Nicola Donadel, data (è importante almeno quanto il nome!) Gruppo 4

**Relazione 1ª esperienza di laboratorio: passaggio di cellule in coltura**

**Scopo dell’esperienza:**

Familiarizzare con la tecnica della diluizione di cellule ad elevata confluenza, per consentirne la proliferazione e mantenerle in coltura per lunghi periodi.

**Procedura sperimentale:**

Prendere la flask con le cellule dall’incubatore ed osservare al microscopio le cellule H1299 in adesione, stabilendo il loro grado di confluenza. Sotto cappa, aspirare il terreno ed introdurre PBS sterile, per ripulire le cellule e lavare inibitori della tripsina. Non grattare le cellule con il puntale. Aspirare il PBS e aggiungere soluzione tripsina/EDTA. Rimettere la flask nell’incubatore per 5 minuti, con il tappo leggermente allentato (non serve, vedi commento sotto). La tripsina è un enzima proteolitico aggiunto per idrolizzare le proteine e dunque le giunzioni inter-cellulari e le adesioni focali, separando le cellule tra di loro e distaccandole dal fondo della flask. L’EDTA è un chelante di ioni bivalenti: li sequestra, facilitando la separazione delle giunzioni cellulari. Riprendere la flask, chiudere il tappo e picchiettarla leggermente, al fine di staccare le cellule dal fondo. Osservare al microscopio le cellule: se sono presenti accumuli di cellule più o meno estesi, incubare ulteriormente. Aggiungere 4 mL di terreno completo (RPMI + 10% FCS + 1% Pen/Strep), da neutralizzare la tripsina. Il siero bovino è necessario per la replicazione cellulare, mentre gli antibiotici garantiscono un certo grado di sterilità da batteri contaminanti. Risospendere le cellule. Trasferire la sospensione in una Falcon e centrifugare a 1000 rpm. Aspirare il surnatante e risospendere delicatamente il pellet. Introdurre nella provetta 5 mL di terreno precedentemente preparato. Prelevare 0,1 µL di sospensione e introdurre tale volume in una cameretta di Neubauer per la conta cellulare.

**Risultati:**

Richiesti 5 mL di sospensione cellulare a concentrazione 5 • 104 cell/mL. Cellule nei quattro quadranti (media): 170/4 = 42,5 cell. Conc. della sospensione iniziale: 42,5 cell/0,1 µL = 4,25 • 105 cell/mL. Vol. sospensione iniziale da prelevare: (5 mL x 5 • 104 cell/mL)/4,25 • 105 cell/mL = 0,58 ml, ovvero ≈ 0,60 mL. Vol. terreno da aggiungere: 5 mL - 0,60 mL = 4,40 mL

**Discussione:**

Le cellule utilizzate sono cellule epiteliali della linea H1299, cellule di tumore ai polmoni, che crescono in terreno RPMI. Al microscopio le cellule presentano: una morfologia cuboidale regolare, conseguenza dell’elevato numero di giunzioni cellulari che le tengono ancorate le une alle altre; una distribuzione piuttosto omogenea, dovuta all’elevato grado di confluenza; più nucleoli per nucleo cellulare: tale caratteristica è propria di cellule con fenotipo tumorale, confermando, quindi, la natura neoplastica delle cellule utilizzate.

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) E’ importante che il tappo della flask sia socchiuso quando le cellule rimangono nell’incubatore durante la crescita. Durante la tripsinizzazione, che dura solo alcuni minuti, ciò è irrilevante.

4) Il calcolo va fatto in maniera precisa, l’approssimazione di 0,58ml a 0,6ml va invece discussa, altrimenti non ricordi come mai alla fine hai messo 0,6 ml.