

IVIAP – In vitro Induced Antibody Production

(Caterino-de-Araujo, 1992)

- Sensibilizar as placas com antígeno (estéril) e incubar “ overnight”. Bloquear as placas com BSA 2% (estéril)
- Retirar o baço do camundongo
- Macerar o baço com meio de cultura RPMI em placa de petri
- Separar os linfócitos utilizando **Solução de Lise** (v/v) ou Ficoll
- Centrifugar a 1500rpm por 15 minutos. Remover todo o sobrenadante e a camada superficial do “pellet”
- Contar as células e ajustar a concentração para 2×10^6 /ml ($100 \mu\text{l}/\text{well} = 2 \times 10^5$)
- Incubar (CO_2) por 48 horas
- Após esse período, lavar o poço cuidadosamente e em seguida realizar o ELISA normalmente

* Solução de Lise de hemácias (Tris-ammonium chloride)

Hudson & Hay, 1989

Cloreto de Amônio (0,16M)	8,30 g/litro
Tris (hydroxymethyl) aminomethane (0,17M)	20,60 g/litro

Adicionar 10ml de Tris para 90ml de Cloreto de Amônio e ajustar para pH 7.2

Meio RPMI 1640 (com drogas)

	Solução estoque	Uso/100ml
Anfotericina B	5mg/ml	50 μl
Penicilina	500.000 UI/ml	20 μl
Estreptomicina	200mg/ml	50 μl
β - mercaptoetanol	#	35 μl