

Disciplina 7600078 - Biologia Celular

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

Laboratório: Mohammad Sadraeian (msadraeian@usp.br)

Tarefas gerais:

• 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 #3: Estrutura da citoesqueleto usando microscopia confocal

Tipo celular: célula HEK 293T

Objetivo: Estudar a estrutura do **citoesqueleto** usando microscopia confocal

Explicação: Quatro metodologias distintas são usadas rotineiramente para a visualização dos microfilamentos de **actina**, filamentos intermediários ou **microtúbulos** do citoesqueleto;

1. Utilizando construções que podem expressar actina, tubulina ou talina marcadas em células vivas, permitindo que os pesquisadores estudarem a dinâmica do citoesqueleto.
2. Os conjugados de faloidina (com os fluoróforos como rodamina), que se ligam aos filamentos de actina em células fixadas e permeabilizadas.
3. **Cyto-Tracker Green** (um conjugado de Taxol) é fornecido inicialmente como um composto não-fluorescente não-carregado que passa através da membrana plasmática das **células vivas** para corar a **tubulina** polimerizada.
4. Usando os anticorpos primários anti-actina e anti-tubulina conjugados com fluoróforos, em 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 3:** Determinar o intervalo da concentração de Cyto-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:** Planeje uma construção para expressão de proteínas fluorescentes na mitocôndria. Determine o plasmídeo de expressão apropriado. Além disso, determine os sinais necessários na construção.
- **Configuração do microscópio:** Para cada método, determine o filtro adequado, o rótulo (label, ex. GFP, Alexa,...), a excitação / o comprimento de onda da emissão (EX/Em).