



Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal



Roteiro geral para Citometria de Fluxo em Plantas

- 1) Colocar pedaços com aprox. 2 cm² de folhas jovens do material que se deseja analisar, bem como do padrão interno adequado, em uma placa de Petri de vidro apoiada sobre uma bolsa térmica/isopor com gelo. É possível utilizar outros tecidos vegetais, tais como flor, semente e polínia. A proporção de material entre amostra/controle pode mudar mediante testes.
- 2) Adicionar 1 a 2 mL de tampão de isolamento de núcleos (*Woody Plant Buffer-WPB*, *Lysis Buffer 01-LB01*, *Marie Buffer* etc.) à placa de Petri.
- 3) Picotar as folhas embebidas no tampão com uma lâmina de gilete com cortes secos e precisos, evitando esmagar o material. A intensidade do corte deve ser ajustada mediante testes.
- 4) Retirar a suspensão nuclear resultante com o auxílio de um pipetador e passá-la por um filtro com malha de nylon (30-50 µm) apoiado em um tubo de ensaio específico para o citômetro CyFlow Partec.
- 5) Adicionar de 20 a 50 µL (dependendo do volume total da amostra) de iodeto de propídeo (1mg/mL) à suspensão nuclear filtrada. Misturar bem. Em alguns casos, deixar a amostra algumas horas na geladeira antes da adição de iodeto de propídeo ajuda a ter leituras melhores no citômetro. Tudo que foi contaminado pelo iodeto de propídeo tem que ser descartado ou descontaminado de forma apropriada.
- 6) Levar a amostra ao citômetro e encaixá-la com cuidado no suporte de tubos.
- 7) A análise de partículas é feita pelo software FloMax. A escala de fluorescência (FL1) do histograma deve estar no modo Linear para medições de tamanho do genoma. Os valores de ganho (*gain*) devem ser ajustados para a correta visualização dos picos no histograma na seção *Instrument Settings*. Ganhos maiores permitem a visualização de partículas menores, enquanto ganhos menores permitem a visualização de partículas maiores. É importante manter a velocidade de partículas por segundo entre 10 e 20, ajustando a velocidade na seção *Instrument settings*. Todos os picos devem ter uma contagem de no mínimo 1000 partículas.
- 8) O cálculo do tamanho do genoma (2C, em picogramas) é feito através da análise dos picos que aparecem no histograma FL1 (Fluorescência) x *Counts* (nº de partículas), onde o tamanho do genoma é calculado multiplicando o tamanho do genoma do controle pela razão entre os valores médios de fluorescência dos picos da amostra e do padrão (média dos valores de três repetições para três diferentes indivíduos).

Tampões de isolamento mais utilizados no laboratório (valores para preparo de 100 mL). Após a preparação, os tampões devem ser filtrados e armazenados a 4 °C.

WPB (ph 7,5)	LB01 (ph 7,5)	Marie Buffer (ph 7,2)
0,4 mL Tris HCl 1M (pH 7,5) 0,81 g Cloreto de magnésio 0,072 g Na ₂ EDTA 0,502 g Cloreto de sódio 0,1901 g Metabisulfito de sódio 1 g PVP 1 mL Triton X-100	150 µL Tris HCL 1M (pH 7,5) 0,074 g Na ₂ EDTA 0,017 g Espermina 0,596 g Cloreto de potássio 0,117 g Cloreto de sódio 100 µL Triton x-100	0,9 g Glucose 0,088 g Cloreto de sódio 0,112 g Cloreto de potássio 1,861 g Na ₂ EDTA 1,471 g Citrato de sódio 0,5 mL Tween 20 1,192 g HEPES 1 g PVP