

## **PROTOCOLO INMUNOCITOQUÍMICA**

### **DÍA 1 (LUNES): SEMBRAR LAS PLACAS.**

Sembramos células MDCKII 24 horas antes del inicio del experimento en placas de 6 pocillos sobre cubres redondos estériles de 13mm de diámetro. La siembra se realiza a una densidad de 500.000 cel/pocillo y en 2mL medio/pocillo.

Tendremos 2 tipos celulares, unas células PARENTALES y otras que expresan la proteína transportadora Abcg2 de RATÓN. Ambos tipos celulares crecen a la misma velocidad por lo que sembraremos las dos a la misma densidad.

Partimos de un frasco T-75 con las células confluentes (entre 6 y 8 millones de células).

1. Retiramos el medio del frasco
2. Lavamos con 5 ml de PBS
3. Añadimos 3 ml de Tripsina, agitar suavemente y dejar 10 minutos en incubador
4. Neutralizamos la Tripsina con 25 ml de medio fresco y cogemos muestra para contar
5. Contamos las células
6. Sembramos las células a una densidad de 500.000 células por pocillo teniendo en cuenta que cada pocillo lleva 2 ml de medio con células

### **DÍA 2 (MARTES): INMUNOCITOQUÍMICA PARTE 1**

Observamos las placas las placas al microscopio y comprobamos que el cultivo se encuentra subconfluyente. A continuación iniciamos la primera parte del protocolo:

1. Fijación con metanol frío: se retira el medio de cultivo de cada pocillo y se realizan 2 lavados con 2 mL de PBS/pocillo. A continuación se añade la misma cantidad de metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se deja 10 minutos. Una vez fijado el cultivo, se retira el metanol y se realiza un nuevo lavado con PBS.
2. Permeabilización de la membrana: se añaden 2 mL de tritón X-100 al 1% y se mantiene 10 minutos en agitación. A continuación se lava nuevamente 3 veces con PBS y se realiza un nuevo lavado con PBS-tween al 0,5%.
3. Incubación con el anticuerpo primario (anti-BCRP BXP-53) dilución 1:50 en PBS, 50 $\mu\text{L}$ /cubre y se mantiene toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  en ambiente húmedo.

Cubrir el fondo de una placa petri con papel de filtro y humedecerlo bien; colocar encima parafilm y sobre él las gotas de anticuerpo con los cubres encima (precaución: poner la parte del cubre que contiene las células en contacto con el anticuerpo). Se cierra la placa, se sella con parafilm y se mete en el frigo hasta el día siguiente.

### **DÍA 3 (MIÉRCOLES): INMUNOCITOQUÍMICA PARTE 2**

Sacamos la placa petri del frigo y continuamos con el protocolo. Para ello abrimos la placa y colocamos los cubres de nuevo en placas de 6 pocillos. (Es importante colocar la parte del cubre que contiene las células hacia arriba, para no perderles la pista).

1. Lavamos 3 veces con PBS (2 mL/pocillo) y una vez más con PBS-tween al 0,5%.
2. Incubación con el anticuerpo secundario (anti-rata IgG conjugado con Alexa Fluor 568) dilución 1:200 en PBS, 35µL/cubre. La incubación se realiza durante 35 minutos en oscuridad.
3. Tinción con DAPI: lavamos con PBS (3 veces) y a continuación incubamos con DAPI (dilución 1:1000) en PBS 5 minutos en oscuridad. Retiramos el DAPI y añadimos PBS.
4. Montaje de las preparaciones: añadimos 15µL/cubre de medio de montaje VECTASHIELD y sobre él colocamos los cubres con las células hacia abajo. Sellamos con esmalte y dejamos secar.
5. Observación al microscopio de fluorescencia.