**Passaggio di cellule in coltura per mantenimento di cellule per lunghi periodi.**

Scopo: diluire una coltura di cellule che crescono in adesione e hanno raggiunto elevata confluenza in modo da consentirne la proliferazione e mantenerle in coltura per la successiva osservazione.

Procedimento: Si preleva la flask dall’incubatore e si osservano le cellule al microscopio ottico rovesciato per valutare il grado di confluenza. Si utilizzano diversi ingrandimenti: 4X e 10X per la confluenza, 20X e 40X per osservare la morfologia delle cellule. Sono stati osservati fibroblasti (BJ), che hanno forma allungata con lunghe protrusioni, e cellule epiteliali da linea tumorale di carcinoma polmonare (H1299). Le cellule epiteliali, a differenza delle BJ, risultavano avere un elevato grado di confluenza, quindi era necessario passarle in coltura. Le cellule epiteliali sono piccole e quadrate, crescono in adesione formando colonie. A bassa confluenza si possono trovare anche isolate, ad alta confluenza formano isole.

Sotto la cappa a flusso laminare, si rimuove il terreno contenuto nella flask. Si aggiungono 5ml di PBS sterile per eliminare inibitori della tripsina contenuti nel terreno. Si aspira il PBS e si mette nella flask 1ml di tripsina/EDTA. Quando si aggiungono soluzioni alla flask inclinare la stessa in modo che la soluzione di depositi in un angolo e non direttamente sulle cellule per non danneggiarle. Si mette la flask nell’incubatore a 37°C e si attendono circa 5 minuti affinché la tripsina agisca. Si rimuove la flask dall’incubatore e si osservano le cellule al microscopio ottico per verificare che le cellule si siano staccate: le cellule appaiono come tondeggianti e galleggianti nel liquido. Se dall’osservazione risultassero cellule ancora adese, rimettere la flask nell’incubatore e attendere. Sotto cappa si aggiungono 4ml di terreno precedentemente preparato per neutralizzare la tripsina. Il terreno per la coltura cellulare contiene terreno RPMI (terreno di base per H1299), 10% V/V di siero (FCS), 1% V/V di antibiotici (penicillina e streptomicina). Si risospendono le cellule spipettando e si trasferisce la sospensione in una provetta Falcon da 15ml. Si centrifugano le cellule a 1000rpm per 5 minuti. Si aspira il surnatante (che contiene terreno e cellule morte), si aggiungono 5ml di terreno nuovo per risospendere le cellule. Con la p200 si trasferisce una goccia della sospensione in una delle camere dell’emocitometro. Si procede alla conta al microscopio ottico: si contano le cellule presenti nei 4 quadrati e si fa una media del numero di cellule. Il n° cellule in 1ml di sospensione è il n° cellule in un quadrato x 104. $Media cellule×10^{4}=C\_{i} =\frac{15+11+12+20}{4}×10^{4}=14,5×10^{4}cellule/mL$. Si decidono concentrazione finale 5x104 cellule/ml e volume finale di 5ml e si procede alla diluizione della sospensione madre utilizzando la relazione CiVi=CfVf. 🡪 $V\_{i}=\frac{V\_{f}xC\_{f}}{C\_{i}}=\frac{5ml x 5 x 10^{4}}{14,5 x 10^{4}}=1,72ml $volume di soluzione iniziale da prelevare. Volume di terreno da aggiungere 3,3 ml.

Si controllano le cellule al microscopio per verificare il corretto trasferimento. Dopo l’osservazione riporre le cellule in incubatore.

Commento:

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

2) Meglio separare chiaramente scopo da procedimento.