**RELAZIONE DI LABORATORIO** Laura Palmieri 14/04/2019

 **Passaggio di cellule in coltura**

Lo scopo dell’esperimento è:

* Valutare il grado di confluenza cellulare al fine di diluire le cellule per consentirne la proliferazione e il mantenimento in coltura per lunghi periodi.

Procedura sperimentale

Le cellule analizzate in questo esperimento sono cellule fibroblastiche umane BJ, di derivazione mesenchimale e caratterizzate da una forma allungata.

Per prima cosa bisogna valutare il grado di confluenza cellulare al microscopio: è buona pratica osservare in un primo momento le cellule con un ingrandimento 4X, e solo successivamente osservarle con un ingrandimento più alto. Successivamente ci si sposta sotto cappa biologica a flusso laminare e si aspira il terreno di incubazione (RPMI completo con 1% P/S, e 10% FCS) e si elimina il siero (che contiene un anti-tripsina) grazie a 2 lavaggi in PBS 1X (alla temperatura di 37°C). Successivamente si inserisce nella *flask* una soluzione di Tripsina/EDTA a 37°C, necessaria al distacco cellulare dal fondo del piatto e al sequestro di ioni Ca2+ implicati nelle giunzioni cellula-cellula. Si lascia agire per 5 minuti in incubatore e dopodiché si aggiunge DMEM completo, inibendo l’azione della tripsina. Grazie ad aspirazioni e rilascio svolti vigorosamente si possono ottenere cellule singole, senza agglomerati. Infine, le cellule vengono trasferite in una Falcon da 15 ml per poi essere centrifugate a 1000 rpm per 5 minuti. Successivamente si elimina il surnatante e si risospende il pellet cellulare in 5 ml di RPMI completo. Al fine di calcolare l’effettivo numero di cellule in sospensione dopo tripsinizzazione, si utilizza la camera conta cellule. La camera utilizzata è un Emocitometro, strumento costituito da una griglia delimitante 4 quadranti, ciascuno con un volume di 0,1 mm3 (0,1 μL) e costituito da 16 quadrati più piccoli. Successivamente si inseriscono circa 20 μl di cellule in sospensione nella celletta conta cellule. Vengono contate le cellule presenti all’interno dei 4 quadranti, e il numero delle cellule presenti in 1 ml viene calcolato tramite la seguente formula:

*numero di cellule/ml* = media numero di cellule x 10'000 = 112’500 cell/ml

Successivamente si piastrano le cellule in un piatto Petri avente 5 cm di diametro (Vfinale= 5ml) ad una concentrazione finale di 50'000 cell/ml. Pertanto, avremo 2,8 ml di RPMI e 2,2 ml di soluzione contenente cellule posti in una Falcon da 15 ml e si piastreranno tramite gocce sparse in maniera omogenea sul piatto da coltura. Questo risultato è stato ottenuto mettendo Vi= Cf∙Vf/Ci.

Commento: Procedimento descritto in maniera molto chiara e con un buon flusso logico. Mancava una descrizione più dettagliata degli ingrandimenti del microscopio usati, ovvero che l’ingrandimento totale è di 40 per l’osservazione della confluenza e 100-200X per l’osservazione di strutture particolari come il nucleo, filopodi, etc. (ovvero l’ingrandimento totale è dato dal 10X negli oculari, e 4X-10X e 20X degli obiettivi posti sul revolver). Mancava il calcolo per esteso.