

# Microscopia Confocal

1. O laboratório de microscopia confocal/fluorescência tem a finalidade de prestar serviços de microscopia por fluorescência utilizando módulo confocal de varredura à laser para docentes dos Programas de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental e em Fisiocirurgia da UERJ.
2. O equipamento e acessórios foram obtidos em Projeto da FAPERJ (Processo Nº E-26/190.311/2012), estando assim disponíveis desde que observadas as regras específicas de utilização.

1. Coordenadores:

Prof [Carlos A. Mandarim-de-Lacerda](#) e Prof [Francisco J. B. Sampaio](#),

2. Profª Responsável Drª [Tatiane Silva Faria](#)

3. Técnico responsável: Bióloga [Thatiany Marinho](#)

4. Solicitação de Serviço: somente por E-Mail para [agendaconfocal@gmail.com](mailto:agendaconfocal@gmail.com) (para onde deve ser enviado o formulário preenchido).

5. Baixar o FORMULÁRIO nas páginas do Departamento de Anatomia ([www.anatomia.uerj.br](http://www.anatomia.uerj.br)), do **BHEX** ([www.bhex.uerj.br](http://www.bhex.uerj.br)), ou da Fisiocirurgia ([www.fisiocirurgia.uerj.br](http://www.fisiocirurgia.uerj.br));

6. Localização do laboratório: [Departamento de Anatomia](#)

7. Usuários: [Docentes](#) dos Programas de Pós Graduação em Biologia Humana e Experimental, e Fisiocirurgia.

1. **Funcionalidades:** Microscopia confocal se destina ao estudo de amostras biológicas (*in vivo* e fixadas) fluorescentes (autofluorescentes ou marcadas). Ferramenta fundamental para estudos em Biologia Celular, permite estudar células/tecidos localizando proteínas no interior das células/tecidos e a interação entre proteínas.
2. As amostras são identificadas com marcação por imunofluorescência com diferentes fluorocromos. As técnicas devem ser adequadas ao tipo de amostra e procedimento.
3. O microscópio Confocal é útil para a formação de imagens em 2D (2 dimensões), 3D (3 dimensões).

1. **Características do Equipamento:** Sistema de Microscópio Confocal de Varredura a Laser da marca Nikon, modelo C2. Unidade de laser: módulo de 3-laser (AOM ou modulação manual). Detector padrão: detector fluorescente até 4 canais com 3 PMT, detector diascópico: 1 canal PMT.
2. **Módulo laser:** Laser de estado sólido dispondo de uma ampla faixa de lasers visíveis para atender à maioria das aplicações padrão de fluorescência, incluindo: 405nm, 488nm e 640nm. Possibilitando a excitação da amostra nos seguintes comprimentos de onda: 358nm, 495nm e 556nm e a emissão em 461nm, 519nm e 573nm.
3. **Módulo eletrônico e Software NIS-Elements C:** Visualização e renderização de 3D volume/ortogonal, costura de imagem grande, tempo transcorrido de ponto múltiplo, separação espectral, DAQ e controle I/O, análise de tempo transcorrido, deconvolução, análise de proporção; segmentação morfológica, saída de arquivo AVI e MOV.

## Protocolo para Imunofluorescência (Tecidos Congelados)

**Material:** Tecidos – cortes de 5 µm de espessura em lâminas silanizadas

**Alvo:** proteínas de matriz extracelular, intracelulares ou de superfície celular

**Revelação:** fluoróforos Alexa

- |    |  |        |
|----|--|--------|
| a) | Fixar com acetona a -20°C .....  | 15'    |
| b) | PBS 1X .....   | 3 x 5' |
| c) | Triton X-100 0,5% (somente para proteínas intracelulares).....   | 15'    |
| d) | PBS 1X .....   | 3 x 5' |
| e) | PBS/BSA 1% .....   | 3 x 5' |
| f) | PBS/BSA 5% .....   | 1h     |
| g) | Anticorpo primário temperatura ambiente (diluir em PBS/BSA 1%).....  | 2h     |
| h) | PBS/BSA 5% .....   | 20'    |
| i) | PBS/BSA 1% .....   | 3 x 5' |
| j) | Anticorpo 2° conjugado com fluoróforo Alexa.....   | 1h     |
| k) | PBS 1X .....   | 5 x 5' |
| l) | Água destilada ou bidestilada .....  | 3 x 2' |
| m) | DAPI 1:1000 .....  | 5'     |
| n) | Montar lâminas com N-propil-galato ou SlowFade (Invitrogen):<br>* Adicionar 1 gota componente <b>C (tampão) do kit SlowFade (Invitrogen)</b> ..... | 5'     |
|    | * Montar lâminas com SlowFade - 1 gota componente A (Invitrogen)   |        |
| o) | Selar lamínulas com esmalte no dia seguinte  |        |

**Obs:** Não esquecer do controle negativo (sem anticorpo primário, somente anticorpo secundário) e de montar uma lâmina sem qualquer anticorpo.

## Protocolo para Imunofluorescência (Inclusão em Parafina/Paraplast)

**Material: Tecidos – cortes de 5 µm de espessura em lâminas silanizadas (para proteínas intracelulares)**

**Revelação: fluoróforos Alexa**

a)	Estufa 58°C .....	20'
b)	Xilol 1 .....	10'
c)	Xilol 2 .....	10'
d)	Álcool 100% .....	5'
e)	Álcool 90% .....	3'
f)	Álcool 70% .....	3'
g)	H <sub>2</sub> O destilada .....	3'
h)	Tampão Citrato 60° C pH 6,0 .....	20'
i)	Ambientalizar .....	30'
j)	PBS 1X .....	3 x 5'
k)	<b>Triton X-100 0,5% (somente para proteínas intracelulares)</b> .....	<b>15'</b>
l)	<b>PBS 1X</b> .....	<b>3 x 5'</b>
m)	Bloqueio com Cloreto de Amônio .....	30'
n)	Bloqueio com Glicina 2% .....	30'
o)	PBS/BSA 5% .....	1h
p)	Anticorpo primário temperatura ambiente (diluir em PBS/BSA 1%).....	overnight
q)	PBS/BSA 5% .....	20'
r)	PBS 1X .....	5 x 5'

A partir deste momento **NÃO expor a luz**

s)	Anticorpo 2° conjugado com fluoróforo Alexa.....	1h
t)	PBS 1X .....	5 x 5'
u)	DAPI .....	5'
v)	Lavagem H <sub>2</sub> O destilada .....	1 X
w)	Montar lâminas com N-propil-galato ou SlowFade (Invitrogen): * Adicionar 1 gota componente <b>C (tampão) do kit SlowFade (Invitrogen)</b> .....	5'
	* Montar lâminas com SlowFade - 1 gota componente <b>A (Invitrogen)</b>	
x)	Selar lamínulas com esmalte no dia seguinte	

**Obs: Não esquecer do controle negativo (sem anticorpo primário, somente anticorpo secundário) e de montar uma lâmina sem qualquer anticorpo (para verificar a autofluorescência)**

# Opções de recuperação antigênica (para tecidos fixados, se necessário):

## Alta temperatura:

1. Banho-Maria - citrato 10mM pH 6.0 por 20 min, 30 min à temperatura ambiente.
2. Panela de pressão (pp) - citrato 10mM pH 6.0 por 4 min contados a partir da pressurização total. Esfriar por 20 min sob água corrente.
3. Panela à vapor (Steamer- pv): citrato 10mM pH 6.0 por 30-60 min. Esfriar por 20 min à temperatura ambiente.
4. EDTA 1mM (Sigma E-5134) pH 8 por 30 min em Banho-Maria (pv). Esfriar por 30 min à temperatura ambiente.

## Digestão enzimática:

1. Tripsina/Pepsina (Digest-All kit, Invitrogen [003006](#)) a 37°C;
2. Proteinase-K (Gibco cat.25530-015) por 20 min a 37°C

# Regras de utilização

## Sistema Confocal C2

- 1) O FORMULÁRIO requisitando os serviços deve ser preenchido, assinado e enviado por email para: [agendaconfocal@gmail.com](mailto:agendaconfocal@gmail.com);
- 2) Baixar o FORMULÁRIO nas páginas do Departamento de Anatomia ([www.anatomia.uerj.br](http://www.anatomia.uerj.br)), do **BHEX** ([www.bhex.uerj.br](http://www.bhex.uerj.br)), ou da FisioCirurgia ([www.fisiocirurgia.uerj.br](http://www.fisiocirurgia.uerj.br));

### Observações importantes:

- a. Amostras com muito *background* ou com marcação fraca não ficarão melhores no confocal.
- b. Limite o número de imagens ao mínimo necessário.
- c. Os arquivos gerados serão de responsabilidade do usuário: cada usuário deverá levar seu CD/ DVD. O microscópio não está conectado à Internet e está proibida a utilização de *pen drive*.



3. Cada sessão terá duração máxima de 3 h. Apenas o técnico responsável operará o equipamento. Haverá turnos da manhã (9-12h) ou tarde (14-17h). Desistências e atrasos superiores a 15 min devem ser avisados com antecedência.
4. Para melhor atendimento, é estipulado um máximo de 9 h semanais por usuário.
5. O agendamento de sessões será catalogado por usuário, marcando-se um horário por vez. O próximo horário somente poderá ser marcado após o uso.
6. As sessões devem ser necessariamente acompanhadas pelo usuário. Não é atribuição do técnico conhecer a amostra ou interpretar os resultados. Ajudará se o usuário trouxer uma imagem (artigo ou arquivo) do que deseja visualizar.