

Protocolo Básico de Cultura de Células

- Limpar com álcool 70 % a mesa do Fluxo Lâminar.
- Limpar com álcool 70 %
 - 1 cilindro com pipetas de 10 e 5 ml
 - 1 dispensador
 - 1 frasco de ½ cultura aquecido 37 °C (banho maria)
 - 1 frasco com ATV aquecido
 - 1 frasco de Soro Fetal
- Ligar o fluxo + lâmpada U.V com o material acima citado no seu interior por aproximadamente 30 minutos.
- Desligar a U.V
- Abrir o pacote de pipetas
- Colocar 10 ml de ATV na garrafa grande ou 5 ml na garrafa pequena a ser repicada, tampar e deixar o ATV agir, até aparecer “furos” no tapete celular.
- Dispersar o ATV, fechar a garrafa e “bater” para desprender as células.
- Ressuspender as células com 2 ml de soro fetal (garrafa pequena) ou 4 ml (garrafa grande).
- Ressuspender 8 vezes com a pipeta.
- Distribuir em 2 garrafas com 2 ml cada (grande) ou 4 garrafas com 0,5 ml cada (pequena).
- Completar com meio (RPMI, TC100, DMEM)
- Homogeneizar, anotar célula e data e levar para a estufa de CO₂ a 37°C

Meio RPMI

Em uma proveta de 1 litro, colocar:

200 µl de gentamicina (antibiótico)
8 ml de glutamina
4,76 g/l de hepes (tampão)
5 ml de soro fetal bovino 10%

Depois completar com meio RPMI até 1 litro e filtrar.

Para 250 ml de meio:

50 µl de gentamicina
1,2 ml de hepes

1,25 ml de soro fetal
2,0 ml de glutamina

Para 400 ml de meio:

80 µl de gentamicina
1,9 ml de hepes
2,0 ml de soro fetal
3,2 ml de glutamina

Teste de esterilidade

- Após filtrado e aliqotado, são retirados 1ml de cada alíquota e adicionados em tioglicolato ou simplesmente em tubos Falcon(5ml de meio). O ideal é realizar o teste da pipeta, puxando-se somente o tioglicolato até quase o final da pipeta.
- Deixar todas as amostras na estufa 37° C durante uma semana, para verificar se não houve contaminação.

L-Glutamina

L-Glutamina (P.M.= 146,1)

- Solução estéril 200 mM
- Pesar 1,46g/50ml H₂O
- Passar pelo filtro Millipore no fluxo e distribuir em frascos (1m/frasco)
- Congelar -20° C
- Uso: 1ml/100ml de meio.
- [L]= 2mM/ml.