

Protocolo para imuno em cortes de criostato (embriões)

1. Cortar os embriões no criostato e deixar os cortes secar nas lâminas cerca de 30-60min.
2. Rodear os cortes com caneta hidrofóbica.
3. Lavar 3x em PBS 1X (10min cada).
4. **(Opcional)** Se o tecido tiver denso e/ou o antígeno inacessível, incubar com Triton 0,2% em PBS 1X durante 20min e lavar 3x em PBS 1X (10min cada).
5. Cobrir os cortes com 5% BSA em PBS 1X e incubar durante 30min.
6. Colocar anticorpo 1^{ário} diluído em 1% BSA em PBS 1X, overnight a 4°C.
7. Lavar 3x em PBS 1X (10min cada).
8. Colocar anticorpo 2^{ário} diluído em 1% BSA em PBS 1X durante 1h à temperatura ambiente.
9. Lavar 3x em PBS 1X (pelo menos 10min cada)
NOTA : se existir muito background, lavar em PBS 4X.
10. Mergulhar as lâminas, uma por uma, numa tina com 5 µg/ml 4'6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) durante 30 segundos cada.
11. Montar em 50 mg/ml propilgalato em PBS:glicerol (1:9) e cobrir com uma lamela. Selar com verniz das unhas.