

## Inmuno amplificación BrdU/NEUN/GFAP fluorescencia

1er DÍA				
1. Lavados con PBS (10 min c/u)				
2. Incubar con PBS y borohidrato de sodio (0.5%) (15 min)				
3. Lavados con PBS (10 min c/u)				
4. Incubar con PBS, Tritón X (1%) y H2O2 (1%) (30 min)				
5. Incubar con PBS y DMSO (1%) (10 min)				
6. Lavados con PBS (10 min c/u)				
7. Incubar con 2N HCL (60 min) 37°C				
8. Lavado con PBS (10 min)				
9. Incubar con PBS y borohidrato de sodio (0.5%) (15 min)				
10. Lavados con PBS (10 min c/u)				
11. Incubar con PBS, Albúmina 10% y TX (0.3%) (30 min)				
<b>12. ANTICUERPO PRIMARIO</b> <b>serotec 1:800</b> 1% y TX (0.32%) (20 hrs mínimo) a 4°C,.	<b>Anti-BrdU (rata)</b> PBS, Albúmina			
2do DÍA				
13. Lavados PBS con TX (0.02%) y Albúmina 1% (15 min)				
<b>14. ANTICUERPO SECUNDARIO</b> biotilado _____ vector 1:500 Albúmina 1% y Tx (0.32%) (3 hrs)	Anti rata IgG en PBS,			
15. Lavados con PBS y TX (0.02%) (10 min c/u)    PREPARAR COMPLEJO AB				
16. Para 10mil de PBS (2A 2B)- TX 0.32% incubar por 90 min				
17. Lavados con PBS (10 min c/u)				
18. Kit Cumarina 1:100 (portaobjetos <b>Sin Gelatinizar</b> ) A partir de aquí OSCURAS!!! CÁMARA HÚMEDA				
19. Lavar con PBS (10 min)				
20. Incubar anticuerpo primario* en PBS-TX 0.32%, albúmina 1% (20 hrs a 4°C) <b>NeuN ratón (1:250)</b>				

## Inmuno amplificación BrdU/NEUN/GFAP fluorescencia-2

3er DÍA			
21. Lavar con PBS-TX 0.02%, albúmina 1% (15 min)			
22. <b>ANTICUERPO SECUNDARIO</b> IgG biotilado _____ vector 1:300 Albúmina 1% y Tx (0.32%) (3 hrs)	Anti mouse en PBS,		
23. Lavados con PBS y TX (0.02%) (10 min c/u) <b>COMPLEJO AB</b>	<b>PREPARAR</b>		
24. Para 10mil de PBS (2A 2B)- TX 0.32% incubar por 90 min			
25. Lavados con PBS (10 min c/u)			
26. Kit CY3 1:100 (portaobjetos <b>Sin Gelatinizar</b> ) A partir de aquí <b>OSCURAS!!!</b> <b>CÁMARA HÚMEDA</b>			
27. Lavar con PBS (10 min)			
28. Incubar anticuerpo primario* en PBS-TX 0.32%, albúmina 1% (20 hrs a 4°C) GFAP conejo ( <b>1:500</b> )			
4to DÍA			
29. Lavar con PBS-TX 0.02%, albúmina 1% (15 min)			
30. Anticuerpo secundario ** en PBS-TX 0.32%, Albúmina 1% (3hrs). 488 antirabbit (1:1250 VERDE)	Alexa		
31. Lavar con PBX-TX 0.02% (10 min)			
32. Lavar con PBS (10 min)			