**SCOPO: Passaggio in coltura per permettere alla linea cellulare di continuare a crescere per tempi prolungati e senza entrare in quiescenza.**

Ho passato cellule H1299 (linea cellulare di carcinoma polmonare umano) non completamente a confluenza (essendo venerdì ho preferito passarle comunque per non rischiare che lunedì fossero già a completa confluenza).

Sotto cappa aspiro il terreno; aggiungo delicatamente il PBS per eliminare i residui degli inibitori della tripsina, depositandolo sul fondo della flask per evitare che le cellule si stacchino per dilavamento meccanico; lascio agire qualche secondo e lo aspiro. Aggiungo 1mL di tripsina+EDTA e lascio in incubatore per far staccare le cellule dalla flask e tra loro. ***NOTA****: dopo ~5’ osservare al microscopio per assicurarsi che le cellule si siano effettivamente staccate dalla flask (se sono in sospensione e solo alcune sono ancora legate tra loro si può procedere perché poi verranno separate meccanicamente).*

Sotto cappa neutralizzo la tripsina aggiungendo terreno completo per evitare di rovinare le cellule e poi centrifugo per 5’ a 1000 rpm per separare le cellule dal surnatante.

Sotto cappa aspiro il terreno+tripsina+EDTA e risospendo delicatamente il pellet in 5mL di terreno completo fresco , assicurandomi che sia tutto in sospensione.

Metto qualche μL di sospensione nell’emocitometro. ***NOTA****: la goccia di terreno entrerà per capillarità nella cameretta, basta appoggiare il puntale nella piccola conca sul vetrino; per far aderire il coprivetrino si bagnano le barrette verticali (sfrutta la tensione superficiale dell’acqua).*

Con obiettivo 40x, nei 4 quadrati marginali della croce ho contato: 19, 39, 22, 41 cellule; la media è 30.25 cellule per μL perché l’emocitometro è costruito in modo che ogni quadrato esterno abbia un volume di 0.1mm³ = 0.1μL; quindi ho una concentrazione di 30.25x104 cell/mL.

Volendo creare una nuova coltura con volume di 5mL e una concentrazione di cellule (al momento dell’inoculo) di 5x104 cell/mL, devo prelevare dalla soluzione contenuta nella falcon un volume pari a: $Vi=\frac{Cf x Vf}{Ci}=\frac{\frac{5x10^{4}cell}{mL}x5mL}{30.25x10^{4}cell/mL}=0.83mL$ arrotondati a 0.8mL; i restanti 4.2mL sono terreno. ***NOTA****: il volume di sospensione è piccolo: meglio usare la P1000 piuttosto che la propipetta.*

Sverso la sospensione diluita in una capsula petri funzionalizzata e la muovo per assicurare una distribuzione omogenea delle cellule.

**CONSIDERAZIONI FINALI:** osservando al microscopio ottico dopo alcuni minuti la coltura appena creata si nota che alcune cellule si sono adese al fondo della petri, mentre altre stanno ancora galleggiando in sospensione. È possibile mettere a fuoco una cellula e un po’ alla volta notare che andrà fuori fuoco man mano che si deposita, scendendo rispetto al piano messo a fuoco, fino a toccare il fondo.

Commento: chiaro, conciso e fluente. Attenzione ai passaggi logici: “per evitare di rovinare le cellule” lo avevi messo dopo la centrifugazione, invece va messa quando parli della neutralizzazione!