BATTISTEL MARTA STB III ANNO 14/03/2019

TITOLO: Passaggio di cellule in coltura

SCOPO dell’esperimento: diluire cellule in coltura ad alto grado di confluenza, in modo da togliere l’inibizione da contatto e mantenere la coltura nel tempo.

Procedura sperimentale

Cellule usate: H1299 cheratinociti del carcinoma polmonare umano coltivati in terreno RPMI 1640 e BJ fibroblasti umani immortalizzati coltivati in terreno DMEM.

Il grado di confluenza si valuta con l’ingrandimento del microscopio ottico rovesciato 40X. Si osserva che sia le cellule H1299 e BJ sono ad alta confluenza, poiché ci sono pochi spazi tra una cellula e l’altra, per cui è necessario diluirle e trasferirle. Tuttavia le BJ sono a un grado di confluenza minore, infatti ci sono più spazi tra le cellule, poiché queste cellule crescono più lentamente.

Sotto cappa: rimozione del terreno, lavaggio con PBS per eliminare gli inibitori della tripsina contenuti nel siero. Aggiungere tripsina/EDTA e lasciar agire nell’incubatore; il tempo necessario alla reazione deve essere sufficiente da staccare le cellule tra loro e dalla matrice ma non eccessivo da degradare la membrana(1h).

Si osserva che i cheratinociti si staccano velocemente dal contenitore (5’) ma difficilmente tra loro, restano in gruppi anche agitando meccanicamente il contenitore. Al contrario i fibroblasti sono già isolati ma il tempo richiesto per staccarsi dalla flask è maggiore dei cheratinociti (15’).

Le cellule staccate dalla flask cambiano morfologia rispetto alla prima osservazione: sono tondeggianti, riflettenti e fluttuano. La morfologia si osserva con ingrandimento 400X

Viene neutralizzata la tripsina con terreno completo (DMEM, siero e antibiotico). Si osserva che il fondo della flask da opaco è diventato trasparente, evidenza del fatto che le cellule si sono staccate. La centrifugazione serve per eliminare cellule morte che restano nel surnatante, il terreno e la tripsina, mentre nel pellet ci sono le cellule vive. Il pellet viene risospeso in 5 mL di terreno fresco.

Conta al microscopio di H1299:

|  |  |
| --- | --- |
| Q1=12 cellule | Q2=28 cellule |
| Q3=24 cellule | Q4=12 cellule |

Si contano le cellule per quadrante, poi si calcola la media di cellule per quadrante che è 19 cellule. Il volume del quadrato è 1mm3, per cui la concentrazione è 19x10^4 cellule/mL. VfCf=ViCi

Dato un volume finale, Vi= 5mL x 5x10^4 / (19 x 10^4) = 1,3 mL

Viene osservato al microscopio il terreno per verificare che le cellule siano presenti. Si osserva che le cellule sono a minor confluenza.

Commento: chiaro e con buon flusso logico. Attenzione ai termini tecnici: la parete di solito si dice per i batteri ma non per cellule eucariotiche.