

Apéndices

Apéndice A.

Buffers y reactivos

1. PBS

2.27 g Na_2HPO_4

0.40 g KH_2PO_4

16,12 g NaCl

0.447 g KCl

Aforar con agua hasta 200ml para una concentración final de PBS 10x

2. PBT

1 ml de Tween 20

999 ml PBS

3. Buffer/ solución de bloqueo goat serum

4 ml de goat serum (abcam)

16 ml de KTBT

Para un volumen final de 20 ml, almacenar a $-20\text{ }^\circ\text{C}$

4. Solución Anti-dioxigenina-AP (1:500)

1 μl de Anti-dioxigenina-AP, roche

500 μl goat serum (abcam)

5. Buffer de detección

25 ml de Tris-HCL 1M (Ph 9.5)

25 ml de NaCl 1M

Aforar con agua libre de RNasas hasta 250 ml y ajustar el Ph hasta 9.5

6. Buffer de hibridación

7.5 ml de formamida 50%

3.75 ml de SSC 5x

303 µl de *goat roche serum blocking solution*

15 µl tween 20 0.1%

15 µl Heparin 50µg/ml

700 µl ARN de torula

300 µl EDTA 1mM

150 µl CHAPS 0.1%

Aforar hasta 15ml con agua libre de RNasas, almacenar a -20 °C

7. CHAPs-SSC

CHAPs 0.1%-SSC 2x

35ml de SSC 20x

0.35ml CHAPs 10x

Aforar con agua hasta 350ml

CHAPs 0.1%-SSC 0.2x

2.5 ml de SSC 20x

2.5 ml CHAPs 10x

Aforar con agua hasta 250ml

8. KTBT

30 ml Tris- HCl 50mM (Ph 7.5)

2.629 g NaCl 150mM

0.223g KCl 10mM

0.3 ml Tween 0.3%

Aforar hasta 300ml con agua libre de RNasas

9. NTM

5 ml Tris-HCl 100mM (Ph 9.5)

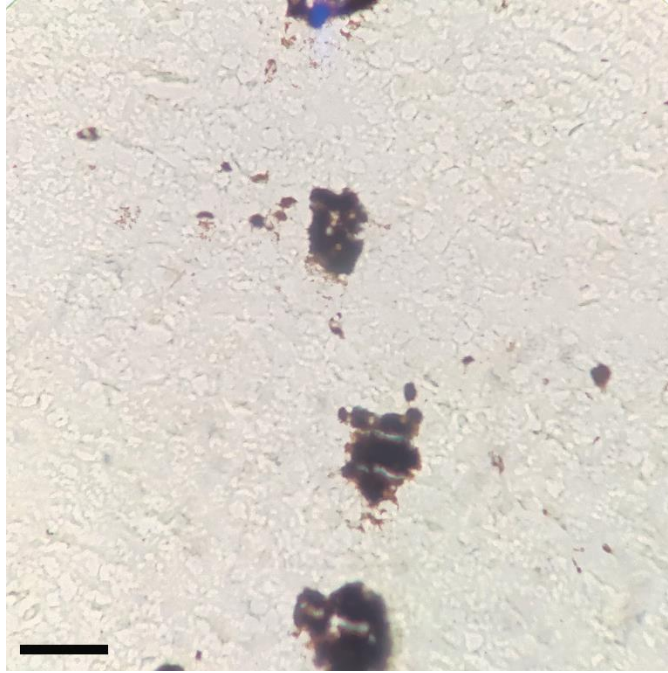
0.119 g MgCl₂ 50mM

0.1446 g NaCl 0.1M

Aforar hasta 25ml con agua libre de RNasas

Apéndice B.

Hibridación in situ no exitosa



Nota. Corte histológico de hígado. Hibridación *in situ* no exitosa con Th de 60 °C.

[] Proteinasa K: 10 µg/ml por 15 min

Th: 60 °C.

T lavados: 70 °C.

[] anticuerpos 1:1000

[] Sonda T7: 50 ng/µl

Tiempo en sustrato: > 2 horas