Флуоресцентное окрашивание по Нисслю срезов мозга

Окрашивание по Нисслю — широко используемый гистологический метод визуализации морфологии нервной ткани. Метод основан на взаимодействии основных красителей с нуклеиновыми кислотами клеток. Из-за интенсивного синтеза белка, перикарион нейронов имеет высокое содержание рибосомальной РНК в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме (т. н. «вещество Ниссля»), и в следствие этого, окрашивание нейронов основными красителями в цитоплазме более выражено, чем в ядрах. На этом основании окрашенные по Нисслю нейроны можно отличить от глиальных клеток, а данный метод считается специфичным для обнаружения нейронов.

Флуоресцентные красители для окрашивания по Нисслю (Fluorescent Nissl Stains) представляют собой непроникающие в живые клетки красители, которые не флуоресцируют в отсутствие нуклеиновых кислот, но многократно усиливают свою флуоресценцию при связывании с РНК и ДНК. Мы предлагаем высококонцентрированные (1000×) флуоресцентные красители для метода Ниссля, обладающие различными спектральными свойствами.

Обращение и утилизация

Перед открытием каждую пробирку следует нагреть до комнатной температуры, а затем кратковременно центрифугировать в микроцентрифуге, чтобы раствор стек на дно пробирки. Если в растворе присутствуют частицы красителя, их необходимо растворить повторно, кратковременно обработав ультразвуком или энергично встряхнув пробирку после нагревания.

В настоящее время нет данных о мутагенности или токсичности данных красителей. Поскольку они связываются с нуклеиновыми кислотами, их следует рассматривать как потенциальные мутагены и обращаться с ними с соответствующей осторожностью. Работа со стоковыми растворами в ДМСО требует особого внимания, так как ДМСО усиливает всасывание органических молекул в ткани организма. Как и все красители нуклеиновых кислот, растворы красителей для окрашивания по Нисслю следует утилизировать в соответствии с местными рекомендациями.

Прежде чем начать

- Если окрашивание методом Ниссля совмещается с иммуногистохимией, сначала необходимо провести инкубации антител, и после этого окрашивание по Нисслю.
- Блокирующие растворы, содержащие лошадиную сыворотку, бычий сывороточный альбумин или обезжиренное сухое молоко, могут гасить сигнал флуоресцентного красителя для окрашивания по Нисслю. Используйте 0,5% рыбий желатин в качестве альтернативы этим реагентам.

Lumiprobe Corporation
115 Airport Dr Suite 160
Westminster, Maryland 21157
USA
Phone: +1 888 973 6353
Fax: +1 888 973 6354
Email: order@lumiprobe.com

Lumiprobe GmbH
Feodor-Lynen-Strasse 23
30625 Hannover
Germany
Phone: +49 511 16596811
Fax: +49 511 16596815
Email: de@lumiprobe.com

Lumiprobe RUS Ltd
Kotsyubinsky street, 4
121351 Moscow
Russian Federation
Phone: +7 800 775 3271
Email: ru@lumiprobe.com

Lumiprobe Limited
Suite 12, 3/F, Great Eagle Centre
23 Harbour Road, Wan Chai
Hong Kong
Mob.: +852-5929-0488 (from HK)
Phone: +86-147-14316277 (from China)
Email: hk@lumiprobe.com

Lumiprobe LTD
2 Tuvim St.
3223562, Haifa
Israel
Phone: +972-(0)4-374-0377
Email: il@lumiprobe.com

Lumiprobe Co., Ltd.
10H-11, Shenmao Commercial Center
No. 59 Xinwen Rd., Meiling Community
Lianhua Street, Futian District
Shenzhen, China
Phone: +86-1471431-6277
Email: cn@lumiprobe.com

Окрашивание замороженных срезов мозга

1. Соберите замороженные срезы мозга на предметном стекле, покрытом поли-L-лизином. Дайте им подсохнуть.

   Важно! Поскольку при окрашивании на стеклах диффузия красителя происходит только с одной стороны препарата, мы не рекомендуем использовать для этой цели срезы толще 25 мкм.

2. Фиксируйте срезы холодным нейтральным 4% параформальдегидом в течение 15 мин.
3. Промойте срезы дважды по 10 мин в 0,1 М фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7,4).
4. Пермеабилизируйте срезы инкубацией в 0,1% TBS (PBS с 0,1% Triton® X-100) в течение 10 мин при комнатной температуре. Данный шаг важен для достижения оптимального окрашивания.
5. Промойте срезы дважды по 5 мин в PBS.
6. Приготовьте окрашивающий раствор. Для этого добавьте концентрат красителя в пробирку с PBS в соотношении 1:1000 и тщательно перемешайте растворы. Оптимальное разведение красителя определяется эмпирическим путем.
7. Нанесите примерно 200 мкл окрашивающего раствора на предметное стекло так, чтобы срез был полностью покрыт. Инкубируйте в течение 20 мин при комнатной температуре.
8. Удалите краситель и промойте срезы в 0,1% TBS в течение 10 мин при комнатной температуре.
9. Промойте срезы дважды по 5 мин в PBS.
10. Для достижения наилучших результатов промойте срезы в PBS дополнительно в течение 2 ч при комнатной температуре или оставьте их в PBS на ночь при 4°C.
11. При необходимости контрастируйте срезы и промойте их в PBS.

Lumiprobe Corporation
115 Airport Dr Suite 160
Westminster, Maryland 21157
USA
Phone: +1 888 973 6353
Fax: +1 888 973 6354
Email: order@lumiprobe.com

Lumiprobe GmbH
Feodor-Lynen-Strasse 23
30625 Hannover
Germany
Phone: +49 511 16596811
Fax: +49 511 16596815
Email: de@lumiprobe.com

Lumiprobe RUS Ltd
Kotsyubinsky street, 4
121351 Moscow
Russian Federation
Phone: +7 800 775 3271
Email: ru@lumiprobe.com

Lumiprobe Limited
Suite 12, 3/F, Great Eagle Centre
23 Harbour Road, Wan Chai
Hong Kong
Mob.: +852-5929-0488 (from HK)
Phone: +86-147-14316277 (from China)
Email: hk@lumiprobe.com

Lumiprobe LTD
2 Tuvim St.
3223562, Haifa
Israel
Phone: +972-(0)4-374-0377
Email: il@lumiprobe.com

Lumiprobe Co., Ltd.
10H-11, Shenmao Commercial Center
No. 59 Xinwen Rd., Meiling Community
Lianhua Street, Futian District
Shenzhen, China
Phone: +86-1471431-6277
Email: cn@lumiprobe.com

Окрашивание свободно плавающих срезов мозга

1. Изготовьте срезы фиксированного мозга и соберите их в лунки планшета для культивирования клеток.
2. Промойте срезы дважды по 10 мин в PBS.
3. Пермеабилизируйте срезы инкубацией в 0,1% TBS в течение 10 мин при комнатной температуре. Данный шаг важен для достижения хорошего прокрашивания.
4. Приготовьте окрашивающий раствор. Для этого добавьте концентрат красителя в пробирку с PBS в соотношении 1:1000 и тщательно перемешайте растворы. Оптимальное разведение красителя определяется эмпирическим путем.
5. Добавьте 500 мкл окрашивающего раствора в каждую лунку со срезами и инкубируйте в течение 20 мин при комнатной температуре.
6. Удалите краситель и промойте срезы в 0,1% TBS в течение 10 мин при комнатной температуре.
7. Промойте срезы дважды по 5 мин в PBS.
8. Для достижения наилучших результатов промойте срезы в PBS дополнительно в течение 2 ч при комнатной температуре или оставьте их в PBS на ночь при 4°C.
9. При необходимости контрастируйте срезы и промойте их в PBS.
10. Соберите срезы на покрытые поли-L-лизином или желатином предметные стекла.

Заключение под покровные стекла

1. Нанесите на предметное стекло подходящую заключающую среду и накройте срезы покровным стеклом. Мы рекомендуем использовать для заключения среду LumiMount и наш подробный протокол для монтирования покровных стекол.
2. Окрашивание остается сохранным в течение нескольких недель или дольше, если предметное стекло хранится в темноте при температуре 4°C или -20°C. Со временем фон на препарате может усилиться, поскольку краситель постепенно вымывается в заключающую среду.

Lumiprobe Corporation
115 Airport Dr Suite 160
Westminster, Maryland 21157
USA
Phone: +1 888 973 6353
Fax: +1 888 973 6354
Email: order@lumiprobe.com

Lumiprobe GmbH
Feodor-Lynen-Strasse 23
30625 Hannover
Germany
Phone: +49 511 16596811
Fax: +49 511 16596815
Email: de@lumiprobe.com

Lumiprobe RUS Ltd
Kotsyubinsky street, 4
121351 Moscow
Russian Federation
Phone: +7 800 775 3271
Email: ru@lumiprobe.com

Lumiprobe Limited
Suite 12, 3/F, Great Eagle Centre
23 Harbour Road, Wan Chai
Hong Kong
Mob.: +852-5929-0488 (from HK)
Phone: +86-147-14316277 (from China)
Email: hk@lumiprobe.com

Lumiprobe LTD
2 Tuvim St.
3223562, Haifa
Israel
Phone: +972-(0)4-374-0377
Email: il@lumiprobe.com

Lumiprobe Co., Ltd.
10H-11, Shenmao Commercial Center
No. 59 Xinwen Rd., Meiling Community
Lianhua Street, Futian District
Shenzhen, China
Phone: +86-1471431-6277
Email: cn@lumiprobe.com