

Materiais

- Tubos eppendorf 0,6 mL
- Caneta permanente (tinta não sai com álcool)
- Lâminas a serem analisadas
- Tampão Fosfato 0,1M – bancada 2
- PFA 4% em uso – Geladeira área nova
- Proteinase K – Freezer 2 área nova
- Tampão de Equilíbrio – Freezer 2 área nova
- bDNTP – Freezer 2 da área nova
- TdT – Freezer 2 área nova
- SSC 20x – Geladeira área nova
- H₂O₂ – Geladeira área nova
- Streptoavidina – Geladeira área nova
- DAB substrate - Geladeira área nova
- DAB – Geladeira da área nova
- PBS.T – Soluções da bancada 2
- D.P.X. – Armário da área nova

Soluções

Tampão Fosfato 0,1M

- Misture 810 mL de solução B (NaH₂PO₄ – fosfato dibásico) 0,2 M com 190 mL de solução A (Na₂HPO₄ – fosfato monobásico) 0,2 M para 1L de tampão fosfato 0,1M.

Procedimentos

- 1- Lavar lâminas em Tampão Fosfato, 1 vez por 10 minutos.
- 2 - Refixar amostra com PFA 4% por 10'.
- 3 - Lavar lâminas com tampão fosfato, 1 vez por 10 minutos.
- 4 - Tratar com Proteinase K (1:500, diluído em PBS 1x ou Tampão Fosfato) por 10 minutos.
- 5 - Lavar lâminas com tampão fosfato, 1 vez por 5 minutos.
- 6 - Refixar lâminas com PFA 4% por 10 minutos.
- 7- Lavar lâminas com tampão fosfato, 1 vez por 5 minutos.
- 8 - Incubar com tampão de equilíbrio por 10 minutos.
- 9 - Preparar mix - 98 µL de tampão de equilíbrio + 1 µL de TdT (vortexar) + 1 µL de bDNTP (vortexar)
- 10 - Incubar com mix por 30 minutos na estufa a 37 graus.
- 11 - Diluir o SSC 20x para 2x em tampão fosfato.

12 - Lavar lâminas com tampão fosfato, 3 vezes por 2 minutos cada.

13 - Diluir H₂O₂ 20x para 4x em tampão fosfato.

14 - Incubar por 3 minutos com H₂O₂ 0,4x

15 - Lavar lâminas com tampão fosfato, 3 vezes por 2 minutos cada.

16 – Incubar por 30 minutos com streptoavidina (1:500 em tampão fosfato).

17 - Lavar lâminas com tampão fosfato, 3 vezes por 2 minutos cada.

18 – Preparação solução DAB – 85 µL de Q + 5 µL de DAB substrate (vortexar) + 5 µL de H₂O₂ 20x (vortexar) + 5 µL de DAB (vortexar).

19 - Incubar com solução de DAB e visualizar reação na lupa – parar quando os núcleos ficarem bem marcados (por volta de 5 minutos).

20 - Lavar lâminas com tampão fosfato, 3 vezes por 30 segundos cada.

21 - Lavar com Tampão Fosfato por 2'.

22 - Lavar lâminas com tampão fosfato, 3 vezes por 30 segundos cada.

23 - Corar núcleos mergulhando as lâminas em Methylgreen por 20 segundos (filtre antes de utilizar) O methylgreen é reutilizável.

24 - Na capela:
Desidratar em banhos seriados de álcool 70% por 1 minuto e 30 segundos;
95% por 2 minutos (duas vezes);
100% por 2 minutos (duas vezes);
Xilol por 2 minutos (duas vezes).

24 – Montar lâmina com X.P.D.

Reagentes	Fonte
Eppendorf 0,6 ml	Axygen- MCT-060-C
NaOH	Sigma S8045
Tris	Invitrogen 15504-070
TUNEL	Promega G7362