

## 1. Meios de cultivo celular

### 1.1 Antibióticos e antifúngicos

Os antibióticos e o antifúngico utilizados tem por objetivo controlar pequenas contaminações provenientes da manipulação dos cultivos. Porém, a manipulação cuidadosa, evitando a introdução de contaminantes, é o meio mais eficaz de prevenir estas.

As quantidades utilizadas são referentes à 1 litro de meio, independente do meio utilizado. Quando da utilização de meio contendo 2x ou 5x (antibiótico e antifúngico), apenas multiplicar estes valores.

Reagentes	Quantidade
Penicilina (10.000UI/mL) e Estreptomicina (10mg/mL)	10 mL
Ciprofloxacina (1 comprimido de 500mg dissolvido em 50mL*)	1mL
Anfotericina B (250µg/mL)	2,25mL

\*Filtrar usando filtro de 0,22 µm

### 1.2 Meio Essencial Mínimo (MEM)

1. Pesar 9,77g de MEM; 2,2g de bicarbonato de sódio.
2. Acrescentar 1 litro de água destilada e agitar até dissolver por completo, utilizando agitador magnético.
3. Filtrar a solução resultante e separar uma alíquota para o exame bacteriológico.
4. Incubar na estufa (azul) por 72 horas à 37°C.
5. Acrescentar antibióticos e antifúngicos.
6. Distribuir em frascos menores e armazenar em geladeira (4°C).

### **1.3 Meio Essencial Mínimo 2X (MEM 2X)**

1. Pesar 19,54g de MEM; 4,4g de bicarbonato de sódio.
2. Acrescentar 1 litro de ultra pura (Milli- Q®) e agitar até dissolver por completo.
3. Filtrar a solução resultante e separar uma alíquota para o exame bacteriológico.
4. Incubar na estufa (azul) por 48 horas à 37°C.
5. Acrescentar antibióticos e antifúngicos (deve-se adicionar o dobro do que seria utilizado no MEM).
6. Distribuir em frascos menores e armazenar em geladeira.

### **1.4 Meio RPMI**

1. Pesar 10,4 de RPMI; 2g de bicarbonato de sódio.
2. Acrescentar 1 litro de água destilada e agitar até dissolver por completo.
3. Filtrar a solução resultante e separar uma alíquota para o exame bacteriológico.
4. Incubar na estufa (azul) por 48 horas à 37°C.
5. Distribuir em frascos menores e armazenar em geladeira.

#### **OBS.:**

- Acrescentar antibióticos e antifúngicos apenas se achar necessário ou se quem for usar solicitar.

### **1.5 Meios F10 e 199**

1. Separar um balão volumétrico (estéril) e acrescentar 2L de Água ultra pura (Milli- Q®).
2. Acrescentar um frasco inteiro de F10 ou MEIO 199
3. Acrescentar 2,4g de bicarbonato de sódio

4. Filtrar e separa uma amostra para o exame bacteriológico.
5. Incubar na estufa (azul) por 48 horas à 37°C.

### **1.6 *Tripsina***

1. Pesar e acrescentar NaCl, glicose, bicarbonato de sódio, KCl, tripsina e EDTA.
2. Acrescentar 1L de água ultra pura (Milli-Q®) e 1,4 mL de Vermelho de Fenol
3. Filtrar a solução resultante.
4. Incubar na estufa (azul) por 48 horas à 37°C.
5. Distribuir em frascos de aproximadamente 70mL e congelar

<b>Reagentes</b>	<b>Quantidades</b>
Cloreto de Sódio - NaCl	8g
Glicose	1g
Bicarbonato de Sódio - NaHCO <sub>3</sub>	0,35g
Cloreto de Potásio - KCl	0,4g
Tripsina	0,5g
EDTA	0,25g
Vermelho de Fenol 1%	1,4mL
Água ultra pura qsp	1L

### **1.7 *PBS (Tampão fosfato-salino ou Phosphate buffered saline) – pH 7,4***

<b>Reagente</b>	<b>Concentração final (mmol)</b>	<b>Quantidade (gramas)</b>
NaCl	137	8
KCl	2,7	0,2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	8,1	1,44
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,76	0,24
Água qsp	-	1 litro

A solução de PBS deve ter um pH ajustado para 7,4. A fórmula descrita acima é para a preparação de PBS 1X, porém para facilitar a rotina laboratorial, este pode ser preparado na

concentração de 10X. Para isso, deve-se multiplicar a quantidade de todos os sais por 10, porém estes serão solubilizados em apenas 1 litro de água. Após a preparação, este pode ser ou não autoclavado para posterior armazenamento.

### **1.8 Soro Equino**

Após a coleta do sangue equino, armazenar na geladeira até a separação do soro, armazenar em um frasco limpo. Adicionar antibiótico e antifúngicos.