Progetto: passaggio di cellule in coltura

Julia Passerino

Data: 21/03/2019

Finalità: diluire cellule ad elevata confluenza per consentirne la proliferazione e il mantenimento in coltura per lunghi periodi.

* Riscaldare tutte le soluzioni nel bagnetto termostato a 37°C.
* Sotto la cappa a flusso laminare preparare 50 mL di terreno DMEM 10% FCS, 1% penicillina/streptomicina.
* Osservare al microscopio se effettivamente le cellule nella flask hanno raggiunto la confluenza.
* Sotto cappa aspirare il terreno dalla flask e fare un lavaggio con 5 mL di PBS sterile (soluzione fisiologica). È un passaggio importante per eliminare gli inibitori della tripsina.
* Una volta tolto il PBS mettere 1 mL di tripsina/EDTA. Rimettere la flask nell’incubatore e attendere 5 minuti (10 se l’incubatore viene aperto varie volte in poco tempo).
* Prelevare la flask dall’incubatore, agitarla leggermente per far staccare le cellule dal fondo e osservare al microscopio. Se ci sono tanti aggregati rimettere in incubatore per qualche minuto o spipettare.
* Aggiungere nella flask 4 mL di terreno per neutralizzare la tripsina. Spipettare per risospendere bene le cellule.
* Trasferire la sospensione in una Falcon da 15 mL e centrifugare per 5 minuti a 1000 rpm. Scartare il surnatante. Risospendere il pellet con 5 mL di terreno.
* Contare le cellule con l’emocitometro, bagnare con dell’acqua i binari a lato delle due camere per far aderire il vetrino. (Cellule in 1mL di sospensione = cellule in un quadrato della camera ∙ 104). Calcolare il volume di sospensione da prelevare per ottenere la diluizione desiderata.
* In una Falcon mettere il terreno e aggiungere il volume calcolato nel punto precedente (prima di prelevarlo spipettare in modo da risospendere le cellule). Spipettare un paio di volte.

Mettere tutto in una Petri, osservare al microscopio l’effettiva presenza di cellule e mettere in incubatore.

Risultati: nei 4 quadrati della camera dell’emocitometro sono state contate 7, 10, 13 e 20 cellule, per una media di 12.5∙104 cellule per mL di sospensione. Il volume da prelevare, per ottenere una sospensione finale di 5 mL con 4∙104cell/mL, è di 1.6 mL. 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, ovvero poteva valere la pena aggiungere che per l’osservazione della confluenza si è usato l’ingrandimento totale 40X mentre per osservare strutture particolari come il nucleo si è usato 100-200X (ovvero dato dal 10X negli oculari, e 4X-10X e 20X degli obiettivi posti sul revolver).