Data: 14/03/2019 Giulia Canarutto

Relazione esperimento 1, passaggio di cellule in coltura

Scopo del primo esperimento è stato diluire una coltura di cellule che crescono in adesione ed hanno raggiunto un’elevata confluenza, in modo da consentirne la proliferazione e mantenerle in coltura per l’osservazione successiva. Sono state due le linee cellulari utilizzate, entrambe di origine umana: fibroblasti BJ, immortalizzati, che si piastrano a 105 cellule/ml e cellule epiteliali H1299 derivanti da un carcinoma polmonare, che si piastrano a 5 x 104 cellule/ml. Osservando le cellule al microscopio ottico invertito si è osservato che la linea H1299 possiede numerosi nucleoli, con una media di quattro a cellula, evidenziando come queste siano molto attive e alcune presentino estroflessioni della membrana che garantiscono la capacità di migrazione. Si sono inoltre osservati granuli chiari, ricchi di lipidi. Le cellule della linea BJ presentano dei lamellipodi molto lunghi, essendo dotate di capacità di migrazione ed il corpo cellulare è fusiforme, risultando più grande delle cellule tumorali che sono, in confronto, più piccole e poligonali. Nessuna delle due linee cellulari osservate appariva ad elevata confluenza. Prima di cambiare il terreno e procedere con il protocollo, scaldare il PBS sterile a bagnetto a 37° per evitare alle cellule uno shock termico. Osservando al microscopio, dopo aver aggiunto la tripsina alle cellule, si osserva che le H1299 hanno un aspetto più tondeggiante e si muovono, essendo in sospensione e non più adese, tendendo inoltre a trovarsi in aggregati di piccole dimensioni. Le BJ, d’altro canto, risultano estremamente adese le une alle altre e non si muovono, evidenziando come siano presenti numerose adesioni focali. Una volta in sospensione, si trovano isolate le une dalle altre. In linea generale, le BJ necessitano di circa 15/20 minuti in tripsina, mentre le H1299 5 minuti. Si sono utilizzati due diversi terreni per le cellule, DMEM per le BJ e RPMI per le H1299, accumunati dalla presenza di siero al 10%, per inattivare la tripsina ed evitare che digerisse le cellule, e antibiotici quali la penicillina e la streptomicina all’1%. Procedendo alla conta delle cellule BJ al microscopio con l’emocitometro o cameretta di Neubauer, si sono osservate 3 cellule in Q1, 2 cellule in Q2, 5 cellule in Q3 e 5 cellule in Q4, con una media di 3.5 cellule. Sapendo che il numero di cellule in 1 ml di sospensione è pari al numero di cellule in un quadrato (Q1, Q2, Q3 e Q4) moltiplicato per 104, si sono quindi contate 3.5 x 104 cellule/ml. Si calcola il volume di cellule da prelevare secondo la seguente formula: Ci x Vi = Cf x Vf . Considerato che la sospensione contiene 3.5 x 104 cellule/ml (=Ci,) che il volume finale desiderato è pari a 5 ml (=Vf) e che si vuole una concentrazione di 2.5 x 104 cellule/ml (=Cf), si ottiene che il volume iniziale da prelevare Vi è pari a 3.6 ml. Essendo il volume finale desiderato pari a 5 ml, si sono aggiunti 1.4 ml di terreno DMEM. Il numero di cellule in 5 ml di soluzione è pari a 1.75 x 105, ossia 175000 cellule finali ottenute. Questo dimostra che, in effetti, le cellule non erano a confluenza e potevano essere lasciate a crescere ancora.

Commenti: chiaro e ricco di descrizione; mancavano I dettagli degli ingrandimenti del micoscopio utilizzati per l’osservazione della confluenza (40X) e per strutture cellulari come il nucleo (100X).