



**Procedimiento de Preparación de Covers para Microscopio
Confocal LSM 510 y LSM 800
Elaborado por: Daniel Valdés**

PREPARACIÓN DE COVERS

Autoclavar los covers en placa Petri, es recomendable una cajita distribuirla en 3 ó 4 placas

Tapar los covers con colágeno

Incubar entre 37 y 40° C por 2 horas

Aspirar el exceso de solución que pudiese haber quedado

Secar placa en estufa entre 4 y 24 horas a 37°C.

Antes de usar:

- Lavar los covers con PBS pH 7,4 estéril, para hidratar y despegar del fondo de la placa. Si no dispone de PBS pH 7,4 se puede realizar con medio de cultivo.
- Si no se utilizan todos los covers colagenizados, retirar el exceso de PBS pH 7,4 estéril ó medio de cultivo y dejar en estufa a 37°C.



Procedimiento de Preparación de Medio de Montaje para Microscopio Confocal LSM 510 y LSM 800

MEDIO DE MONTAJE DABCO

Se disuelve 1 g de reactivo DABCO en 9 mL de glicerol con agitación. Luego se agrega 1 mL de PBS 1X pH 7,2 y 4 mg de azida de sodio.

No conviene preparar más de 10 mL pues este reactivo se descompone con la luz, lo que ocurre cuando adopta un color amarillo.

Guardar alicuotado de 1mL a 4°C en oscuridad.

DABCO: 1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octano (DABCO Trietilendiamina)
Sigma Chemical Co. St Louis USA.
Masa Molecular: 112,2 g/mol 99% Pureza
Catalogo D-2522



Procedimiento de Preparación de muestras por inmunofluorescencia indirecta para Microscopio Confocal LSM 510 y LSM 800

Inmunofluorescencia Indirecta Técnica de ejemplo

- Células HeLa (50.000 células por pocillo) se siembran en covers colagenizados hasta 95-100% confluencia en medio de cultivo adecuado con suplemento (Penicilina 100Ui/mL, Estreptomicina 100ug/mL, 10% SFB, Piruvato 1 mM e insulina 10ug/ml (concentración final)) en placa de 24 pocillos.
- Los cultivos se lavan cuidadosamente con PBS 1X pH 7.4, 3 veces por 4 min.
- Fijar células con PFA 1% en PBS por 20 min a 4°C.
- Lavar con PBS frío. 3 veces por 4 min.
- Permeabilizar células con EtOH 70% frío por 10 min a -20°C.
- Lavar con PBS frío. 3 veces por 4 min.
- Bloquear los covers con PBS-BSA 1% durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar con PBS frío. 3 veces por 4 min.

Desde este momento, los covers se tratan boca abajo en cámara húmeda.

- Se adiciona a cada cover ~50 uL de dilución 1:200 de Anticuerpo primario mouse anti-citokeratina en PBS-BSA 1% durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Lavar con PBS frío. 3 veces por 4 min.



- Se adiciona a cada cover ~50 uL de dilución 1:50 de Anticuerpo secundario (Goat antimouse IgG-FITC), en PBS-BSA 1% durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar con PBS frío. 3 veces por 4 min.
- Tratar covers con solución 1:20000 de bromuro de etidio (stock 1mg/mL) en agua destilada por 3 min ó bien con solución de Yoduro de propidio 1:1000 a partir del stock 1mg/mL a temperatura ambiente (Usar guantes).
- Lavar con agua destilada 2 veces por 3 min (Usar guantes).
- Montar en DABCO (~15 uL) y sellar con cutex.