Studente: CHIARA KALEBIĆ

Data: 29/03/2019

**Progetto**: PASSAGGIO DI CELLULE IN COLTURA

**Finalità**: ottenere cellule sempre proliferanti che vengono mantenute in coltura a tempo prolungato per altri esperimenti.

**Procedura sperimentale:**

* Preparazione del terreno contenente siero e antibiotici sotto cappa
* Al microcopio vengono osservate le cellule epiteliali polmonari **H1299**
* Lavaggio delle cellule con PBS (sotto cappa)
* Aspirazione del PBS e aggiunta della tripsina/EDTA
* Osservazione al microscopio delle cellule staccate dal fondo della flask
* Aggiunta del terreno RPMI completo per la neutralizzazione della tripsina
* Risospensione delle cellule
* Centrifugazione delle cellule trasferite in una falcon per 5min a 1000rpm.
* Aspirazione del terreno e risospensione del pellet in 5ml di terreno completo
* Conta delle cellule grazie al utilizzo del emocitrometro
* Diluizione delle cellule ad una concentrazione finale di 5\*104 cell/mL.
* Osservazione al microscopio
* Riposizione delle capsule Petri in incubatore

**Risultati:**

1. Il risultato ottenuto in seguito alla conta delle cellule trasferite sull’emocitrometro è stato:
- quadrante superiore sinistro: 21 cell
- quadrante superiore destro: 7 cell
- quadrante inferiore sinistro: 18 cell
- quadrante inferiore destro: 8 cell

In media si hanno: (21+7+18+8)/4 = **13,5\*104 cell/mL**

1. Conoscendo la concentrazione finale alla quale si vogliono diluire le cellule, ossia **5\*104 cell/mL**, e il volume finale della coltura sia **5mL**, si procede facendo il calcolo del volume di sospensione cellulare da prelevare per ottenere la concentrazione desiderata, effettuare dunque la diluizione:

Vi = ?
Ci = 13,5\*104 cell/mL

Vf = 5mL

Cf = 5\*104 cell/mL

**Vi x Cf = Vf x Ci
Vi =** 5mL x5\*104 cell/mL /13,5\*104 cell/mL (qui c’era scritta nel denominatore la Ci anziché Cf), quindi il calcolo cambia)
**Vi = 1,48 mL**Vengono prelevati **1,5 mL** di sospensione cellulare che vengono aggiunti a **3,5 mL** di terreno RPMI, poiché il Vf corrisponde a **5 mL**.

**Discussione:**

* Durante la prima osservazione al microscopio, ho osservato i cheratinociti della linea H1299, che sono apparsi in una forma variabile tra il rotondeggiante e il poligonale e luminosi. Il loro stato di confluenza non era al massimo, ma comunque la confluenza era altra ed era dunque necessario che le cellule venissero passate. Ho notato anche alcune cellule in attiva divisione. Osservando alcune cellule dei miei compagni con i fibroblasti di linea BJ, ho osservato che queste erano più confluenti, di forma fusiforme, e che in tali è più difficile distinguere nettamente i confini cellulari causa la loro forma meno ‘ordinata’, come anche il nucleo.
* In seguito all’aggiunta della tripsina, che ha staccato le cellule dal fondo, osservando le stesse al microscopio si osserva un cambiamento nella loro morfologia, queste appaiono più rotondeggianti, poiché è stata persa l’adesione.
* È importate neutralizzare/inibire la tripsina che viene aggiunta per staccare le cellule dalla flask, poiché questa potrebbe andare a degradare le molecole (proteine) della membrana delle cellule.
* Conta delle cellule: vengono contate in una camera, a sua volta divisa in 9 quadrati, dei quali 4 sono quelli utilizzati per la conta. Per una conta più precisa viene contato il numero di cellule in ognuno dei 4 quadrati, e viene dunque fatta la media per il numero di cell/quadrato. Sapendo che ogni quadrato corrisponde a 0,1μL, concludiamo che per ottenere la concentrazione cellulare, ossia il numero di cellule/mL, si deve moltiplicare il numero di cellule contate per 104.
* Mentre le cellule si trovano nell’incubatore viene lasciato il tappo non completamente chiuso per favorire un passaggio di gas.

Commento:

1) il procedimento è stato descritto bene, peccato per il calcolo!

2) Manca una descrizione degli ingrandimenti usati per l’osservazione al microscopio.