Vidotto Luca

Progetto: Passaggio di cellule in coltura

 Data: 28/03/2109

La finalità dell’esperienza consiste nel diluire cellule ad alta confluenza (utilizzate cellule BJ,

fibroblasti umani immortalizzati) per consentire la proliferazione e mantenerle in coltura per lunghi

periodi. Procedura:

1. Stabilire grado di confluenza al microscopio ottico, se troppo elevato, necessaria diluizione;

2. Sotto cappa a flusso laminare, aggiungere 5ml PBS (soluzione fisiologica) per lavare via il

terreno, aspirare PBS, aggiungere 1ml Tripsina/EDTA e lasciare nell’incubatore per circa 10 minuti;

3. Neutralizzare la Tripsina con l’aggiunta di 4 ml di terreno di coltura completo (DMEM + 10% FCS + 1% Penicillina/Streptomicina) e risospendere la soluzione;

4. Trasferire la soluzione in una Falcon e Centrifugare a 1000 rpm per 5 minuti;

5. Rimuovere surnatante, risospendere il pellet aggiungendo 5ml DMEM;

6. Contare cellule al microscopio con l’uso di un emocitometro. Determinare numero medio di

cellule e moltiplicarlo per 104 (perché la cameretta di Neubauer contiene 0,1 mm3 = 0.1 µl e

dobbiamo passare a ml) .

Risultato = 18.5 $x $104 cell/ml ($C\_{i }$concentrazione iniziale della mia soluzione);

7. Determinare volume iniziale ($V\_{i}$) di soluzione da prelevare dalla Falcon per ottenere una

soluzione contente la mia linea cellulare BJ, la quale deve avere un volume finale $ V\_{f}$ = 5 ml ed

una concentrazione finale $C\_{f}=4 x $104 cell/ml.

$C\_{i }x V\_{i}=C\_{f} x V\_{f}$ 🡪 $V\_{i}=\frac{C\_{f} x V\_{f}}{C\_{i }}$ =$\frac{5 ml x 4x 10^{4}cell/ml}{18.5 cell/ml}$ = 1.08 ml  ~ 1.1 ml;

Aggiungere al volume appena trovato 3.9 ml di DMEM per ottenere i 5 ml richiesti.

8. Trasferire la soluzione in una Petri e conservare nell’incubatore.

Commento:

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

2) Manca 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 etc. (ovvero l’ingrandimento totale è dato dal 10X negli oculari, e 4X-10X e 20X degli obiettivi posti sul revolver).