Esercitazione: Passaggio di cellule in coltura 29/03/2019

Alberto Coglot

Finalità: diluire cellule ad elevata confluenza per consentire la proliferazione e mantenere le cellule in coltura per lunghi periodi.

Osservazione delle cellule in una flask da 75cm2 al microscopio ottico rovesciato per stabilirne la confluenza. La linea BJ dei fibroblasti che è stata osservata presentava una confluenza media che ha permesso di apprezzarne la caratteristica forma allungata. L’oculare del microscopio ha un ingrandimento fisso di 10x e usando gli obiettivi 4X, 10x e 20x si osservano le cellule con un ingrandimento di 40X, 100x e 200x che permette di determinare la confluenza e anche strutture particolari della cellula come il nucleo, rispettivamente.

A questo punto è necessario spostarsi sotto cappa a flusso laminare che permette di lavorare in condizioni di sterilità, si procede dunque, seguendo il protocollo fornito, con la rimozione del vecchio terreno e con dei lavaggi delicati di PBS per rimuovere l’inibitore delle proteasi. Si può quindi aggiungere la soluzione di tripsina/EDTA e riporre la flask nell’incubatore per qualche minuto.

I fibroblasti già dopo 10 minuti risultavano staccati dal substrato, infatti al microscopio era possibile vedere delle cellule tondeggianti e luminose. Il classico aspetto delle cellule non adese conferma il fatto che la tripsina abbia rotto le adesioni al substrato ed eventuali giunzioni tra le cellule. Viene quindi neutralizzata la tripsina con l’aggiunta di terreno completo e la sospensione viene centrifugata dopo essere stata trasferita in una falcon.

Il pellet ora risospeso in terreno fresco può essere utilizzato per la conta cellulare. Si trasferisce una goccia nell’’emocitometro e si osserva al microscopio la camera, suddivisa in 4 quadranti a loro volta suddivisi in 4. Sull’emocitometro è posizionato un vetrino copri oggetti che favorisce lo scorrimento della sospensione nei solchi della camera, assicurando all’operatore che il volume all’interno di questa si esattamente 0,1mm3 che equivalgono a 0,1 µL.

Si esegue una media dei 4 quadranti, nel mio caso: 13,5 cell/ 0,1µL = 13,5x 104 cell/ 1ml

La richiesta era di ripiastrare 4x104 cell/mL , in un volume finale di 5 ml.

Usando la formula Ci x Vi = Cf x Vf ;il volume da prelevare dalla sospensione risultava essere 1,5ml avendo fatto il calcolo Vi=4x104 cell/mL x 5 mL diviso 13,5x 104 cell/ml risulta 1,48 mL che si può arrotondare a 1,5 mL). In una nuova flask metto 1,5 ml della sospensione cellulare e 3,5 ml di terreno DMDM (ottimale per i fibroblasti, precedentemente scaldato a 37° e arricchito di FCS al 10% v/v e antibiotici 1%)

Si può quindi mettere la coltura diluita nell’incubatore assicurandosi di allentare il tappo per consentire lo scambio di gas. Dopo circa 3-4 giorni è necessario osservare le cellule per vedere se avranno proliferato e aderito al substrato.

Impressioni: è importante lavorare in condizioni si sterilità assoluta per evitare la contaminazione da parte di batteri, virus o funghi. Le operazioni vanno svolte sotto cappa (precedentemente pulita) ed è essenziale utilizzare materiale sterile. Negli spostamenti bisogna ricordarsi di chiudere ermeticamente il tappo ma ricordarsi di aprirlo quando le cellule sono nell’incubatore. Sempre tenere a mente che si sta lavorando con cellule viventi per cui anche nei passaggi di lavaggio e spostamento è buona norma aggiungere e rimuovere le soluzioni/sospensioni con delicatezza.

Commento:

Chiaro, conciso con flusso logico, mancava il calcolo per esteso.