Esperienza 1 Maeva Zamperoni 29/03/2019

PROGETTO: Passaggio di cellule in coltura

FINALITÀ: Mantenere cellule in coltura proliferanti per un tempo prolungato

PROCEDURA SPERIMENTALE:

* Osservazione di una coltura di fibroblasti (BJ) al microscopio ottico rovesciato per valutarne la confluenza. La confluenza della coltura osservata è elevata, infatti sono presenti pochi spazi liberi tra le varie cellule (la stessa considerazione è stata fatta da coloro che hanno osservato le colture di cellule epiteliali derivanti da tumore polmonare).
* Sotto cappa si aspira il terreno dalla flask contenente la coltura e si effettua un lavaggio con PBS (facendo attenzione a non staccare le cellule con il flusso della soluzione) per eliminare i residui di terreno che contiene gli inibitori della proteasi. Si aggiunge Tripsina/EDTA e si lascia ad incubare (nell’incubatore la flask non deve essere chiusa totalmente per permettere alle cellule di ricevere l’ossigeno e per permettere alla proteasi di agire).(Commento: per la tripsinizzazione questo è irrilevante)
* Al microscopio, dopo aver sbattuto leggermente la flask, si verifica che le cellule si siano staccate.
* Sotto cappa si aggiunge il terreno DMEM completo (terreno+10%FCS+1%Pen/Strep) per neutralizzare la tripsina (altrimenti comincerebbe a digerire anche le membrane cellulari) e si spipetta.
* Si centrifuga e si osserva la formazione del pellet.
* Sotto cappa si aspira il surnatante (con esso si eliminano tripsina e cellule morte) e si aggiunge il terreno completo e si procede alla risospensione delle cellule spipettando.
* Si effettua la conta al microscopio con l’emocitometro.
* Sotto cappa, dopo aver preparato la diluizione desiderata, si passa la coltura su una capsula Petri (per distribuire si esegue un movimento a croce).
* Al microscopio si controlla la presenza delle cellule nella Petri e si mette ad incubare.

RISULTATI:

La conta dei fibroblasti al microscopio ottico si esegue valutando quante cellule sono presenti nei quadranti della griglia dell’emocitometro. Si considerano i quattro quadrati ai vertici e si fa una media. I risultati ottenuti sono: 15, 16, 11 e 10 cellule. Quindi:

n°cell= [(15+16+11+10)/4] x 104= 13x104 cell/mL (Si moltiplica per 104 perché il volume di un quadrante è 0,1mm3)

Si desidera ottenere una coltura con Vf=5mL e Cf=4x104 cell/mL (→ n°cell tot= 20x104)

Il volume da diluire si calcola con la formula Ci x Vi = Cf x Vf

Vi= (Cf x Vf)/Ci= (4x104 cell/mL x 5mL)/13x104 cell/mL= 1,5mL

Il volume di terreno da aggiungere si ricava dalla differenza: Vf – Vi = (5-1,5)mL=3,5mL

DISCUSSIONE:

* Per valutare la confluenza è stato utilizzato il microscopio ottico rovesciato con obiettivo 4x e successivamente 10x per poter apprezzare meglio la morfologia allungata e con lamellipodi dei fibroblasti.
* Le cellule non più adese risultano galleggianti e avere una forma tondeggiante.
* Per eseguire la conta è stato usato l’obiettivo 10x per individuare meglio le cellule (con il 4x alcuni detriti cellulari possono essere scambiati per cellule e alterare la conta).
* Sia i fibroblasti che le cellule epiteliali sono risultate ad elevata confluenza, ma nella conta i fibroblasti sono risultati essere in un numero leggermente inferiore probabilmente a causa delle loro dimensioni maggiori.
* Quando si risospende il pellet è necessario usare inizialmente un piccolo volume per aggiungere solo successivamente il volume totale. In questo modo il pellet non si stacca in blocco dal fondo del Falcon, ma si risospende in modo omogeneo.

Commento:

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

2) Le flask devono avere il tappo semiaperto quando le si ripone per far crescere le cellule: in quel caso serve lo scambio gassoso, ma non durante la tripsinizzazione che dura solo pochi minuti. Per la tripsinizzazione conta la temperatura che è ideale a 37°C.