Luca Secco, 14 marzo 2017

**PASSAGGIO DI CELLULE IN COLTURA**

**Scopo:** diluire cellule a elevata confluenza per consentire la proliferazione e mantenerle in coltura per lunghi periodi.

Dopo aver osservato al microscopio due linee cellulari, H1299 di carcinoma polmonare e fibroblasti BJ, si è scelto di procedere al passaggio delle prime, dato che avevano raggiunto confluenza.

Entrambe le linee cellulari sono tenute in flask da 5 mL in terreno completo RPMI o DMEM, rispettivamente, contenente FBS al 10% e PenStrep.

**Procedimento:**

Scaldare le soluzioni a 37°C, per evitare shock termici alle cellule durante i processi, e porre tutto sotto cappa, per operare in sterilità.

Sotto cappa, aspirare il terreno dalla fiasca ed effettuare un lavaggio con PBS, in modo da consentire la massima efficacia della tripsina.

Aggiungere 1 mL di tripsina + EDTA e incubare le cellule per qualche minuto. Lasciare agire l’enzima fino a completo distacco delle cellule, verificando al microscopio.

Dopo essere tornati sotto cappa, aggiungere alla fiasca 4 mL di terreno, che contiene al suo interno anche un inibitore della tripsina in modo da bloccare la reazione e impedire danni cellulari. Il terreno va aggiunto sul lato di adesione in modo da recuperare il maggior numero di cellule possibili.

Aspirare l’intero contenuto della fiasca, porlo in una falcone da 15 mL e centrifugare per 5’ a 1000 rpm.

Aspirare il surnatante e risospendere il pellet con 5 mL di terreno fresco.

Ora occorre contare le cellule presenti, poiché esse vanno ripiastrate ad una concentrazione stabilita.

Si allestiste dunque una camera di conta di Neubauer. Vi si inserisce una goccia del terreno precedentemente risospeso e si procede alla conta: si effettua una media delle cellule, contate al microscopio, presenti nei quadrati posti agli angoli della cameretta.

Questo numero viene poi moltiplicato per il fattore di conversione 104, in modo da ottenere la concentrazione di cellule x mL.

È stata contata una media di 19 cellule per quadrato.

La concentrazione di cellule iniziale è dunque 1.9 x 105 cell/mL.

La concentrazione a cui vanno piastrate le H1299 è di 5x104 cell/mL.

Il volume finale della fiasca è 5 mL

Utilizzando questi dati, si applica la formula seguente per ricavare il volume di cellule da prelevare e piastrare:

Vf x Cf = Vi x Ci

Da cui:

**Vi**= Vf x Cf / Ci

Sono quindi stati piastrati 1.3 mL di cellule e aggiunti 3.7 mL di terreno fresco.

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 40X 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).