

Soluções

β -gal Solução A

100 mM NaPO₄ pH 7.3
2 mM MgCl₂
5 mM EGTA

β -gal Solução B

100 mM NaPO₄ pH 7.3
2 mM MgCl₂
0,01% sódio deoxicolato
0.02 % NP-40

β -gal Developer

100 mM NaPO₄ pH 7.3
2 mM MgCl₂
0,01% sódio deoxicolato
0.02 % NP-40
5 mM K₃Fe(CN)₆
5 mM K₄Fe(CN)₆

100x X-gal

1 g X-gal
10 ml dimetilformamida

Glutaraldeído 0,5%

Diluir Glutaraldeído 25% 50 vezes em PBS

Ex: 0,5 ml de Glut 25% + 24,5 ml de PBS

Procedimentos

- 1- Fixar por, no mínimo, 30 minutos com glutaraldeído 0,5%;
OBS: Quando reagindo tecidos usar placas de 24 ou 48 poços.
- 2- Remover fixador e lavar duas vezes com PBS;
- 3- Enxaguar uma vez com Solução A;
- 4- Incubar com solução A por 30 minutos a temperatura ambiente;
- 5- Remover solução A e lavar uma vez com PBS;
- 6- Enxaguar uma vez com Solução B;
- 7- Incubar com solução B por 5 minutos a temperatura ambiente;

Procedimentos (cont.)

- 8- Diluir X-gal (100 X) no β -gal Developer;
- 9- Remover solução B;
- 10- Incubar na solução Developer contendo X-gal por no mínimo 30 minutos a 37°C;
OBS: Amostras positivas se ficarão azul escuro.
- 11- Parar reação lavando 5 vezes em PBS.

Reagentes

Fonte

Dimetilformamida	Fisher D
Glutaraldeído	Sigma E1510
X-Gal	Sigma E1510
K ₃ Fe(CN) ₆	Promega x
K ₄ Fe(CN) ₆ 1 Kb	Promega G754A
sódio deoxicolato	Fisher FB-SB1316
MgCl ₂	Invitrogen 15504-070
NP40	Promega H5003
EGTA	Sigma E5134