

Disciplina 7600078 - Biologia Celular

Docente responsável: profa. Ana Paula Ulian de Araujo (anapaula@ifsc.usp.br), Cristina Kurachi (cristina@ifsc.usp.br) e Rafael Guido (rvcguido@ifsc.usp.br)

Laboratório: Mohammad Sadraeian (msadraeian@usp.br)

Tarefas gerais para microscopia de fluorescência confocal:

• Planejar o experimento:

1. Elaborar um roteiro contendo objetivo, materiais e métodos do experimento com no máximo 1000 palavras. Deve-se manter o padrão e a estrutura de escrita científica. Muito importante explicar como será realizado o experimento e com que propósito.
2. Os materiais necessários para a realização do experimento deverão ser listados contendo informações de concentração, quantidade, pH, etc a fim de auxiliar o pré-preparo e a obtenção dos mesmos.
3. O protocolo para preparo de amostras biológicas deve vir de (ou ser baseado em) artigos científicos ou teses.

Tema #1: Estrutura do Reticulo Endoplasmático (ER) e do Complexo de Golgi

Tipo celular: célula HeLa

Objetivo: Estudar a estrutura e localização do Retículo Endoplasmático (ER) usando microscopia confocal

Explicação: existem três métodos empregando sondas moleculares para imagens de ER em células vivas ou fixas:

1. ER-Tracker Dye para células vivas
2. Usar construções (plasmídeos) que expressam proteínas fluorescentes com sinais de localização e retenção no ER.
3. Usar anticorpos primários para ER (conjugados com fluoróforos) para coloração de células fixadas.

Tarefas do grupo:

- Determinar um protocolo para fixação celular para observação em microscopia confocal (levar em conta o substrato utilizado)
- **Para o método 1:** Determinar o intervalo da concentração de ER-Tracker Dye para o experimento (baseado na literatura). Determinar as condições experimentais; tempo e condições de cultivo, tratamento do substrato, etc.
- **Para o método 2:** Planejar uma construção para expressão de proteínas fluorescentes no ER. Determinar o plasmídeo de expressão apropriado. Além disso, determinar os sinais necessários (peptídeo sinal e sinal de retenção no ER) na construção.
- **Para o método 3:** Determinar os anticorpos conjugados fluorescentes apropriados para marcação do ER (*ER labeling*).

- **Configuração do microscópio:** Para cada método, determine o filtro adequado, a marcação (label, ex. GFP, Alexa,...), o comprimento de onda da excitação/emissão (EX/Em).