pessoas. A possibilidade de contaminação das superfícies e outros materiais também deverá ser considerada.

Regras e Planeamento

Para além dos riscos para o operador, que atrás se referem, as experiências que se realizarão são certamente novidade para alguns dos estudantes, com experiência laboratorial limitada e rotinas de boas práticas laboratoriais não estabelecidas. Importa, por isso, prevenir.

É boa prática observar, cumprir e fazer cumprir as regras, procedimentos e comportamentos que se indicam:

Bata

O uso de uma bata comprida, limpa e devidamente ajustada ao corpo é indispensável sempre que se opere em laboratório. A bata protege o operador e o seu vestuário de eventuais acidentes. Idealmente a bata deverá ser usada apenas no laboratório, sendo vestida à entrada e despida à saída. Desta forma, além de proteger o experimentador, a bata minimiza o transporte de potenciais agentes infecciosos para o exterior do laboratório.

Mãos

À entrada e à saída do laboratório é preciso lavar bem as mãos com abundante água e sabão, também para minimizar potenciais contaminações cruzadas. Dependente do tipo de produtos a manipular, o uso de luvas impermeáveis, máscaras ou outras proteções, poderá ser exigível. Mesmo quando normalmente não recomendado, o uso de luvas poderá ser necessário em situações de solução de continuidade na pele das mãos do operador.

Comer e beber

É expressamente proibido comer, beber, fumar, manipular lentes de contato ou aplicar cosméticos durante a execução de experiências laboratoriais. Usar sempre pipetas mecânicas, nunca pipetar com a boca. É aconselhável adquirir o hábito de manter as mãos longe da boca.

Bancada de trabalho

O local de trabalho deverá estar sempre devidamente limpo, para o que se impõe proceder à limpeza da bancada antes de iniciados os trabalhos, para não permitir a contaminação das próprias experiências com microrganismos de sessões anteriores, e depois das manipulações terminadas para minimizar a potencial propagação de agentes infecciosos contaminantes dos materiais biológicos com que se operou.

Livros e cadernos

Só é permitido levar para a bancada o material de apoio estritamente indispensável à execução do trabalho, como o protocolo experimental, um bloco de notas ou um caderno e um lápis. Todos os restantes pertences do operador, como pastas, casacos ou sacos deverão ser acondicionados em local próprio, antes de iniciada a experimentação.

Materiais

Todo o equipamento e material de laboratório amovível, utilizado durante a experimentação, deverá ser repostado no local indicado depois de concluída a sua utilização. Particularmente os materiais que tenham contactado com amostras de origem biológica deverão ser rejeitados em local próprio para descontaminação.



Acidentes

Qualquer acidente deverá ser de imediato reportado ao responsável pela sessão de trabalho. Líquidos ou outro material biológico, inadvertidamente transferidos para fora dos contentores a que se destinam deverão ser de imediato desinfectados com o apoio do responsável.

Planeamento

Não iniciar qualquer experiência sem o conveniente planeamento. O conhecimento e compreensão prévios dos procedimentos experimentais, grelhas adequadas para registo dos resultados e a efetiva disponibilidade de todos os recursos materiais necessários constituem elementos importantes para o sucesso das experiências. O tempo "perdido" num planeamento inicial é largamente compensado pelo nível da aprendizagem conseguido e pela prevenção da necessidade de repetição de experiências eventualmente bloqueadas.

Procedimentos gerais

Todos os procedimentos deverão ser efetuados tendo em mente a minimização da contaminação do material em uso e a formação de aerossóis ou respingos, numa perspectiva de proteção do próprio operador e de terceiros. Mais importante que um conjunto de regras a obedecer é a presença de bom senso nos trabalhos a realizar. É muito importante usar a cabeça antes das mãos.



REGISTOS E RELATÓRIOS

É conveniente usar um bloco ou caderno para registo de todas as ocorrências e dos resultados da experimentação. Sugere-se o uso de caderno de laboratório, de preferência com folhas não amovíveis, para que não sejam eliminadas notas ou registos considerados irrelevantes na altura, como sucede com frequência quando se passam os apontamentos "a limpo", mas de grande utilidade para consulta futura para eventual repetição da experiência. O rigor e pormenor dos registos efetuados facilitarão a aprendizagem, a interpretação dos resultados obtidos e a redação posterior do relatório do trabalho.

Um qualquer relatório de uma experiência laboratorial deverá documentar de forma tão completa quanto possível o procedimento executado e os resultados obtidos. Para além disso deverá ser também objectivo do relator redigir um documento compreensível para o leitor e susceptível de apoiar a eventual repetição da mesma experiência em idênticas condições. Para a elaboração dos relatórios sugere-se, como orientação, as seguintes secções:

Título	Identificador do conteúdo do relatório
Resumo	Pequeno texto de que constem os objectivos almejados e as conclusões obtidas
Objectivo	Razão de ser do trabalho realizado
Introdução	Dados conhecidos que justificam a realização da experiência relatada
Palavras-chave	Termos diretamente relacionados com o trabalho
Material e reagentes	Listagem exhaustiva do equipamento, reagentes e outro material usado
Protocolo experimental	Marcha geral dos procedimentos aplicados. Deverão ser relatados os procedimentos concretos executados, com referência a eventuais desvios relativamente ao procedimento recomendado / descrito
Resultados	Registo das observações efetuadas e dos dados recolhidos
Discussão	Comentário crítico aos resultados obtidos
Conclusão	Descrição do cumprimento ou incumprimento do objectivo, decorrente dos resultados obtidos
Nota crítica	Comentário à globalidade da experiência, com recomendações para a sua repetição ou outras consideradas adequadas
Bibliografia	Referências consultadas ou utilizadas para a realização do trabalho
Dependente do tipo do trabalho executado, da forma do relatório e da sensibilidade do relator, algumas das secções descritas poderão ser fundidas, como "Resultados e discussão" ou "Discussão e conclusões", por exemplo	



ANTICORPOS MONOCLONAIS

Introdução

Anticorpos monoclonais são imunoglobulinas homogêneas com especificidade definida, possíveis de produzir em largas quantidades. Podem ser obtidas por imortalização de linfócitos B, clonados e expandidos em culturas celulares contínuas (anticorpos monoclonais propriamente ditos) ou por recombinação de DNA, expresso noutras linhas celulares eucarióticas (anticorpos monoclonais “engineered”).

Em 1975 Köhler e Milstein descobriram e empregaram pela primeira vez a tecnologia dos hibridomas: fizeram combinar o material genético de células normais produtoras de anticorpos com o de células de origem maligna da mesma linhagem. Iniciaram então uma nova metodologia que desde então não parou de evoluir e conduziu ao desenvolvimento da tecnologia para a produção de quantidades virtualmente inesgotáveis de anticorpos com níveis de pureza nunca antes atingidos. Trata-se de uma tecnologia de aplicação horizontal em todas as áreas científicas da Biologia, cujo impacto só é comparável ao da tecnologia da recombinação do DNA.

Os anticorpos são proteínas produzidas por linfócitos B, destinadas a intervir nos processos de defesa imunitária dos organismos superiores: as imunoglobulinas. Têm como principal característica, numa perspectiva de aplicação científica / biotecnológica, a capacidade de se ligarem ao antígeno que reconhecem. Atualmente, para a sua obtenção, recorre-se quase exclusivamente à chamada tecnologia dos hibridomas para a preparação de anticorpos monoclonais.

Os hibridomas são, como o nome indica, células híbridas, imortalizadas em cultura de tecidos, produtoras de anticorpos monoclonais com especificidade única e pré-determinada pelo processo da sua preparação.

No processo clássico para a obtenção de hibridomas utilizam-se células de baço de murganhos imunizados com o antígeno que se pretende reconhecer. Estes linfócitos ativados são fundidos com células de mieloma da mesma origem animal, mutantes não produtores de imunoglobulinas, na presença de polietilenoglicol. As células então fundidas são cultivadas em meio seletivo (contendo HAT) em condições que determinam apenas a sobrevivência dos híbridos formados entre linfócitos e células de mieloma. Os hibridomas com as características pretendidas, nomeadamente no que se refere à especificidade antigénica, taxas de produção e crescimento e tipo de imunoglobulina são selecionados por métodos imuno-enzimáticos e preservados por clonagem e congelamento. A caracterização do anticorpo produzido e o desenvolvimento do processo para a sua produção em larga escala dependem dos objectivos finais do investigador.

Imunização

O processo de imunização destina-se a conseguir linfócitos B ativados para participar na fusão celular. A espécie animal e órgãos donde podem ser obtidos (baço, timo, nódulos linfáticos, sangue periférico), bem como os protocolos de imunização do animal dependem da origem do antígeno, da sua imunogenicidade e do destino a dar aos anticorpos a preparar.

O murganho Balb/C, espécie animal de referência, é a que mais frequentemente é utilizada na obtenção de anticorpos monoclonais, por se tratar de um animal pequeno, de fácil manutenção e manipulação no laboratório, com um sistema imunitário bastante bem conhecido e para o qual existem disponíveis linhas celulares de mieloma adequadas à obtenção de hibridomas histocompatíveis e enxertáveis no animal.

O esquema de imunização a adoptar depende também do tipo e origem do antígeno e do tipo de anticorpos pretendidos. Em geral uma administração única de antígeno no murganho conduz à obtenção de uma maior percentagem de IgM relativamente a IgG. No que se refere aos linfócitos produtores específicos obtêm-se em maior abundância no baço na sequência de múltiplas administrações de antígeno. Para antígenos solúveis de elevado peso molecular, é regra proceder-se a uma imunização em doses repetidas de antígeno, separadas entre si cerca de três semanas a um mês.



A eficácia do processo de imunização é avaliada 2 semanas após uma das últimas administrações, por análise do título do soro do animal em anticorpos capazes de reconhecer o antigénio. A expansão clonal dos linfócitos B, induzida pela presença do antigénio, determina uma concentração máxima daquelas células, produtoras de anticorpos específicos, no baço do animal 2 a 3 dias após a administração do antigénio.

Para outro tipo de antigénios, previsivelmente eliminados do organismo por mecanismos em que o sistema imunitário não desempenha o papel principal, como são os casos de moléculas hidrofóbicas, hidrofílicas de baixo peso molecular ou fraca antigenicidade, é necessário recorrer à adição de outros compostos que iniciem a resposta imunitária (haptenos, "carriers").

Fusão Celular

A fusão entre as células de uma mistura, destinada a imortalizar os linfócitos produtores de anticorpos, pode ocorrer espontaneamente, mas com uma muito baixa probabilidade. Para aumentar essa probabilidade introduzem-se outros agentes na mistura de células.

As células do baço dos animais imunizados são recolhidas e misturadas com células de mieloma, da mesma espécie animal, não produtoras de anticorpos e portadoras das mutações HGPRT- ou TK-. As células da mistura, quando na presença de agentes fusogénicos, como proteínas do vírus Sendai, PEG ou campo eléctrico (electro fusão, electroporação), fundem os seus conteúdos, determinando o aparecimento de híbridos intra- e interespecíficos. A imortalização dos linfócitos, em particular quando se trata de células de origem humana, pode também ser conseguida por transformação com vírus tumorigénicos (EBV).

Seleção Metabólica e Seleção Imunológica

Após o processo de fusão obtém-se uma mistura de células de diversos tipos: linfócitos e células de mieloma não intervenientes em qualquer fusão, híbridos resultantes da fusão de mais de um linfócito, híbridos resultantes da fusão de mais de uma célula de mieloma e híbridos resultantes da fusão de células de mieloma com linfócitos. Nas condições de cultura subsequentes não sobrevivem os linfócitos originais e os híbridos entre linfócitos, por não terem capacidade para crescer em cultura na ausência dos convenientes fatores de crescimento. As células de mieloma e os híbridos resultantes de fusões entre estas também não poderão sobreviver, dado que, apesar de possuírem a capacidade de crescer em cultura, são portadoras de mutações das enzimas HGPRT ou da TK e, na presença de aminopterina, não conseguem sintetizar os precursores para a síntese do DNA. Só podem crescer em cultura os híbridos entre células de mieloma e linfócitos que hajam adquirido a capacidade de crescer em cultura, dos primeiros, e a capacidade de sintetizar os precursores do DNA através das vias metabólicas que utilizam a HGPRT e a TK, provenientes dos linfócitos. São os hibridomas.

Os métodos imunológicos para a deteção, quantificação e caracterização das imunoglobulinas incluem a imunoprecipitação, ensaios imuno-enzimáticos, imuno-radiométricos e de imuno-fluorescência e cromatografias. Particularmente no que se refere à seleção inicial dos hibridomas resultantes da fusão impõe-se a adopção de métodos de rápida execução, aplicáveis a centenas de amostras e de custos reduzidos.

De entre os hibridomas resultantes, há que identificar as linhas celulares produtoras de anticorpos específicos do antigénio. Os métodos mais frequentemente utilizados nesta seleção imunológica são a ELISA ("Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay"), RIA ("Radio Immuno Assay"), IRMA ("Immuno Radio-Metric Assay" ou "Sandwich") e Imuno-fluorescência. O método de primeira escolha, a ELISA, baseia-se numa fixação do antigénio a um suporte sólido seguida do reconhecimento deste pelos anticorpos produzidos pelos hibridomas. A presença dos anticorpos específicos é revelada por outros anticorpos, específicos da espécie (domínios constantes das imunoglobulinas), e conjugados com enzimas capazes de alterar as características cromáticas de um substrato. São selecionadas as culturas cujos sobrenadantes apresentem reação enzimática positiva no ensaio.



Clonagem e Preservação das Células Produtoras

Uma vez identificadas as culturas produtoras dos anticorpos convenientes há que preservá-las e, frequentemente, caracterizá-las antes da sua utilização para a produção dos anticorpos monoclonais.

A partir do momento em que pela seleção imunológica são detectados hibridomas produtores, estas culturas deverão ser congeladas, mesmo antes da clonagem, para evitar a sua perda.

Sendo os hibridomas células poliploides, têm uma tendência natural para segregar os cromossomas que possuem em excesso, razão pela qual seria conveniente manter uma pressão seletiva para preservar o DNA responsável pela síntese dos anticorpos. Não existindo qualquer antibiótico ou metabolito que possa exercer esta pressão seletiva, a manutenção da expressão é conseguida através da clonagem, processo para isolamento e expansão de uma cultura a partir de uma só célula.

O método mais expedito para a clonagem dos hibridomas é a clonagem por diluição limite, em que a cultura é diluída e distribuída por microplacas em concentrações inferiores a uma célula por poço. Outros métodos, como a clonagem em agarose são menos frequentemente utilizados porque mais laboriosos.

Os hibridomas, tal como outras células eucarióticas estabelecidas em cultura, podem conservar-se por congelação em azoto líquido, onde se mantém viáveis durante vários anos.

Caraterização e Purificação de Anticorpos Monoclonais

A caraterização do anticorpo obtido constitui um requisito essencial para a sua conveniente utilização.

A isotipagem, que consiste na determinação do tipo de imunoglobulina presente, obtêm-se por reação imunológica com anticorpos de outra espécie animal específicos dos diferentes tipos de cadeias constantes de murganho (IgA, IgM, IgG1, IgG2, ...).

A especificidade epitópica relativa de diferentes monoclonais contra o mesmo antígeno determina-se por ensaio imunológico em que com uma quantidade fixada de antígeno se fazem reagir misturas de anticorpos em diferentes percentagens relativas. Dois anticorpos reconhecerão diferentes epitopos se uma mistura dos dois origina um sinal superior ao de qualquer deles isolado, na saturação do antígeno.

Também a afinidade relativa de um anticorpo para o antígeno poderá ser relevante. Determina-se fazendo reagir o antígeno, radioativamente marcado, com uma determinada quantidade de anticorpo. O antígeno fixado por unidade de massa do anticorpo reflete a afinidade entre os dois, nas condições experimentais usadas. Esta quantidade de antígeno, quando referida a unidade de volume do sobrenadante da cultura do respectivo hibridoma, constitui um indicativo da produtividade desta cultura.

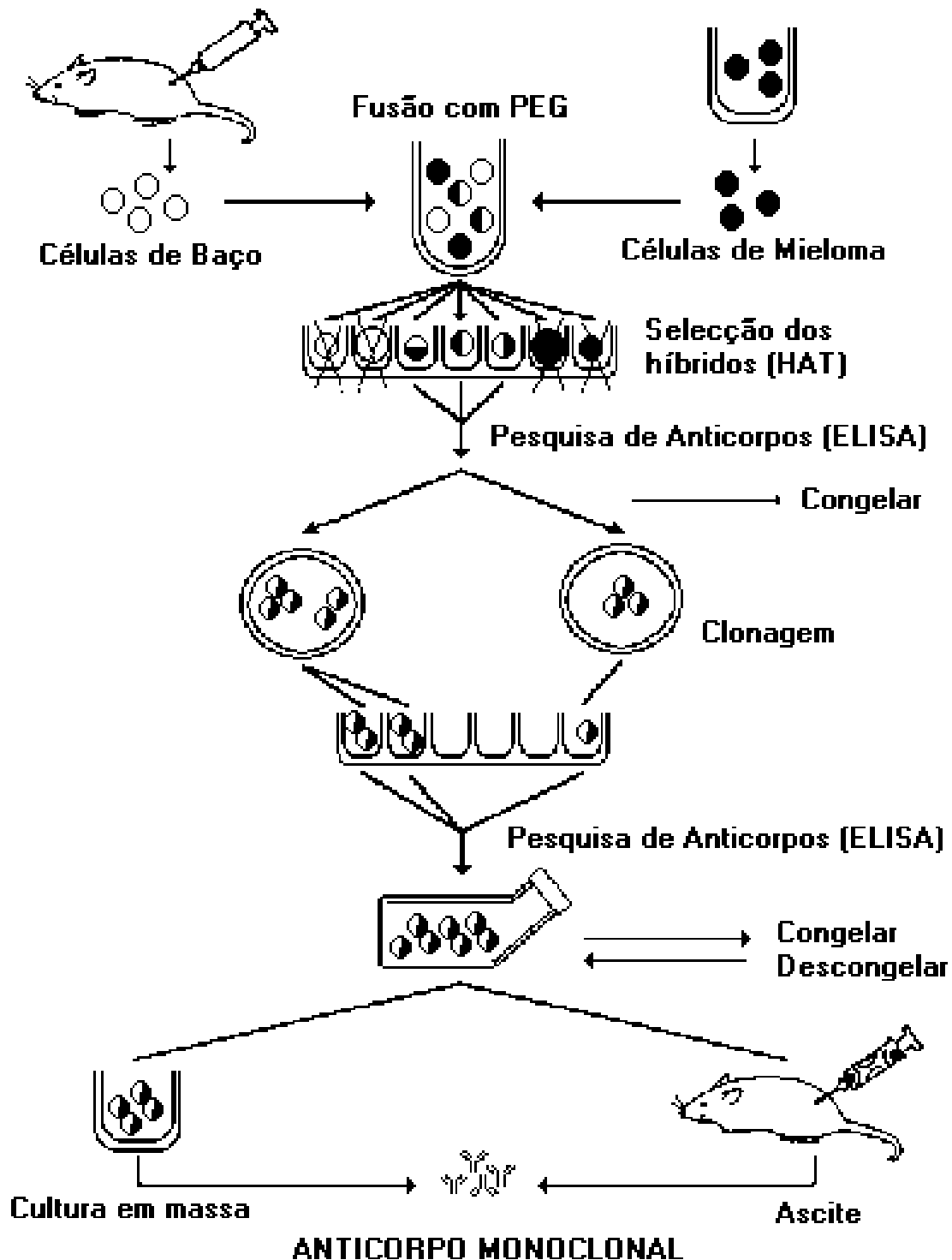
O conhecimento das características físico-químicas, como a massa molecular e/ou o ponto isoeléctrico poderão ser importantes para o desenho do respectivo processo de purificação.

Partindo de linhas celulares de hibridomas produtores, os anticorpos monoclonais podem obter-se por cultura de células "in vitro" e purificação a partir do sobrenadante (com rendimentos da ordem dos 100 µg/mL) ou a partir de ascites e soros de animais portadores de tumores induzidos pela injeção dos respectivos hibridomas (rendimentos da ordem dos 2 mg/mL).

São métodos de eleição para a purificação de anticorpos monoclonais as cromatografias de afinidade, nomeadamente com a Proteína A Sepharose, se se tratar de imunoglobulinas tipo G, ou com o antígeno fixado a um suporte sólido.



Esquema geral para a obtenção de Anticorpos Monoclonais





PROTOSCOLOS EXPERIMENTAIS

1. PIPETAGENS, SOLUÇÕES E DILUIÇÕES

Introdução

O rigor nas diluições a efetuar com alguns materiais biológicos e reagentes, no contexto de vários dos trabalhos experimentais que aqui se incluem, é crítico e fundamental para o sucesso e para a fiabilidade dos resultados.

Porque se observa com frequência alguma inabilidade inicial dos estudantes para a manipulação adequada das micropipetas, para um raciocínio operacional sobre diluições (em especial quando expressas em potências de 10) e nas formas de preparar soluções tituladas, introduz-se este trabalho preliminar.

Material e reagentes

- Solução saturada de azul-de-metileno
- Água destilada
- Micropipetas diversas
- Microtubos
- Espectrofotómetro

Procedimento (por grupo)

Diluições decimais

1. Marque microtubos de 1 a 8
2. A partir da solução concentrada de azul-de-metileno proceda, às seguintes diluições sequenciais:

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8
Solvente (mL)	0	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,5
Corante (mL)	1,5	0,15	0	0	0	0	0	0
Solução precedente (mL)	0	0	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0
Diluição (10^x)								

3. Completar o preenchimento da tabela acima com as diluições em cada tubo.
4. Verifique os volumes relativos e registre as intensidades de cor observáveis nos diferentes tubos
5. Determine a absorvência das soluções a 600-660 nm (ler da mais diluída para a mais concentrada, na mesma cuvete. Última amostra: controlo).

Diluições centesimal

1. Marque tubos de ensaio de 1 a 6
2. A partir da solução concentrada de azul-de-metileno proceda, às seguintes diluições sequenciais:

Tubo	1	2	3	4	5	6
Solvente (μ L)	0	1500	1500	1500	1500	1500
Corante (μ L)	1500	15	0	0	0	0
Solução precedente (μ L)	0	0	15	15	15	0
Diluição (10^x)						

3. Completar o preenchimento da tabela acima com as diluições em cada tubo.
4. Verifique os volumes relativos e registre as intensidades de cor observáveis nos diferentes tubos



- Determine a absorvência das soluções dos tubos com número par a 600-660 nm (ler da mais diluída para a mais concentrada, na mesma cuvete. Última amostra: controlo)

Diluições de três em três

- Marque tubos de ensaio de 1 a 10)
- A partir da solução concentrada de azul-de-metileno proceda, às seguintes diluições sequenciais:

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Solvente (mL)	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1,5
Corante (mL)	1,5	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0
Solução precedente (mL)	0	0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0
Diluição (10 ^x)										

- Completar o preenchimento da tabela acima com as diluições em cada tubo.
- Registe as intensidades de cor observáveis nos diferentes tubos
- Determine a absorvência das soluções dos tubos com número par a 600-660 nm (ler da mais diluída para a mais concentrada, na mesma cuvete)

Diluição única (TPC)

- Considerando os trabalhos anteriores, desenhe um protocolo para a realização de teste a diluições milésimas.
- A partir da solução concentrada de azul-de-metileno faça os cálculos para proceder à preparação de 5 mL de cada uma das seguintes soluções, indicando os volumes a usar:
 - Diluição de 5×10^2
 - Diluição de 5×10^{-2}

Preparação de soluções (TPC)

- Pretendendo-se obter 100 mL de cada uma das soluções que se listam, indique as quantidades de produtos a misturar para a sua preparação no laboratório:
 - NaOH 0,1 N
 - SO₄H₂ 0,1 N
 - NaCl 0,1 M
 - NaCl 100 mM
 - Glicerol 10% (fórmula C₃H₈O₃)
 - Glucose 10% (fórmula C₆H₁₂O₆)
 - Etanol 70% (fórmula C₂H₆O₂)

Pesos atômicos: H=1; C=12; O=16; Na=23; S=32; Cl=35.



Registo de Observações e Resultados

PIPETAGENS E DILUIÇÕES

Operador: _____ Data: ___/___/___

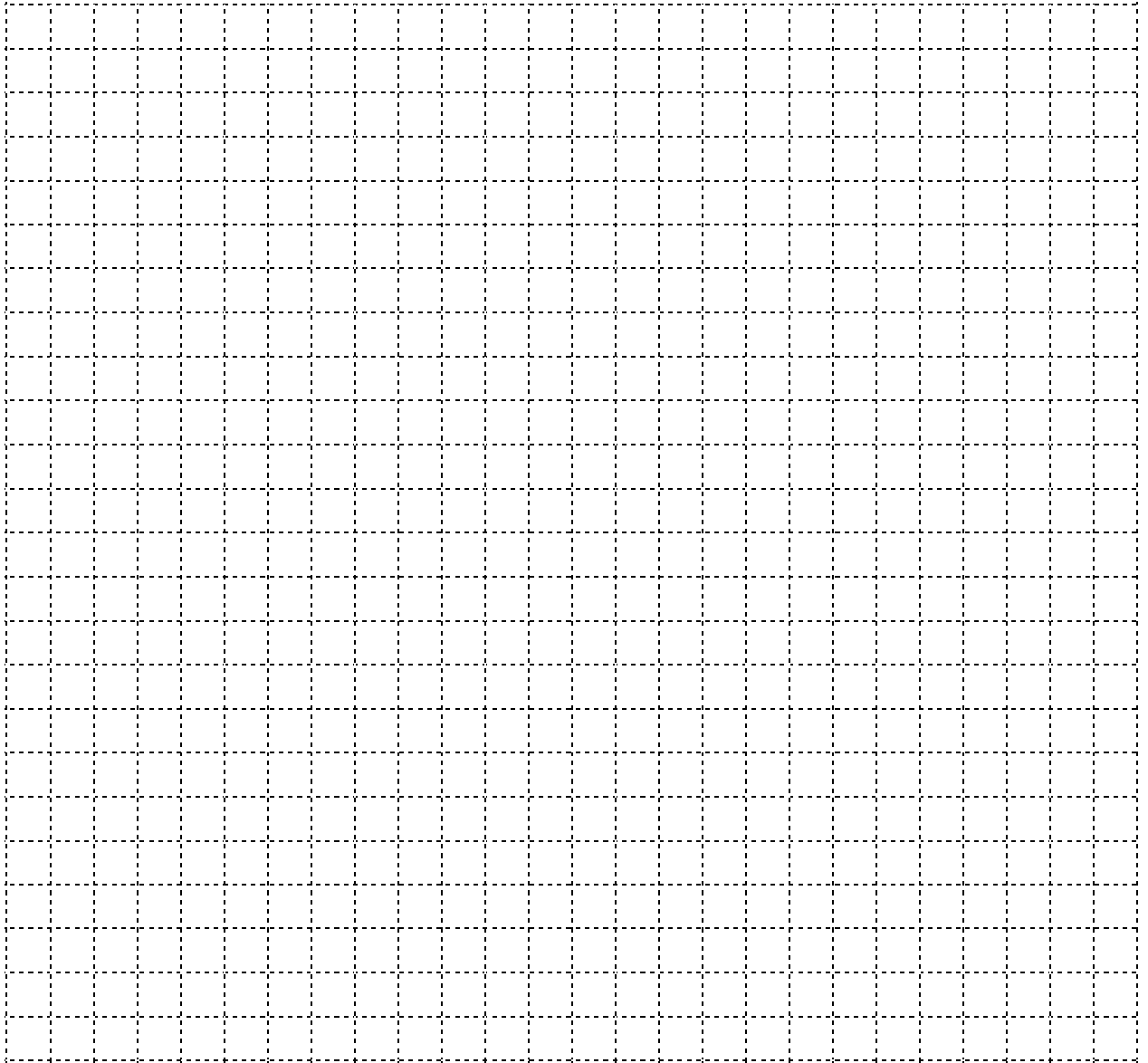
Diluições decimais	Tubo	Amostra	DO _{600nm} / mL	Concentração calculada	Observações
	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
	6				
	7				
	8				

Diluições centesimais	Tubo	Amostra	DO _{600nm} / mL	Concentração calculada	Observações
	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
	6				

Diluições de três em três	Tubo	Amostra	DO _{600nm} / mL	Concentração calculada	Observações
	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
	6				
	7				
	8				
	9				
	10				



Gráfico



Observações:



SOLUÇÕES

Operador: _____ Data: ___/___/___

	Componentes	Peso / volume
Diluição 5 X 10 ²		
Diluição 5 X 10 ⁻²		
NaOH 0,1 N (100 mL)		
H ₂ SO ₄ 0,1 N (100 mL)		
NaCl 0,1 M (100 mL)		
NaCl 100 mM (100 mL)		
Glicerol 10% (100 mL)		
Glucose 10% (100 mL)		
Etanol 70% (100 mL)		

Observações



2. CALIBRAÇÃO DE MICROPIPETAS

Introdução

O rigor nas diluições a efetuar com alguns materiais biológicos e reagentes, no contexto de vários dos trabalhos experimentais que aqui se incluem, é crítico e fundamental para o sucesso e para a fiabilidade dos resultados.

A utilização frequente das pipetas disponíveis no laboratório por estudantes sem experiência leva a utilizações incorretas donde resulta que alguns dos volumes indicados nos visores não coincidam com as quantidades medidas. Neste contexto é importante conhecer a forma de calibrar as micropipetas a usar.

Material e reagentes

- Água destilada
- Micropipetas diversas e pontas
- Microtubos, copos de boémia
- Balança de precisão

Procedimento (por grupo)

Ajuste de volume (5 μ L)

1. Utilize uma pipeta de 20 μ L
2. Ajuste o indicador de volume aos 5 μ L
3. Pipete, na balança, para tubo calibrado 5 μ L
4. Observe o peso indicado
5. Se superior aos 5 mg, reduza o volume indicado na pipeta e repita 3. e 4.
6. Se inferior aos 5 mg, aumente o volume indicado na pipeta e repita 3. e 4.
7. Quando a quantidade de água destilada pesada for de 5 mg, anote a indicação de volume que, na pipeta, corresponde aos 5 μ L.

Ajuste de volume (50 μ L)

1. Utilize uma pipeta de 200 μ L
2. Repita os passos do procedimento anterior (de 1. a 7.) para a massa de 50 mg (correspondente a 50 μ L)

Ajuste de volume (500 μ L)

1. Utilize uma pipeta de 1000 μ L
2. Repita os passos do procedimento inicial (de 1. a 7.) para a massa de 500 mg (correspondente a 500 μ L)



Calibração de pipeta (200 μL)

1. Meça, na balança, um volume de 10 μL para copo tarado. Anote o peso
2. Repita mais duas vezes esta determinação
3. Repita os pontos 1 e 2 para os volumes de 20 μL ; 50 μL ; 100 μL ; 150 μL e 200 μL
4. Faça médias de cada conjunto de três pesagens homólogas
5. Desenhe o gráfico de calibração da pipeta, fazendo corresponder os volumes indicados no visor com os pesos avaliados.

NB

Os procedimentos para outros volumes ou outras pipetas são idênticos.



Registo de observações e Resultados

CALIBRAÇÃO DE PIPETAS

Operador: _____ Data: ___/___/___

Calibração de pipeta 20 µL	Volum e	Peso 1	Peso 2	Peso 3	Média	Observações
	1 µL					
	2 µL					
	5 µL					
	10 µL					
	15 µL					
	20 µL					

Calibração de pipeta 200 µL	Volum e	Peso 1	Peso 2	Peso 3	Média	Observações
	10 µL					
	20 µL					
	50 µL					
	100 µL					
	150 µL					
	200 µL					

Calibração de pipeta 1000 µL	Volum e	Peso 1	Peso 2	Peso 3	Média	Observações
	50 µL					
	100 µL					
	200 µL					
	500 µL					
	750 µL					
	1000 µL					



3. TESTE À IMUNIDADE NATURAL

Material e reagentes

- Suspensão de Micrococos
- Soro fisiológico estéril
- Liozima pó
- Espectrofotômetro e tubos
- Pipetas e micropipetas
- Placas de petri com agar nutritivo

Procedimento experimental

Teste à Liozima (1 grupo por turma)

1. Preparar 8 diluições decimais de liozima, em microtubos:

Tubo	L0	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10
Liozima pó (mg)	100										
Amostra anterior (µL)	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	-
Soro fisiológico (µL)	1000	900	900	900	900	900	900	900	900	900	900
Diluição											

2. Rejeitar 100 µL da diluição do tubo L9
3. Adicionar a cada tubo 2 mL de suspensão bacteriana
4. Homogeneizar com pipeta, evitando espuma
5. Ler e registrar os valores da absorvência de cada amostra a 540 nm (tempo 0)
6. Incubar a 37°C
7. Repetir leitura do espectrofotômetro a cada 10 minutos.
8. Expressar os resultados em gráfico.



Teste à Saliva (restantes grupos da turma)

1. Recolher cerca de 2.5 mL de saliva em placa de petri esterilizada
2. Preparar diluições decimais de saliva, em microtubos:

Tubo	S0	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Saliva (µL)	1000						
Amostra anterior (µL)	-	100	100	100	100	100	-
Soro fisiológico (µL)	-	900	900	900	900	900	900
Diluição							

3. Rejeitar 100 µL da diluição do tubo S5
4. Adicionar a cada tubo 2 mL de suspensão bacteriana
5. Homogeneizar com pipeta, evitando espuma
6. Avaliar morte bacteriana por cultura:
 - a. Tomar para eppendorfs novos 100 µL dos tubos par (S0; S2; S4; S6);
 - b. Incubar a 37°C durante 30 minutos
 - c. Inocular por espalhamento em placa de agar nutritivo;
 - d. Incubar a 37 °C durante, pelo menos uma noite;
 - e. Contar colónias
7. Avaliar a morte bacteriana por densitometria:
 - a. Ler e registar os valores da absorvência de cada diluição (S0; S1; S2; S3; S4; S5; S6) a 540 nm (tempo 0)
 - b. Incubar a 37°C
 - c. Repetir leitura do espectrofotómetro a cada 10 minutos.
8. Expressar resultados em gráfico.
9. Avaliar a concentração relativa de bactericidinas na saliva por comparação com o controlo positivo de lisozima



Registo de resultados

TESTE À IMUNIDADE NATURAL

LISOZIMA	Absorvência										
Tempo (min)	L0	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10
0											
10											
20											
30											
40											

SALIVA	Absorvência						
Tempo (min)	S0	S1	S2	S3	S4	S5	S6
0							
10							
20							
30							
40							

Crescimento bacteriano (nº colónias)			
S0	S2	S4	S6

Observações



4. IMUNIZAÇÃO ARTIFICIAL

Material e reagentes

- Galinhas
- Excipiente oleoso (Adjuvante de Freund, Parafina líquida)
- Solução de antigénio (BSA a 10 mg/mL em SF)
- Seringas e agulhas hipodérmicas

Procedimento experimental

Preparação da emulsão para imunização

1. Adicionar 5 mL de solução de antigénio em tubo de ensaio
2. Adicionar 5 mL de adjuvante oleoso
3. Misturar vigorosamente, com auxílio de uma seringa com agulha
4. Verificar o estado da emulsão com uma gota sobre a superfície de água fria (não deve misturar-se de imediato)

Imunização

Dia 1	Recolher amostra de sangue para teste Injetar 1 mL de emulsão por via subcutânea em diversos pontos (4 a 6 picadas)
Dia 15	Recolher amostra de sangue para teste
Dia 30	Recolher amostra de sangue para teste Repetir a injeção da mesma quantidade de antigénio emulsionado em adjuvante incompleto
Dia 45	Recolher sangue para análise
Dia 60	Recolher sangue para análise

Registar todos os dados de identificação dos animais, volumes de sangue e soro, datas das operações e outras ocorrências

Observações



5. RECOLHA DE SANGUE

Preparação do Soro

Material e reagentes.

- Animais imunizados e/ou não imunizados (galinhas)
- Seringas estéreis
- Centrífuga
- Microtubos
- Azida de sódio a 10%

Procedimento experimental

1. Picar a veia jugular ou a veia da asa e tomar amostra de sangue por aspiração (máximo 2 mL)
2. Compensar o animal com soro fisiológico estéril, se necessário
3. Marcar o tubo e homogeneizar o sangue recolhido.
4. Aguardar de 20 a 30 minutos a temperatura ambiente
5. Arrefecer no frigorífico durante 1 hora
6. Centrifugar 4000 rpm durante 10 min
7. Pipetar até 1 mL de soro por cada microtubo devidamente identificado
8. Adicionar azida de sódio a 0,02% final (sock 100 X)
9. Conservar congelado a -20°C.

Observações



Preparação de Eritrócitos

Material e Reagentes

- Solução anticoagulante (ACD):
 - Ácido cítrico – 4.0 g/L
 - Citrato de sódio – 22,6 g/L
 - D-Glucose – 22.0 g/L
 - Autoclavar
- PBS-A
- Seringas (2,5 mL) e agulhas para recolha de sangue
- Centrífuga de baixa rotação

Procedimento experimental

1. Pipetar 300 μ L de solução ACD para tubos Eppendorf (2 por galinha)
2. Tomar o sangue venoso da veia jugular ou da asa da galinha (até 2,0 mL por ave)
3. Remover agulha da seringa
4. Adicionar imediatamente a cada tubo ACD cerca de 0,9 mL de sangue
5. Homogeneizar suavemente por rotação
6. Transferir o sangue para tubo de centrífuga contendo 10 mL de PBS-A (pipeta Pasteur)
7. Centrifugar 500 g X 10 minutos
8. Remover o sobrenadante
9. Lavar mais duas vezes as células com 10 mL de PBS-A, homogeneizando suavemente
10. Ressuspender o sedimento de células com 5 mL de PBS-A
11. Avaliar hematócrito (10% v/v)
12. Conservar a 4°C

Observações



6. OBSERVAÇÃO DE CÉLULAS SANGUÍNEAS (HUMANAS)

Coloração de Wright

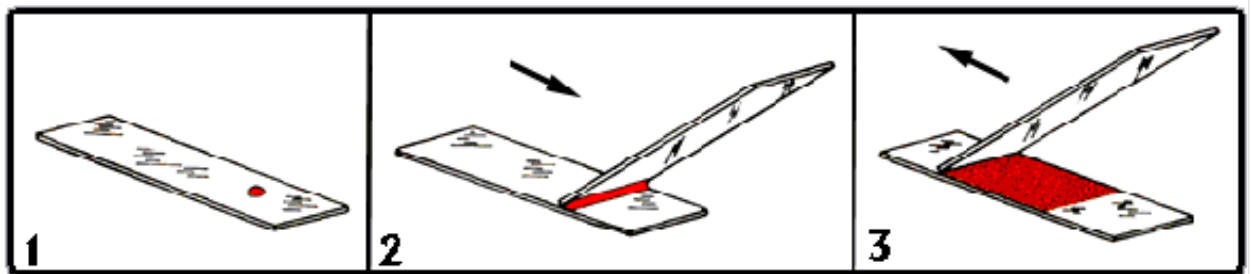
Material e reagentes

- Sangue total capilar, fresco
- Solução de Wright (corante)
- Solução tampão (6.63 g KH_2PO_4 ; 2.56 g Na_2HPO_4 ; H_2O ad. 1L)
- Lâminas de microscópio novas (lavadas e desengorduradas)

Procedimento experimental (individual)

(Trabalho individual a efetuar com o próprio sangue)

1. Colocar 1 gota de sangue fresco a 1/3 da extremidade da lâmina
2. Espalhar uniformemente a amostra com auxílio de outra lâmina (ver esquema)
3. Deixar secar ao ar
4. Cobrir o esfregaço com solução corante de Wright
5. Deixar atuar durante 2 minutos
6. Adicionar igual volume de solução tampão
7. Homogeneizar movimentando o corante com jacto de ar de pipeta
8. Deixar atuar durante 3 a 4 minutos
(as margens deverão apresentar uma cor avermelhada e o centro um brilho metálico esverdeado)
9. Remover o corante por lavagem em água corrente. Lavar a lâmina com água destilada
10. Deixar secar ao ar. Observar ao microscópio. Registrar observações, desenhando e identificando os diferentes tipos de células



Observações



7. PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS – PRECIPITAÇÃO DIFERENCIAL

Material e Reagentes

- Soro a purificar
- Solução saturada de Sulfato de amónio em água
- PBS-A (pH 7,2)
 - 0,8% NaCl
 - 0,02% KH_2PO_4
 - 0,144% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Microtubos
- Manga de diálise

Procedimento experimental (por grupo)

1. Pipetar 500 μL de soro a purificar para microtubo
2. Adicionar 400 μL de sulfato de amónio saturado (40-45%)
3. Misturar e conservar no gelo durante 30 minutos
4. Centrifugar 5 min na eppendorf
5. Pipetar e rejeitar o sobrenadante
6. Escorrer bem o tubo
7. Dissolver o sedimento com 250 μL de PBS
8. Dialisar contra PBS-A contendo 0,02% de azida de sódio, pelo menos durante uma noite
9. Recuperar o conteúdo da manga de diálise
10. Congelar a -20°C .

Observações



8. IMUNOPRECIPITAÇÃO - QUALITATIVA

Teste do anel

Material e Reagentes

- Soro a testar
- Imunoglobulinas purificadas
- Solução de antígeno
- Glicerol a 10%
- Microtubos de ensaio em vidro
- Micropipetas

Procedimento experimental

1. Equilibrar todas as soluções e tubos a 37°C
2. Pipetar 200 µL de soro a testar e/ou imunoglobulinas para o fundo do tubo
3. Adicionar 20 µL de glicerol, homogeneizando com a pipeta
4. Pipetar 200 µL de solução de antígeno para a superfície do soro, cuidadosamente e sem misturar as fases
5. Incubar a 37°C durante 30 minutos a 1 hora
6. Observar a formação de um precipitado em anel na zona da interface entre as duas soluções

Observações



Teste em lâmina

Material e Reagentes

- Soro a testar
- Imunoglobulinas purificadas
- Solução de antigénio
- Lâminas de microscópio
- Micropipetas

Procedimento experimental

1. Equilibrar todas as soluções e lâminas a 37°C
2. Pipetar 1 gota de solução de antigénio no centro de uma lâmina
3. Pipetar 1 gota de soro a testar sobre a gota precedente
4. Repetir com as imunoglobulinas purificadas
5. Incubar a 37°C durante 30 minutos a 1 hora
6. Observar a formação de precipitado
7. Registar observação

Observações



Nefelometria

Material e Reagentes

- Soro a testar ou Imunoglobulinas purificadas
- Solução de antígeno 1mg/ml
- PBS-A
- Microtubos eppendorf
- Micropipetas

Procedimento experimental

1. Marcar 5 tubos eppendorf de 1 a 5
2. Pipetar 200 μ L de soro a testar para tubo 1
3. Pipetar 100 μ L de soro a testar para tubo 2
4. Adicionar 200 μ L de PBS-A. Homogeneizar
5. Transferir 100 μ L da solução do tubo 2 para o tubo 3
6. Adicionar 200 μ L de PBS-A. Homogeneizar
7. Transferir 100 μ L da solução do tubo 3 para o tubo 4
8. Adicionar 200 μ L de PBS-A. Homogeneizar
9. Transferir 100 μ L da solução do tubo 4 para o tubo 5
10. Adicionar 200 μ L de PBS-A. Homogeneizar
11. Remover e rejeitar 100 μ L da solução do tubo 5
12. Adicionar 200 μ L de PBS-A ao tubo 6
13. Adicionar a cada tubo 800 μ L de solução de antígeno
14. Homogeneizar.
15. Incubar a 37°C por 30 minutos
16. Ler a DO de todos os tubos
17. Registrar os dados.

Observações



9. IMUNOPRECIPITAÇÃO – QUANTITATIVA

Curva de precipitação

Material e Reagentes

- Soro a testar
- Solução de antigénio (1 mg/mL)
- PBS-A
- Microtubos
- Micropipetas

Procedimento experimental

1. Preparar diluições do soro: 10^{-0} , 3×10^{-1} , 10^{-1} , 3×10^{-2} , 10^{-2} , 3×10^{-3} , PBS
2. Pipetar 200 μ L de cada diluição dos soros a testar para cada tubo
3. Adicionar a cada tubo 200 μ L de solução de antigénio
4. Misturar no vortex
5. Incubar em estufa a 37°C durante uma hora
6. Centrifugar 2 minutos
7. Observar e registar os níveis de precipitado visível em cada tubo
8. Decantar o sobrenadante.
9. Escorrer e secar o sedimento
10. Pesar os sedimentos a peso constante
11. Quantificar o título do soro pela determinação do ponto de equivalência do relativamente ao antigénio

Observações



10. IMUNODIFUSÃO

Imunodifusão simples

Material e Reagentes

- | | |
|---|---|
| — Soros a testar ou Imunoglobulinas purificadas | — Solução corante de Coomasie (0.25% de azul de Coomasie em solução descorante) |
| — Solução de antigénio a 10 mg/mL | — Solução descorante (ácido acético glacial - 10%, metanol - 50%) |
| — Agar ou Agarose tipo V (ou II) | — Lâminas de microscópio |
| — Azida de sódio 10% | |

Procedimento experimental

1. Preparação do gel
 - a. Pesar 0.1 g de agar ou agarose para erlenmeyer
 - b. Adicionar 9 mL de PBS. Fundir em forno de micro-ondas
 - c. Arrefecer a cerca de 50°C. Adicionar 50 µL de azida a 10%
 - d. Adicionar 1 mL de solução de antigénio. Homogeneizar.
 - e. Aplicar cuidadosamente em cada lâmina uma quantidade que permita uma altura de ± 2 a 3mm (5 mL por lâmina de microscópio)
 - f. Deixar solidificar sobre superfície horizontal
 - g. Com pipeta Pasteur truncada perfurar a agarose (~1,5 mm Ø) em 3 locais equidistantes e centrados. Remover o agar cortado por aspiração
2. Ensaio
 - a. Distribuir as amostras de soros ou imunoglobulinas a testar pelos orifícios (~15 µL por poço)
 - b. Cobrir a lâmina com filme plástico transparente
 - c. Incubar em estufa a 37°C, em câmara húmida, durante, pelo menos, 1 hora
3. Observar a precipitação. Registrar e desenhar as observações
4. Coloração (se necessário)
 - a. Corar o gel com azul de Coomasie
 - b. Diferenciar em solução descorante. Lavar em PBS
 - c. Observar e registar os resultados

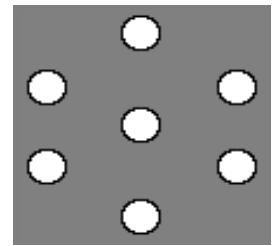
Observações



Imunodifusão dupla (Ouchterlony)

Material e Reagentes

- Soros a testar ou Imunoglobulinas purificadas
- Solução de antígeno 10 mg/mL
- Agar ou Agarose tipo V (ou II)
- Azida de sódio 10%
- Solução corante de Coomassie (0.25% de azul de Coomassie em solução descorante)
- Solução descorante (ácido acético glacial - 10%, metanol - 50%)
- Lâminas de microscópio



Procedimento experimental

1. Preparação do gel
 - a. Pesar 0.1 g de agar ou agarose
 - b. Adicionar 10 mL de PBS. Fundir em forno de micro-ondas
 - c. Arrefecer a cerca de 50°C. Adicionar 50 µL de azida a 10%
 - d. Aplicar cuidadosamente em cada lâmina 5 mL de gel (± 5 mm de altura)
 - e. Deixar solidificar sobre superfície horizontal
 - f. Perfurar a agarose, conforme à ilustração (em pontos equidistantes e separados de 1 cm do orifício central). Aspirar o agar cortado com pipeta.
2. Ensaio
 - a. Encher o orifício central com solução de antígeno
 - b. Colocar em cada um dos outros orifícios volumes iguais de soro a testar e imunoglobulinas purificadas (não diluído e diluído a 1:10)
 - c. Cobrir lâmina com filme plástico transparente
 - d. Incubar em estufa a 37°C, em câmara húmida, durante, pelo menos, 1 hora
3. Observar linhas de precipitação. Registrar e desenhar as observações
4. Coloração
 - a. Corar o gel com azul de Coomassie
 - b. Diferenciar em solução descorante. Lavar em PBS
 - c. Secar o agar com papel absorvente (compressão prolongada com múltiplas camadas de absorvente)
5. Observar e registrar os resultados

Observações



11. HEMAGLUTINAÇÃO

Material e Reagentes

- Eritrócitos de galinha lavados
- Soros a testar
- Solução de antígeno (10 mg/mL)
- PBS-A
- Tubos de vidro pequenos de fundo redondo

Procedimento experimental

1. Ressuspender suavemente os eritrócitos lavados;
2. Tomar 1 mL de suspensão homogénea para tudo de centrífuga;
3. Centrifugar 500 G X 10 minutos;
4. Remover e rejeitar o sobrenadante;
5. Ressuspender as células com 1 mL de PBS-A
6. Por cada soro a testar, marcar 4 tubos e distribuir:

	1	2	3	4
PBS-A (µL)	200	100	100	-
Suspensão de eritrócitos lavados (µL)	200	200	200	200
Solução antígeno (µL)	-	-	100	100
Soro a testar	-	100	-	100
	Controlo células	Controlo soro	Controlo antígeno	TESTE

7. Agitar suavemente os tubos para misturar o conteúdo
8. Repousar a temperatura ambiente até à sedimentação das células (verificar sedimentação completa em tubo 1)
9. Observar e registar os resultados em todos os tubos

Observações



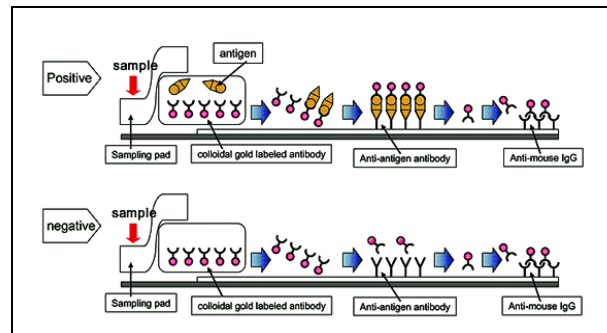
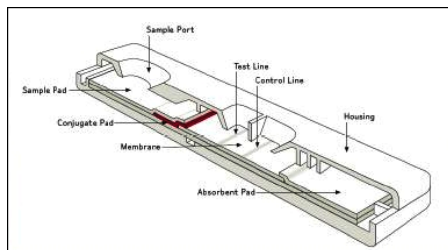
12. TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO (RÁPIDO)

Material e Reagentes

- Amostra a testar
- Dispositivo imunocromatográfico descartável

Procedimento experimental

1. Tomar o dispositivo e deixar aquecer à temperatura ambiente
2. Aplicar III gotas da amostra a estudar no receptáculo da amostra
3. Observar a migração da amostra pela matriz
4. Observar a formação de uma ou duas bandas coradas
5. Registrar a observação



Observações



13. IMUNOELECTROFORESE

Material e Reagentes

- | | | |
|-------------------------------------|--|---|
| — Soro a testar | — Tampão barbital (2X): | — Solução corante de Coomassie (0.25% de azul de Coomassie em solução descorante) |
| — Solução de antigénio a 10 mg/mL | — Barbitol de sódio 0,2 M - 50 mL | — Solução descorante |
| — Agar ou Agarose tipo V (ou II) | — HCl 0,2 M - 6,0 mL | ○ Ác. acético glacial 10% |
| — Azida de sódio 10% | — H ₂ O destilada ad 100 mL | ○ Metanol - 50% |
| — Barbital de sódio (Veronal) 0,2 M | pH 8,6 | — Lâminas de microscópio |

Procedimento experimental

Preparação do gel

1. Pesar 0.15 g de agar lavado ou agarose para erlenmeyer
2. Adicionar 5 mL de água destilada. Fundir em forno de micro-ondas. Arrefecer a cerca de 50°C
3. Adicionar 5 mL de T. Barbital 2X. Misturar.
4. Posicionar perpendicularmente à lâmina o pente para formação dos poços de aplicação
5. Aplicar em cada lâmina 5 mL de solução de agar 1,5%
6. Deixar solidificar sobre superfície horizontal. Remover o pente

Electroforese

1. Adicionar a cada amostra de soro 20% de glicerol 50%
2. Encher os depósitos dos eléctrodos e os poços do gel com T. Barbital
3. Aplicar a amostra de soro a testar sob o tampão de barbital em cada poço
4. Colocar a lâmina na tina de electroforese.
5. Fazer as pontes entre os eléctrodos e o gel com papel de filtro embebido no T. Barbital
6. Cobrir a lâmina com larfilm, sem bolhas de ar
7. Aplicar a corrente eléctrica (8 mA por lâmina) durante 30 minutos
8. Remover a lâmina e corar

Coloração

1. Corar o gel com azul de Coomassie
2. Diferenciar em solução descorante.
3. Lavar em PBS
4. Observar e registar os resultados

Observações



14. ELISA (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

“Checker board”

Material e reagentes

— Microplacas para ELISA (2 X 8 poços)	— Tampão de Fixação pH 9,6 - 0,159% Na ₂ CO ₃ - 0,293% NaHCO ₃ - 0,02% NaN ₃	— Tampão de Substrato pH 5,0 - 1,118% Na ₂ HPO ₄ - 0,56% Ácido cítrico
— Solução de antígeno a 10 mg/mL (BSA)	— Tampão de Bloqueio - 5% Leite em pó desnatado em PBS-A	— Solução OPD (extemp.) OPD (O-fenileno-diamina) - 20 mg H ₂ O ₂ - 10 µl
— Soro a testar	— Tampão de Lavagem pH 7,2 - 0,8% NaCl - 0,02% KH ₂ PO ₄ - 0,144% Na ₂ HPO ₄ .2.H ₂ O - 0,05% Tween 20	Tampão de substrato - 60 mL
— 2º. Anticorpo Soro anti-galinha conjugado com peroxidase (diluído em Tampão de bloqueio 1:5000)		— 4N H ₂ SO ₄

Procedimento experimental

1. Marcar 8 tubos eppendorf (1 a 8)
2. Fazer diluições:

Tubo (filas)	1	2	3	4	5	6	7	8
Tampão de fixação (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1
Antígeno - BSA 10 mg/mL (mL)	0,5	-	-	-	-	-	-	-
Solução precedente (mL)	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-

3. Usar todos os poços (de 1 a 8) de três filas (A...H) de uma microplaca
4. Distribuir 100 µL de cada diluição para o respectivo poço de cada uma das três filas da microplaca (exemplo: colunas A, B, C; poços das filas 1 a 8)
5. Anotar as diluições de antígeno de cada poço utilizado
6. Incubar 4°C durante, pelo menos, 24 horas, ao abrigo da dissecação
7. Lavar três vezes cada poço da microplaca com 200 µL de Tampão de Lavagem, repousando durante 3 min de cada vez
8. Fazer as diluições do soro a usar:

Tubo (colunas)	A	B	C
Tampão de bloqueio (µl)	-	900	900
Soro a testar (µl)	1000	100	-
Solução precedente (µl)	-	-	100

9. Distribuir 100 µL de cada tubo para os poços respectivos das três colunas da microplaca
10. Incubar 37°C durante 30 minutos (ou a 4°C durante uma noite), ao abrigo da dissecação
11. Lavar três vezes cada poço da microplaca com 200 µL de Tampão de Lavagem, repousando durante 3 min de cada vez
12. Distribuir 100 µL da solução do 2º Anticorpo por cada poço da microplaca utilizado (Cada grupo utiliza diferentes soluções diluídas - 1:1000; 1:2000; 1:5000; 1:7500; 1:10000)
13. Incubar 37°C durante 30 minutos, ao abrigo da dissecação
14. Lavar três vezes cada poço da microplaca com 200 µL de Tampão de Lavagem, repousando durante 3 min de cada vez



15. Adicionar 200 μL de solução OPD a cada poço
16. Incubar 37°C durante 15 min, ao abrigo da dissecação e no escuro, observando até ao surgimento de cor nalguns dos poços
17. Adicionar 50 μL de H_2SO_4 em cada poço
18. Observar e registar as intensidades de cor relativas (cada elemento do grupo faz uma leitura autónoma)
19. Estabelecer a média das leituras efetuadas para cada poço
20. Definir as melhores concentrações de antigénio e anticorpo a usar no teste de ELISA a realizar com os soros de cada grupo



Registo de resultados

Concentrações de antígeno / soro (0 a +++)

		1	2	3	4	5	6	7	8		
Soro	1									Coluna	
	1:10										
	1:100										
		1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243	1:729	0	Antígeno	

Concentrações de antígeno / soro (0 a +++)

		1	2	3	4	5	6	7	8		
Soro	1									Coluna	
	1:10										
	1:100										
		1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243	1:729	0	Antígeno	

Concentrações de antígeno / soro (0 a +++)

		1	2	3	4	5	6	7	8		
Soro	1									Coluna	
	1:10										
	1:100										
		1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243	1:729	0	Antígeno	

Observações



Teste

Material e reagentes

(os mesmos que para Checker board)

- Soro a testar
- Solução de antígeno a 10 mg/mL
- Soro a testar
- 2º Anticorpo - GACIG-HRPO

Diluir cada solução de acordo com os resultados da experiência anterior

Procedimento experimental

1. Diluir o antígeno de acordo com a avaliação efetuada no “checker board”.
2. Distribuir 100 µL de solução de antígeno por poço de microplaca
3. Incubar 4°C durante, pelo menos 24 horas, ao abrigo da dissecação
4. Lavar três vezes cada poço da microplaca com 200 µL de Tampão de Lavagem, repousando durante 3 min de cada vez
5. Distribuir 200 µL de Tampão de Bloqueio por poço.
6. Incubar durante 30 minutos a 37°C
7. Lavar três vezes cada poço da microplaca com 200 µL de Tampão de Lavagem, repousando durante 3 min de cada vez
8. Preparar diluições sequenciais de 3 em 3 de cada soro a testar:

Amostra(poço)	1(B)	2(C)	3(D)	4(E)	5(F)	6(G)	7(H)
T. Bloqueio	120	120	120	120	120	120	120
Soro a testar	-	60					
Diluição anterior	-	-	60	60	60	60	60

9. Nos poços da fila A aplicar 100 µL de Tampão de bloqueio
10. Nos poços das filas B a H aplicar 100 µL das diluições do soro a testar (conforme tabela)
11. Fazer réplicas (repetir passos 8 a 10 em colunas diferentes)
12. Incubar 37°C durante 1 hora (ou a 4°C durante uma noite), ao abrigo da dissecação
13. Lavar três vezes cada poço da microplaca com 200 µL de Tampão de Lavagem, repousando durante 3 min de cada vez
14. Distribuir 100 µL da solução diluída do 2º. Anticorpo por cada poço da microplaca
15. Incubar 37°C durante 1 hora (ou a 4°C durante uma noite), ao abrigo da dissecação
16. Lavar três vezes cada poço da microplaca com 200 µL de Tampão de Lavagem, repousando durante 3 min de cada vez
17. Adicionar 200 µL de solução OPD a cada poço
18. Incubar 37°C durante 15 min, ao abrigo da dissecação e no escuro, até ao aparecimento de cor nalguns poços
19. Adicionar 50 µL de H₂SO₄ por poço
20. Observar e registar as intensidades de cor relativas (cada elemento do grupo faz uma leitura autónoma)
21. Estabelecer a média das leituras efetuadas para cada poço
22. Avaliar título aproximado do soro (última diluição positiva diferente do controlo negativo)



Registo de resultados

Resultados observados (de ++++ a 0) - OPERADOR 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Resultados observados (de ++++ a 0) - OPERADOR 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Observações



Resultados observados (de ++++ a 0) - OPERADOR 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

MÉDIA DOS RESULTADOS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Amostra: _____

Títulos dos soros.

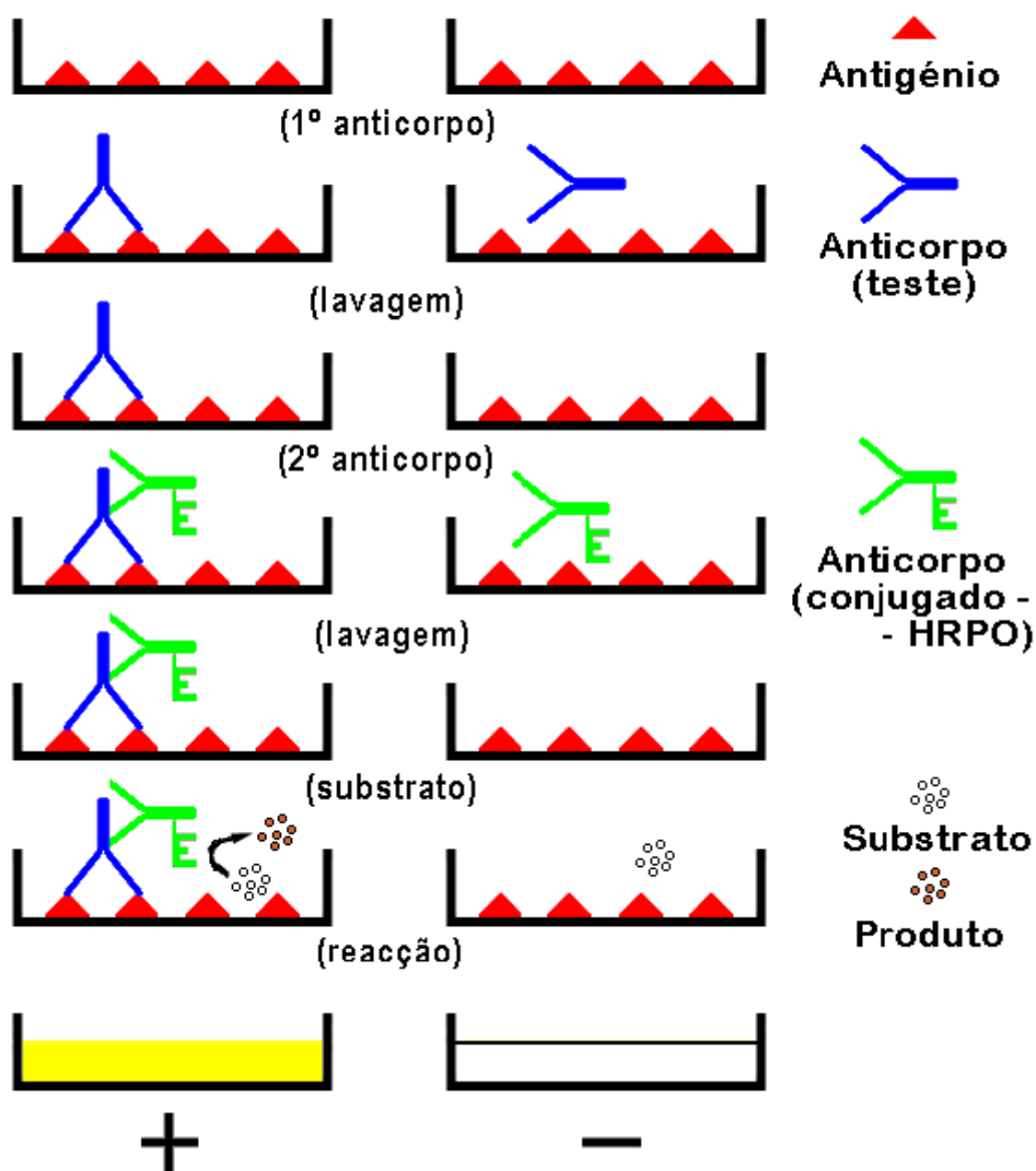
Pré-imune	
15 dias	
30 dias	
45 dias	
60 dias	



Representação esquemática de uma ELISA

ELISA

(*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*)



Carlos Sinogas