

## INCUBAÇÃO DE CÉLULAS HELA COM TNF- $\alpha$ E DETECÇÃO DE NF- $\kappa$ B POR IMUNOCITOQUÍMICA

1. Marcar as caixas de Petri de 3cm de diâmetro contendo lamelas com células HeLa (parte de baixo da caixa) com os tempos.
2. Às caixas de Petri marcadas com o tempo zero e a do controlo deixar ficar o meio de cultura e passar para **6**.
3. A cada uma das outras caixas de Petri adicionar o meio de cultura fresco contendo TNF- $\alpha$  na concentração de **10 ng/ml**.
4. Incubar a 37°C durante os **tempos indicados no quadro fornecido** (vire a folha se faz favor).
5. Findo o tempo de incubação retirar o meio das células.
6. Lavar as células rapidamente com **PBS** (1 ml).
7. Retirar o PBS e adicionar às células ~1 ml de **metanol a -20°C**.
8. Incubar a **-20°C** durante **8** minutos.
9. Aspirar o metanol completamente.
10. Lavar as células com **PBS** (1 ml) 2 x durante 1 minuto.
11. Adicionar PBS e deixar durante 5 minutos à temperatura ambiente. Retirar o PBS.
12. Adicionar com 15  $\mu$ l de **tampão de bloqueio** (soro normal de cavalo a 2,5% em PBS).
13. Incubar 30 minutos à temperatura ambiente.
14. **ATENÇÃO:** centrifugar (5 min a 11 000 rpm, microcentrífuga) a diluição do anticorpo imediatamente antes de usar para remover os agregados.
15. Aspirar completamente o tampão de bloqueio.
16. Depositar **11  $\mu$ l** da diluição apropriada de **anticorpo primário** (anticorpo monoclonal anti-NF- $\kappa$ B p65) (1,0  $\mu$ l em 400  $\mu$ l de tampão bloqueio ou 2,5  $\mu$ g/ml). Nas lamelas **controlo** depositar 11  $\mu$ l de **tampão bloqueio**.
17. Incubar durante a noite em câmara húmida a 4°C.
18. Lavar em **PBS/0,1% Tween 20** 3 x 5 minutos com agitação ligeira.
19. Aspirar completamente o PBS.
20. Depositar **11  $\mu$ l** de anticorpo **anti-IgG** de murganho conjugado biotina na diluição apropriada
21. Incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente em câmara húmida.
22. Lavar em **PBS** 3 x 5 minutos com agitação ligeira.
23. Aspirar completamente o PBS.
24. Adicionar **11  $\mu$ l** do reagente contendo avidina e **HRP** biotinilada (reagente ABC).
25. Incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente em câmara húmida.
26. Lavar em **PBS** 3 x 5 minutos com agitação.
27. Aspirar completamente o PBS.
28. Adicionar **11  $\mu$ l** de **substrato de HRP**.
29. Incubar durante 5 minutos à temperatura ambiente.
30. Lavar em **água** durante 3 x 5 minutos
31. Aspirar completamente a água.
32. Adicionar **11  $\mu$ l** de **hematoxilina de Gill**
33. Incubar durante 60 segundos
34. Lavar repetidamente em **água** (10 x 10 segundos)
35. Desidratar em **etanol** a 30% durante 30 segundos
36. Desidratar em etanol a 70% durante 30 segundos
37. Desidratar em etanol a 95% durante 30 segundos
38. Desidratar em etanol a 100% durante 30 segundos
39. Desidratar em **xileno** durante 30 segundos
40. Montar em meio de montagem numa lâmina de microscópio (Organo/Limonene mount)

## Bioquímica Experimental IV

Imunocitoquímica – tempos de incubação das células HeLa com TNF

Células sem TNF	Células com TNF	Início de incubação	Final de incubação
controlo	0 min		
	0 min		
	15 min		
	30 min		
	45 min		
	60 min		
	75 min		
	90 min		
	105 min		
	120 min		