Proggetto: passaggio di cellule epiteliali( H1299) in coltura

Alberto Capoleva 24/04/2019

Scopo: diluire una coltura di cheratinociti ad elevata confluenza per mantenere la loro capacità di proliferare per lunghi periodi

Procedura: la prima operazione da svolgere è quella di determinare il grado di confluenza delle cellule contenute nelle Flask.Appena le Flask vengono tolte dall’incubatore si chiude completamente il tappo per evitare contaminazioni della coltura. Si osservano quindi le cellule al microscopio ottico(con ingrandimento tale da vedere lo stato complessivo della coltura, ovvero 40X) e se queste risultano ad un alto grado di confluenza si può procedere con i punti successivi. Le cellule sono attaccate al fondo delle Flask quindi si procede nel seguente modo per staccarle: si elimina il terreno di crescita , si effettua un lavaggio con PBS(per togliere gli inibitori della Tripsina) e si aggiunge 1mL di Tripsina/EDTA con cui le cellule vengono incubate per alcuni minuti. Si osservano le cellule che appaiano ora più tondeggianti e mobili. Per eliminare gli ultimi agglomerati di cellule si sbatte leggermente la Flask. Le cellule vengono quindi risospese con l’aggiunta di un terreno (RPMI, 10%FCS, 1% Pen/Strep), preparato in precedenza, in modo da inibire l’azione della Tripsina. Si sposta l’intera coltura in una falcon da 15 ml che viene poi centrifugata( 5 minuti x 1000rpm).Finita la centrifugazione si elimina il surnatante e si rispospende delicatamente il pellet con 5mL di terreno e spipettando favorisco la risospensione. Preparo quindi l’emocitometro ed effettuo la conta delle cellule. I risultati mi permetteranno di calcolare il volume di terreno che devo aggiungere alla coltura per ottenere la concentrazione desiderata. Conta:

16

13

16

15

60/4=15. 15 cellule in 0,1 microL quindi la coltura risulta avere una concentrazione di 15x10^4 cell/mL. Voglio ottenere una coltura di 4x10^4 cell/mL su 5mL. Utilizzo la formula CiVi=CfVf. Vi= (CfVf)/Ci = (4x10^4 cell/ml x 5mL ) / 15x10^4 cell/mL = 1,3 mL . Prelevo quindi dalla Falcon 1,3 mL della mia coltura con il terreno e si aggiungono 3,7 mL . Trasferisco quindi la coltura in una petri e la si inserisce nell’incubatore dopo averla contrassegnata.

Discussione: le cellule utilizzate hanno forma cubica e crescono in adesione. Per far aderire al meglio il vetrino sulla cameretta di Neubauer per la conta si può muovere il vetrino una volta appoggiato in modo da distribuire tutto il liquido e cosi da creare un effetto a ventosa che assicura aderenza tra le due componenti.

Commento: descrizione chiara e con un buon flusso logico. Manca una precisazione sugli ingrandimenti del microscopio utilizzati per vedere strutture come il nucleo (100-200X).