

PROTOCOLOS E REAGENTES
E-Signal lab

CULTURA DE CÉLULAS

Inativação de Soro Fetal Bovino ou Soro de Cavalo

Em banho-maria 56°C durante 30 minutos.

- Agitar de 10 em 10 minutos
- Aliquotar no fluxo laminar em tubos falcon de 50mL.

*** Importante: não encher até a boca do falcon, pois o SFB deverá ser congelado.

Aditivos para cultura

*** Filtrar todas as soluções em filtro 0,2 µm (low-protein binding filters)

Camundongo: Insulina (Atual: Sigma Cat# I1882-100mg - anteriormente: Sigma Cat# I5500-100 mg - na verdade o que tínhamos no freezer era a I6634)

Ativação em pH ácido

Estoque para células de camundongo 2 mg/mL

Uso: 5 µg/mL

100 mg em 50 mL de H₂O filtrada (acidificada com HCl pH 2,0-3,0)

Humano (só S1 e T4): Insulina (Sigma Cat# I5500-100 mg - na verdade o que tínhamos no freezer era a I6634)

Estoque para células humanas 100 µg/mL

Uso: 250 ng/mL

Preparar estoque-mãe 5mg/mL:

Ativação em pH ácido

50 mg em 10 mL de H₂O filtrada (acidificada com HCl pH 2,0-3,0)

A partir do estoque 5 mg/mL (tem eppys de 500uL aliquotado):

500 µL de Insulina Estoque em 24,5 mL de H₂O

Filtrar para esterilizar

Transferrina (Sigma Cat# T1147 - 100 mg)

Diluir em 5 mL de H₂O, para concentração 20 mg/mL

Uso: 10 µg/mL

Filtrar para esterilizar

Selenito de Sódio (Sigma Cat# S9133 - 1mg)

Diluir em 50 mL de H₂O filtrada, para concentração 20 µg/mL

A partir de 20 µg/mL diluir 1,2 mL em 10mL de água filtrada para fazer uma solução 2,6 µg/mL

Uso: 2,6 ng/mL

Filtrar para esterilizar

Soy Bean Trypsin Inhibitor (Sigma Cat#T6522)

Usado para inativar tripsina no lugar do Soro Fetal Bovino (SFB) em células que são cultiva.

Protocolos do e-signal lab

Utiliza-se para células que são cultivadas sem SFB.

Preparar 10mg/mL em H₂O milliQ filtrada

Usar: 60 uL para 0,5 mL de tripsina

100 uL para 1,0 mL de tripsina

Puromicina (Sigma Cat#P8833)

Preparar estoque a 5mg/mL em água MiliQ filtrada

Aliquotar 200uL/tubo e guardar no -20C

Toxina Colérica (Sigma Cat#C8052-.5MG)

Preparar estoque a 1mg/mL em água miliQ filtrada

Add 500uL de água no 0.5mg de liofilizado, preparar aliquotas de 20uL

NÃO CONGELAR

G418 (Sigma Cat#A1720 ou #5013)

Preparar estoque a 50mg/mL em água miliQ

IMPORTANTE: Cheque a potência da droga em cada frasco e dilua de acordo para chegar aos 50mg/mL!!!

Hidrocortisona (Sigma Cat# H4001)

MW.362,46

1G

Preparar 1mg/mL

50 mg em 50 mL (1 mL de Etanol +49 mL de PBS)

Estoque para células de camundongo 1 mg/mL

Uso: 1 µg/mL

Estoque para células humanas 1.4 mM

Preparar a partir do 1 mg/mL diluir 5,07 mL em 4,93 mL de PBS

Filtrar para esterilizar

EGF (Sigma Cat# E4127)

0,1 mg

Diluir o conteúdo total em 1 mL de PBS 1% BSA

Solução estoque/uso 20 µg/mL

Diluir 200 µL da solução EGF 100 ug/mL em 800 µL de PBS 1% BSA para fazer a solução de estoque/uso (que terá a concentração 20 µg/mL)

Filtrar para esterilizar

Estradiol (Sigma Cat# E2758)

MW 272.38

0.27238 mg – 1mL – 1mM

- Preparar uma solução mãe 10^{-4} M (1000x mais concentrada do que a solução uso/estoque - 10^{-7} M)
Cálculo para preparo da da solução mãe (10^{-4} M):
3000 μ g – x
27,2 μ g – 1mL
X=110 mL (2,2 mL de etanol abs. + 107,8 mL de PBS 1x conforme explicado abaixo*)

*Dissolver o conteúdo do vial primeiramente em 2,2 mL de Etanol Absoluto e depois adicionar 107,8 mL de PBS

- Para preparo da solução uso/estoque 10^{-7} M (0,1 μ M)
Diluir 10 μ L da solução mãe em 9,99 mL de PBS

Filtrar para esterilizar

Prolactina (Sigma Cat# L6520)

1mg/mL (30IU/mL) em NaHCO₃ (110,83 mg em 50 mL de H₂O, pH 8).

Dissolver 1000 IU em 33,3 mL NaHCO₃. Filtrar para esterilizar

Prolactina (Dr Parlow - UCLA) <http://www.humc.edu/hormones/material.html>

Prolactin PRL (Ovine) 10mG

Diluir 44mg de NaHCO₃ (bicarbonato de sodio) em 20mL de H₂O, filtrar no 0.22 para esterilizar

Add 10mL da solução de NaHCO₃ ao vial com 10mg de PLR (para 1mg/mL).

Fazer aliquotas de 500uL.

(Instruções que a Angelina trouxe da Mina)

Células 1-HTM-3522

Composição do meio H14 (meio para células HMT-3522)

Adicionar os aditivos para 10 mL DMEM/F-12:

Aditivo	Estoque	Vol.	Conc. final	Expira 4 °C	Expira 20 °C
Insulina	100 µg/mL	25 µL	250 ng/mL	1 mês	5 meses
Transferrina	20 mg/mL	5 µL	10 µg/mL	1 mês	3 meses
Selenito de Sódio	2.6 µg/mL	10 µL	2.6 ng/mL	1 sem	1 mês
Estradiol	10 ⁻⁷ M	10 µL	10 ⁻¹⁰ M	3 meses	6 meses
Hidrocortisona	1.4 x 10 ⁻³ M	10 µL	1.4 x 10 ⁻⁶ M	1 mês	6 meses
Prolactina	1 mg/ mL (30u/mL)	50 µL	5 µg/mL	1 mês	6 meses
EGF (SOMENTE S1)	20 µg/mL	5 µL	10 ng/mL	2 semanas	3 meses

Descongelamento

Protocolo T4-2/S1:

- Preparar meio completo (DMEM/F12 + Insulina, transferrina, selenito de sódio, estradiol, hidrocortisona, prolactina, EGF* apenas células S1)
- Descongelar a 37°C
- Ressuspender qsp 10 mL de DMEM/F12 sem aditivos
- Centrifugar a T°C ambiente, 200 RCF (~1000 rpm) por 5 minutos
- Ressuspender em até 10 mL meio completo (se cultivado em T-75, ajustar o volume dependendo do tamanho da garrafa)
- Número de células: T4-2 750K células/T-75; S1 1,5 M células /T-75

Tripsinização

- Aspirar meio de cultivo
- Lavar as células com 1,0 mL (T-25) ou 3,0 mL (T-75) de tripsina 0,25%
- Adicionar 0,5 mL (garrafa T-25) ou 1,0 mL (garrafa T-75) de tripsina
- 2-3 minutos a 37 °C (T4-2) e 5-7 minutos a 37 °C (S1) (após 1 minuto, olhar ao microscópio)
- Inativar a tripsina Soybean Trypsin Inhibitor (STI) (60 µL para 0.5 mL ou 100 µL para 1 mL de tripsina)
- completar para 5mL com meio DMEM/F12 para homogenizar
- Centrifugar a T °C ambiente, 200 RCF (~1000 rpm) por 5 minutos
- Aspirar o meio (muito cuidado com o seu pellet de células)
- Adicionar 5 mL de meio
- Contar as células em câmara de Neubauer (com azul de tripan. Use 95 uL do meio contendo as células ressuspensas e 5 uL de azul de tripan)
 - o Adicionar 10 uL da mistura (células + azul de tripan) em cada lado da câmara
 - o Contar 3-4 retículos periféricos
 - o Número de células/ mL = células contadas (as células não coradas que serão sempre brilhantes) X 10.000
- Passar para flask de cultivo (750K células/T-75 ou 300 células /T-25)

Congelamento

- 10% glicerol; 15% SFB e 75% meio DMEM/F-12
- 1 mL por cryovial. Colocar os vials no container de congelamento e colocá-lo diretamente no -80 °C

Células EpH4

Composição do meio de crescimento (meio completo):

Adicionar os aditivos para 10 mL DMEM/F-12:

Aditivo	Conc Estoque	Vol. em μL	Conc final	Expira 4 °C	Expira 20 °C
SFB		200 μL	2%		
Insulina	2 mg/mL	25 μL	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1 mês	6 meses
Gentamicina	10 mg/mL	50 μL	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	rótulo	

Descongelamento

Protocolo EpH4:

- Preparar meio completo
- Descongelar a 37°C no banho. Processo rápido, geralmente leva menos que 1 minuto
- Ressuspender qsp 10 mL de DMEM/F12 sem aditivos
- Centrifugar a T °C ambiente, 200 RCF (~1000 rpm) por 5 minutos
- Aspirar sobrenadante. Cuidado com o pellet de células
- Ressuspender pellet com meio completo. Numa garrafa de 25 cm² (T25) use 3,5mL de meio completo e para uma de 75 cm², use 10 mL

Tripsinização

- Aspirar meio de cultivo
- Lavar as células com 1,0 mL (T-25) ou 3,0 mL (T-75) de tripsina 0,05%
- Adicionar 0,5 mL (T-25) ou 1,0 mL (T-75) de tripsina
- 2-3 minutos a 37 °C (olhar ao microscópio, após 1 minuto)
- Inativar a tripsina com meio + SFB (4.5 mL para T-25 e 9.5 mL para T-75)
- Centrifugar a T °C ambiente, 200 RCF (~1000 rpm) por 5 minutos
- Aspirar o meio
- Adicionar 5 mL de meio de crescimento para T-75 ou 2.5 mL para T-25
- Contar as células na câmara de Neubauer (com azul de tripan. Use 95 uL do meio contendo as células ressuspendidas e 5 uL de azul de tripan)
 - o Adicionar 10 uL da mistura (células + azul de tripan) em cada lado da câmara
 - o Contar 3-4 retículos periféricos
 - o Número de células/ mL = células contadas (as células não coradas que serão sempre brilhantes) X 10.000
- Passar para flask de cultivo (500K/T-75 ou 175K/T-25)

Congelamento

- 10% DMSO; 90% SFB
- 1 mL por cryovial
- 500K células por vial. Colocar os vials no container de congelamento e colocá-lo diretamente no -80 °C

Células D2A1 e D2.OR

As células D2A1 e D2.OR são linhagens mamárias tumorais obtidas a partir de clones de célula única de diferentes tumores (D2 e D2ST5, respectivamente) oriundos da linhagem de nódulo alveolar hiperplásico mamário pré-neoplásico D2HAN inoculadas em camundongos Balb/C (Rak et al., 1992). A linhagem D2A1 é considerada mais agressiva, e tem período de latência relativamente curto, tanto quando inoculadas na veia caudal de camundongos imunocompetentes, quanto em cultura 3D em matrigel (on top). Enquanto isso, as células D2.OR tem menor tumorigenicidade e são utilizadas como modelos de dormência tanto em cultura, quanto em animais (Barkan et al., 2008; 2010; Barkan & Green 2011). Estas células foram obtidas como doação da Dr Robin Anderson, Laboratório de Metástase, Olivia Newton John Cancer Research Centre/ Austrália (originalmente doadas pela Dr Ann Chambers, Canadá).

Rak JW, McEachern D, Miller FR. Sequential alteration of peanut agglutinin binding-glycoprotein expression during progression of murine mammary neoplasia. Br J Cancer, 65(5):641-8, 1992.

Barkan D, Kleinman H, Simmons JL, Asmussen H, Kamaraju AK, Hoenorhoff MJ, Liu ZY, Costes SV, Cho EH, Lockett S, Khanna C, Chambers AF, Green JE. Inhibition of metastatic outgrowth from single dormant tumor cells by targeting the cytoskeleton. Cancer Res. 68(15):6241-50, 2008.

Barkan D, El Touny LH, Michalowski AM, Smith JA, Chu I, Davis AS, Webster JD, Hoover S, Simpson RM, Gauldie J, Green JE. Metastatic growth from dormant cells induced by a col-I-enriched fibrotic environment. Cancer Res. 70(14):5706-16, 2010.

Barkan D, Green JE. An in vitro system to study tumor dormancy and the switch to metastatic growth. J Vis Exp. (54). pii: 2914, 2011.

Meio de crescimento (rotina): DMEN high glucose 10% FBS 1% Penicilina/Estreptomicina.

Descongelamento

Descongelar pela manhã, para trocar o meio a tarde, quando as células estiverem aderidas

- Descongelar a 37°C no banho. Processo rápido, geralmente leva menos que 1 minuto
- Adicionar a garrafa (T75)
- Lentamente adicionar 13mL de meio completo
- Colocar na incubadora e trocar o meio no final da tarde, depois que as células aderirem

Repique

*****Realizada com EDTA 0,02%*****. Preparar EDTA 1% (estoque) em água, pH 7,4 (acertar com NaOH em pellets). Filtrar para esterilizar. Diluir 1:50 em PBS estéril para 0,02% final.

- Não deixar atingir mais de 70-80% de confluência
- Aspirar meio de cultivo
- Lavar as células com PBS
- Adicionar 1mL (T-25) ou 3mL (T-75) de EDTA 0.02%
- 5 minutos a 37 °C
- “Bater” na garrafa

- Adicionar quantidade de meio apropriada para fazer os repiques (1:2 ou 1:3 → confluyente no dia seguinte; 1:4 ou 1:5 → confluyente em 2-3 dias; 1:10 → confluyente em 4-5 dias; melhor não passar muito de 1:10)
- Passar para nova garrafa

Congelamento

- 10% DMSO; 90% SFB
- 0,5 mL por cryovial
- 3 vials para cada T75. Colocar os vials no container de congelamento e colocá-lo diretamente no -80 °C

Células 4T1.13 e 67NR

A linhagem murina de carcinoma mamário triplo negativo 4T1 foi isolada por Miller e colaboradores na década de 70, a partir de um tumor de mama espontâneo altamente heterogêneo, que também deu origem à linhagem 67NR (Dexter et al., 1978). Por sua vez, a linhagem 4T1.13, foi derivada pelo grupo da Dr Robin Anderson a partir de um clone de célula única da linhagem 4T1 (Lelekakis et al., 1999). Diferente de outras linhagens, clones derivados de tumores 4T1 metastizam espontaneamente para diversos órgãos (incluindo pulmão, fígado e ossos) quando inoculadas ortotopicamente em camundongos imunocompetentes (Eckhardt et al., 2012). Por outro lado, células 67NR não apresentam potencial metastático nessas mesmas condições (Eckhardt et al., 2012). Estas células foram obtidas como doação da Dr Robin Anderson, Laboratório de Metástase, Olivia Newton John Cancer Research Centre/ Austrália.

Dexter, D.L., Kowalski, H.M., Blazar, B.A., Fligiel, Z., Vogel, R., and Heppner, G.H. Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 38:3174-3181, 1978.

Eckhardt BL, Francis PA, Parker BS, Anderson RL. Strategies for the discovery and development of therapies for metastatic breast cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 11(6):479-97, 2012.

Lelekakis M1, Moseley JM, Martin TJ, Hards D, Williams E, Ho P, Lowen D, Javni J, Miller FR, Slavin J, Anderson RL. A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone. *Clin Exp Metastasis.* 17(2):163-70, 1999.

Meio de crescimento: alpha-MEM + 4g/L NaCl + 2,2g/L NaHCO₃, 5% FBS 1% Penicilina/Estreptomicina.

Descongelamento

Descongelar pela manhã, para trocar o meio a tarde, quando as células estiverem aderidas

- Descongelar a 37°C no banho. Processo rápido, geralmente leva menos que 1 minuto
- Adicionar a garrafa (T75)
- Lentamente adicionar 13mL de meio completo
- Colocar na incubadora e trocar o meio no final da tarde, depois que as células aderirem

Repique

*****Realizada com EDTA 0,02%***.** Preparar EDTA 1% (estoque) em água, pH 7,4 (acertar com NaOH em pellets). Filtrar para esterilizar. Diluir 1:50 em PBS estéril para 0,02% final.

- Não deixar atingir mais de 70-80% de confluência
- Aspirar meio de cultivo
- Lavar as células com PBS
- Adicionar 1mL (T-25) ou 3mL (T-75) de EDTA 0.02%
- 5 minutos a 37 °C
- “Bater” na garrafa
- Adicionar quantidade de meio apropriada para fazer os repiques (1:2 ou 1:3 → confluyente no dia seguinte; 1:4 ou 1:5 → confluyente em 2-3 dias; 1:10 → confluyente em 4-5 dias; dá para fazer repiques ainda maiores por que elas aguentam, e vieram de clone de célula única)
- Passar para nova garrafa

Congelamento

- 10% DMSO; 90% SFB
- 0,5 mL por cryovial
- 3 vials para cada T75. Colocar os vials no container de congelamento e colocá-lo diretamente no -80 °C

Células EpH4- β -cas CFP (células expressando o promotor de β -caseína dirigindo a expressão de CFP)

Composição do meio para cultivo.

Adicionar os aditivos para 10 mL DMEM/F-12:

Aditivo	Conc Estoque	Vol. em μ L	Conc final	Expira 4 °C	Expira 20 °C
SFB			2%		
Insulina	5 mg/mL	10 μ L	5 μ g/mL	1 mês	6 meses
G418 (Neomicin)	50mg/ml	40 μ L	200 μ g/mL		

Descongelamento

- Preparar meio completo
- Descongelar a 37°C. Processo rápido, geralmente leva menos que 1 minuto
- Ressuspender qsp 10 mL de DMEM/F12 sem aditivos
- Centrifugar a T °C ambiente, 200 RCF (~1000 rpm) por 5 minutos
- Ressuspender pellet com meio completo. Numa garrafa de 25 cm² (T-25) use 3,5 mL de meio completo e para uma de 75 cm² (T-75) use 10 mL.

Tripsinização

- Aspirar meio de cultivo
- Lavar as células com 1,0 mL (T-25) ou 3,0 mL (T-75) de tripsina 0,05%
- Adicionar 0,5 mL (T-25) ou 1,0 mL (T-75) de tripsina
- 2-3 minutos a 37 °C (olhar ao microscópio, após 1 minuto)
- Inativar a tripsina com meio + SFB (4,5 mL para T-25 e 9,5 mL para T-75)
- Centrifugar a T °C ambiente, 200 RCF (~1000 rpm) por 5 minutos
- Aspirar o meio
- Adicionar 5 mL de meio de crescimento para T-75 ou 2.5 mL para T-25
- Contar as células em câmara de Neubauer (com azul de tripan. Use 95 μ L do meio contendo as células ressuspensas e 5 μ L de azul de tripan)
 - o Adicionar 10 μ L da mistura (células + azul de tripan) em cada lado da câmara
 - o Contar 3-4 retículos periféricos
 - o Número de células/ mL = células contadas (as células não coradas que serão sempre brilhantes) X 10.000
- Passar para garrafa de cultivo (750K células/T-75 ou 250K células/T-25)

Congelamento

- 10% DMSO; 90% SFB
- 1 mL por cryovial
- 750-800K células por vial. Colocar os vials no container de congelamento e colocá-lo diretamente no -80 °C

Células MCF10A e MCF12A

Adicionar os aditivos para 10 mL DMEM/F-12

5% Soro de Cavalo - 500 µL (Invitrogen # 16050122)

Aditivo	Conc Estoque	Vol. em µL	Conc final
Insulina	2 mg/mL	50 µL	10 µg/mL
Hidrocortisona	1 mg/ mL	10 µL	10 µg/mL
Toxina colérica	1 mg/ mL	1 µL	1 µg/mL
EGF	20 µg/mL	10 µL	20 ng/mL

Descongelamento

Protocolo:

- Preparar meio completo (DMEM/F12 + Insulina, hidrocortisona, toxina colérica, EGF)
- Descongelar a 37°C
- Ressuspender qsp 10 mL de DMEM/F12 sem aditivos
- Centrifugar a T°C ambiente, 200 RCF (~1000rpm) por 5 minutos
- Aspirar sobrenadante. Cuidado com o pellet de células
- Ressuspender em meio completo
- Passar para garrafa
- 1M de células para garrafa T75

Tripsinização

- Aspirar meio de cultivo
- Lavar as células com 1,0 mL (T-25) ou 3,0 mL (T-75) de tripsina 0,05%
- Adicionar 0,5 mL (T-25) ou 1,0 mL (T-75) de tripsina
- 10 minutos a 37 °C (olhar ao microscópio, após 8 minutos)
- Inativar a tripsina com meio + Soybeen Trypsin Inhibitor (STI) (60 µL)
- Centrifugar a T °C ambiente, 200 RCF (~1000 rpm) por 5 minutos
- Aspirar o meio
- Adicionar 5 mL de meio
- Contar as células em câmara de Neubauer (com azul de tripan. Use 95 uL do meio contendo as células ressuspensas e 5 uL de azul de tripan)
 - o Adicionar 10 uL da mistura (células + azul de tripan) em cada lado da câmara
 - o Contar 3-4 retículos periféricos
 - o Número de células/ mL = células contadas (as células não coradas que serão sempre brilhantes) X 10.000
- Se necessário, centrifugar as células e ressuspender em quantidade de meio de interesse.
- Passar para flask de cultivo (1M células /T75 ou 300K células /T25)

Congelamento

- 7,5% DMSO; 15% SFB e meio DMEM/F-12
- 1 mL por cryovial. Colocar os vials no container de congelamento e colocá-lo diretamente no -80 °C

Células MDA-MB-231 e -468

Composição do meio

Adicionar os aditivos para 10 mL DMEM/High glucose:

Aditivo	Estoque	Vol.	Conc. final	Expira 4 °C	Expira 20 °C
Penicilina/Streptomicina	100X	100 µL	1x		
Soro feral Bovino		1mL	10%		

Descongelamento

- Preparar meio completo (colocar recipiente de cultivo (garrafa ou placa) na estufa contendo 9 mL de meio completo)
- Descongelar a 37°C
- Ressuspender qsp 10 mL de DMEM/High Glucose sem aditivos
- Centrifugar a T°C ambiente, 200 RCF (~1000rpm) por 5 minutos
- Ressuspender em 1mL meio completo
- Número de células para placa de 100mm: 500K células

Subcultivo/Tripsinização

- Tripsinizar a cada 3-4 dias (confluência 70-80%)
- Aspirar meio de cultivo
- Lavar as células com 3,0 mL (para placa de 100mm) de tripsina 0,25%
- Adicionar 1,0 mL (para placa 100mm) de tripsina
- Não coloque na estufa (as células soltam facilmente). Espere 1-2 minutos e cheque ao microscópio para monitorar as células soltando. –
- Inativar a tripsina com 4 mL de meio completo
- Centrifugar a T °C ambiente, 200 RCF (~1000rpm) por 5 minutos
- Aspirar o sobrenadante
- Ressuspende em 5 mL de meio
- Contar as células em câmara de Neubauer (com azul de tripan. Use 95 uL do meio contendo as células ressuspendidas e 5 uL de azul de tripan)

Adicionar 10 uL da mistura (células + azul de tripan) em cada lado da câmara

Contar 3-4 retículos periféricos

Número de células/ mL = células contadas (as células não coradas que serão sempre brilhantes) X 10.000

- Passar para flask de cultivo (500K/placa de 100mm)

Congelamento

10% DMSO; 15% SFB e 75% meio DMEM/High glucose

1 mL por cryovial. 500k por vial. Colocar os vials no container de congelamento e colocá-lo diretamente no -80 °C. Após 1 dia, estocar na fase gasosa do tanque de nitrogênio

Células MCF7

Composição do meio

Adicionar os aditivos para 10 mL DMEM/High glucose:

Aditivo	Estoque	Vol.	Conc. final	Expira 4 °C	Expira 20 °C
Penicilina/Streptomicina	100X	100 µL	1x		
Soro fetal Bovino		1mL	10%		

Descongelamento

- Preparar meio completo (colocar recipiente de cultivo (garrafa ou placa) na estufa contendo 9 mL de meio completo)
- Descongelar a 37°C
- Ressuspender qsp 10 mL de DMEM/High Glucose sem aditivos
- Centrifugar a T°C ambiente, 200 RCF (~1000rpm) por 5 minutos
- Ressuspender em 1mL meio completo
- Número de células para placa de 100mm: 1M células

Subcultivo/Tripsinização

- Tripsinizar a cada 3-4 dias (confluência 70-80%)
- Aspirar meio de cultivo
- Lavar as células com 3,0 mL (para placa de 100mm) de tripsina 0,25%
- Adicionar 1,0 mL (para placa 100mm) de tripsina
- Não coloque na estufa. Espere 1-2 minutos e cheque ao microscópio para monitorar as células soltando.
- Inativar a tripsina com 4 mL de meio completo
- Centrifugar a T °C ambiente, 200 RCF (~1000rpm) por 5 minutos
- Aspirar o sobrenadante
- Ressuspende em 5 mL de meio
- Contar as células em câmara de Neubauer (com azul de tripan. Use 95 uL do meio contendo as células ressuspendidas e 5 uL de azul de tripan)
 - Adicionar 10 uL da mistura (células + azul de tripan) em cada lado da câmara
 - Contar 3-4 retículos periféricos
 - Número de células/ mL = células contadas (as células não coradas que serão sempre brilhantes) X 10.000

- Passar para flask de cultivo (1M/placa de 100mm)

Congelamento

- 10% DMSO; 90% do meio completo
- 1 mL por cryovial. Colocar os vials no container de congelamento e colocá-lo diretamente no -80 °C. Após 1 dia, estocar na fase gasosa do tanque de nitrogênio

Células HCC1500

Composição do meio

Adicionar os aditivos para 10 mL RPMI1640:

Aditivo	Estoque	Vol.	Conc. final	Expira 4 °C	Expira 20 °C
Penicilina/Streptomicina	100X	100 µL	1x		
Soro feral Bovino		1mL	10%		

Descongelamento

- Preparar meio completo (colocar recipiente de cultivo (garrafa ou placa) na estufa contendo 9 mL de meio completo)
- Descongelar a 37°C
- Ressuspender qsp 10 mL de RPMI1640 sem aditivos
- Centrifugar a T°C ambiente, 200 RCF (~1000rpm) por 5 minutos
- Ressuspender em 1mL meio completo
- Número de células para placa de 100mm: 2M células

Subcultivo/Tripsinização

- Tripsinizar a cada 7-10 dias (confluência 70-80%)
- Aspirar meio de cultivo
- Lavar as células com 3,0 mL (para placa de 100mm) de tripsina 0,25%
- Adicionar 1,0 mL (para placa 100mm) de tripsina
- Não coloque na estufa. Espere 1-2 minutos e cheque ao microscópio para monitorar as células soltando. –
- Inativar a tripsina com 4 mL de meio completo
- Centrifugar a T °C ambiente, 200 RCF (~1000rpm) por 5 minutos
- Aspirar o sobrenadante
- Ressuspende em 5 mL de meio
- Contar as células em câmara de Neubauer (com azul de tripan. Use 95 uL do meio contendo as células ressuspendidas e 5 uL de azul de tripan)
 - Adicionar 10 uL da mistura (células + azul de tripan) em cada lado da câmara
 - Contar 3-4 retículos periféricos
 - Número de células/ mL = células contadas (as células não coradas que serão sempre brilhantes) X 10.000
- Passar para flask de cultivo (2M/placa de 100mm)

Congelamento

- 5% DMSO; 95% do meio completo
- 1 mL por cryovial. 2M por vial. Colocar os vials no container de congelamento e colocá-lo diretamente no -80 °C. Após 1 dia, estocar na fase gasosa do tanque de nitrogênio

Células BT474

Composição do meio

Adicionar os aditivos para 10 mL RPMI1640:

Aditivo	Estoque	Vol.	Conc. final	Expira 4 °C	Expira 20 °C
Penicilina/Streptomicina	100X	100 µL	1x		
Soro feral Bovino		1mL	10%		
Piruvato de sódio	100x (100mM)	100 µL	1x (1mM)		
L-glutamina	200x (200mM)	100 µL	1x (2mM)		

Descongelamento

- Preparar meio completo (colocar recipiente de cultivo (garrafa ou placa) na estufa contendo 9 mL de meio completo)
- Descongelar a 37°C
- Ressuspender qsp 10 mL de RPMI1640 sem aditivos
- Centrifugar a T°C ambiente, 200 RCF (~1000rpm) por 5 minutos
- Ressuspender em 1mL meio completo
- Número de células para placa de 100mm: 1.5M células

Subcultivo/Tripsinização

- Tripsinizar a cada 7-10 dias (confluência 70-80%)
- Aspirar meio de cultivo
- Lavar as células com 3,0 mL (para placa de 100mm) de tripsina 0,25%
- Adicionar 1,0 mL (para placa 100mm) de tripsina
- Não coloque na estufa. Espere 1-2 minutos e cheque ao microscópio para monitorar as células soltando. –
- Inativar a tripsina com 4 mL de meio completo
- Centrifugar a T °C ambiente, 200 RCF (~1000rpm) por 5 minutos
- Aspirar o sobrenadante
- Ressuspende em 5 mL de meio
- Contar as células em câmara de Neubauer (com azul de tripan. Use 95 uL do meio contendo as células ressuspendidas e 5 uL de azul de tripan)
 - Adicionar 10 uL da mistura (células + azul de tripan) em cada lado da câmara
 - Contar 3-4 retículos periféricos
 - Número de células/ mL = células contadas (as células não coradas que serão sempre brilhantes) X 10.000
- Passar para flask de cultivo (1.5M/placa de 100mm)

Congelamento

- 10% DMSO; 90% do meio completo
- 1 mL por cryovial. 1.5M por vial. Colocar os vials no container de congelamento e colocá-lo diretamente no -80 °C. Após 1 dia, estocar na fase gasosa do tanque de nitrogênio

Células SKBR3

Composição do meio

Adicionar os aditivos para 10 mL RPMI1640:

Aditivo	Estoque	Vol.	Conc. final	Expira 4 °C	Expira 20 °C
Penicilina/Streptomicina	100X	100 µL	1x		
Soro feral Bovino		1mL	10%		
Piruvato de sódio	100x (100mM)	100 µL	1x (1mM)		
L-glutamina	200x (200mM)	100 µL	1x (2mM)		
HEPES	1M	150 µL	15mM		

Descongelamento

- Preparar meio completo (colocar recipiente de cultivo (garrafa ou placa) na estufa contendo 9 mL de meio completo)
- Descongelar a 37°C
- Ressuspender qsp 10 mL de RPMI1640 sem aditivos
- Centrifugar a T°C ambiente, 200 RCF (~1000rpm) por 5 minutos
- Ressuspender em 1mL meio completo
- Número de células para placa de 100mm: 1.5M células

Subcultivo/Tripsinização

- Tripsinizar a cada 7-10 dias (confluência 70-80%)
- Aspirar meio de cultivo
- Lavar as células com 3,0 mL (para placa de 100mm) de tripsina 0,25%
- Adicionar 1,0 mL (para placa 100mm) de tripsina
- Não coloque na estufa. Espere 1-2 minutos e cheque ao microscópio para monitorar as células soltando.
- Inativar a tripsina com 4 mL de meio completo
- Centrifugar a T °C ambiente, 200 RCF (~1000rpm) por 5 minutos
- Aspirar o sobrenadante
- Ressuspende em 5 mL de meio
- Contar as células em câmara de Neubauer (com azul de tripan. Use 95 uL do meio contendo as células ressuspendidas e 5 uL de azul de tripan)
 - Adicionar 10 uL da mistura (células + azul de tripan) em cada lado da câmara
 - Contar 3-4 retículos periféricos
 - Número de células/ mL = células contadas (as células não coradas que serão sempre brilhantes) X 10.000
- Passar para flask de cultivo (1.5M/placa de 100mm)

Congelamento

- 10% DMSO; 90% do meio completo
- 1 mL por cryovial. 1.5M por vial. Colocar os vials no container de congelamento e colocá-lo diretamente no -80 °C. Após 1 dia, estocar na fase gasosa do tanque de nitrogênio

Crescimento de células em lamínulas

Lavar as lamínulas 2x com álcool 90°. Mantê-las em álcool 70° dentro de um pote de vidro com tampa

Colocar cuidadosamente 1 lamínula por poço da placa de (por exemplo, para lamínulas de 13 mm de diâmetro, a placa é de 24 wells)

Completar os poços com PBS. Deixar a placa com a lamínulas 5-10 minutos no UV do fluxo laminar. E, deixar na estufa até o momento de plaquear (para aquecer a placa)

- A densidade das células vai depender da linhagem, do experimento ou do tempo de cultivo.
-

Imunofluorescência (IF) para células cultivadas em lamínulas

- To o procedimento deverá ser realizado preferencialmente na placa de cultivo Lavar as lamínulas 2x com PBS 1x por 5 minutos
- Fixar as amostras com 4% PFA (cat#15710 EMS) por 10 minutos
- Lavar 2x com PBS/Glicina (1x, 0,1 M) por 5 minutos (etapa para o quench do PFA)
- Lavar 2x com PBS por 5 minutos
- Permeabilizar as células com PBS/Triton 0,2% por 10 minutos
- Bloquear por 1h em PBS/1% BSA com 5% soro proveniente do animal que foi feito o anticorpo secundário (por exemplo: usar soro de cabra quando o secundário for goat-anti-mouse)
*** Atenção para IF que usam anticorpos secundários provenientes de espécies diferentes (quando o secundário for anti-cabra, não usar soro de cabra)
- Incubar o anticorpo primário em solução de bloqueio (overnight). A concentração do primário vai depender do anticorpo.
*** Pergunte aos membros do lab caso vá utilizar um anticorpo que já foi usado anteriormente. Caso o anticorpo nunca foi usado no lab, cheque o datasheet e a literatura. Em alguns casos vale a pena testar algumas concentrações
- Lavar 3x com PBS por 5 minutos
- Incubar o secundário em solução de bloqueio (1:400 para anticorpos conjugados com Alexa. Para outros anticorpos cheque o datasheet) 45 minutos
- Lavar 5x com PBS por 5 minutos, em agitação leve
- 10 min com 0.5 µg/mL DAPI em PBS
- Lavar 3x com PBS por 5 minutos
- Montar a lamínula com Prolong Diamond (com muito cuidado para não formar bolhas) e selar com esmalte de unha
*** Prolong Diamond deve ser deixado curando overnight na geladeira

Diferenciação em IrECM (EpH4)

Em 2% IrECM (matrigel)

- tripsinizar as células
- separar a quantidade correta de células para cada tipo de placa (2.5k/cm²)
- centrifugar 5 minutos a 800 rpm
- cultivar as células em meio completo
- no dia seguinte trocar o meio por meio GIH
- após 24 horas trocar o meio por meio GIH+ Prl+ 2% matrigel e cultivar por 48h (pico de expressão de beta-caseína)

Meio GIH

Adicionar os aditivos para 10 mL DMEM/F-12:

Aditivo	Conc estoque	Vol. em µL	Conc final
Hidrocortisona	1 mg/mL	10 µL	1 µg/ml
Insulina	5 mg/mL	10 µL	5 µg/ml
Gentamicina	10 mg/mL	50 µL	50 µg/ml

*** Concentração de Prl (Prolactina) 3 µg/ml – usar 3 µl da solução estoque por mL (1mg/mL)

*** O matrigel deve ser sempre mantido em gelo, assim como o meio suplementado com 2% matrigel.

*** Neste experimento a densidade de células é menor do que utilizado na rotina de cultivo das EpH4s. O experimento dura 4 dias e temos que assegurar que ao final do experimentos a cultura das células controle (que só receberam GIH + Prl) não alcance confluência.

PolyHema preparação, coating e ensaio 3D

Poly (2-hydroxyethyl methacrylate) - 529265-5G Sigma Aldrich

PolyHEMA preparação e coating

Preparar solução 12 mg/mL, dissolvendo 120 mg de PolyHema em 10 mL de Etanol 95% (preparar a partir de etanol da Sigma)

Agitar lentamente (rotação ou inversão) overnight à 37 °C

Centrifugar a 2500 rpm por 30 minutos (para remover as partículas não dissolvidas)

Coletar o sobrenadante cuidadosamente para não perturbar as partículas assentadas.

Cobrir a placa (s) com 0.8 mg/cm². Por exemplo, para uma placa de 60 mm adicione ~1500 µL

Deixar a placa secar com a tampa por 48 horas em estufa à 37 °C

Ensaio – expressão de β -caseína em estruturas 3D

1. Plaquear 30 k células por cm² (para placa 60 mm utilizamos 600K células), cultivar em meio DMEM/F12 + insulina-hidrocortisona (IH).

***Lembre-se que para EpH4 β -cas CFP utilizamos G418 (200 µg/ mL).

2. cultivar por 24-48 horas. Checar formação de clusters

3. Coletar as estruturas mais meio com uma ponteira com ponta cortada e lavar a placa com meio para coletar o máximo de estruturas possível.

4. centrifugar a 200xg por 2 minutos. Checar pellet.

5. Ressuspender as estruturas em 400 µL meio IH+Prl ou meio IH+Prl+ 2% matrigel (sempre no gelo) 30k células por cm² (para well da placa de 24 w utilizar 60k). As estruturas deverão ser cultivadas por 48 horas (período para a máxima de expressão de β -caseína).

Imunofluorescência em estruturas 3D

Utilizar ponteiros cortadas

1. Manter a placa em gelo durante todo o procedimento
2. Aspirar o meio e rinsar 2 x com PBS gelado
3. Deixar no gelo por 15-30 minutos
Rinsar ponteiros e todos os tubos com PBS/BSA 5% antes de transferir as estruturas
4. Transferir as estruturas para um tubo
5. Coletar o matrigel do fundo com o auxílio de uma ponteira ou scraper
6. Ressuspender bem
7. Deixar no gelo por 15-30 minutos
8. Checar se o matrigel se dissolveu por completo
9. Centrifugar o tubo a 600 rpm por 2 minutos
10. Aspirar o sobrenadante
11. Ressuspender em PBS gelado
12. Pipetar aproximadamente 20 µL da suspensão em uma lâmina
13. Deixar as estruturas assentarem por 10-15 minutos a 37°C
14. Fixar as estruturas com PFA 4% por 10 minutos a temperatura ambiente
15. Parar com PBS-Glicina por 10 minutos
16. Lavar 2x com PBS 1x
17. Permeabilizar as células com PBS/Triton 0,5% por 30 minutos
18. Lavar 2x com PBS 1x
19. Bloquear por 1h em PBS/1%BSA com 5% Soro de Cabra
20. Incubar o anticorpo primário em solução de bloqueio (1:250 (YAP) e 1:500 (ITGA6) -overnight)
21. Lavar 3x com PBS por 5 minutos
22. Incubar o secundário em solução de bloqueio (1:400) 45 minutos-2 horas
23. Lavar 5x com PBS por 5 minutos, agitar levemente.
24. 10 min com 0.5µg/mL DAPI em PBS
25. Lavar 3x com PBS por 5 minutos
26. Montar e selar com esmalte de unha

Criostato

- O tecido deve estar congelado em OCT (Tissue-Tek® Sakura).
 - o O tecido recém retirado é colocado nas formas
 - o É então embebido em OCT e orientado com o auxílio de uma pinça
 - o Rapidamente colocado em gelo seco
 - o Levado a -80°C
- Colocar o espécime no suporte e deixar dentro do criostato para atingir a temperatura. O espécime deve ficar firmemente fixado no suporte.
 - o A temperatura pode variar de tecido para tecido (~-21 °C para matrigel e ~-37 °C para glândula mamária).
 - o Desbastar o espécime
- Ajustar a base móvel do criostato para aproximar da navalha
- Sempre deixar o rebatedor (peça preta) enquanto se manuseia o espécime.
- Girar a base móvel até alcançar o espécime.
 - o Para desbastar o tecido usar 30-40 µm e para coletar 10-30 µm.
- A peça de vidro ajuda a esticar o tecido.
- A lamina a temperatura ambiente faz com que o tecido grude de forma mais fácil.

Imunofluorescência em criosecções

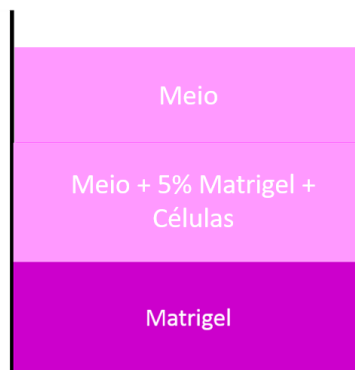
1. Secar as amostras por 10 minutos a temperatura ambiente
2. Fixar as amostras com 4%PFA 10 minutos
3. Lavar 2x com PBS/Glicina (0,1 M) por 5 minutos (Quench)
4. Lavar 2x com PBS por 5 minutos
5. Permeabilizar as células com PBS/Triton 0,5% por 30 minutos (3D incluídas em OCT) 1 hora (tecido)
6. Bloquear por 1h em PBS/1%BSA com 5% Soro de Cabra
7. Incubar o anticorpo primário em solução de bloqueio (overnight)
8. Lavar 3x com PBS por 5 minutos
9. Incubar o secundário em solução de bloqueio (1:400) 45 minutos-2 horas
10. Lavar 5x com PBS por 5 minutos, agitar levemente.
11. 10 min com 0.5µg/mL DAPI em PBS
12. Lavar 3x com PBS por 5 minutos
13. Montar e selar com esmalte de unha

Cultivo 3D

“On Top”

Antes de tripsinizar as células

- Adicionar o matrigel às placas (250 uL na placa de 24 poços)
- deixar a 37° C por pelo menos 20 minutos.
- tripsinizar as células
- separar a quantidade correta de células para cada tipo de placa
- centrifugar 5 minutos a 800 rpm
- Aspirar o meio
- ressuspender as células em metade do volume de meio de acordo com cada tipo de célula
(5k células T4-2 e 7,5K células S1)
- colocar as células na superfície da placa com o matrigel.
- esperar de 15 a 30 minutos para as células acentarem
- preparar meio + aditivos+ 5% matrigel
- remover o meio cuidadosamente
- adicionar gota-a-gota o meio + aditivos+5% matrigel em cada poço ou placa (250 uL na placa de 24 wells).



Cultivo 3D

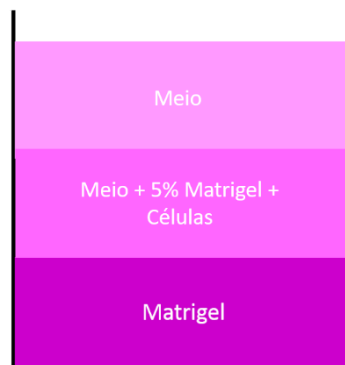
“Embedded”

Antes de tripsinizar as células

- Adicionar o matrigel às placas (250 uL na placa de 24 poços)
- deixar a 37° C por pelo menos 20 minutos.
- tripsinizar as células
- separar a quantidade correta de células para cada tipo de placa
- centrifugar 5 minutos a 800 rpm
- Aspirar o meio
- ressuspender as células em matrigel - 250 uL na placa de 24 wells, cuidado para não formar bolhas

(10k células T4-2 e 15K células S1)

- colocar a suspensão de matrigel e células na superfície da placa com o matrigel.
- deixar a 37° C por 15 minutos.
- preparar meio + aditivos
- adicionar o meio +aditivos cuidadosamente em cada poço ou placa (150ul na placa de 24 wells).
- trocar o meio a cada 2-3 dias
- crescer as células até 10 dias para formar esferoides



Imunofluorescência em estruturas 3D em matrigel

Utilizar ponteiros cortadas

1. Manter a placa em gelo durante todo o procedimento
2. Aspirar o meio cuidadosamente
3. Deixar no gelo por 15-30 minutos
4. Coletar o matrigel do fundo com o auxílio de uma ponteira cortada
5. Ressuspender bem
6. Deixar no gelo por 15-30 minutos
7. Pipetar aproximadamente 20 μ L da suspensão em uma lâmina
8. Deixar as estruturas assentarem por 10-15 minutos a 37°C (ou até o matrigel secar um pouco)
9. Fixar as estruturas com PFA 4% por 10 minutos a temperatura ambiente
10. Parar com PBS-Glicina por 10 minutos
11. Lavar 2x com PBS 1x
12. Permeabilizar as células com PBS/Triton 0,5% por 30 minutos
13. Lavar 2x com PBS 1x
14. Bloquear por 1h em PBS/1%BSA com 5% Soro de Cabra
15. Incubar o anticorpo primário em solução de bloqueio (1:250 (YAP) e 1:500 (ITGA6) -overnight)
16. Lavar 3x com PBS por 5 minutos
17. Incubar o secundário em solução de bloqueio (1:400) 45 minutos-2 horas
18. Lavar 5x com PBS por 5 minutos, agitar levemente.
19. 10 min com 0.5 μ g/mL DAPI em PBS
20. Lavar 3x com PBS por 5 minutos
21. Montar e selar com esmalte de unha

Desparafinização de secções de tecidos incluídos em parafina

- 10' Xilol 100% (novo)
- Rehidratação em série decrescente de Etanol
 - 1' etanol 100%
 - 1' etanol 100%
 - 1' etanol 90%
 - 1' etanol 70%
 - 1' H₂O
 - 5' H₂O

Recuperação antigênica com Tampão Citrato

Tampão citrato 0,01M pH6.0

- Diluir 1,92 g de ácido cítrico (anidro) em 800 mL de H₂O miliQ
- Acertar o pH 6.0
- Completar qsp 1L

Recuperação antigênica

No micro-ondas:

- Colocar as laminas submersas em tampão citrato
- 1' em potência máxima
- Deixar esfriar
- 9' em potência média

Recuperação antigênica com Proteinase K

Proteinase K (20 mg/mL)

- Diluir a proteinase K em TRIS-HCl 0.01M pH 7.4 na concentração 20 µg/ mL (1:1000)
- Incubar por 10' a 37°C

Imunofluorescência em secções desparafinizadas

1. Lavar 2x com PBS por 5 minutos
2. Permeabilizar com PBS/Triton 0,5% por 20 minutos
3. Bloquear por 1h em PBS/1%BSA com 5% Soro de Cabra
4. Incubar o anticorpo primário em solução de bloqueio (overnight)
5. Lavar 3x com PBS por 5 minutos
6. Incubar o secundário em solução de bloqueio (1:400) 45 minutos-2 horas
7. Lavar 5x com PBS por 5 minutos, agitar levemente.
8. 10 min com 0.5µg/mL DAPI em PBS
9. Lavar 3x com PBS por 5 minutos
10. Montar e selar com esmalte de unha

REAGENTES DE BANCADA

Sodium bicarbonate (NaHCO_3) (1 M)

NaHCO_3 (m.w. = 84)

Dissolver 12.6 g de NaHCO_3 em 100 mL de H_2O .

Ajustar o volume para 150 mL para 1 M. esterilizar por filtração e manter a temperatura ambiente.

EDTA (0.5M pH 8.0)

Agitar e ajustar o pH para 8.0 adicionar NaOH

Aliquotar e esterilizar em autoclave.

***solubiliza em pH 8.0

MgCl_2 (1M Magnesium chloride)

Dissolver 203.3 g de MgCl_2 em 800 mL de H_2O

NaCl 5M

Dissolve 292 g of NaCl in 800 mL of H_2O . Adjust the volume to 1 L with H_2O . Dispense into aliquots and sterilize by autoclaving. Store the NaCl solution at room temperature.

Tris-HCl 1M pH7.4

Dissolver 121.1 g de Tris base em 800 ml de H_2O .

Ajustar o pH adicionando HCl.

Esfriar e acertar o pH ajustar o volume para 1 L e esterilizar em autoclave.

Tris-HCL 1.5M pH 8.8

Dissolver 181.65 g de Tris base em 800 ml of H_2O .

Ajustar o pH adicionando HCl.

Esfriar e acertar o pH ajustar o volume para 1 L e esterilizar em autoclave.

Tris-HCl 1.0M pH 6.8

Dissolver 121.1 g of Tris base in 800 ml of H_2O .

Ajustar o pH adicionando HCl.

Esfriar e acertar o pH ajustar o volume para 1 L e esterilizar em autoclave.

PFA 4%

- 2g de Paraformaldeído
- 25 mL de PBS 2x (diluir o PBS 10x 1:4 em H₂O miliQ)
- Solubilizar a 60° C com a adição de NaOH 1M e pH 8 no máximo (cuidado para não passar)
- Acertar o pH 7.4-7.6 com HCl 1M (muito cuidado para não baixar demais)
- Completar o volume para 50mL com água miliQ

PBS 10x

- Na₂HPO₄ 14.4 g
- KH₂PO₄ 2.4496 g
- NaCl 80.0669 g
- KCl 2.0129 g
- H₂O miliQ qsp para 1L
- Homogeinizar em agitador magnético

PBS 1x

- Diluir 100mL de PBS 10x em 900mL de H₂O miliQ
- Homogeinizar em agitador magnético

*** Para cultura, o PBS1x deverá ser filtrado (filtros de 0,2 µm)

PBS-glicina 10x (1M)

Usado para inibir ação do PFA

Glicina (MW - 75.0666)

- Para 1L de PBS 10x adicionar 75,0666g de Glicina
- Homogeneizar bem em agitador magnético
- Solução 1x (0.1M) diluir 1:9 em H₂O miliQ

PBS-Azida (0.02%)

- 0,1 g Azida sódica
- 50 mL PBS 10x
- H₂O miliQ qsp 500mL
- Homogeneizar em agitador magnético

PBS 0,5 % Triton X

Para IHQ de blocos de parafina ou OCT

- Diluir PBS (para 1x - 1:9)
- Em 99,5 mL de PBS adicional 0,5 mL de Triton X

PBS 0,2 % Triton X

Para células cultivadas em lamínulas

- Diluir PBS (para 1x - 1:9)
- Em 99,8 mL de PBS adicional 0,2 mL de Triton X

EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E WESTERN BLOT

RIPA buffer (Lise celular)

- 50mM Tris pH 8
- 150 mM NaCl
- 0.1% SDS (optional)
- 1% sodium deoxycholate
- 1% NP-40
- 0,5 mM EDTA

Aspirar o meio e colocar as placas em gelo.

Lavar as placas 2x com PBS 1x gelado.

Aspirar o PBS e adicionar RIPA gelado com inibidores (1mL para placa de 100mm e 200µl por poço da placa de 6 poços)

Raspar as placas com o rodinho (scraper) até remover as células completamente.

Homogeneizar com a pipeta e transferir para um tubo eppendorff

Deixar 30 minutos no gelo

Centrifugar a 14000 rpm por 15 min a 4 °C

Coletar o sobrenadante e manter a -80 °C até o uso

Tampão de Lise (Chaps - lise mais branda)

- 4.8mL NaCl 5N
- 0.4mL EDTA 0.5M pH 8.0
- 16.0 mL Hepes
- 0.6g Chaps

Aspirar o meio e colocar as placas em gelo.

Lavar as placas 2x com PBS 1x gelado.

Aspirar o PBS e adicionar tampão de lise gelado com inibidores (1mL para placa de 100mm e 200µl por poço da placa de 6 poços)

Raspar as placas com o rodinho (scraper) até remover as células completamente.

Homogeneizar com a pipeta e transferir para um tubo eppendorff

Deixar 30 minutos no gelo

Centrifugar a 14000 rpm por 15 min a 4 °C

Coletar o sobrenadante e manter a -80 °C até o uso

Compartment fractioning (Nuclear and cytoplasmic protein extraction)

Buffer A (cell lysis buffer)

- 10mM HEPES; pH 7.5,
- 10mM KCl,
- 0.1mM EDTA,
- 1 mM dithiothreitol (DTT),
- 0.5% Nonidet-40

Incubate on ice for 15-20 min with intermittent mixing.

Tubes are vortexed to disrupt cell membranes and then centrifuged at 12,000 g at 4°C for 15 min.

The supernatant is stored at -70°C till further use as cytoplasmic extract.

The pelleted nuclei were washed thrice with the cell lysis buffer and resuspended in the nuclear extraction buffer

Buffer B (nuclear extraction buffer)

- 20mM HEPES (pH 7.5),
- 400mM NaCl,
- 1mM EDTA,
- 1mM DTT,
- incubated in ice for 30 min.

Nuclear extract is collected by centrifugation at 12,000 g for 15 min at 4°C.

Protein concentration of the nuclear extract is estimated using Bradford's reagent (BioRad, USA). The extract is either immediately used or stored at -70°C till further use.

Buffer C (Urea Lysis Buffer)

- 8M Urea
- 400mM NaCl
- 0.5% NP40
- 50mM Na₂PO₄
- 50mM TRIS pH 8.0

Buffer usado para proteínas insolúveis. Para solubilizar completamente deve-se sonicar o extrato (Pode ser usado no extrato nuclear para extrato nuclear total, ou no pellet – CBP).

INIBIDORES:

Inibidor de protease - Roche - preparar segundo o fabricante (contêm EDTA)

Inibidor de fosfatase - Sigma Cocktail 3- vem pronto para uso

INIBIDORES DE PROTEASES:

	Stock	Uso
Leupeptina	1 mg/ml em agua	1 µl de stock por ml de lisis buffer
Pestatina	1 mM em metanol	1 µl de stock por ml de lisis buffer
Aprotinina	1 mg/ml em agua	1 µl de stock por ml de lisis buffer
PMSF	200 mM em etanol	5 µl de stock por ml de lisis buffer

INIBIDORES DE FOSFATASES:

	Stock	Uso
Ortovanadato	0,5 M em agua	2 µl del stock por ml de lisis buffer
β-glicerofosfato	25 mM em agua	25 µl del stock por ml de lisis buffer
Fluoruro sódico	10 mM em agua	20 µl del stock por ml de lisis buffer

SDS loading buffer (5X)

0.25% Bromophenol blue

500 mM DTT

50% Glycerol

10% SDS

250 mM Tris-Cl (pH 6.8)

***200 mM β-mercaptoethanol can be used instead of DTT.

SDS loading buffer (2X)

0.2% (w/v) bromophenol blue

200 mM DTT (dithiothreitol)

20% glycerol

4% SDS (sodium dodecyl sulfate; electrophoresis grade)

100 mM Tris-Cl (pH 6.8)

***200 mM β -mercaptoethanol can be used instead of DTT.

APS 10%

Dissolver 1 g ammonium persulfate in 10 mL of H₂O and store at 4°C.

A solução estoque deve ser substituída a cada 2-3 semanas.

SDS 20%

Dissolver 200 g de “electrophoresis-grade” SDS em 900 mL of H₂O.

Aquecer a 68°C e agitar com agitador magnético.

Se necessário ajustar o pH para 7,2 adicionando HCl bem devagar e cuidadosamente.

Ajustar o volume e manter a temperatura ambiente. Não esterilizar.

Solução de Acrilamida 30%

Adicionar 29,2 g de acrilamida e 0,8 g de bisacrilamida para 100 ml of H₂O.

Filtrar a solução estoque em papel filtro e manter a 4°C.

Preparar fresh a cada 2-3 semanas.

Tampão de Corrida 10x (Western blot)

- 30.3 g TRIS
- 144.4 g Glicina
- 10g SDS (usar máscara)
- H₂O miliQ qsp 1 L

Verter o pó vagarosamente em 750 mL de H₂O

Depois deverá se completar o volume para 1 L

Tampão de Transferência 10x (Western blot)

- 30.3 g TRIS
- 144.4 g Glicina
- H₂O miliQ qsp 1 L

***Ao tampão de transferência 1x pode-se adicionar metanol

- 100 mL Tampão de Transferência 10x
- 700 mL H₂O miliQ
- 200 mL Metanol

TBS (Tris Buffered Saline)

- 60 mL NaCl 5M
- 40 mL Tris 1M pH7.4
- H₂O qsp 2L

Tween 20 (10%)

- 50 mL Tween 20
- 450 mL H₂O miliQ

TBS – tween (Tris Buffered Saline)

- 60 mL NaCl 5M
- 40 mL Tris 1M pH7.4
- 20 mL Tween20 (10%)
- H₂O qsp 2L

Solução de Bloqueio (BSA 1%+0,01% Azida)

- 0,05 g Azida sódica
- 50 mL TBS 10x
- 5g de BSA
- H₂O miliQ qsp 500mL
- Homogeneizar em agitador magnético

*** A solução pode ser filtrada e reutilizada e usada para guardar os anticorpos primários em geladeira

Solução de Bloqueio (leite desnatado 5%)

Protocolo agressivo de bloqueio

- 2.5g leite desnatado
- 50 mL PBS 1x

*** Sempre deve ser feito fresco

Ponceau S staining solution

0.5% (w/v) Ponceau S

1% acetic acid

Qsp H₂O

Coomassie Blue Protein Gel Stain

Reagente	Quantidade	Concentração
Metanol	500 mL	50% (v/v)
Ácido acético glacial	100 mL	10% (v/v)
Azul de Coomassie	1.25 g	0.125% (w/v)
H ₂ O	400 mL	

Filtrar com papel filtro e manter a temperature ambiente.

Quantificação de Proteína (DC BioRad)

1. Diluir o BSA estoque (28,8 mg/mL) – solução final 2 mg/mL
 - 69,4 µL de BSA estoque em 930,6 µL de RIPA

Para a curva de concentração:

Std #	BSA 2mg/mL	Buffer (µL)	Final Concentration (mg/mL)
1	0	100	0,0
2	10	90	0,2
3	25	75	0,5
4	35	65	0,7
5	50	50	1,0
6	75	25	1,5
7	100	0	2,0

2. Preparar a solução A': para cada 1 mL de solução A' adicionar 20 µL de solução S, caso o buffer de extração tenha detergentes. Se não tiver usar a solução A pura.

Na placa de 96 poços:

Standard: colocar 5 µL em cada poço para a curva padrão

Amostras: colocar 5 µL em cada poço para determinar a concentração

Em cada poço colocar 25 µL da solução A' ou A e 200 µL da solução B

Aguardar 15 minutos a temperatura ambiente

Avaliar a absorbância em Espectrofotômetro a 650nm-700nm.

Para determinar a concentração – usar a planilha de quantificação de proteínas.

Gel de acrilamida (desnaturante)

Solutions for preparing resolving gels for Tris-glycine SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

VOLUME (ML) OF COMPONENTS REQUIRED TO CAST GELS OF INDICATED VOLUME								
COMPONENTS	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
6% GEL								
H ₂ O	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
30% ACRYLAMIDE MIX	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0
TRIS-CL (1.5 M, pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
SDS (10%)	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% AMMONIUM PERSULFATE	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8% GEL								
H ₂ O	2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9	18.5	23.2
30% ACRYLAMIDE MIX	1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	10.7	13.3
TRIS-CL (1.5 M, pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
SDS (10%)	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% AMMONIUM PERSULFATE	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10% GEL								
H ₂ O	1.9	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8
30% ACRYLAMIDE MIX	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	13.3	16.7
TRIS-CL (1.5 M, pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
SDS (10%)	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% AMMONIUM PERSULFATE	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12% GEL								
H ₂ O	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
30% ACRYLAMIDE MIX	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0
TRIS-CL (1.5 M, pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
SDS (10%)	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% AMMONIUM PERSULFATE	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15% GEL								
H ₂ O	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
30% ACRYLAMIDE MIX	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	20.0	25.0
TRIS-CL (1.5 M, pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
SDS (10%)	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% AMMONIUM PERSULFATE	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

** Para gel gradiente colocar: 60% APS e 30% TEMED – ex. para gel de 15mL (90ul APS e 4,5ul TEMED)

Solutions for preparing 5% stacking gel for Tris-glycine SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

VOLUME (ML) OF COMPONENTS REQUIRED TO CAST GELS OF INDICATED VOLUMES								
COMPONENTS	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	8 ml	10 ml
H ₂ O	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
30% ACRYLAMIDE MIX	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1	1.3	1.7
TRIS-CL (1.0 M, pH 6.8)	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1	1.25
SDS (10%)	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
AMMONIUM PERSULFATE (10%)	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

Protocolo Western Blotting

Cobrir todo o sistema com Tampão de Corrida

- 80 volts para stacking
- 120 volts para running

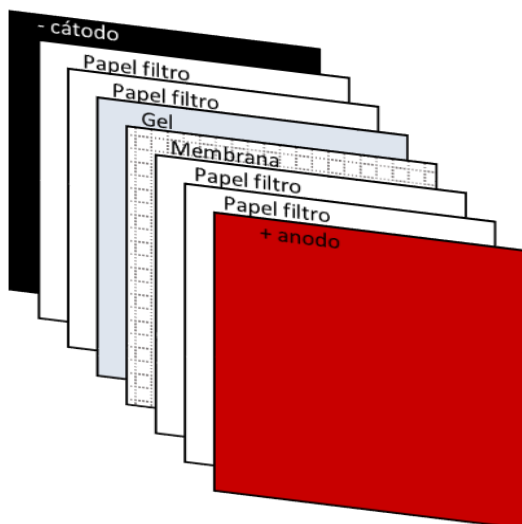
Protocolo Transferência

Ativar a membrana de PVDF em uma solução alcoólica (etanol ou metanol absolutos) por 1 minuto

Lavar com água por 5 minutos

Tudo deve ser equilibrado em tampão de transferência por 5 minutos no mínimo

Montagem do sistema de transferência:



Transferir 495mA/1.5 horas - EM GELO

15 Volts/15 horas para géis de concentração >10% ou 12 horas para géis de concentração <10%.

Protocolo Immunoblot

Standard:

Bloquear em solução de TTBS+1%BSA+0,01%Azida Sódica por 1-2 horas em temperatura ambiente

Não lavar e incubar o anticorpo primário na diluição desejada por 1h a temperatura ambiente ou overnight a 4°C (TTBS+1%BSA+0,01%Azida Sódica)

Lavar 3 vezes, 7 minutos com TBS-Tween.

Adicionar o anticorpo secundário (conjugado a HRP), 1 hora a temperatura ambiente em TBS-Tween.

Lavar 3-5 vezes, 7 minutos com TBS-Tween.

Revelar seguindo o procedimento adequado.

Inativação de ação da Peroxidase

*** para impedir a interferência do secundário da revelação anterior (mata a peroxidase)

TTBS

0,1% Azida Sódica

Incubar overnight a 4°C

Depois da inativação pode-se incubar direto com o anticorpo primário.

Stripping detergente

*** para remover a detecção anterior

Sol 1% SDS

H2O miliQ

20 minutos a 60°C ou 1 hora a temperatura ambiente sob agitação vigorosa.

A partir daí bloquear e proceder normalmente com o Immunoblot.

Preparação de proteína A Sepharose para IP

Resuspender um pote (1,5 gr) de proteína A sepharose CL-4B (GE) em PBS. Centrifugar, eliminar sobrenadante, e lavar de novo com PBS.

(O volume que 1,5 gr de proteína A sepharose são 7-7,5 ml).

A este volume se adiciona 9 volumes de sepharose CL 4B (previamente lavada com PBS, várias vezes, para eliminar o solvente em qual está e equilibrar em PBS).

Após isso se ressuspende toda a resina em PBS+0,02% de azida sódica (7-7,5 mL).

AFINIDADE PROTEÍNAS A E G

SPECIES	IMMUNOGLOBULIN	BINDING TO PROTEIN A	BINDING TO PROTEIN G
HUMAN	IgG (normal)	++++	++++
	IgG1	++++	++++
	IgG2	++++	++++
	IgG3	-	++++
	IgG4	++++	++++
	IgM	-	-
	IgA	-	-
	IgE	-	-
MOUSE	IgG1	+	++++
	IgG2a	++++	++++
	IgG2b	+++	+++
	IgG3	++	+++
RAT	IgG1	-	+
	IgG2a	-	++++
	IgG2b	-	++
	IgG2c	+	++
GOAT	IgG	+/-	++
RABBIT	IgG	++++	+++
SHEEP	IgG	+/-	++

Imunoprecipitação

*** todo o procedimento em gelo

A partir de um lisado proteico, separar a concentração (0,1 - 15 mg) de proteínas

Separar 20µl de Proteína A Sepharose

Fazer o pré-clearence dos beads proteína A

- Lavar com o mesmo volume de PBS
- Centrifugar 12000 rpm 1'
- Repetir 2x

Adicionar 1-2 µg de anticorpo, com os beads de proteína A sepharose e o extrato.

Deixar overnight a 4°C sob agitação por inversão.

Centrifugar a máxima velocidade por 30 segundos

Descartar o sobrenadante

Ressuspender em tampão de amostra, aquecer a 100°C

Aplicar com beads e correr no gel SDS-PAGE na concentração correspondente para a proteína de interesse

ENSAIOS DE ATIVIDADE E DEGRADAÇÃO

Ensaio atividade quinase cell free (HER2-HER4)

Buffer K tampão HTNG

50mM Heppes, pH7.4

50mM NaCl

1% Triton X100

10% Glicerol

15mM MgCl₂

Ensaio:

Em placas de 100mm lavar as células com PBS gelado

Lisar as células em tampão de lise sem inibidores de fosfatase

Quantificar a concentração proteica

Imunoprecipitar a quinase de interesse

Lavar a imunoprecipitação com tampão HNTG

Aquecer a 37° C e retirar alíquotas nos tempos definidos (1 min, 30 min, 1 hora, 3 horas, 6 horas, 20 horas)

Para parar a reação de degradação deve-se adicionar tampão de amostra e congelar rapidamente em N₂

Detectar a proteína de interesse fosforilada ou em caso de autofosforilação Y99

Ensaio degradação proteica cell free (p27)

Buffer D de degradação 10x

- 500 µL 1M Tris-HCl pH8.3
- 50 µL 1M MgCl₂
- 10 µL 1M DTT
- Qsp 1mL H₂O miliQ

Coleta

1. Tecido – 50-100mg em 1.5 mL eppendorff adicionar 100-200 µL de buffer D 1x com inibidores (1mM PMSF, 100 µg/mL Aprotinina e 10 µg/mL Leupeptina) e homogeneizar de 30-60 segundos.
2. Congelar a -80° C
3. Células – lavar a placa com PBS gelado 2x.
4. Adicionar 100-200 µL de buffer D 1x com inibidores (1mM PMSF, 100 µg/mL Aprotinina e 10 µg/mL Leupeptina) e raspar a placa em gelo e passar para um 1.5mL eppendorff.
5. Congelar a -80° C
6. No dia do ensaio - Para homogeneizar completamente: congelar rapidamente em N₂ e descongelar em gelo para homogeneizar melhor.
7. Avaliar a contração proteica pelo método de interesse

Reação de degradação 1x:

- 100 µg de proteína
- 2 µg de proteína recombinante
- 3 µL de tampão D
- 2mM ATP
- Qsp 30 µL (H₂O miliQ)

Reação de degradação:

1. Aquecer a 37° C e retirar alíquotas nos tempos definidos (1min, 30 min, 1hora, 3 horas, 6 horas, 20 horas)
2. Para parar a reação de degradação deve-se adicionar tampão de amostra e congelar rapidamente em N₂
3. Aliquotar a -80° C até o uso.

EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA

EXTRAÇÃO DE RNA total TRIZOL Reagent (Thermo)

A. Required reagents:

- Ice cold PBS
- DEPC-treated water
- TRIzol Reagent (Invitrogen)
- Cell scraper
- 70% ethanol
- Isopropyl alcohol

B. Equipment and supplies:

- Refrigerated centrifuge
- Microcentrifuge
- Micropipettors
- Vortex mixer
- Powder-free gloves
- Centrifuge tubes

Homogenization:

Rinse cell monolayer with ice cold PBS once. Lyse cells directly in a culture dish by adding 1 ml of TRIzol Reagent per 3.5 cm diameter dish and scraping with cell scraper. Pass the cell lysate several times through a pipette. Vortex thoroughly. The amount of TRIzol reagent added is based on the area of the culture dish (1 ml per 10 cm²) and not on the number of cells present. An insufficient amount of TRIzol Reagent may result in DNA contamination of the isolated RNA.

Incubate the homogenized sample for 5 minutes at room temperature to permit the complete dissociation of nucleoprotein complexes. Centrifuge to remove cell debris. Transfer the supernatant to new tube.

PHASE SEPARATION:

Add 0.2 ml of chloroform per 1 ml of TRIzol Reagent. Cap sample tubes securely.

Mix vigorously for 15 seconds and incubate them at room temperature for 2 to 3 minutes. Centrifuge the samples at no more than 12,000 x g for 15 minutes at 2 to 8°C.

Following centrifugation, the mixture separates into lower red, phenol/chloroform phase, an interphase, and a colorless upper aqueous phase. RNA remains exclusively in the aqueous phase.

Transfer upper aqueous phase carefully without disturbing the interphase into fresh tube. Measure the volume of the aqueous phase (The volume of the aqueous phase is about 60% of the volume of TRIzol Reagent used for homogenization).

RNA PRECIPITATION:

Precipitate the RNA from the aqueous phase by mixing with isopropyl alcohol. Use 0.5 ml of isopropyl alcohol per 1 ml of TRIzol Reagent used for the initial homogenization.

Incubate samples at 15 to 30°C for 10 minutes and centrifuge at not more than 12,000 x g for 10 minutes at 2 to 4°C. The RNA precipitate, often invisible before centrifugation, forms a gel-like pellet on the side and bottom of the tube.

RNA WASH:

Remove the supernatant completely. Wash the RNA pellet once with 75% ethanol, adding at least 1 ml of 75% ethanol per 1 ml of TRIzol Reagent used for the initial homogenization.

Mix the samples by vortexing and centrifuge at no more than 7,500 x g for 5 minutes at 2 to 8 °C. Repeat above washing procedure once.

Remove all leftover ethanol.

REDISSOLVING RNA:

Air-dry or vacuum dry RNA pellet for 5-10 minutes. Do not dry the RNA pellet by centrifuge under vacuum. It is important not to let the RNA pellet dry completely as this will greatly decrease its solubility. Partially dissolved RNA samples have an A260/A280 ratio < 1.6. Dissolve RNA in DEPC-treated water by passing solution a few times through a pipette tip.

SPECTROPHOTOMETRIC ANALYSIS:

In the Nanodrop, 1 µl of RNA take OD at 260 nm and 280 nm to determine sample concentration and purity. The A260/A280 ratio should be above 1.6. Apply the convention that 1 OD at 260 equals 40 µg /ml RNA.

RT-PCR - Síntese de cDNA (Superscript protocolo Thermo)

Volume final de reação 20 µL para 1 µg de RNA total ou 250 ng de mRNA

1. Add the following components to a nuclease-free microcentrifuge tube:

- Oligo(dT)12-18 (500 µg/mL) or 1 µL
- 50–250 ng random primers or
- 2 pmole gene-specific primer (GSP)
- 1 ng to 5 µg total RNA or x µL
- 1–500 ng of mRNA
- 1 µL dNTP Mix (10 mM each) 1 µL
- Sterile, distilled water to 12 µL

Heat mixture to 65°C for 5 min and quick chill on ice.

2. Collect the contents of the tube by brief centrifugation and add:

- 5X First-Strand Buffer 4 µL
- 0.1M DTT 2 µL
- RNaseOUT™ (40 units/µL) (optional)* 1 µL

Mix contents of the tube gently. If you are using oligo(dT)12-18 or GSP, incubate at 42°C for 2 min. If you are using random primers, incubate at 25°C for 2 min.

3. Add 1 µL (200 units) of SuperScript™ II RT and mix by pipetting gently up and down.

If you are using less than 1 ng of RNA, reduce the amount of SuperScript™ II RT to 0.25 µL (50 units) and add sterile, distilled water to a 20 µL final volume.

If you are using random primers, incubate tube at 25°C for 10 min.

4. Incubate at 42°C for 50 min.

5. Inactivate the reaction by heating at 70°C for 15 min.

RT-PCR quantitativo

Pool de amostra (cDNA) 2ng/ul - a partir do 1ug em 50 ul.

Pool de Primer (Fw e Rv) – a partir do 10mM.

10 ul de SYBR

5 ul do Pool de Primer

5ul do Pool de Amostra

BIOLOGIA MOLECULAR

PCR

Ligação em vetor

Clonagem

CITOMETRIA DE FLUXO E *SORTING*

Protocolo Ciclo Celular – Citometria de Fluxo PI ou DAPI

- Tripsinizar as células (rotina) - geralmente para ciclo elas foram plaqueadas em placas de 6 poços (não menos do que 40K), portanto os volumes aqui seriam para esta condição
 - Lavar bem com PBS gelado
 - 0,5mL tripsina ou EDTA – 5'
 - 0,5mL meio completo
 - Centrifugar em 10' @ 200G (melhor usar falcon de 15mL mesmo)
- Remover S/N e ressuspender bem em 0,3mL de PBS
- Add 700uL de EtOH 100% gota a gota e no vortex (as células agregam muito) - final EtOH 70%
- Deixar células fixando no -20C por pelo menos 24h
- Centrifugar as células 10' @ 425G
- Remover S/N
- Add 1mL PBS
- Centrifugar as células 10' @ 425G
- Ressuspender em 200µL da solução com PI (menos o Ctrl NM):

Solução com PI :	(Para preparar 10mL)
I. 200 µg/mL de Rnase A	(2mL de 1mg/mL)
II. 20 µg/mL de PI	(200µL de 1mg/mL)
III. 0,1% de Triton X-100	(10µL)
IV. Completar com PBS-EDTA 0.02%	(8,79 mL)

- Incubar 30min @ 37C
- Vortexar
- Ler no Accuri (**é sem lavar mesmo, por que senão tira o PI**), 1º o NM
 - Fazer density plot SSC-A x FSC-A à 1º gate, tirar debris
 - Fazer density plot FSC-H x FSC-A à 2º gate, tirar doublets
 - Fazer density plot SSC-H x SSC-A à 3º gate, tirar doublets (2)
 - Histograma Count x FL3-A (linear)
 - Coletar idealmente 20 ou 50k eventos (mas 10k eventos é OK) do gate 3 no slow flow (isso é MUITO importante!!!!)
- Salvar os FCS (export) e o CS6 (formato do Accuri)

Se for usar DAPI: tudo igual, mas não precisa usar a RNase A!!! E Accuri não lê (tem que ser no Fortessa)