

Aug 13, 2024

Fluorescent gelatin degradation protocol in 96-well plates

This protocol is a draft, published without a DOI.

Bianca Cruz Pachane¹

¹Universidade Federal de São Carlos - UFSCar



Bianca Cruz Pachane

Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

OPEN  ACCESS



Protocol Citation: Bianca Cruz Pachane 2024. Fluorescent gelatin degradation protocol in 96-well plates. **protocols.io**
<https://protocols.io/view/fluorescent-gelatin-degradation-protocol-in-96-wel-diph4dj6>

License: This is an open access protocol distributed under the terms of the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

Protocol status: Working

We use this protocol and it's working

Created: August 07, 2024

Last Modified: August 13, 2024

Protocol Integer ID: 104905

Keywords: Gelatina Fluorescente, Invasão Celular

Funders Acknowledgement:

FAPESP

Grant ID: 2021/01983-4



Disclaimer

DISCLAIMER – FOR INFORMATIONAL PURPOSES ONLY; USE AT YOUR OWN RISK

The protocol content here is for informational purposes only and does not constitute legal, medical, clinical, or safety advice, or otherwise; content added to **protocols.io** is not peer reviewed and may not have undergone a formal approval of any kind. Information presented in this protocol should not substitute for independent professional judgment, advice, diagnosis, or treatment. Any action you take or refrain from taking using or relying upon the information presented here is strictly at your own risk. You agree that neither the Company nor any of the authors, contributors, administrators, or anyone else associated with **protocols.io**, can be held responsible for your use of the information contained in or linked to this protocol or any of our Sites/Apps and Services.

Abstract

Protocolo do ensaio de degradação de gelatina fluorescente, método de estudo da invasão celular que permite a avaliação da atividade gelatinase *in vitro* por análise de microscopia epifluorescente. Adaptado de Pachane *et al* (2022) para placas de 96 poços.

Fluorescent gelatin degradation protocol, a method for studying cell invasion by detecting gelatinase activity *in vitro* upon epifluorescence microscopy analysis. Adapted from Pachane *et al* (2022) (PMID: 36293503)

Guidelines

Descongelar a gelatina a 37 °C, protegida da luz. Todo o trabalho no fluxo deve ser realizado com a luz da capela apagada (luz ambiente pode estar acesa). Uma vez que o ensaio for finalizado, selar a placa com Parafilm M e deixá-la na geladeira (4 °C) embalada em papel alumínio até a análise.

Materials

Consumíveis

1. Placa de 96 poços preta com fundo chato transparente estéril -



Corning® 96-well Flat Clear Bottom Black Polystyrene TC-treated Microplates, Individually Wrapped **Corning Catalog #3603**

2. Pipetas e tubos estéreis

Soluções:

1. Gelatina conjugada com fluoresceína -



Gelatin From Pig Skin, Fluorescein Conjugate **Thermo Fisher Catalog #G13187**

2. PBS estéril (autoclavado e/ou filtrado)

3. Meio de cultivo sem soro

4. Meio de cultivo com soro

5. Trypan blue -  Trypan Blue solution 0.4% **Merck MilliporeSigma (Sigma-Aldrich) Catalog #T8154- 100 ml**

6. PFA (paraformaldeído $[M]$ 4 % (w/v) em H₂O deionizada , pH 7.6) - filtrar e manter estéril

7. Triton X-100 ($[M]$ 0.1 % (v/v) em H₂O deionizada) - não filtrar

8. Faloidina + DAPI ( 1 μ L  Phalloidin-iFluor 647 Reagent **Abcam Catalog #ab176759** +  0.76 μ L



4,6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (DAPI) **Thermo Fisher Scientific Catalog #D1306** em



5 mL PBS)

Equipamentos

1. Capela de fluxo laminar
2. Incubadora para células
3. Contador de células

Equipment

new equipment

NAME

Bio-Rad

BRAND

1450011

SKU

Cell Counting Slides for TC10™/TC20™ Cell Counter, Dual-Chamber

SPECIFICATIONS

4. Microscópio de Epifluorescência



Equipment

ImageXpress Micro XLS+

NAME

HTS epifluorescence microscope

TYPE

Molecular Devices

BRAND

500496

SKU

Protocol materials

⊗ Gelatin From Pig Skin, Fluorescein Conjugate **Thermo Fisher Catalog #G13187** Materials, Step 1

⊗ Trypan Blue solution 0.4% **Merck MilliporeSigma (Sigma-Aldrich) Catalog #T8154-** 100 ml Materials, Step 7

⊗ Corning® 96-well Flat Clear Bottom Black Polystyrene TC-treated Microplates, Individually Wrapped **Corning Catalog #3603**

Materials, Step 2

⊗ Phalloidin-iFluor 647 Reagent **Abcam Catalog #ab176759** Materials, Step 16

⊗ 4,6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (DAPI) **Thermo Fisher Scientific Catalog #D1306** Materials, Step 16

⊗ Parafilm® M Laboratory Wrapping Film, 4 in. W x 125 ft. L; (10cm x 38m) **Thermo Fisher Catalog #1337410**

Step 18

Safety warnings

⚠ Trabalhar sob condições estéreis em ambiente sem iluminação direta para proteger a fluorescência da gelatina.

Ethics statement

n/a



Before start

Sob condições estéreis, solubilizar a gelatina fluorescente a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ com PBS morno, conforme o *datasheet*, para uma solução estoque de 5 mg/mL . Aliquotar e manter os estoques congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Descongelar o estoque a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por $00:30:00$ antes do uso. Para solução de uso, diluir a solução estoque para 0.2 mg/mL com PBS morno, misturar bem e manter a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o uso.



Preparação da Placa Recoberta com Gelatina Fluorescente

- 1 Descongelar estoque de **Gelatina Fluorescente** a [M] 5 mg/mL ou solução de uso a [M] 0.2 mg/mL por ⌚ 00:30:00 a 🌡 37 °C (estufa ou banho-maria).

30m



🔗 Gelatin From Pig Skin, Fluorescein Conjugate **Thermo Fisher Catalog #G13187**

- 1.1 Preparar a solução de uso com PBS morno e mante-la a 🌡 37 °C até o uso.

- 2 Dentro do fluxo, sob condições estéreis, abrir uma nova **placa preta de 96 poços** e nomear os grupos conforme o mapa experimental, que deverá conter pelo menos:

1. Controle negativo - células em meio sem soro, sem tratamento
2. Controle positivo - células em meio com soro, sem tratamento
3. Tratamento

OBS: planejar ensaio para conter três replicatas técnicas pelo menos.



Corning® 96-well Flat Clear Bottom Black Polystyrene TC-treated Microplates, Individually Wrapped **Corning Catalog #3603**

- 3 Aplicar 🧪 70 µL da solução de uso de gelatina fluorescente ([M] 0.2 mg/mL) diretamente no fundo de cada poço, com as pipetas a 90° em relação ao fundo da placa. Evitar a formação de bolhas ao dispensar o líquido.



- 4 Incubar a placa por ⌚ 00:30:00 em estufa a 🌡 37 °C , protegido da luz, para polimerização da gelatina.

30m



- 5 Remover o excesso de *coating* da placa por pipetagem ou aspiração (evitar tocar no fundo do poço).



- 6 Pré-condicionar a placa com 🧪 200 µL do meio de plaqueamento adequado por ⌚ 00:30:00 em estufa a 🌡 37 °C :

30m



1. Controle negativo: meio sem soro
2. Controle positivo: meio com soro
3. Tratamento: meio sem soro

Preparação e Plaqueamento do Ensaio

2d 16h



- 7 Repicar as células como de costume. Ressuspender células em meio sem soro para contagem automatizada com **trypan blue**.



Trypan Blue solution 0.4% **Merck MilliporeSigma (Sigma-Aldrich)** Catalog #T8154- 100 ml

Equipment

new equipment

NAME

Bio-Rad

BRAND

1450011


SKU

Cell Counting Slides for TC10™/TC20™ Cell Counter, Dual-Chamber

SPECIFICATIONS

- 8 Remover o meio de pré-condicionamento da placa por pipetagem ou aspiração (evitar tocar no fundo do poço).



- 9 Adicionar **meio de plaqueamento + suspensão de células + tratamento** para um volume total de  200 µL . Efetuar o plaqueamento individualizado por poço.



- 9.1 Densidades sugeridas:

MDA-MB-231: 5×10^3 células/poço (= 1×10^5 células/ml)

HUVEC: 5×10^3 células/poço (= 1×10^5 células/ml)

HDFa: 2×10^3 células/poço (= 1×10^4 células/ml)

THP-1: 5×10^3 células/poço (= 1×10^5 células/ml)

MCF7: 5×10^3 células/poço (= 1×10^5 células/ml)



- 10 Incubar a placa em estufa a  37 °C , 5% CO₂, por  16:00:00 a  48:00:00 .

2d 16h



Fixação e Marcação das Células

10m

- 11 Ao final da incubação, remover o meio condicionado da placa. O meio pode ser descartado ou coletado para avaliação de gelatinases por **zimografia**.



- 12 Fixação: Adicionar gentilmente 100 µL PFA 4% em cada poço e incubar em Room temperature (RT) por 00:10:00 . 10m
- 13 Lavar os poços gentilmente com 100 µL PBS . Descartar o sobrenadante. Repetir a lavagem.
- 14 Permeabilização: Adicionar gentilmente 100 µL 0.1% Triton X-100 por poço e incubar em Room temperature (RT) por **exatamente** 00:05:00 . 5m
- 15 Lavar os poços gentilmente com 100 µL PBS . Descartar o sobrenadante. Repetir a lavagem.
- 16 Marcação: adicionar 70 µL Faloidina + DAPI por 00:20:00 em Room temperature (RT) , protegido da luz. 20m
- Phalloidin-iFluor 647 Reagent **Abcam Catalog #ab176759**
- 4,6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (DAPI) **Thermo Fisher Scientific Catalog #D1306**
- 17 Lavar os poços gentilmente com 100 µL PBS . Descartar o sobrenadante. Repetir a lavagem.
- 18 Manter as amostras em 200 µL PBS . Selar a placa com **Parafilm M** e embalar com papel alumínio.
- Parafilm® M Laboratory Wrapping Film, 4 in. W x 125 ft. L; (10cm x 38m) **Thermo Fisher Catalog #1337410**

Imageamento por microscopia de epifluorescência

- 19



Equipment

ImageXpress Micro XLS+

NAME

HTS epifluorescence microscope








TYPE

Molecular Devices

BRAND

500496

SKU

- 20 No software MetaXpress, utilizar o template para placa Corning 3603. Serão utilizados os filtros DAPI (núcleo), FITC (gelatina) e Cy5 (faloidina 647). 
- 21 Ajustar a intensidade do laser, iniciando a partir de 10 ms e aumentando gradativamente 
- Lembrete: intensidades muito altas podem queimar a amostra e a fluorescência é perdida mais facilmente.*
- 22 Verificar a dispersão das células no poço com a lente de 4X. Não é necessário adquirir essa etapa. 
- 23 Ajustar o foco para aquisição das imagens em lentes de 20X e 40X. Selecionar pelo menos 9 sítios por poço. 
- 24 Após a aquisição, exportar os dados brutos para um HD ou pen drive formatado: 
1. Anotar o mapa e nome da placa, junto de seu código no MetaXpress.
 2. *Screening > Plate Data Utilities > Export Images > selecionar a placa desejada > Select*
 3. Selecionar o drive externo > OK
- 25 Desligar o sistema e guardar a placa pós-análise embalada em papel alumínio a 
-  4 °C (geladeira) .

Processamento de imagens - Degradação da Gelatina

- 26 Abrir o software **FIJI** 

Software

ImageJ/Fiji

NAME

Windows 7

OS

National Institutes of Health

DEVELOPER

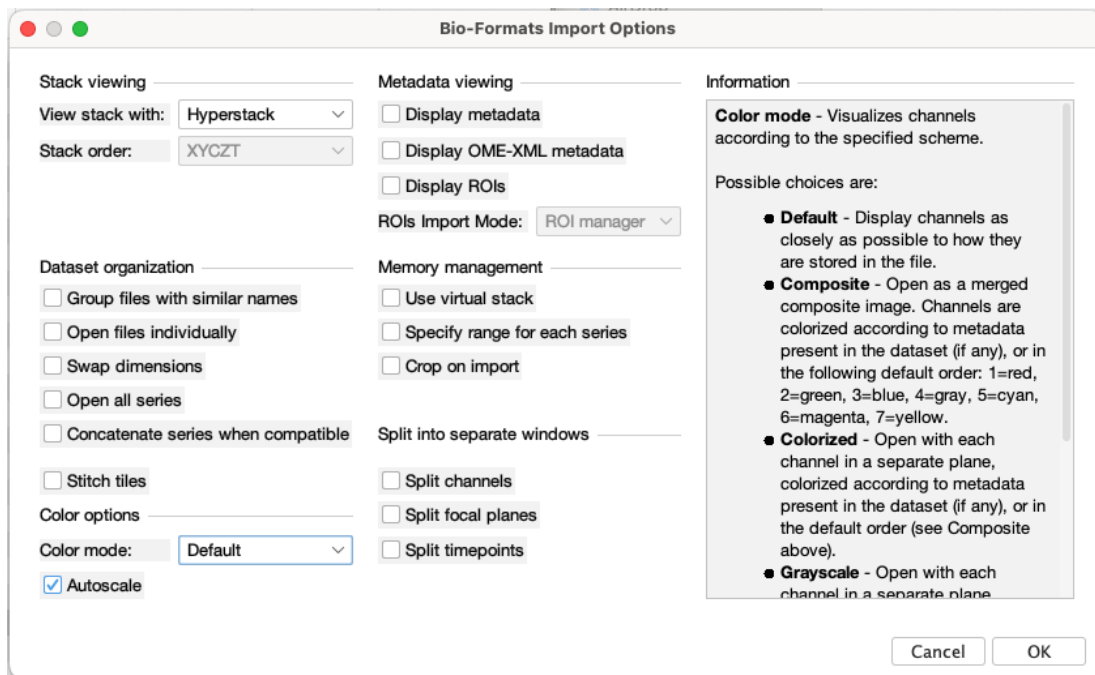
<http://wsr.imagej.net/distros/win/ij152-win-java8.zip>

SOURCE LINK

- 27 Arrastar o arquivo bruto em formato .HTD para o FIJI. Elas devem ser importadas através do BioFormats conforme a imagem abaixo:



27.1



Todas as imagens da placa adquirida irão ser importados de uma única vez. Caso a placa seja muito pesada, você pode selecionar sítio por sitio, realizando uma importação a cada vez.

- 28 A escala das imagens já deverá estar ajustada. Caso contrário, efetuar o ajuste da **escala das imagens**:



Menu *Analyze* > *Set scale* >



Para 4x: 500 px = 800 μ m
Para 10x: 600 px = 400 μ m
Para 20x: 600 px = 200 μ m
Para 40x: 600 px = 100 μ m
Para 60x: 480 px = 50 μ m

> \checkmark *Global* > OK

29 **Ajustar as medidas do sistema:**

Menu *Analyze* > *Set Measurements* > \checkmark *Area* > \checkmark *Standard Deviation* > \checkmark *Shape Descriptor* > \checkmark *Mean grey value* > \checkmark *Perimeter* > \checkmark *Display label* > OK



30 As imagens virão agrupadas em *stacks* contendo todos os filtros de um sítio, em formato 16-bit (escala de cinza).



Para agrupar todos os sítios em um único arquivo:

Menu *Image* > *Stacks* > *Tools* > *Concatenate* >

Na aba *Concatenator* > \checkmark *All open windows* > Renomear > OK

31 **Para selecionar o filtro FITC:**

Menu *Image* > *Colors* > *Split channels*

Minimizar os *stacks* referentes ao DAPI (C1) e ao Cy5 (C3). Manter apenas o *stack* do FITC (C2).



32 **Para transformar a imagem 16-bit em binária:**

Menu *Image* > *Adjust* > *Threshold* >

Na aba *Threshold* > \checkmark *Don't reset range* > Ajustar a máscara para conter apenas os pontos de degradação > *Apply*

Na aba *Convert Stack to Binary* > \checkmark *Black background (of binary masks)* > \checkmark *Create new stack* > OK



33 **Para medir a área de degradação:**

Menu *Analyze* > *Analyze Particles*

Na aba *Analyze Particles* > *Size (micron^2) = 5-Infinity* > \checkmark *Summarize* > OK

Na aba *Process stack?* > *Process all images?* > *Yes*



A tabela contendo o resumo de cada imagem do *stack* será criada pelo sistema e pode ser salva como arquivo de texto .csv.

Menu *File* > *Save as* > Selecionar a pasta > *Save*

A área total será mostrada em μ m². Os arquivos de texto podem ser compilados no Excel para organização dos dados e análise estatística.

Processamento de Imagens: Contagem de Células

34 Abrir o software **FIJI**

Software

ImageJ/Fiji

NAME

Windows 7

OS

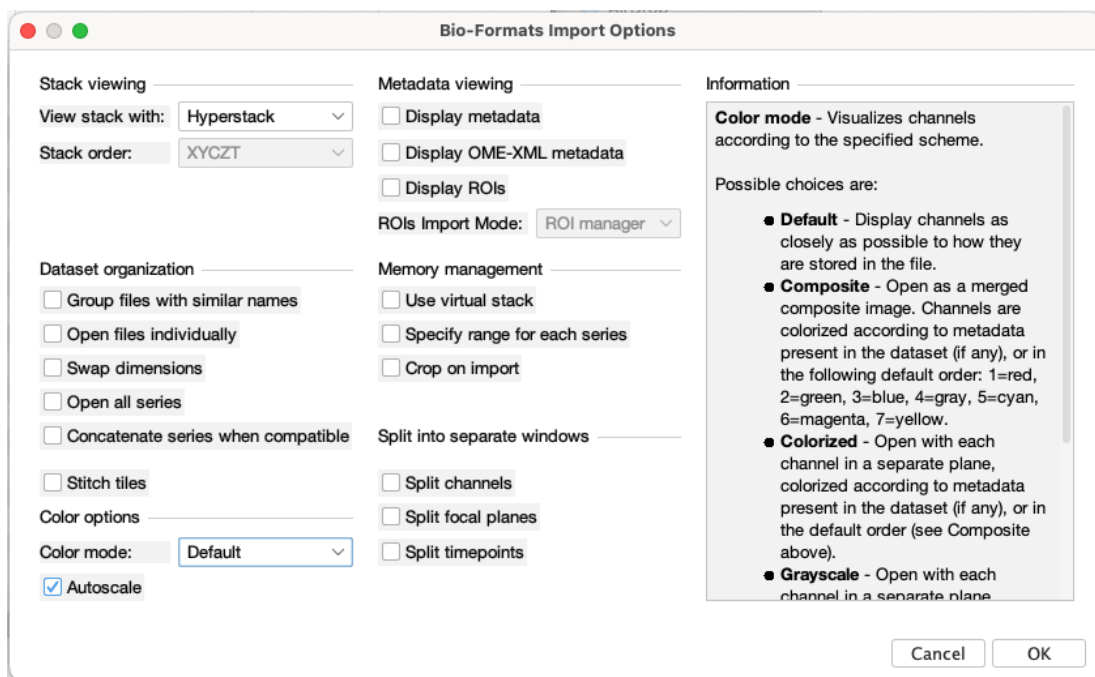
National Institutes of Health

DEVELOPER

<http://wsr.imagej.net/distros/win/ij152-win-java8.zip> SOURCE LINK

35 Arrastar o arquivo bruto em formato .HTD para o FIJI. Elas devem ser importadas através do BioFormats conforme a imagem abaixo:

35.1



Todas as imagens da placa adquirida irão ser importados de uma única vez. Caso a placa seja muito pesada, você pode selecionar sítio por sítio, realizando uma importação a cada vez.

36 As imagens virão agrupadas em *stacks* contendo todos os filtros de um sítio, em formato 16-bit (escala de cinza).

**Para agrupar todos os sítios em um único arquivo:**

Menu *Image > Stacks > Tools > Concatenate >*

Na aba *Concatenator > √ All open windows > Renomear > OK*

37 Para selecionar o filtro DAPI:

Menu *Image > Colors > Split channels*

Minimizar os *stacks* referentes ao FITC (C2) e ao Cy5 (C3). Manter apenas o *stack* do DAPI (C1).

38 Para transformar a imagem 16-bit em binária:

Menu *Image > Adjust > Threshold >*

Na aba *Threshold > √ Don't reset range > Ajustar a máscara para conter os núcleos > Apply*

Na aba *Convert Stack to Binary > √ Black background (of binary masks) > √ Create new stack > OK*

39 Para contagem das células:

Menu *Analyze > Analyze Particles*

Na aba *Analyze Particles > Size (micron²) = 10-Infinity > √ Summarize > OK*

Na aba *Process stack? > Process all images? > Yes*

A tabela contendo o resumo de cada imagem do *stack* será criada pelo sistema e pode ser salva como arquivo de texto .csv.

Menu *File > Save as > Selecionar a pasta > Save*

O número de núcleos estará na coluna *Count*. Os arquivos de texto podem ser compilados no Excel para organização dos dados e análise estatística.

Processamento de Imagens: Morfologia Celular

40 Abrir o software FIJI**Software****ImageJ/Fiji**

NAME

Windows 7

OS

National Institutes of Health

DEVELOPER

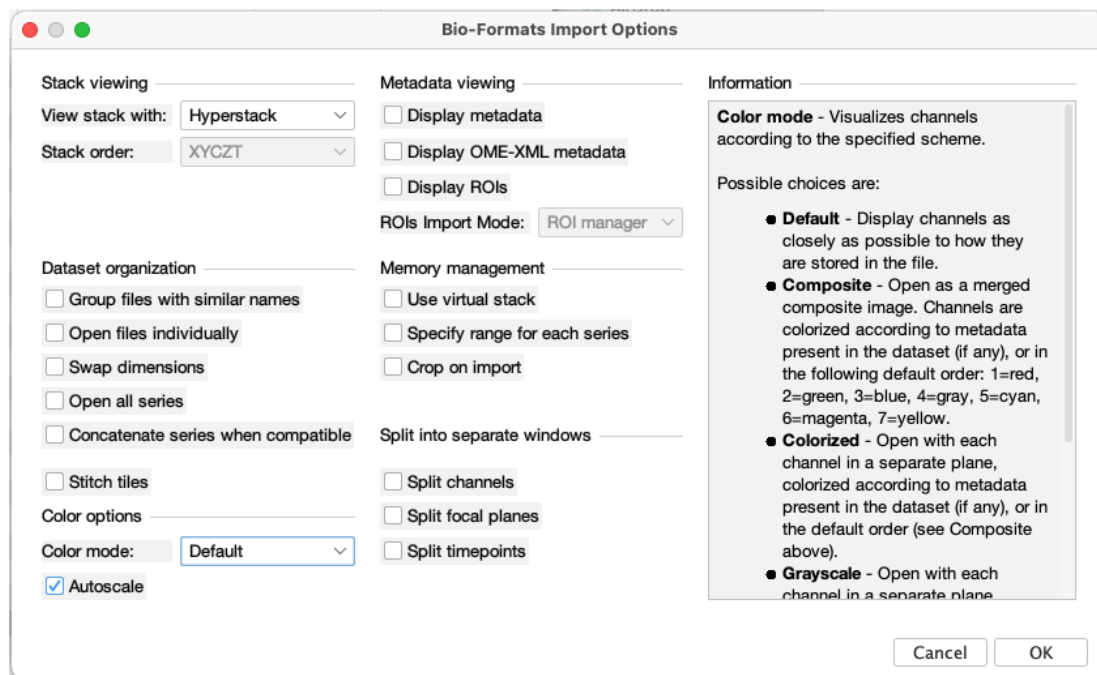
<http://wsr.imagej.net/distros/win/ij152-win-java8.zip>

SOURCE LINK



- 41 Arrastar o arquivo bruto em formato .HTD para o FIJI. Elas devem ser importadas através do BioFormats conforme a imagem abaixo:

41.1



Todas as imagens da placa adquirida irão ser importados de uma única vez. Caso a placa seja muito pesada, você pode selecionar sítio por sítio, realizando uma importação a cada vez.

- 42 A escala das imagens já deverá estar ajustada. Caso contrário, efetuar o ajuste da **escala das imagens**:

Menu *Analyze > Set scale >*

Para 4x: 500 px = 800 μ m

Para 10x: 600 px = 400 μ m

Para 20x: 600 px = 200 μ m

Para 40x: 600 px = 100 μ m

Para 60x: 480 px = 50 μ m

> √ Global > OK

- 43 **Ajustar as medidas do sistema:**

Menu *Analyze > Set Measurements > √ Area > √ Standard Deviation > √ Shape Descriptor > √ Mean grey value > √ Perimeter > √ Display label > OK*



- 44 As imagens virão agrupadas em *stacks* contendo todos os filtros de um sítio, em formato 16-bit (escala de cinza).

Para agrupar todos os sítios em um único arquivo:

Menu *Image > Stacks > Tools > Concatenate >*

Na aba *Concatenator > √ All open windows > Renomear > OK*

- 45 **Para selecionar o filtro Cy5:**

Menu *Image > Colors > Split channels*

Minimizar os *stacks* referentes ao DAPI (C1) e ao FITC (C2). Manter apenas o *stack* do Cy5 (C1).

Para duplicar o filtro Cy5:

Menu *Image > Duplicate*

Na aba *Duplicate > √ Duplicate Stack > OK*

- 46 **Para transformar a imagem 16-bit em binária:**

Menu *Image > Adjust > Threshold >*

Na aba *Threshold > √ Don't reset range > Ajustar a máscara para conter apenas o citoplasma das células > Apply*

Na aba *Convert Stack to Binary > √ Black background (of binary masks) > √ Create new stack > OK*

- 47 **Para separar células manualmente:**

Selecionar a ferramenta conta-gotas

Clicar com o botão direito do mouse > selecionar *White/black*

Selecionar a ferramenta lápis

Clicar duas vezes no ícone para abrir o editor de espessura >

Na aba *Pencil tool > Pencil width (pixels) = 3 > OK*

Utilizando a imagem duplicada como guia, separar as células da imagem binária manualmente com a ferramenta lápis.

- 48 **Para medir as células:**

Menu *Analyze > Analyze Particles*

Na aba *Analyze Particles > Size (micron^2) = 10-Infinity > √ Summarize > √ Display results > OK*

Na aba *Process stack? > Process all images? > Yes*

Duas tabelas contendo o resumo de cada imagem do *stack* e os resultados de cada célula serão criados pelo sistema e podem ser salvos como arquivo de texto .csv.

Menu *File > Save as > Selecionar a pasta > Save*

A área das células estará disposta em μm^2 e a circularidade celular estará disposto em índice (0 mais alongado > 1 mais circular). Os arquivos de texto podem ser compilados no Excel para





organização dos dados e análise estatística.

Processamento de Imagens: Imagens Representativas

49 Abrir o software **FIJI**



Software

ImageJ/Fiji

NAME

Windows 7

OS

National Institutes of Health

DEVELOPER

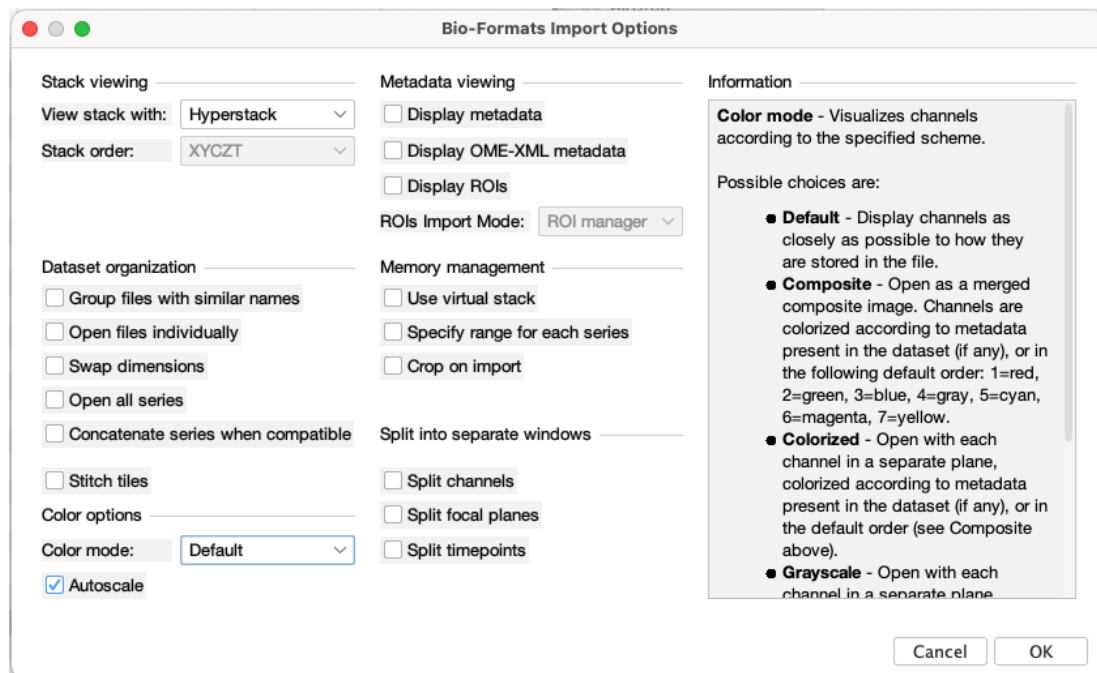
<http://wsr.imagej.net/distros/win/ij152-win-java8.zip>

SOURCE LINK

50 Arrastar o arquivo bruto em formato .HTD para o FIJI. Elas devem ser importadas através do BioFormats conforme a imagem abaixo:



50.1



Todas as imagens da placa adquirida irão ser importados de uma única vez. Caso a placa seja muito pesada, você pode selecionar sítio por sítio, realizando uma importação a cada vez.

- 51 A escala das imagens já deverá estar ajustada. Caso contrário, efetuar o ajuste da **escala das imagens**:



Menu *Analyze > Set scale >*

Para 4x: 500 px = 800 μ m

Para 10x: 600 px = 400 μ m

Para 20x: 600 px = 200 μ m

Para 40x: 600 px = 100 μ m

Para 60x: 480 px = 50 μ m

> \checkmark *Global > OK*

- 52 **Para separar os filtros:**



Menu *Image > Colors > Split channels*

Teremos DAPI = C1, FITC = C2 e Cy5 = C3

Para colorir as imagens:

Selecionar o filtro desejado

Menu *Image > Lookup tables >* Selecionar a cor desejada

Para selecionar uma região na imagem:

Com a ferramenta retângulo, selecionar um quadrado (dica: verificar o valor das arestas na barra do FIJI).

Menu *Image > Duplicate*

Na aba *Duplicate > \checkmark Duplicate Stack > OK*

Para levar essa seleção à outra imagem, mantendo seu tamanho e coordenada:

Menu *Edit > Selection > Restore Selection*

Menu *Image > Duplicate*

Na aba *Duplicate > \checkmark Duplicate Stack > OK*

Para criar uma imagem multicolorida (OBS: Imagens precisam ter mesmo tamanho e profundidade):

Menu *Image > Colors > Merge channels*

Na aba *Merge channels > Incluir as imagens nos filtros > \checkmark Create composite > \checkmark Keep source images > OK*

Para adicionar uma barra de escala:

Menu *Analyze > Tools > Scale Bar*

Aba *Scale Bar >* Selecionar tamanho da barra (*Width*) e espessura (*Thickness in pixels*) >

Ajustar tamanho do texto e/ou retirar o texto da barra > OK

Para salvar as imagens:



Menu *File* > *Save as* > *PNG...* > Seleccionar a pasta de destino > *OK*

Protocol references

PACHANE, Bianca Cruz *et al.* Small Extracellular Vesicles from Hypoxic Triple-Negative Breast Cancer Cells Induce Oxygen-Dependent Cell Invasion. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 20, p. 12646, 2022.

EVEN-RAM, Sharona; ARTYM, Vira. **Extracellular Matrix Protocols: Second Edition**. [S. l.]: Humana Press, 2009.