Valeria Procicchiani Trieste, 29 marzo 2019

***Progetto:*** Passaggio di cellule in coltura

***Finalità:*** Mantenere per lunghi periodi colture cellulari sempre proliferanti.

***Procedura* *sperimentale:***

1. Osservazione della confluenza di cellule epiteliali derivate da carcinoma polmonare (H1299). *Si è osservata alta confluenza in cellule epiteliali H1299.*
2. Lavaggio del terreno con 5 mL di PBS.
3. Tripsinizzazione con 1 mL di tripsina/EDTA. Incubazione per 5 min.
4. Distacco delle cellule dal fondo e osservazione al microscopio ottico.

*Si è osservato il distacco delle cellule dal fondo e tra loro (attraverso il loro movimento che non le rendeva più adese alla matrice). Apparivano tondeggianti e galleggianti.*

1. Neutralizzazione della tripsina con 4 mL di terreno RPMI completo (rosa).
2. Centrifugazione della sospensione per 5 min a 1000 rpm.
3. Risospensione con 5 mL di terreno RPMI completo.
4. Osservazione e conta al microscopio ottico con emocitometro (20 µL di sospensione).
5. Calcolo della diluizione dopo la scelta di concentrazione (5x$10^{4}$ cell/mL) e volume (5 mL) finale.
6. Diluizione della sospensione e piastratura in capsula Petri.
7. Controllo al microscopio ottico e incubazione della capsula Petri.

***Risultati:***

Conta delle cellule: emocitometro

*Media* = $\frac{11+15+32+41}{4}$ = 24,7 cellule = 24,7 x $10^{4}$ cell/mL

* 1° quadrato: 11 cellule
* 2° quadrato: 15 cellule
* 3° quadrato: 32 cellule

N° cellule in 1 mL di sospensione =

N° cellule in un quadrato (vol 1x$10^{-4}$ mL) x $10^{4}$

* 4° quadrato: 41 cellule

*Concentrazione finale* = 5x$10^{4}$ cell/mL

*Volume finale* = 5 mL

 Ci x Vi = Cf x Vf

24,7 x $10^{4}$ cell/mL x Vi = 5x$10^{4}$ cell/mL x 5 mL

Vi = = $\frac{5x10^{4} \frac{cell}{mL} x 5 mL}{24,7 x 10^{4} \frac{cell}{mL}}$ = 1,01 mL = 1 mL

*Cellule in sospensione finali*: 5x$10^{4}$ cell/mL x 5 mL = 25x$10^{4}$ cell

5 mL (1 mL H1299 + 4 mL RPMI)

***Discussione***

* Si sono utilizzate colture di cellule epiteliali in adesione (attecchite a un substrato) perciò si utilizza la tripsina/EDTA per scindere legami tra le cellule e tra le cellule e il substrato. Nell’eventuale presenza di gruppetti di cellule (come è avvenuto nel nostro caso il laboratorio) fare agire ulteriormente la tripsina. Attenzione però a non esporre per lungo tempo la coltura alla tripsina, questa porterebbe a morte cellulare causata dalla degradazione delle proteine delle membrane.
* Per quantificare il grado di confluenza bisogna valutare la concentrazione di cellule presenti e la concentrazione che si otterrebbe se tutte queste raddoppiassero. Spesso quando si raggiunge un’alta confluenza, le cellule si dispongono in colonie, sono molto attaccate tra loro (si vede molto bene il contatto tra le giunzioni) e non si replicano più. Per questo, un altro fattore per valutare il grado di confluenza è osservare la grandezza e l’estensione delle colonie.

La coltura sulla quale si è fatto il passaggio in laboratorio si è stabilito avere un’alta confluenza.

* Le caratteristiche di cellule epiteliali (H1299) osservate al microscopio ottico rovesciato (obiettivo alla base del recipiente e luce arriva da sopra) sono le seguenti:
* Cellule poligonali/tondeggianti
* Cellule piccole
* Crescita in adesione
* Formano colonie di cellule
* Hanno giunzioni intercellulari (difficili da staccare: serve più tempo di esposizione alla tripsina) oltre che adesioni focali
* Contorni delineati
* Nucleo più chiaro del citoplasma
* Molti nucleoli più scuri dentro il nucleo
* Estroflessioni membranose
* Utilizzato terreno completo RPMI (50 mL) colorazione rosa. Costituito: 10% v/v siero (contiene FCS); 1% v/v antibiotici (Penicillina e Streptomicina).
* Quando vado a lavare via il terreno con PBS, lo deposito alla base del recipiente, non da sopra sennò con la pressione rischio di staccare le cellule. Mentre deposito tripsina/EDTA sopra la coltura cellulare perché questo mi aiuta nel mio intento di staccare le cellule.
* La diversità tra il numero di cellule risultanti dalla conta nei quattro quadrati costituenti l’emocitometro può essere dovuta al fatto che la pipetta non era perfettamente dritta quando si sono versati i 20 µL nella camera di conta.

Commento:

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

2) Mancano i dettagli tecnici 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 (giunzioni, adesioni etc.).