

**Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche**

**AA 2019-2020**

**Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare**

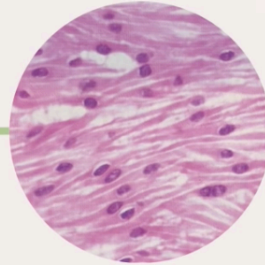
**Lezione 2**

**Generazione**

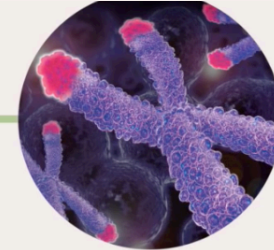
**di colture cellulari 2D in vitro**

# Colture primarie e linee cellulari stabilizzate

## Colture primarie

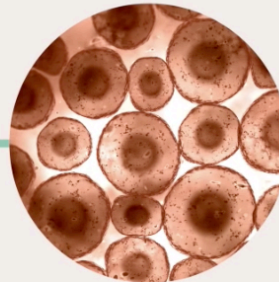


Possono dividersi un numero limitato di volte



Ottenute direttamente da tessuti

## Linee cellulari



Utili per la ricerca a lungo termine



Si dividono indefinitamente

**Generazione di una coltura primaria di cellule isolate  
partendo da un espianto di tessuto**



## Generazione di una coltura primaria di cellule isolate partendo da un espianto di tessuto

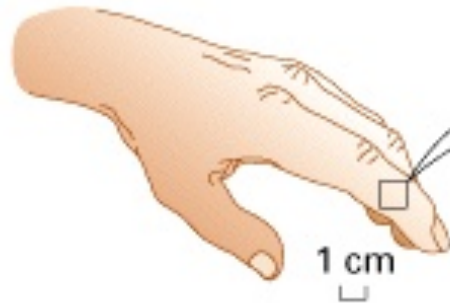
Come illustrato nella prossima slide, per allestire colture di cellule isolate in vitro (o di organoidi, vedi lezione dedicata), a meno che il tessuto di origine non sia il sangue periferico, si deve partire da un espianto di **tessuto** solido o semisolido (una biopsia), e quindi le cellule devono essere **dissociate, cioè isolate le une dalle altre e dalla matrice extracellulare**.

Nei tessuti solidi di tipo **epiteliale** (es. epidermide, colon, polmone, ghiandola mammaria etc.) le cellule sono strettamente **adese** le une alle altre

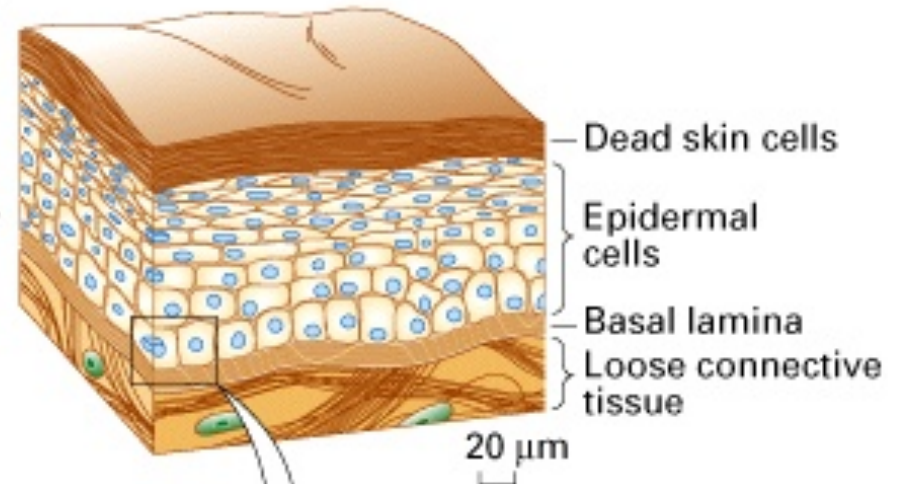
mentre nei tessuti di tipo **mesenchimale** (es. tessuto connettivo, tessuto adiposo, etc.) le cellule sono separate, però sono circondate da abbondante **matrice extracellulare**, che deve essere eliminata prima di porre le cellule in coltura.

# ALLESTIMENTO di una coltura cellulare:

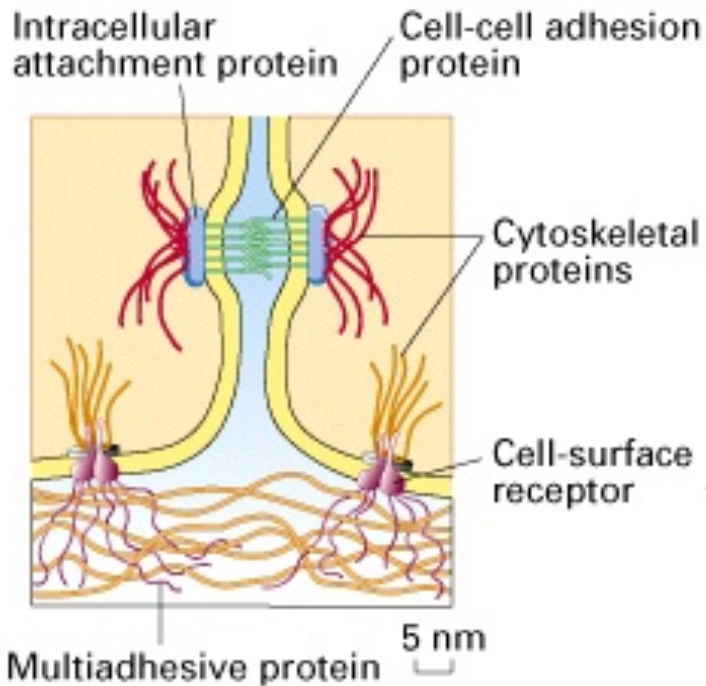
(a)



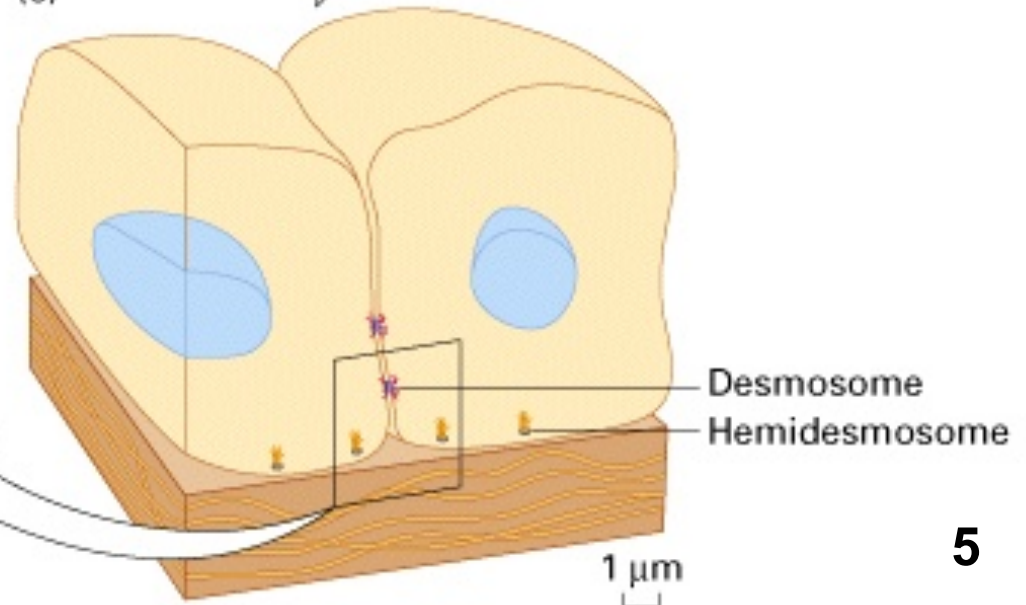
(b)



(d)



(c)



Il tessuto deve essere perciò dapprima **sminuzzato** e **omogeneizzato** in condizioni di sterilità. Ciò si ottiene tagliuzzando finemente il tessuto con un bisturi; se il tessuto è abbastanza molle e si può disporre di quantità abbastanza abbondante del materiale di partenza, è possibile l'uso di omogenizzatori elettrici. Non ci si deve preoccupare di rompere le cellule, poichè con questi trattamenti si ottengono frammenti di tessuto.

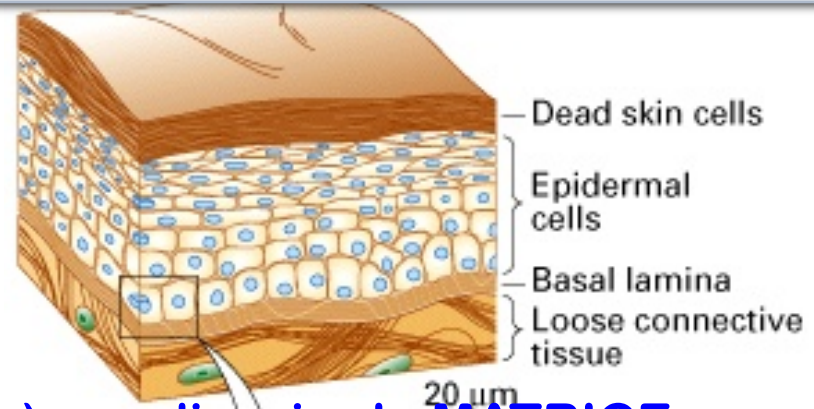
In seguito l'omogeneizzato viene sottoposto a dei trattamenti chimici ed enzimatici, che possono essere effettuati anche utilizzando uno strumento da banco detto dissociatore (slide 7).

Per **eliminare la matrice** che circonda le cellule si usano **enzimi proteolitici**, in grado di digerire il collagene e le altre proteine, ed in aggiunta **enzimi glicolitici** che digeriscono i polimeri dell'acido ialuronico e altri glucosaminoglicani.

Molti tessuti, ad esempio quelli epiteliali, sono composti da cellule strettamente adese le une alle altre grazie alla presenza di giunzioni intercellulari. Queste vanno dissociate sia mediante l'uso di proteasi che eliminano le proteine di membrana responsabili dell'adesione cellula-cellula sia utilizzando agenti chimici chelanti dei cationi bivalenti (come  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$  i quali stabilizzano le giunzioni) quali l'EDTA o l'EGTA.

## ALLESTIMENTO di una coltura cellulare:

**DISSOCIAZIONE**  
di singole **CELLULE**  
da un espianto di **TESSUTO**



**TECNICHE** (usate in combinazione) per digerire la **MATRICE**  
extracellulare e dissociare le **GIUNZIONI** intercellulari

Trattamento **meccanico**

bisturi, omogenizzatore

Seguito da (anche nel dissociatore)

Trattamento con **enzimi**

proteolitici (tripsina, collagenasi, elastasi)

glicolitici (ialuronidasi)

Trattamento con **agenti chimici** (EDTA, EGTA)

chelanti dei cationi bivalenti ( $\text{Ca}^{2+}$ ) che stabilizzano le giunzioni  
cellulari

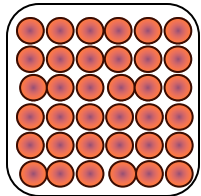
# DISSOCIATORE cellulare da banco



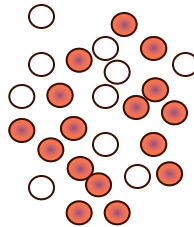


# ALLESTIMENTO DI UNA CULTURA CELLULARE

da un tessuto



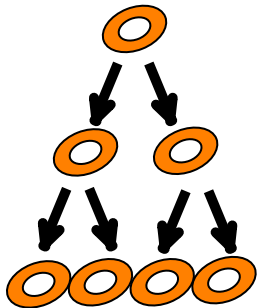
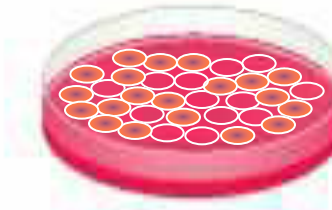
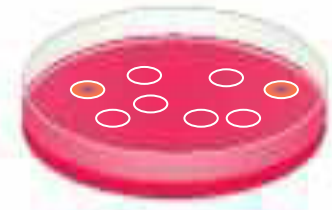
si dissociano singole cellule



Se non viene aggiunto **SIERO**,  
le cellule non proliferano:

**QUIESCENZA**

e si seminano in terreno:



Se **stimolate** con siero, le cellule  
**proliferano** finchè occupano tutta la  
superficie del recipiente  
(**CONFLUENZA**)

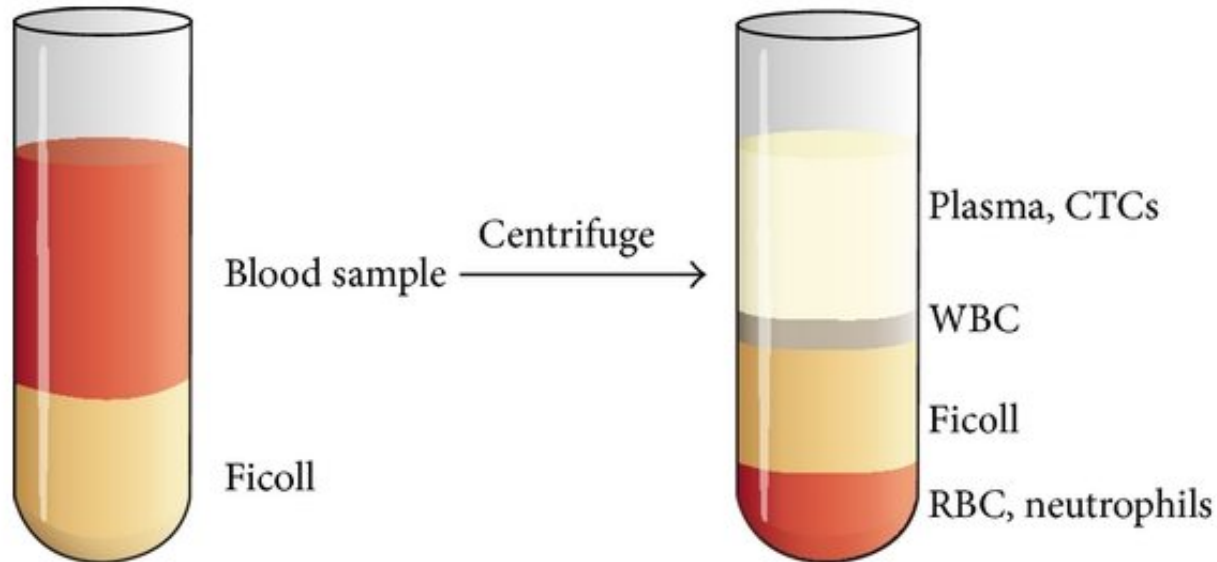
## SEPARAZIONE di diverse popolazioni cellulari:



Quasi sempre, un espianto di tessuto contiene diversi tipi cellulari. Per allestire **colture omogenee (costituite da un unico tipo cellulare)**, è necessario **purificare** specifici tipi cellulari, in base alle loro caratteristiche.

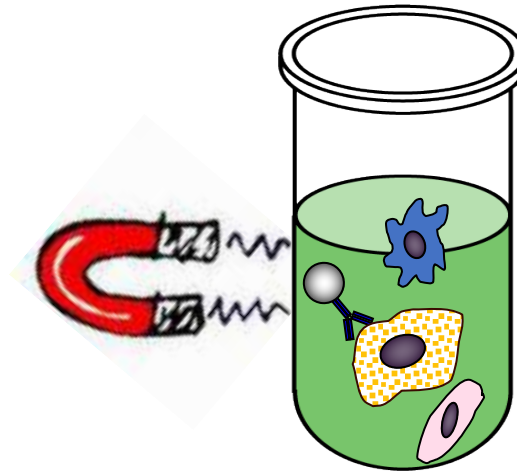
## Separazione in base alla densità

Sedimentazione in un gradiente di densità mediante centrifugazione



La sospensione cellulare viene depositata su un mezzo che forma un gradiente di densità. Sotto la forza della centrifugazione, le cellule scendono attraverso il mezzo e rimangono sospese nel punto in cui la propria densità è uguale a quella del mezzo circostante.

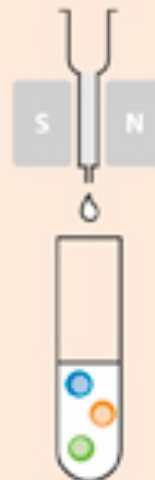
## Separazione mediante coniugazione di beads magnetiche a molecole di superficie cellulare



### Magnetic labeling



### Magnetic separation



### Elution of the labeled cells



# CRIOCONSERVAZIONE

Le cellule vengono **RISOSPESE** in **TERRENO DI CONGELAMENTO** contenente **10% DMSO** e **90% FCS**,

**CONGELATE** e **CONSERVATE** in **AZOTO LIQUIDO** (77K: -196° C) in appositi **CONTENITORI** detti **DEWAR**



## NORME DI SICUREZZA



Le colture cellulari sono fonti di **potenziale rischio biologico** (in particolare per la potenziale presenza di patogeni – es. virus).

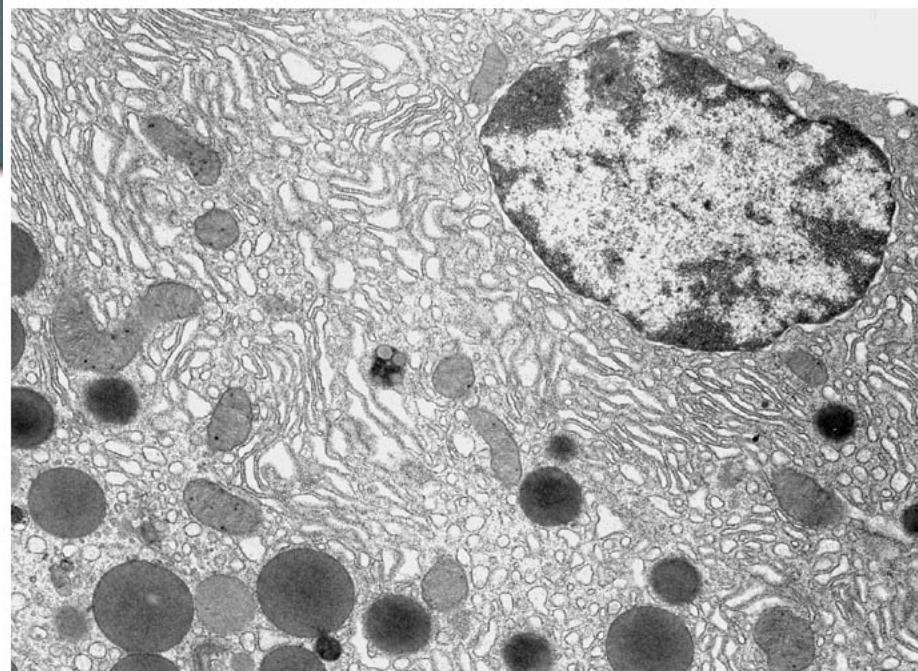
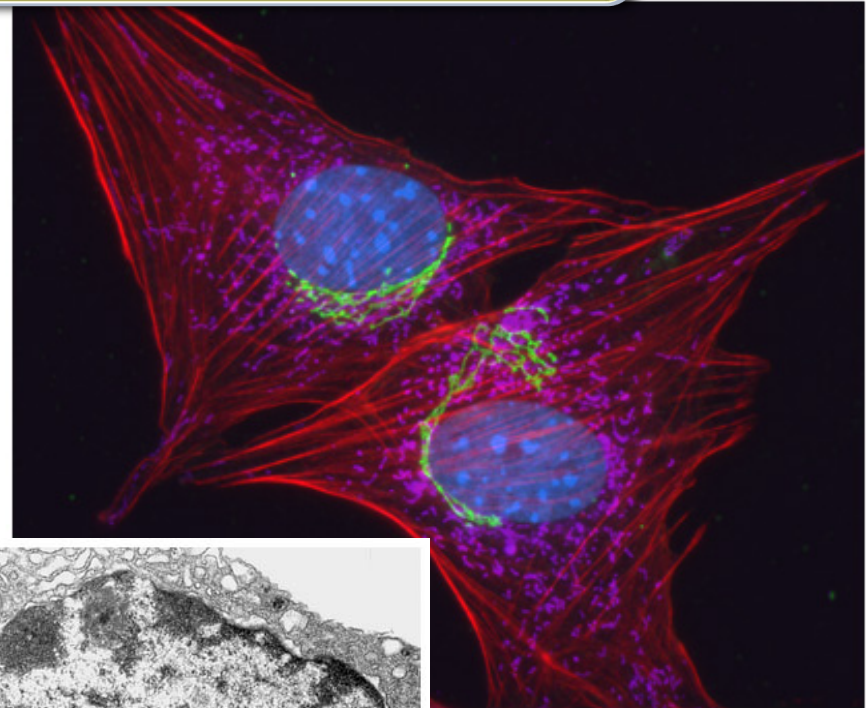
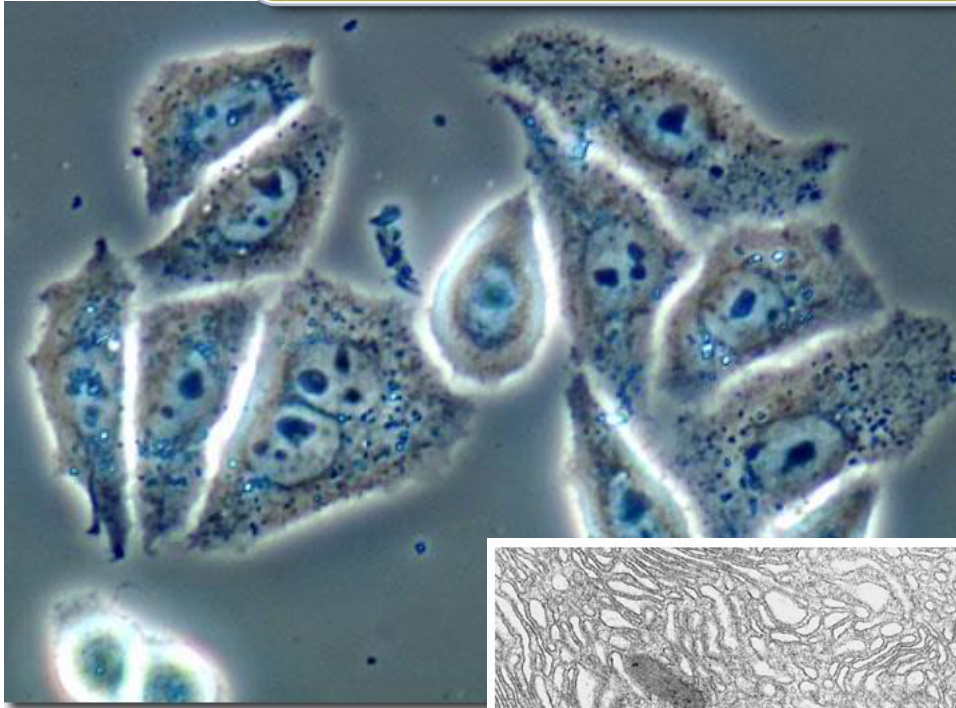
È necessario quindi operare con cautela, in particolare con **colture primarie** che derivano direttamente da **tessuti animali** (specialmente **umani**).

Durante il corso verranno utilizzate solo linee cellulari provenienti da banche e certificate per l'assenza di patogeni.

Tuttavia, è buona norma apprendere subito come lavorare in sicurezza:

- usare **SEMPRE** i **guanti**
- dopo l'uso gettare **SEMPRE** tutto il materiale entrato in contatto con le cellule nei **contenitori dei rifiuti biologici per la sterilizzazione**

# OSSERVAZIONE DI CELLULE IN COLTURA: DIVERSI TIPI DI MICROSCOPIA



Courtesy of T. Howard, Cold Spring Harbor. Noncommercial, educational use only.

## OSSERVAZIONE DI CELLULE IN COLTURA: MICROSCOPI

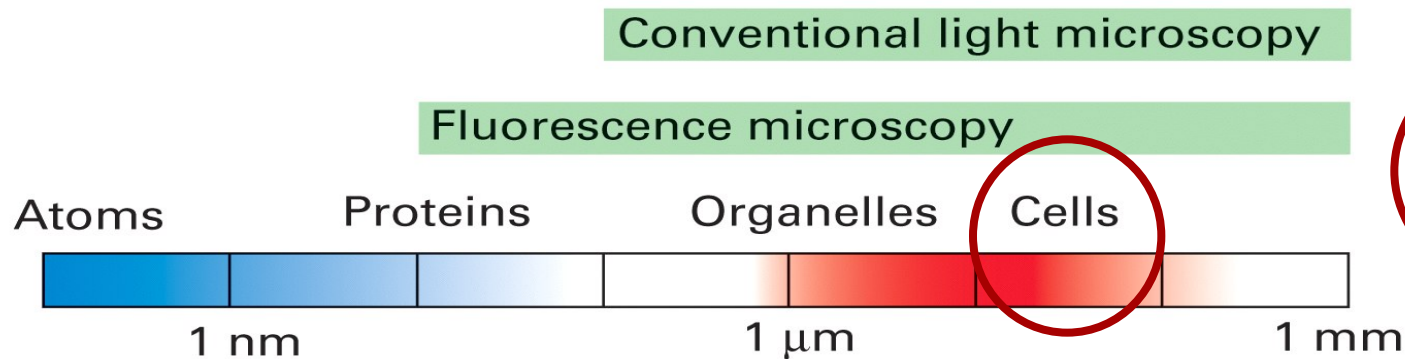


**INGRANDIMENTO:** prodotto dell'ingrandimento delle singole lenti utilizzate nel percorso ottico (obiettivo x oculare)

**POTERE di RISOLUZIONE:** capacità di distinguere 2 punti vicini

INVERSAMENTE proporzionale alla **lunghezza d'onda della luce** utilizzata per illuminare il campione = **LIMITE** di risoluzione del microscopio!

MICROSCOPIO OTTICO (luce visibile) < MICROSCOPIO UV < MICROSCOPIO ELETTRONICO



cellule di  
mammifero:  
**10-100 micron**

Transmission electron microscopy

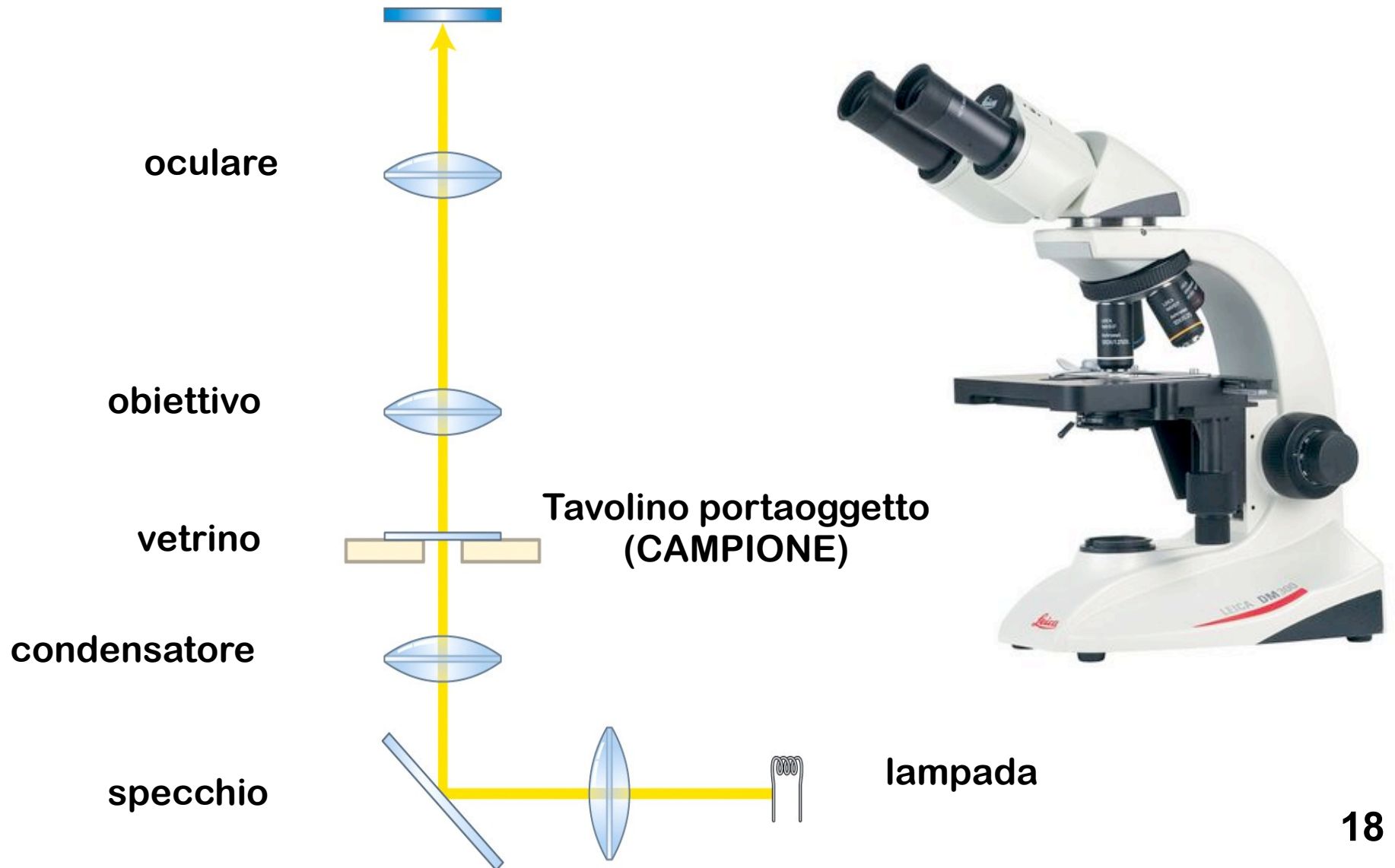
Scanning electron microscopy



## MICROSCOPIO OTTICO

- Utilizza la **LUCE VISIBILE** per illuminare il campione.
- Il **potere di risoluzione massimo** ottenibile e' di **0,2 micron**
- il preparato e' posto su un **TAVOLINO** mobile ed e' illuminato da un fascio di luce incidente che, dopo aver attraversato il campione, passa attraverso **due sistemi di lenti** di ingrandimento, l'**OBIETTIVO** e l'**OCULARE**.
- Normalmente, l'**oculare** e' a ingrandimento fisso (**10x**), mentre l'**obiettivo** e' a ingrandimento variabile (**4-10-20-40x**)
- La **messa a fuoco** si ottiene spostando il sistema obiettivo/oculare rispetto all'oggetto

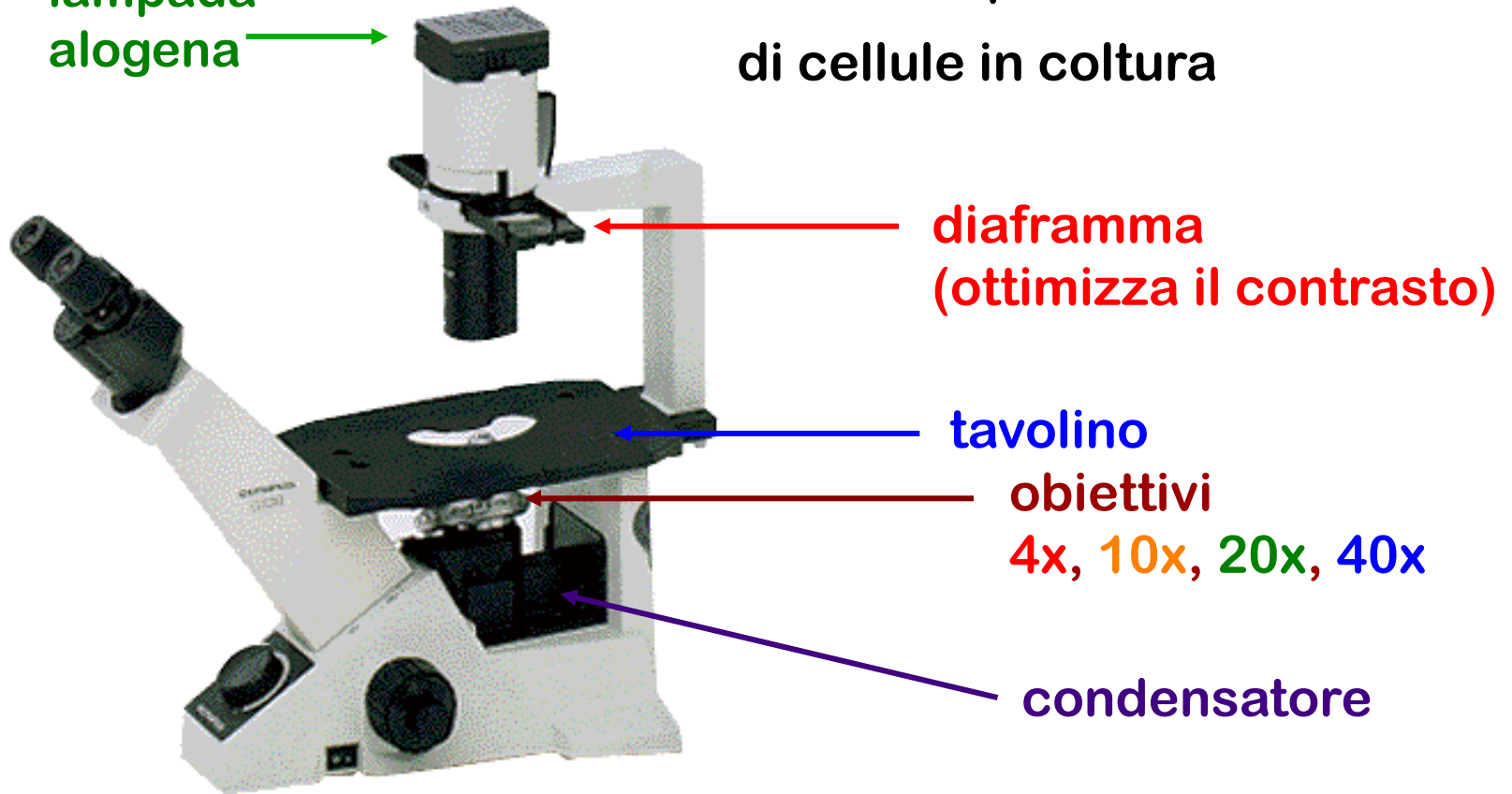
# Cammino ottico del MICROSCOPIO OTTICO DIRITTO (microscopio da istologia)



# MICROSCOPIO ROVESCiato

lampada  
alogenata

Utilizzato per l'osservazione  
di cellule in coltura



in cui l'**illuminazione** proviene dall'**alto**

e gli **obiettivi** sono posti al di **sotto del tavolino** portaoggetto

## OSSERVAZIONE:

- **a fresco** (cellule vive, in terreno di coltura)

la capacità di osservazione è limitata dalle piccole differenze tra gli **indici di rifrazione** dei diversi componenti cellulari

- **dopo fissazione**

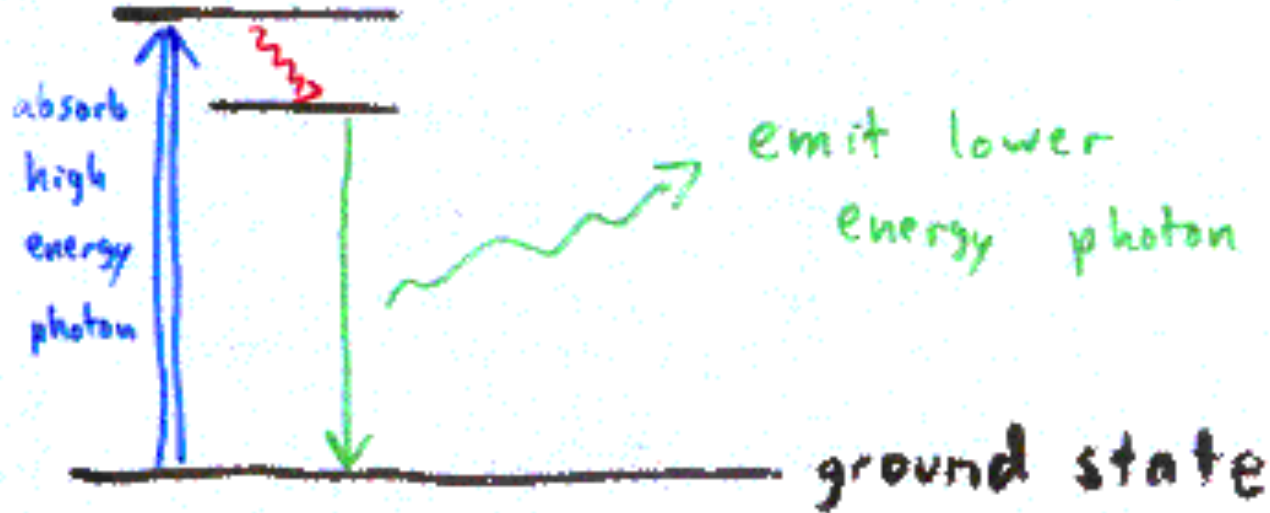
le cellule si disidratano con alcoli (metanolo-acetone)

o si usano aldeidi (formaldeide, glutaraldeide) per formare legami covalenti tra le proteine e gli acidi nucleici e disidratare il campione

Per aumentare il contrasto tra le diverse parti del preparato o i diversi organelli cellulari si può **colorare il campione**.

# **MICROSCOPIA A FLUORESCENZA**

# FLUORESCENZA

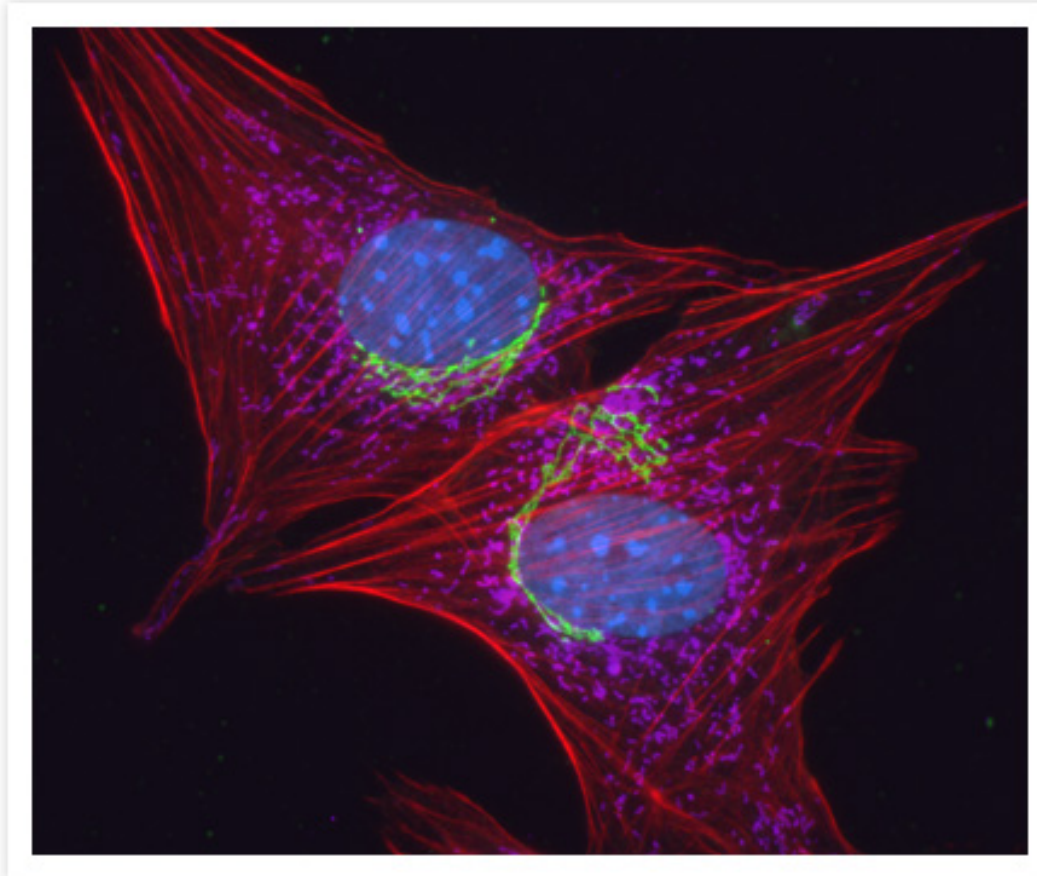


Alcune molecole, dopo **assorbimento** di luce ad una data lunghezza d'onda  
( $\lambda$  eccitazione)

hanno la proprietà di **emettere** luce a lunghezza d'onda superiore  
( $\lambda$  emissione)

Tale proprietà è nota come **fluorescenza**.

È **necessario** colorare il campione con **sostanze fluorescenti** che hanno affinità per **specifiche componenti cellulari**



NIH 3T3  
linea di  
fibroblasti murini

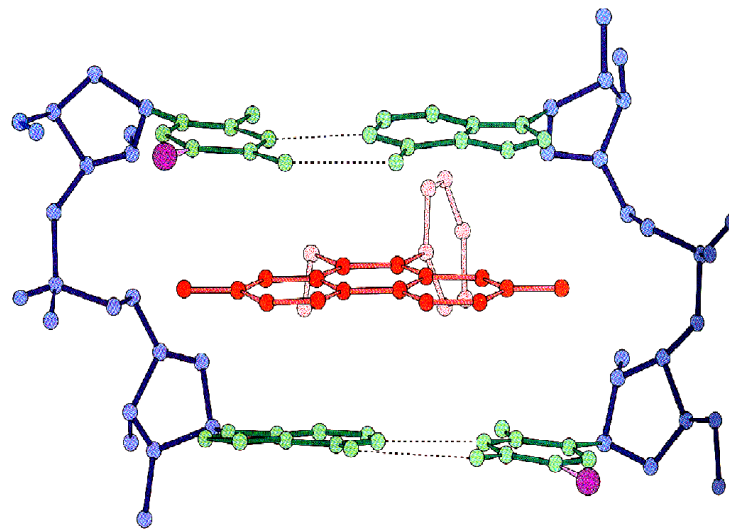
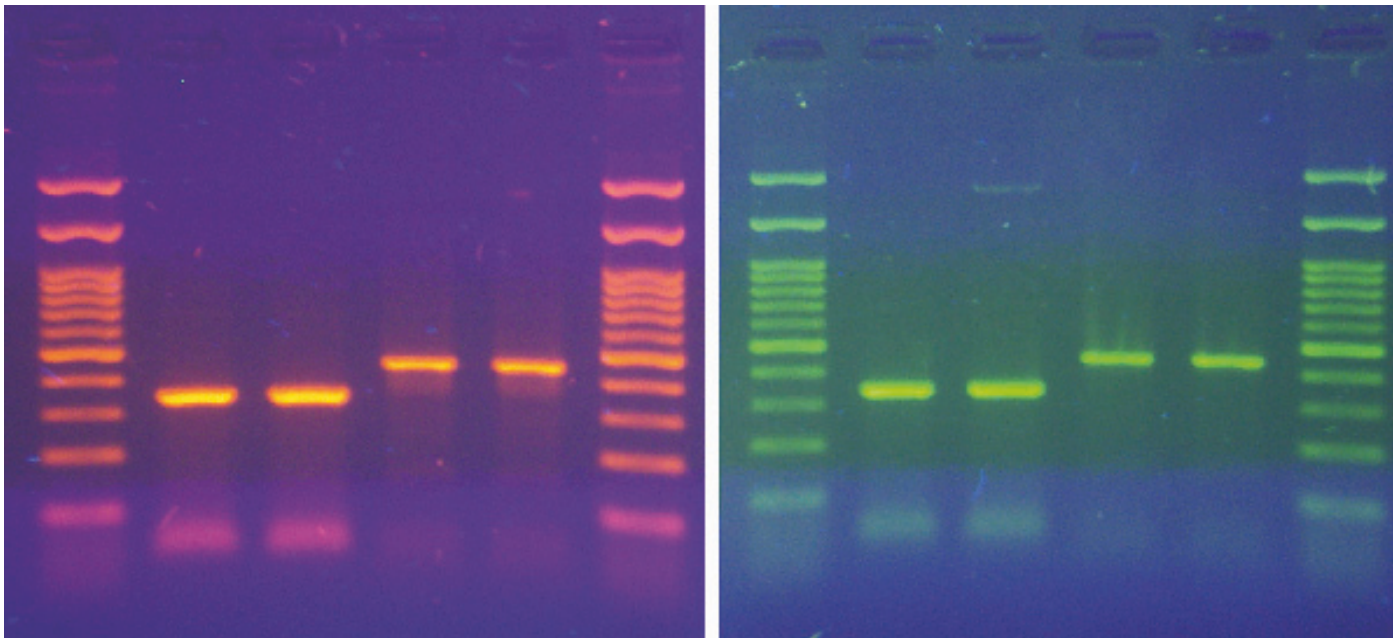
I Nuclei sono colorati con DAPI o HOECHST (intercalanti del DNA -fluorescenza blu).

II CITOSCHELETRO con falloidina-(lega l'F actina)- fluorescente nel rosso

I MITOCONDRI con un colorante che emette fluorescenza rosa quando è ossidato

II GOLGI con una lectina (lega oligosaccaridi) coniugata ad un fluorocromo verde

## Molecole fluorescenti intercalanti il DNA





# Coloranti fluorescenti comunemente utilizzati in microscopia

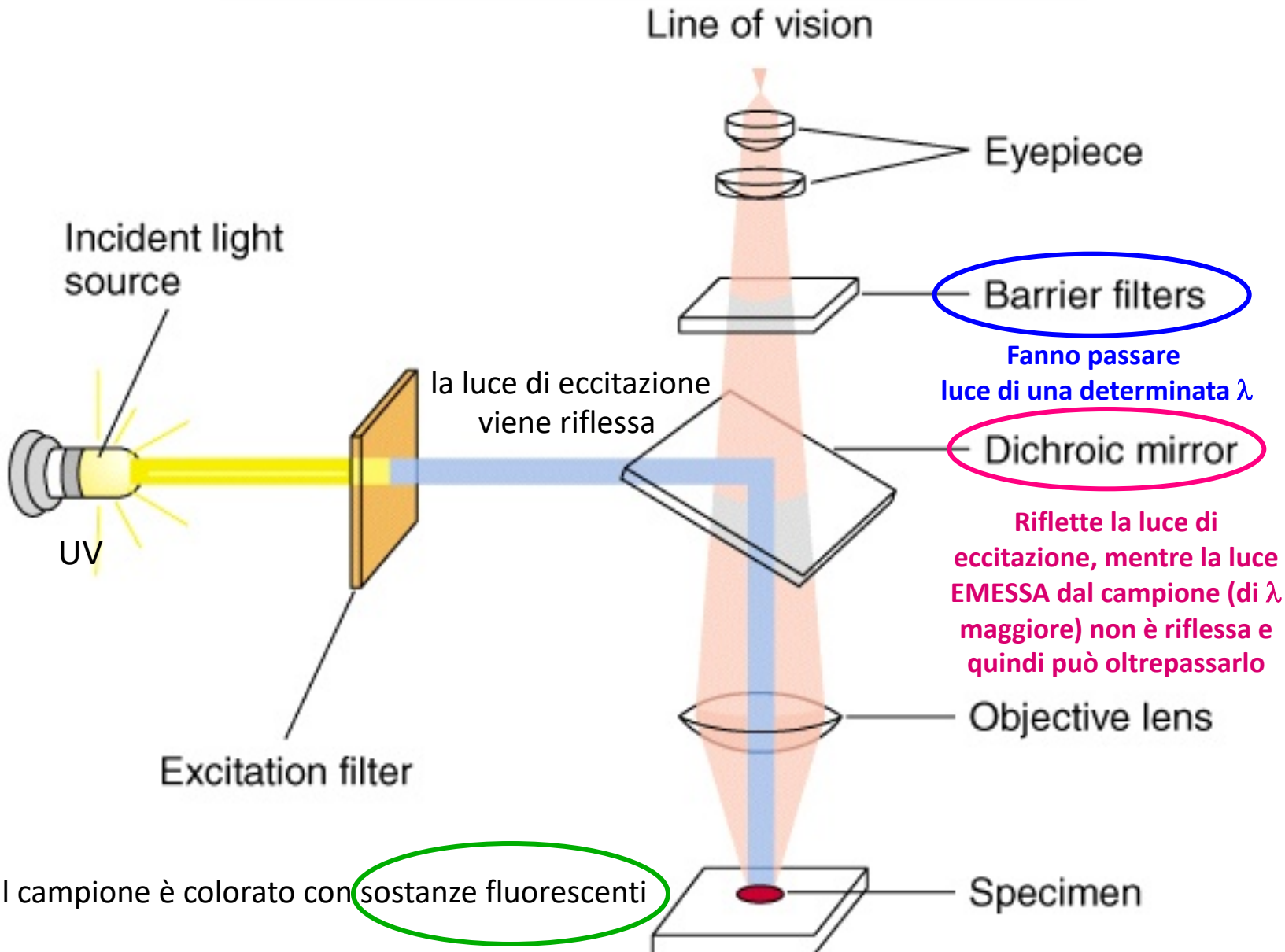


Catalog Code	Description	MW	Excitation (nm)	Emission (nm)	Purpose
890	Certified Blank™				reference
897	Acridine Orange	265	500	526	DNA/RNA
886	Alexa Fluor® 488	643	499	519	conjugate
887	Alexa Fluor® 647	1300	652	668	conjugate
901	Allophycocyanine (APC)	104k	650	660	conjugate
914	APC-Cy™7	104k	650	767	conjugate
898	Chlorophyll ( <i>a + b</i> )	8014 (a) 907 (b)	430,453	642,662	plant pigment
895	Cy™5	792	649	666	conjugate
906	DAPI	277	350	470	DNA (A-T)
913	Far-Out Red	-	475,590	663	reference
891	Fluorescein	389	495	519	conjugate
894	Hoechst 33342	616	346	375,390	dsDNA
916	Pacific Blue™	339	410	455	conjugate
899	PE (R-Phycoerythrin)	240k	480, 565	578	conjugate
908	PE-Cy™5	240k	480,565,650	670	conjugate
889	PE-Cy™7	240k	480	767	conjugate
909	PE-TR	240k	480,565,650	670	conjugate
892	Propidium Iodide	668	536	617	DNA intercalator
905	T.M. Rhodamine (TRITC, TAMRA)	430	557	576	conjugate
893	Texas Red® (Sulforhodamine)	625	589	615	conjugate
915	Violet Laser (Glacial Blue)	-	360	450	reference

## MICROSCOPIO A EPIFLUORESCENZA

- permette di visualizzare **LUCE DI FLUORESCENZA emessa** dal campione
- la **luce incidente e' UV/visibile**: il potere di risoluzione è di 10 nm
- **l'ingrandimento** ottenibile e' **fino a 1000 x**  
(normalmente 10X per l'oculare e fino a 100X per l'obiettivo)
- Il **campione dev'essere autofluorescente oppure colorato con sostanze fluorescenti**  
(che assorbono luce ad una data lunghezza d'onda e la emettono ad una lunghezza d'onda maggiore)
- solo **la luce** di fluorescenza **EMESSA** dal campione è usata per **formare l'immagine**, mentre la luce di eccitazione è schermata da opportuni filtri

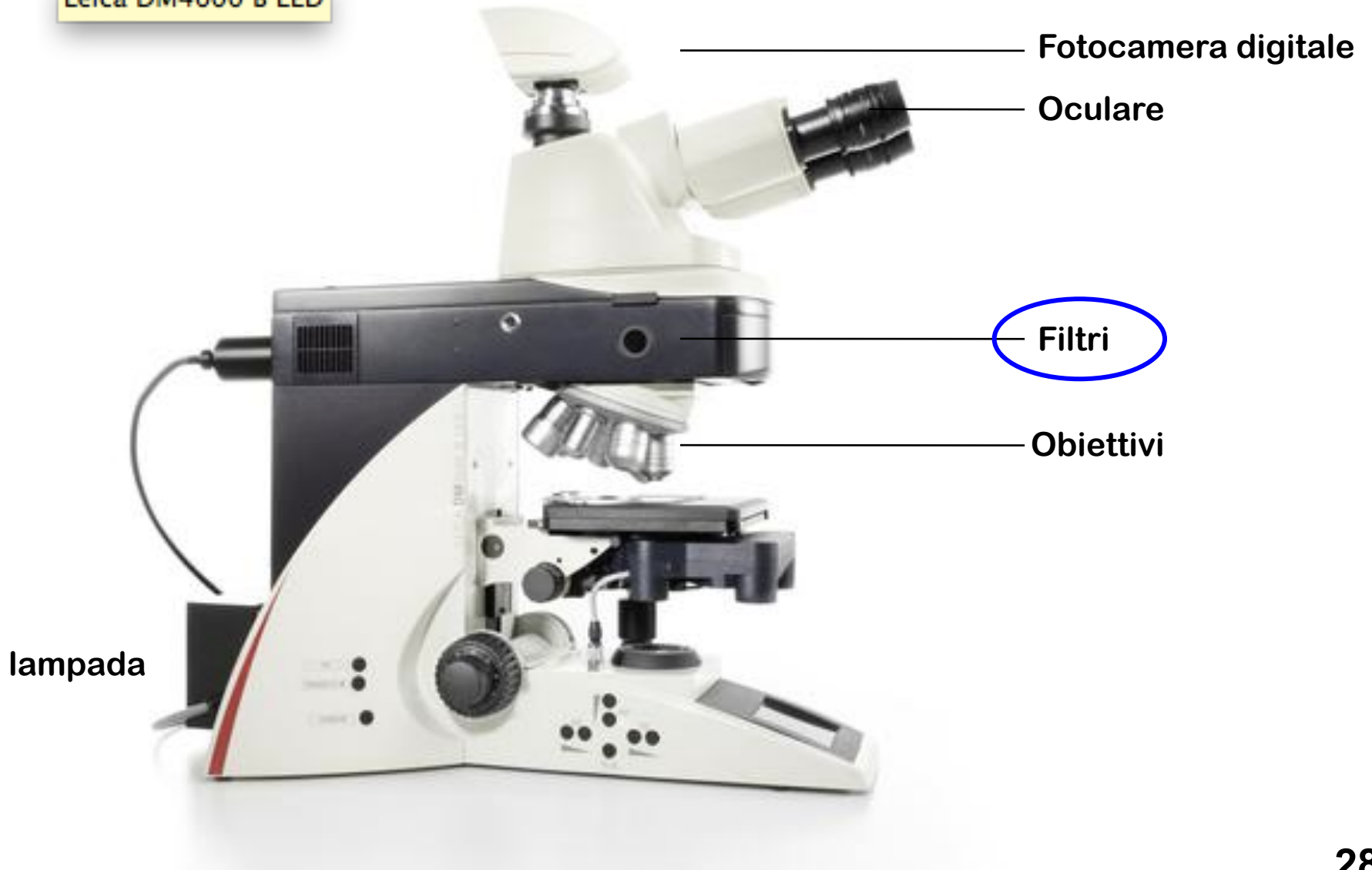
# MICROSCOPIO A EPIFLUORESCENZA



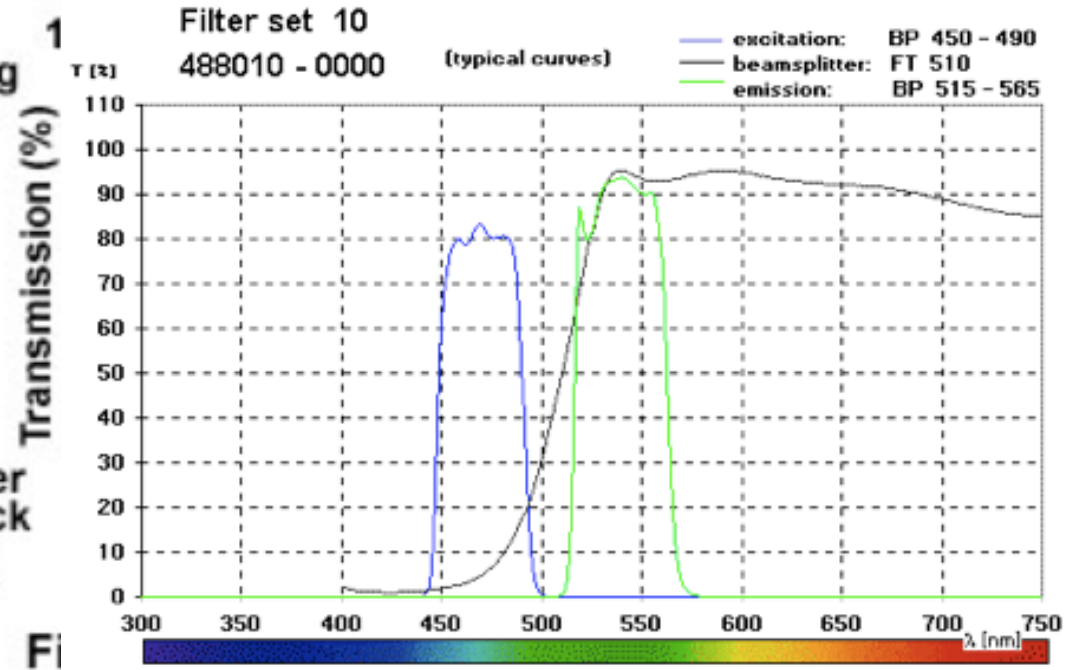
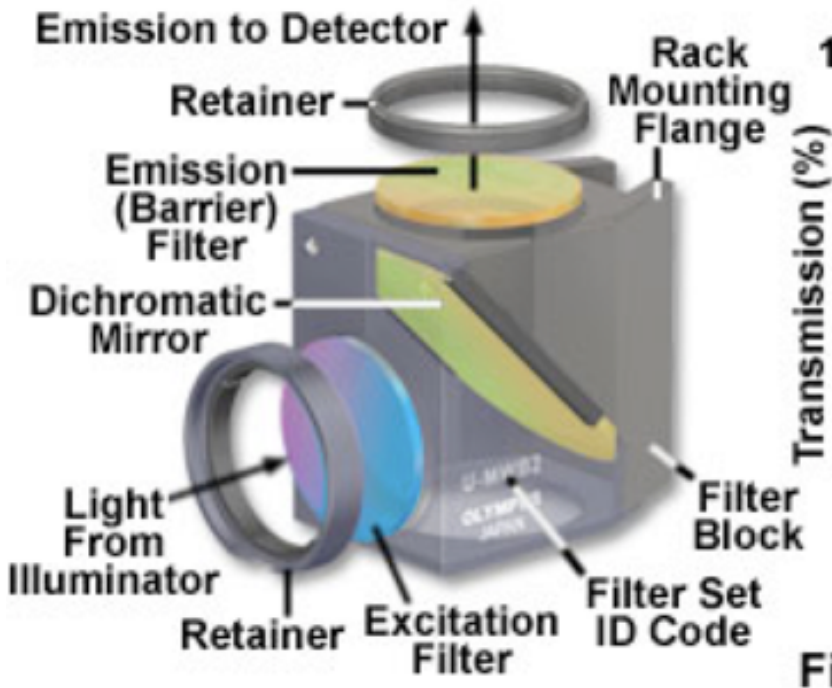
Il campione è colorato con **sostanze fluorescenti**

# MICROSCOPIO A EPIFLUORESCENZA

Leica DM4000 B LED



# Fluorescence Filter Cube (Block) and Associated Spectra



## Combinazione A:

filtro d'eccitazione 340-380/ lamina dicromatica 400/ filtro di sbarramento 430

## Combinazione I3:

filtro d'eccitazione 450-490/ lamina dicromatica 510 / filtro di sbarramento 515

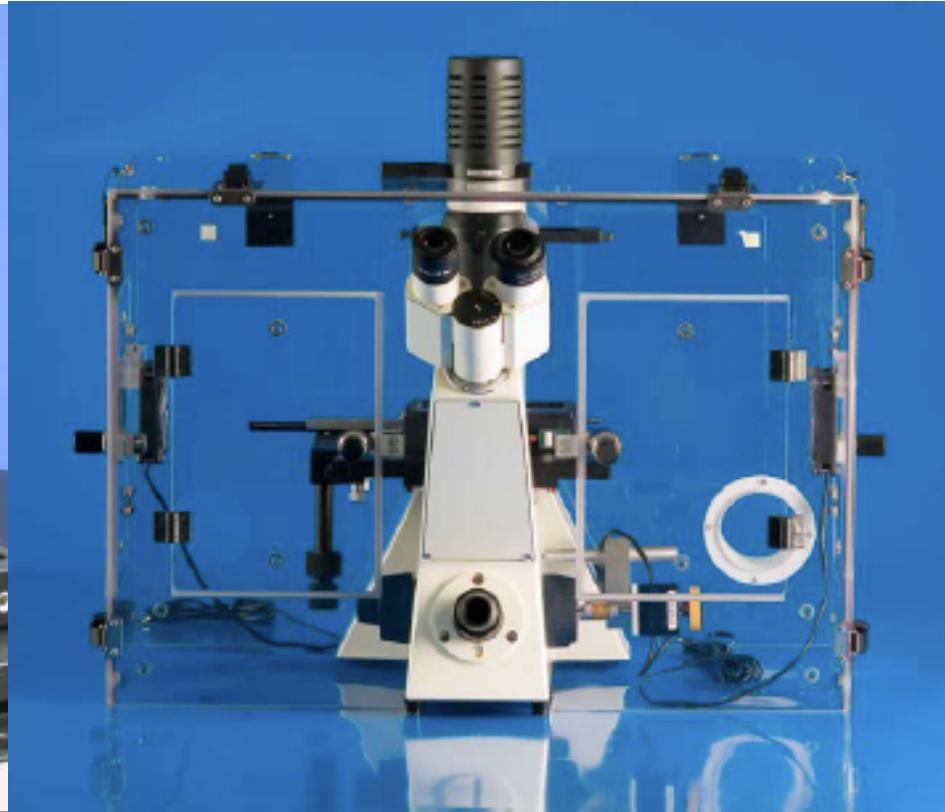
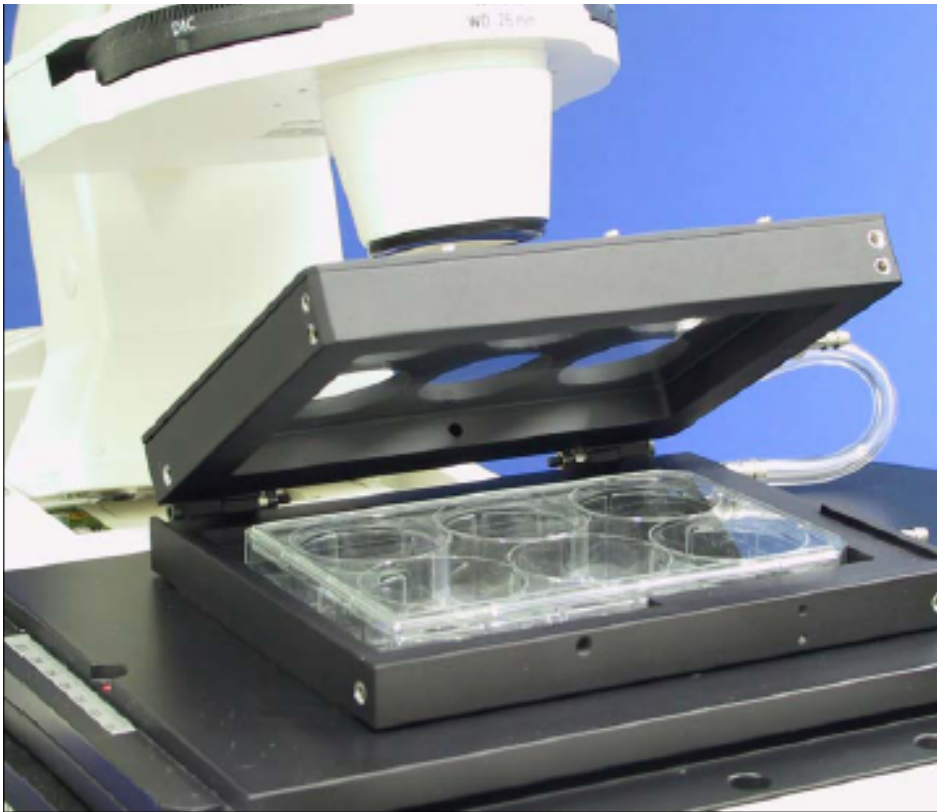
## Combinazione N2.1:

filtro d'eccitazione 515-560/ lamina dicromatica 580/ filtro di sbarramento 590

# LIVE CELL IMAGING: MICROSCOPIA TIME-LAPSE

**STAGE**

**CAGE**



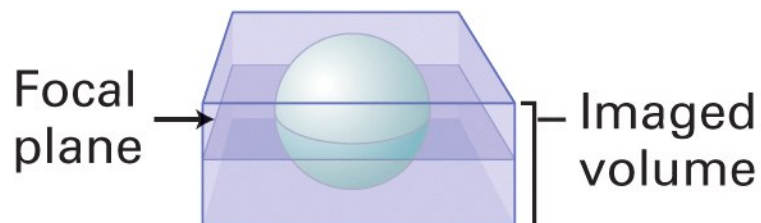
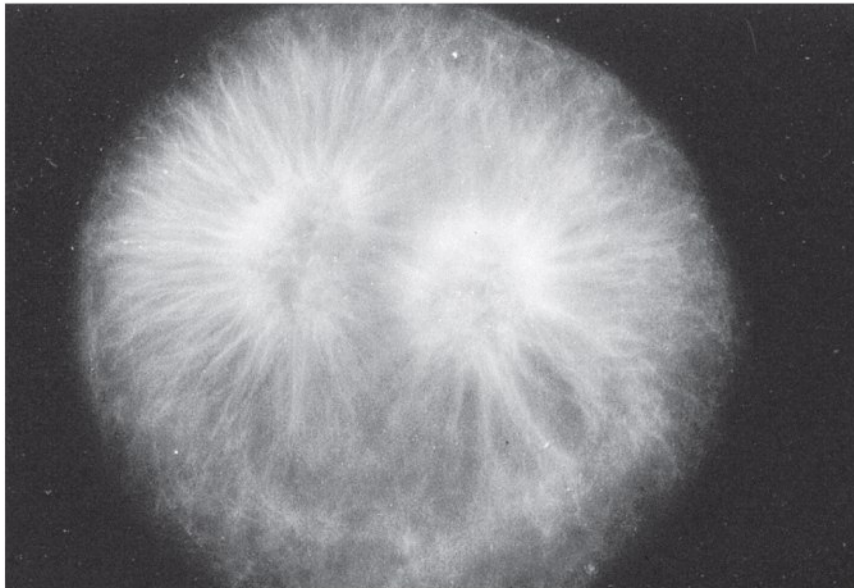
**Link a video**  
**LIVE CELL IMAGING microscopia ottica**  
**cellule in adesione**

<https://www.youtube.com/watch?v=dnXwm6-BBCQ>

# MICROSCOPIA A FLUORESCENZA CONFOCALE

Con un normale microscopio a fluorescenza all'osservatore arriva la luce emessa dalle molecole che stanno nel **piano focale**, ma anche da quelle **sopra e sotto** il piano focale.

(a) Conventional fluorescence microscopy

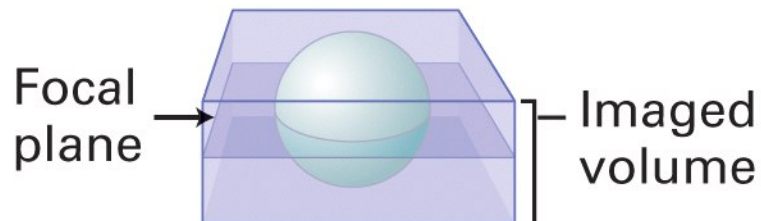
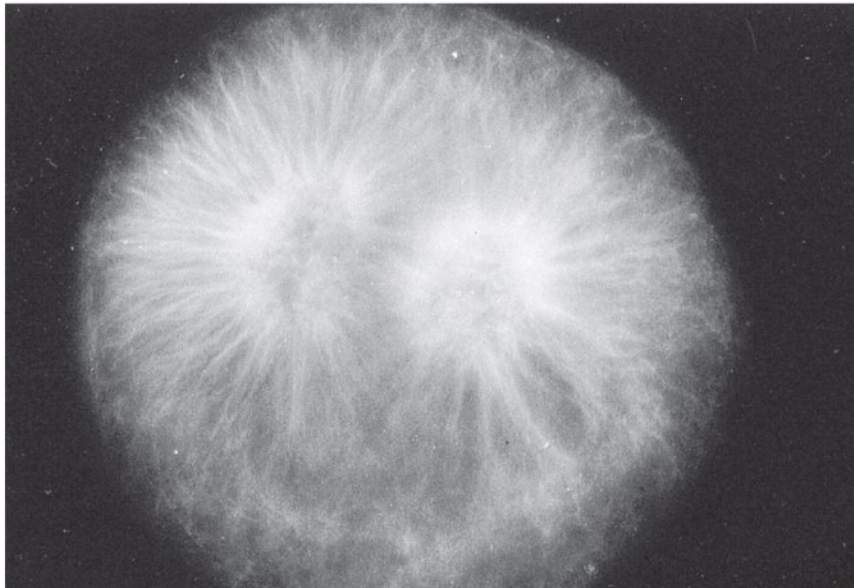




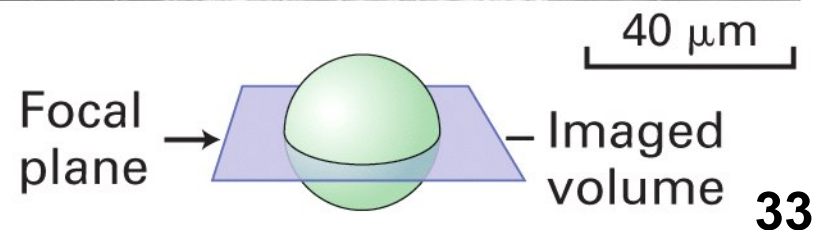
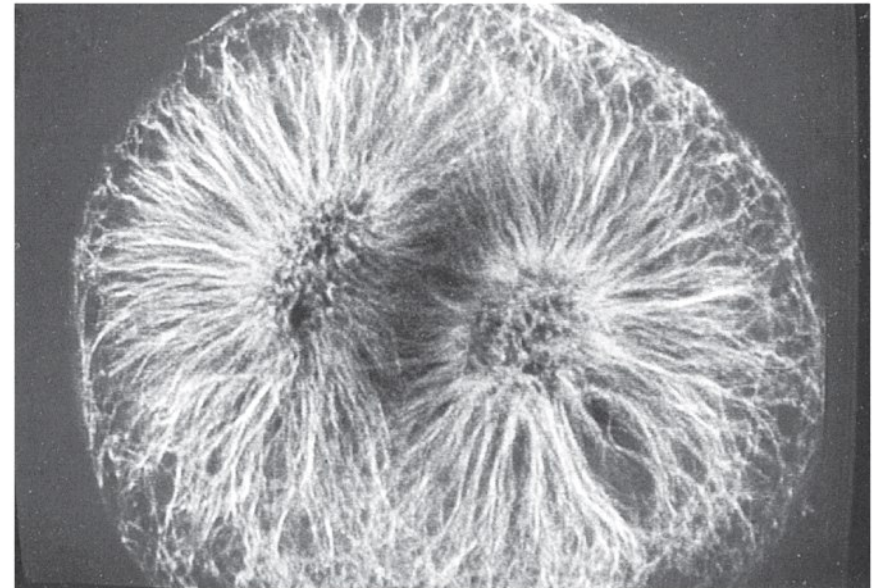
# MICROSCOPIA A FLUORESCENZA CONFOCALE

Con un microscopio a fluorescenza confocale solo la luce EMESSA dal campione che **proviene dal PIANO FOCALE** viene utilizzata per formare l'immagine.

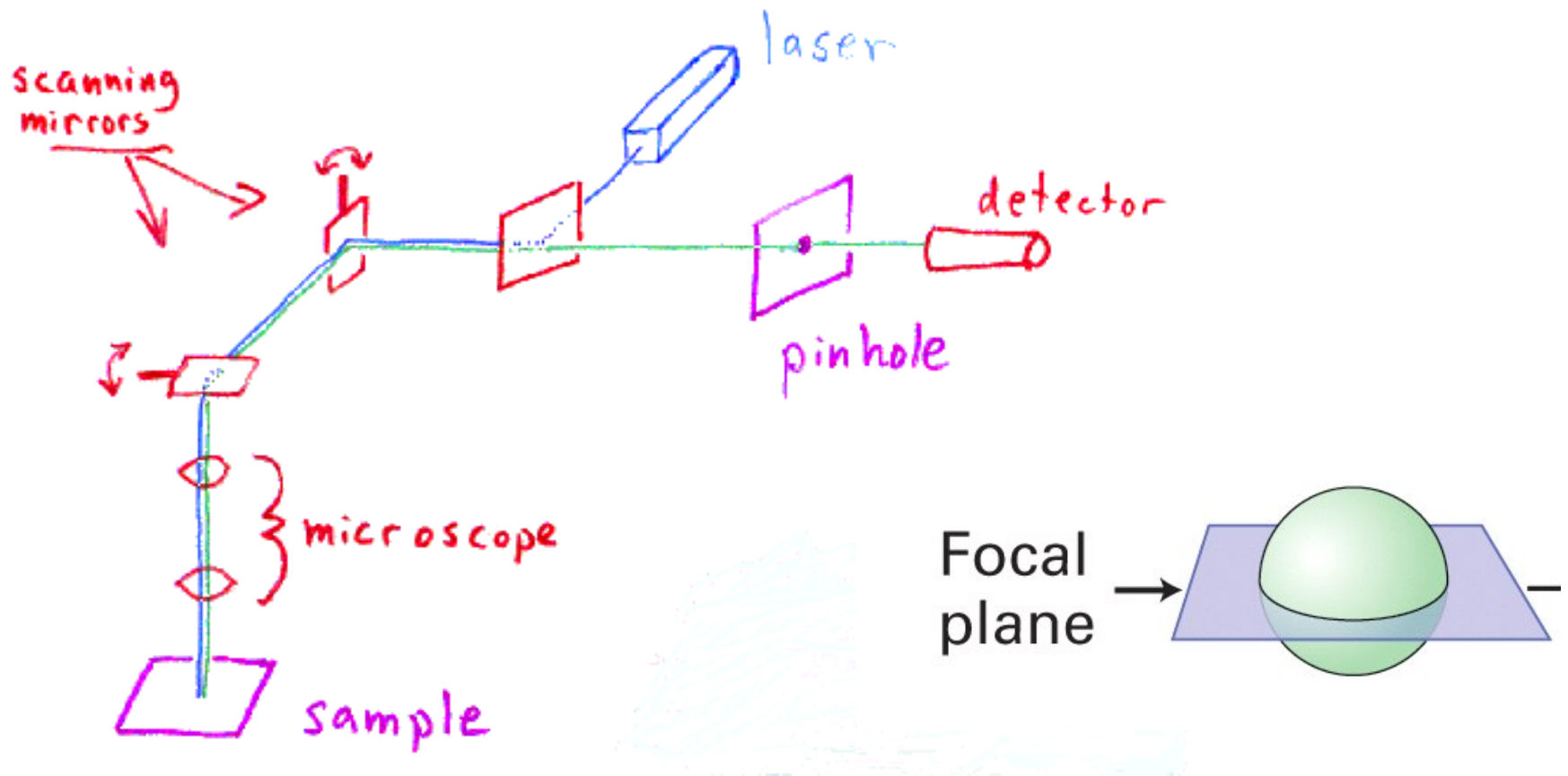
(a) Conventional fluorescence microscopy



(b) Confocal fluorescence microscopy



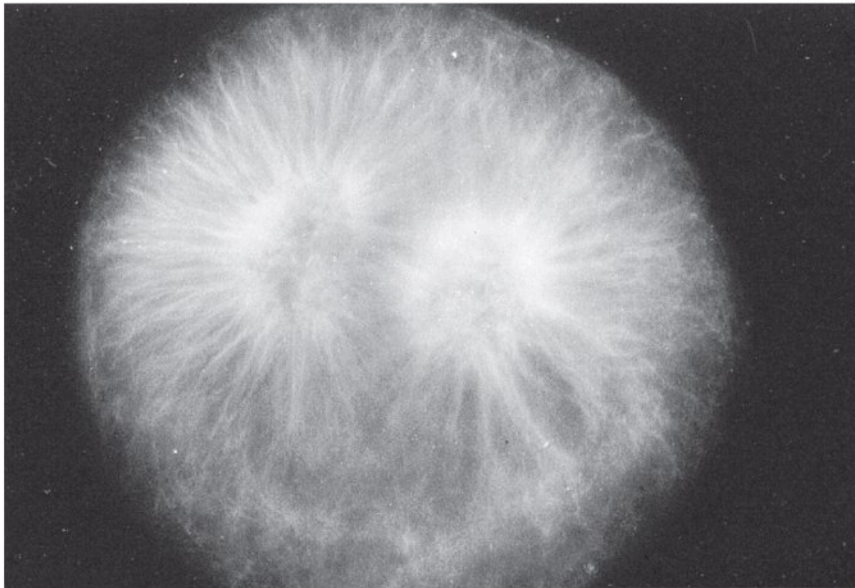
Nel **microscopio confocale** la luce **EMESSA** dal campione passa attraverso un **“pinhole”** che elimina la luce **“fuori fuoco”**, cioè che non proviene dal **PIANO FOCALE**.



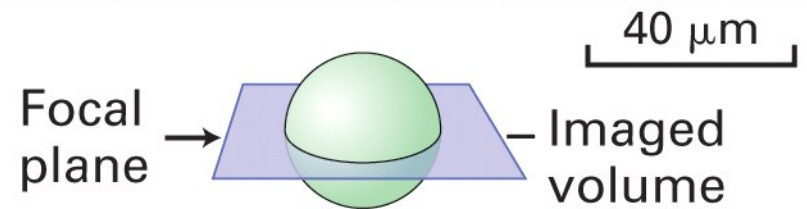
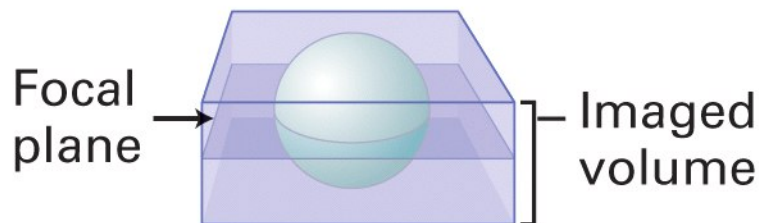
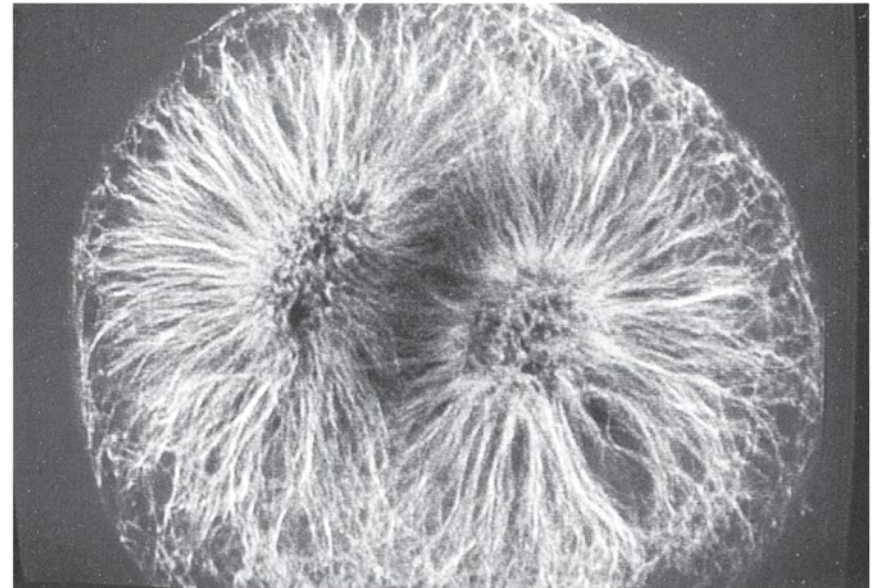
## Microscopio confocale a scansione:

Le immagini emesse dopo eccitazione di diversi punti del campione sono immagazzinate ed elaborate al computer: l'immagine ottenuta è bidimensionale = sezione confocale di un oggetto tridimensionale ed è molto più definita.

(a) Conventional fluorescence microscopy

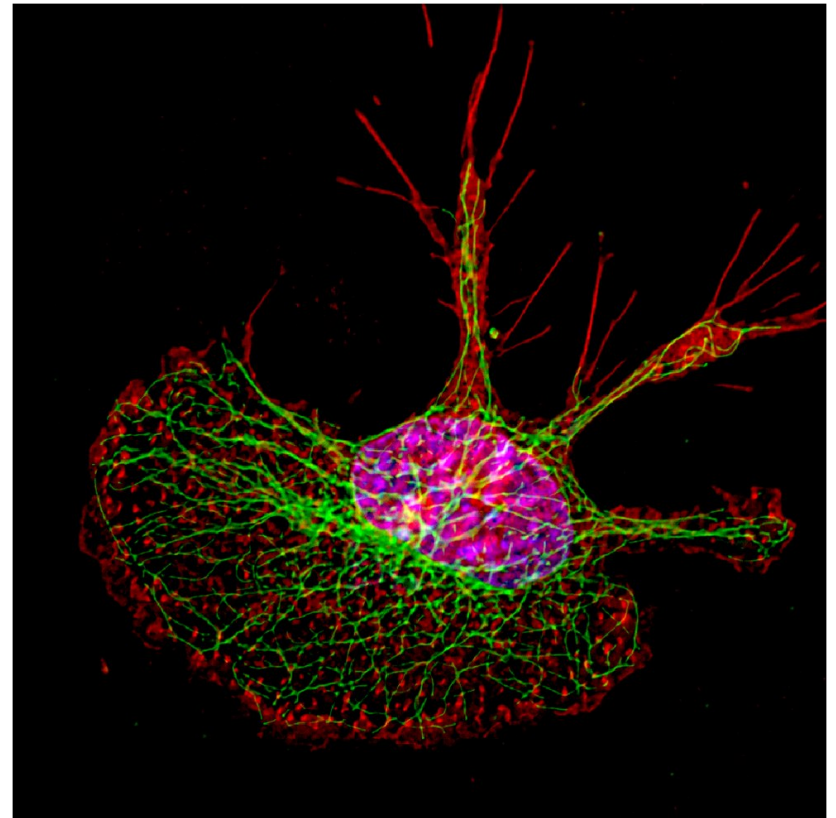
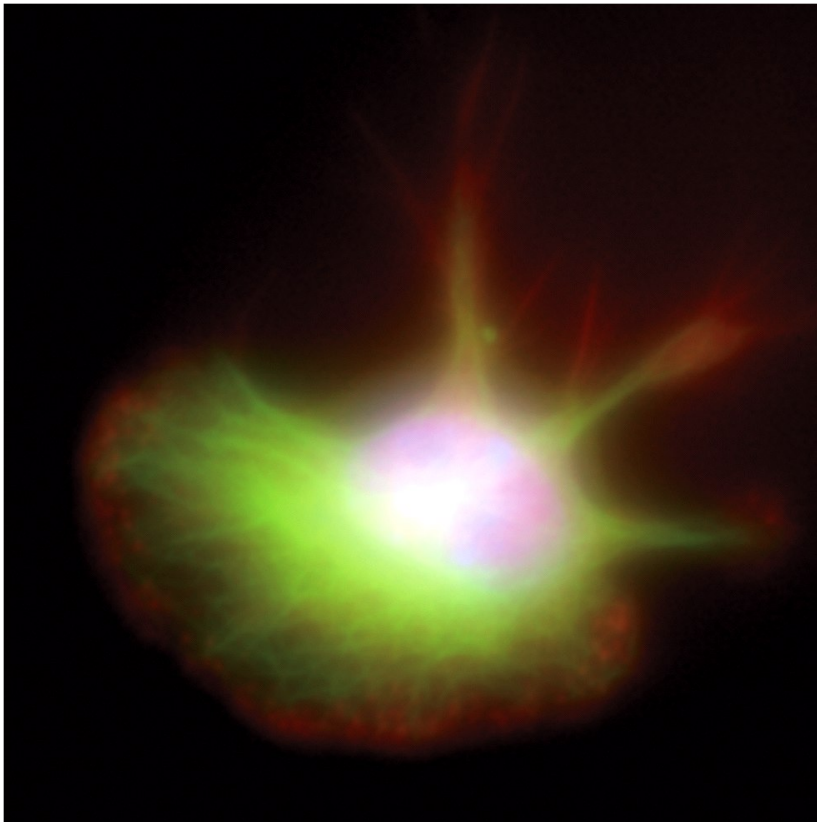


(b) Confocal fluorescence microscopy

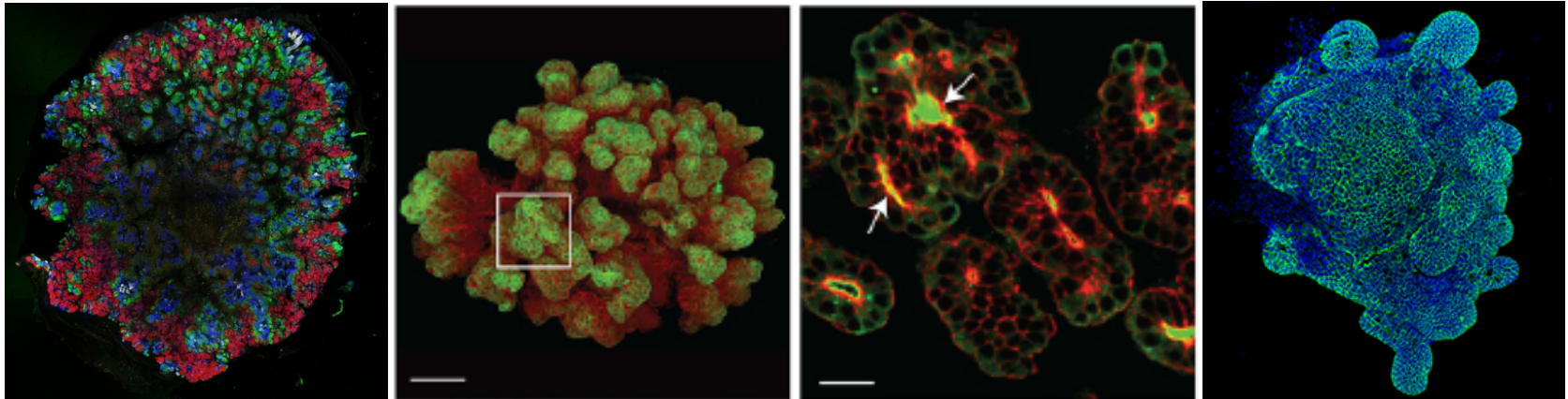


## Microscopio a deconvoluzione:

L'obiettivo riceve la luce sia dal piano focale che da altri piani. Un computer ricostruisce l'immagine (2D o 3D) riassegnando alla luce il corretto piano focale mediante un algoritmo di deconvoluzione, che migliora il potere di risoluzione.

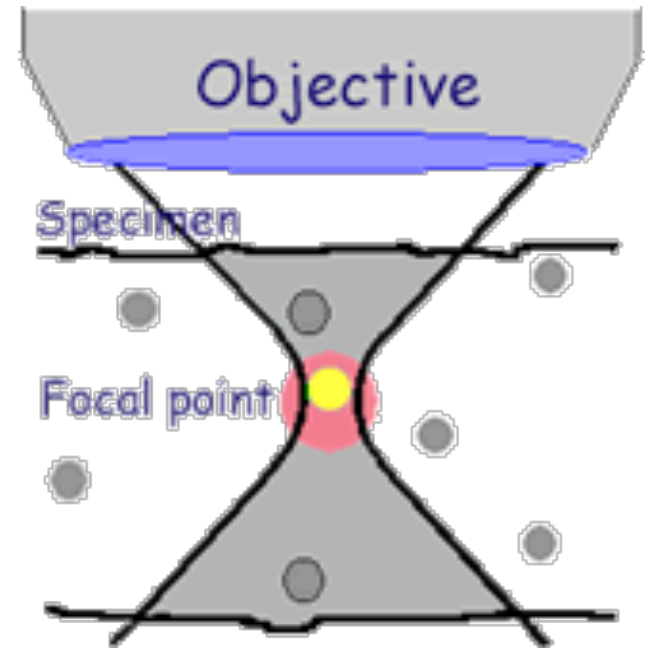
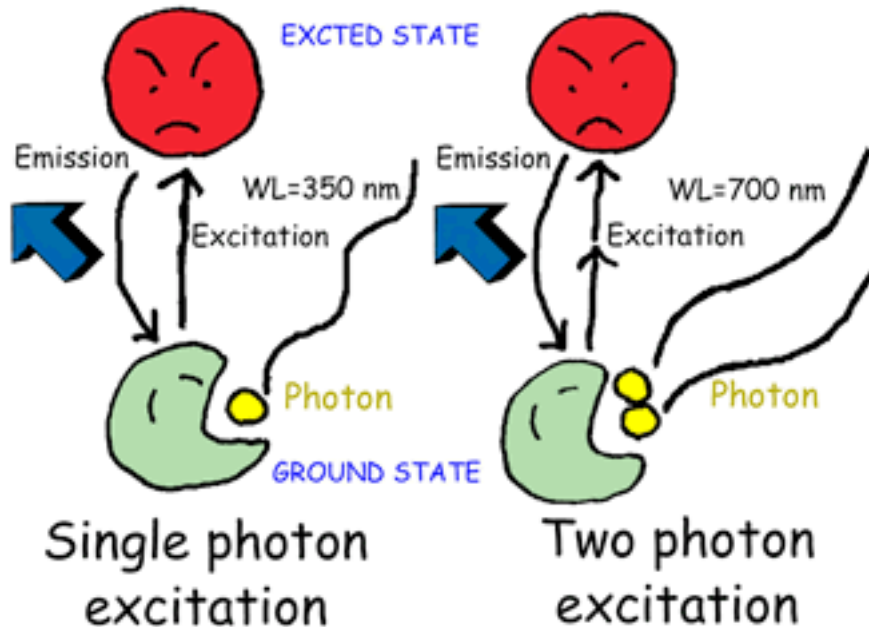


## Ricostruzioni 3D mediante microscopia a deconvoluzione:



# MICROSCOPIA A 2 FOTONI

## 2-photon excitation microscopy



Eccitazione mediante assorbimento simultaneo di due fotoni nell'infrarosso (800-900 nm): più lunga della luce emessa!

La luce IR assicura un'elevata penetrabilità nei tessuti di organismi viventi e un limitato scattering!

