MATTEO CAUTERUCCIO Gruppo 4

Data: (è importante quanto il nome!!)

Passaggio in coltura e diluizione di cellule a confluenza

Scopo:

Diluire cellule ad elevata confluenza per consentirne la proliferazione e mantenerle in coltura per lunghi periodi.

Commento: Per poter lavorare con una stessa linea cellulare nel corso di un lungo periodo di tempo è necessario effettuare diversi passaggi in coltura delle cellule per evitare che esse, dopo essere giunte a confluenza, smettano di moltiplicarsi ed entrino in quiescenza. Lo stato di quiescenza comporta dei cambiamenti considerevoli nel comportamento delle cellule rispetto allo stato proliferativo. Per questo motivo è necessario evitare la quiescenza per poter mantenere le stesse condizioni dell’esperimento.

Fasi preliminari:

Prima di procedere è auspicabile controllare il viraggio di colore del terreno (che vira al giallo in presenza di metaboliti acidi, indice di un terreno in esaurimento) e in seguito lo stato delle cellule (Fibroblasti BJ). Nel caso di colture di adesione sarà necessario osservare le cellule al microscopio ottico. Se queste appaiono adese le une alle altre e si osservano cellule in apoptosi allora la confluenza è elevata e si deve procedere con un passaggio in coltura.

Procedura:

1. Rimozione del terreno esaurito dalla flask tramite pipetta (waste);
2. Lavaggio delle cellule adese con 5mL di PBS, in modo da eliminare eventuali residui di terreno che inattiverebbero la tripsina;
3. Aggiunta di 1mL di soluzione tripsina + EDTA e incubazione a 37° per 5 minuti;

L’azione combinata di tripsina e EDTA permette di staccare le cellule adese alla flask e adese fra loro in quanto la tripsina degrada le proteine di ancoraggio alla superficie, mentre l’EDTA chela gli ioni Ca++, sequestrandoli alle caderine, necessarie per le adesioni intercellulari. Bisogna prestare attenzione a non prolungare troppo nel tempo l’esposizione delle cellule a questa soluzione in quanto può degradarle.

1. In seguito al trattamento con tripsina vanno inseriti nella flask 4mL di terreno fresco (terreno DMEM10% V/V di siero (FCS); 1%V/V di antibiotici Penicillina + Streptomicina) necessari per saturare e inattivare l’enzima;
2. Si preleva tutta la soluzione e la si conserva in una Falcon da 15mL;
3. Si procede quindi alla centrifugazione della soluzione per 5 minuti a 1000 RPM;
4. Nella Falcon si osserverà un pellet di cellule precipitate sul fondo; si elimina il surnatante lasciando però all’incirca 0,2mL di liquido per poter risospendere le cellule che altrimenti si attaccherebbero solidamente al tubo;
5. Si agita con vigore la Falcon per risospendere le cellule fino alla scomparsa del pellet;
6. Si aggiungono allora 5 mL di terreno fresco.

La soluzione così ottenuta contiene le nostre cellule in sospensione e si può procedere con la conta.

 Per la conta cellulare si utilizza una cameretta di conta in vetro. Si prelevano 0,02 mL di soluzione e li si depositano nel cuneo al di sotto del vetrino da conta. Si passa quindi al microscopio e si procede a contare le cellule presenti nei 4 settori da 16 quadratini presenti ai vertici della griglia. Si fa una media delle cellule contate in ogni settore e si moltiplica il valore per 10^4 ottenendo così il numero di cellule in 1 mL.

In questo caso si sono contate una media di 13,75\*10^4 cellule/mL quindi la nostra soluzione di partenza da 5mL conterrà 68,75\*10^4 cellule.

A questo punto si può procedere con la diluizione.

Vogliamo ottenere una soluzione diluita di 5mL contenente 4\*10^4 cellule/mL. Avendo contato le cellule conosciamo la concentrazione iniziale quindi possiamo facilmente calcolare in volume di cellule da prelevare dalla nostra soluzione dalla formula C1V1=C2V2. Dobbiamo prelevare 1,45mL.

Si prepara quindi una Falcon contenente 3,55mL di terreno fresco a cui verranno aggiunti i 1,45mL di soluzione contenente le cellule, ottenendo così 5mL della soluzione desiderata.

A questo punto la soluzione diluita viene piastrata in una capsula Petri da 5mL e incubata a 37°.

Commento:

1) Procedimento descritto in maniera molto chiara e con un buon flusso logico;

2) Manca una descrizione più dettagliata degli ingrandimenti del microscopio usati, ovvero che l’ingrandimento totale è di 40X per l’osservazione della confluenza e 100-200X per l’osservazione di strutture particolari come il nucleo etc. (ovvero l’ingrandimento totale è dato dal 10X negli oculari, e 4X-10X e 20X degli obiettivi posti sul revolver).

3) Attenzione ai termini tecnici.