



Imunofluorescência– Oócitos/Embriões

- 1) Lavar 1x em gotas de 100 µl com PBS + 1% PVP;
- 2) Fixar em uma gota de 200 µl com 2% formaldeído em PBS + 1% PVP por 15 minutos à temperatura ambiente;
- 3) Lavar 3x em gotas de 100 µl com PBS + 1% PVP;
- 4) Remover a ZP por incubação em uma gota de 100 µl de Tyrode's acid por 5 a 10 minutos (até a ZP desaparecer);
- 5) Lavar com PBS + 5% BSA + glicina 0,1M. Cuidado: os oócitos/embriões grudam muito facilmente no plástico quando sem a ZP, por isso usar PBS + 5% BSA. Cuidado com o diâmetro da pipeta pois os oócitos/embriões se deformam muito facilmente;
- 6) Incubar por 15 minutos em uma gota de 200 µl de PBS + 5% BSA + 0,1% saponina;
- 7) Bloquear por 30 a 60 minutos em um tubo de 0,6 ml contendo 100 µl de PBS + 5% BSA + 0,1M glicina;
- 8) Incubar 1 hora à temperatura ambiente ou overnight à 4°C com o anticorpo primário diluído 1:200 (deve ser otimizada) em PBS + 5% BSA + 0,01% saponina + 0,1M glicina (diluir 200 µl do PBS + 5% BSA + 0,1% saponina em 1,8 ml de PBS + 5% BSA + 0,1M glicina). Fazer a incubação em tubo de 0,6 ml contendo 50 µl do anticorpo diluído (0,25 µl do anticorpo em 50 µl do tampão). Separar uma parte das amostras para serem utilizadas como controle negativo. Neste caso, incubar da mesma forma mas somente no tampão usado como diluente;
- 9) Lavar 5x de 5 minutos em gotas de 100 µl de PBS + 5% BSA + 0,1M glicina;
- 10) Incubar com o anticorpo secundário (reativo contra a espécie utilizada para produção do anticorpo primário) diluído 1:400 em PBS + 5% BSA + 0,01% saponina por 45 a 60 minutos. Fazer a incubação em tubo de 0,6 ml contendo 100 µl do anticorpo diluído (0,25 µl do anticorpo em 50 µl do tampão). Também incubar as amostras do controle negativo;
- 11) Lavar 3x de 5 minutos em gotas de 100 µl de PBS + 5% BSA + 0,1M glicina;
- 12) Corar com Hoeschst 33342 em PBS + 5% BSA + 0,1M glicina;

13) Montar lâmina com Prolong Gold e usar silicone/graxa para sustentar a lamínula. Vedar a lamínula com base cosmética sem formaldeído. Alternativamente, analisar em microscópio invertido usando placa de Petri com fundo de lamínula.

PS: se for fazer dupla marcação, incubar separadamente com cada anticorpo primário e então separadamente com os anticorpos secundários.