

POP 005	Meio de cultura completo para Explantes de Retina	
Autor: Pedro Tan Data: 21/09/2017	Revisor 01: Data: //	Revisor 02: Data: //

1. Composição:

DMEM/F12 - HEPES (cat# 12400024) obs: 15 mM HEPES já incluído

5% FBS

2% B27

1% N2

1% Glutamax

1% Pen/Strep

2. Material:

2.1. Reagentes

- Envelope do pó (DMEM 12800-017 (HIGH GLUCOSE) Gibco)
- HEPES Sodium Salt (H7006 Sigma) _____ 5,2 g (Cf 20mM)
- NaOH 5M para ajustar pH entre 7,2 - 7,4
- H₂O MilliQ autoclavada q.s.p. 1000 mL
- Utilizar sempre água MilliQ, resistividade 18,0 Ohms.
- Penicilina/Estreptomicina (#15140-122__Gibco) (CF 1%)
- Glutamax Gibco (35050061, GIBCO) 10 mL (Cf 1% 2mM)
- Soro Fetal Bovino (SFB #J00086 Cultilab) 100 mL (Cf 5%)

2.2. Materiais e vidrarias

- Balão Volumétrico ou proveta de 1L - armário de vidraria
- Béquer de 1L - armário de vidraria
- Espátulas - gaveta material de pesagem
- Agitador magnético - gaveta material de pesagem
- Balança analítica digital - bancada de pesagem
- Potenciômetro (pHmetro) - bancada de pesagem
- Placa agitadora-bancada de pesagem

3. Procedimento para preparo de **1L de DMEM/F12/Hepes pH 7,4:**

ATENÇÃO: este documento é confidencial e só pode ser reproduzido para uso interno ou com a autorização do responsável pelo laboratório.

POP 005	Meio de cultura completo para Explantes de Retina	
Autor: Pedro Tan Data: 21/09/2017	Revisor 01: Data: //	Revisor 02: Data: //

1. Diluir o pó em 500 mL de água MilliQ em Becker com agitador magnético na placa agitadora;
2. Rinsar 3X o saco de pó com a água MilliQ (envelope) e transferir para o Becker;
- 3.
4. Adicionar água milli-Q até 980mL;
5. Aferir e ajustar o pH para 7,2 – 7,4 gotejando NaOH 5M;
6. Avolumar com a proveta para 1L com água milli-Q;
7. Ligar UV do fluxo por 15’;
8. Separar os itens a serem usados dentro do fluxo: garrafas de vidro autoclavadas, dois tubos falcon de 15ml, filtro autoclavado, proveta de vidro de 250ml autoclavada;
9. Higienizar com álcool 70° logo antes de serem adicionados no fluxo já “UVzado”
10. Filtrar a vácuo em filtro estéril de 0,22 µm dentro da capela de fluxo laminar limpa;
11. Retirar a primeira alíquota teste(~5ml);
12. Retirar volume (múltiplos de 90ml, sendo 90ml e 180 os ideais) diretamente na proveta e alíquotar nas garrafas ;
13. Retirar segunda alíquota teste(~5ml)
14. Identificar garrafas com nome do meio, suplementação, preparador e data;
15. Armazenar a 4°C;

4. Procedimento para preparo de 100mL de meio completo:

1. Ligar Fluxo e UV por 15 min
2. Descongelar alíquotas de Penicilina/Estreptomicina e Soro Fetal Bovino
Obs: se o meio será utilizado logo após o preparo, pré-aquecer meio a 37°C
3. Higienizar mãos e braços e paramentar-se para entrar no fluxo
4. Colocar material necessário na cultura, higienizando primeiro com álcool 70% (Descarte limpo, Garrafa de 100 ou 250mL, Estoque de meio DMEM/F12/15 mM Hepes, Alíquotas de SFB, Pen/Strep, Glutamax, N2 e B27)
Obs: se o meio será utilizado logo após o preparo, colocar também erlenmeyers e placas de cultura para dissecação
5. Adicionar 93 mL de meio DMEM/F12/15 mM Hepes pH 7,4
6. Adicionar 5mL de Soro Fetal Bovino (Cf=5%)
7. Adicionar 1mL de Pen/Strep (Cf=1%)

ATENÇÃO: este documento é confidencial e só pode ser reproduzido para uso interno ou com a autorização do responsável pelo laboratório.

POP 005	Meio de cultura completo para Explantes de Retina	
Autor: Pedro Tan Data: 21/09/2017	Revisor 01: Data: //	Revisor 02: Data: //

8. Adicionar 1mL de Glutamax (Cf=1%)
 9. Adicionar 2mL B27 (Cf=2%)
 10. Adicionar 1mL N2 (Cf=1%)
 11. Guardar meio completo de explantes a 4°C identificado com nome, data e preparador
- Obs: se o meio será utilizado logo após o preparo, já pode ser adicionado a erlenmeyers e placas de cultura para dissecação
12. Guardar todos os materiais, lavar fluxo com álcool, desligar e ligar UV por 15min