

Preparação de meios de cultivo celular usuais como DMEM (Dulbecco modification of Minimum Essential Media), RPMI-1640 ou TC 199.

(Todos servem para cultura, mas com pequenas modificações na formulação, a saber, DMEM = poucas coisas maior quantidade, RPMI-1640 = muitas coisas, media quantidade, e 199 = muitíssimas coisas, pouca quantidade).

1. Em um béquer de 1 litro, coloque o conteúdo total da embalagem contendo pó para um litro de qualquer um dos meios e 800 ml de água Milli-Q. Coloque no agitador magnético e deixe agitando por pelo menos 30 minutos até ficar completamente solúvel.

2. Leia no rótulo da embalagem se o pó continha glicose, bicarbonato e glutamina ou não. Algumas embalagens vêm com todos ou com alguns ou sem nenhum. Mais comum com Glutamina (w/glutamine), Glucose (w/glucose) e geralmente sem bicarbonato.

3. Verifique os reagentes que estão faltando, de acordo com a formula do meio apresentado. Isto pode ser visto no catalogo Sigma pelo número do produto ou no envelope em meios nacionais. Pese a quantidade indicada para o meio no catalogo e no inserto da embalagem.

a) Confira sempre glicose, glutamina e bicarbonato pelo menos.

4. Dissolva os reagentes no meio agitando. Aguarde a completa dissolução.

5. Algumas vezes vamos usar meios em estufa comum, muito frequente em proliferação de linfócitos. Outras vezes vamos usar em estufa de CO₂. Isto varia a quantidade de bicarbonato.

a) Para meios que não vão para estufa de CO₂ abertos. O frasco vai ser incubado fechado.

i. Adicione HEPES na quantidade desejada, geralmente para 0.01M (2,38g/l) ou 0.02M (4,76g/l). Isto depende do tempo de proliferação, mais tempo (>3 dias) mais HEPES, menos tempo menos HEPES

ii. O pH deve ficar em torno de 7.0. Coloque um pouco mais de bicarbonato a 10% para levar para 7.2-7,3.

b) Para meios que vão para estufa a 5% de CO₂, o frasco vai ser aberto ½ volta depois de colocado na estufa.

i. Não precisa fazer nada, o CO₂ vai manter o pH certo.

6. Suplementos adicionais podem ser necessários para meios com validade vencida e devem ser colocados antes de acertar o volume do meio.

a) Glutamina 300 mg por litro. A Glutamina degrada com o tempo.

b) Piruvato ou ácido pirúvico, 100 mg/litro. Ativa a oxidação fosforilativa e ajuda as células com energia.

7. O meio dissolvido vai ser completado para 1000 ml em proveta adequada e filtrado em membrana de 0.22 ou 0.49 e colocado em garrafas de 200 ou 400ml de meio cada. Um litro dá duas de 400 e uma de 200.

8. A esterilidade do meio transferido para as garrafas é testada colocando-se a garrafa bem tapada em uma estufa a 37° C por 18 hs.

a) Isto não degrada muito nada e testa a completa viabilidade do meio.

i. Amostrar é um risco porque a contaminação pode ocorrer durante a amostragem.

b) Só adicionar os suplementos abaixo na garrafa de uso.

9. Suplementos estéreis são colocados na garrafa estéril de uso, não no meio toso.

a) Antibióticos

i. Gentamicina 0.1 ml para cada 100 ml de meio

ii. Penicilina, Ampicilina e seus derivados podem ser colocados no momento do uso. Degradam em solução, portanto não adianta colocar antes.

b) Insulina 0.025U/ml, 0,1 ml por 100 ml de meio

c) Soro fetal bovino

i. A adição de soro fetal bovino é feita na garrafa de trabalho na proporção desejada.

ii. Para 10% coloque 10 ml para cada 100 ml de meio pronto

iii. Para 5% coloque 5 ml para cada 100 ml de meio pronto

iv. Se o soro estiver turvo, filtre separadamente, usando pré-filtro de fibra de vidro ou asbestos.

Antes do uso, é adequado colocar o meio para aquecer em banho maria a 37° C ou em estufa. Nunca coloque meio completo gelado nas células. Você não gosta de pés frios elas também não.