**ESERCITAZIONE: Saggio di migrazione**

**Giorno 1**

**MATERIALE:**

Cappa a flusso laminare, incubatore per colture cellulari, centrifuga, microscopio rovesciato, PBS, DMEM completo, tripsina/EDTA, cameretta contacellule Neubauer, Piastra Multi-well 24 pozzetti, inserti (con pori di diametro 8 µm), plasticheria sterile.

**PROCEDIMENTO:**

Ogni gruppo esaminerà la capacità di migrazione di cellule epiteliali (linea cellulare tumorale di mammella) nelle seguenti condizioni:

* A) Cellule trasfettate con vettore di controllo
* B) Cellule trasfettate con vettore per la sovraespressione della forma nucleare del fattore di trascrizione SREBP1;
* C) come B) ma con inibizione dell’attività enzimatica di SCD1.

1. Indossare camice e guanti puliti. Aprire la cappa a flusso laminare ed attendere che il flusso vada a regime. Mettere sotto cappa tutto il materiale necessario, asciugando le bottiglie e pulendone il collo con alcol.
2. Lavorare a gruppi di tre (punti sperimentali A, B, C). Prelevare dall’incubatore il piatto (di 10 cm di diametro) contenente le cellule, **OSSERVARE** la vitalità, la morfologia e il grado di confluenza delle cellule al **MICROSCOPIO**.
3. **LAVARE LE CELLULE PER ELIMINARE GLI INIBITORI DELLA TRIPSINA**. Sotto cappa rimuovere il terreno dalla petri con una pipetta sterile, poi mettere nel piatto 7 ml di PBS sterile e rimuovere via il terreno rimasto.
4. **STACCARE LE CELLULE CON LA TRIPSINA**: Rimuovere il PBS e mettere nella petri 2 ml di tripsina/EDTA. Rimettere il piatto nell’incubatore e attendere 5 minuti.
5. **NEUTRALIZZARE LA TRIPSINA E RECUPERARE LE CELLULE MEDIANTE CENTRIFUGAZIONE**. Mettere nella petri 7 ml di terreno completo in modo da neutralizzare la tripsina. Risospendere bene le cellule spipettando senza fare schiuma. Trasferire la sospensione cellulare in Falcon da 15 ml. Centrifugare 5 minuti a 1000 rpm.
6. Aspirare il surnatante e risospendere DELICATAMENTE il pellet di cellule in terreno senza siero. Mettere nella provetta 10 ml di terreno fresco e risospendere spipettando.
7. **CONTARE LE CELLULE**. Trasferire una goccia della sospensione cellulare nell’emocitometro e procedere alla conta sotto al microscopio ottico.
8. **DILUIRE LE CELLULE**. Diluire le cellule ad una concentrazione di 50.000 cell/ml.
9. **SEMINARE LE CELLULE NELL’INSERTO**.
10. Lavorare in gruppi da 3. Collocare gli inserti in uno dei pozzetti scelti di una Multi-well da 24 e aggiungere **1 ml** della sospensione cellulare utilizzando una pipetta Gilson da 1000.
11. Inserire **750 ml** di terreno con siero all’interno del pozzetto della Multi-well da 24, prestando attenzione a non fare bolle.
12. **RIPORRE LE MULTI-WEEL NELL’INCUBATORE**.

**Giorno 2**

**MATERIALE:**

Piastre Multi-well da 24 pozzetti, PBS, H20 distillata, PFA 4% (**ATTENZIONE TOSSICA**), Crystal Violet 0,5%, cotton-fioc, vetrino porta-oggetti e vetrino copri-oggetti, bisturi, pinzette e smalto.

**PROCEDIMENTO:**

1. Lavorare a gruppi di tre (punti sperimentali A, B, C). Prendere le cellule dall’incubatore e osservarle al microscopio.
2. Sul banco preparare (in una piastra multi-well) per ogni inserto due pozzetti con 1 ml di PBS, necessari per i lavaggi.
3. **ELIMINAZIONE DELLE CELLULE NON MIGRATE**. Recuperare l’inserto con le mani (stando molto attenti a non toccare la membrana dove sono presenti le cellule) e SCRIVERE LE PROPRIE INIZIALI PER IDENTIFICARLO; con la P1000 eliminare il terreno all’interno dell’inserto e utilizzando un cotton-fioc imbevuto di PBS rimuovere le cellule non migrate; eseguire questa operazione per due volte.
4. Eseguire due lavaggi in PBS immergendo l’inserto nei due pozzetti precedentemente riempiti di PBS per un paio di secondi. Utilizzare una pinzetta.
5. **FISSAGGIO**. Sotto cappa chimica aggiungere 1 ml di PFA 4% nell’apposita multi-well da 24 che si troverà sotto cappa. Rimuovere con la P1000 eventuali residui di PBS all’interno dell’inserto e immergerlo nel pozzetto contenente PFA 4%. Incubare per 20 minuti a RT.
6. Nel frattempo nella propria Multi-well aggiungere 1 ml di PBS in 2 pozzetti (per ogni inserto).
7. Al termine dei 20 minuti, recuperare il proprio inserto, eliminare l’eccesso di PFA 4% e eseguire (come al punto 4) due lavaggi in PBS.
8. **COLORAZIONE DELLE CELLULE**: In un pozzetto preparare 1 ml di Crystal Violet 0,05%, aggiungerci l’inserto dopo aver rimosso con la P1000 l’eccesso di PBS e lasciare in incubazione 30 minuti a RT.
9. Nel frattempo rimuovere dai pozzetti precedentemente utilizzati il PBS usato per i lavaggi. Riempire con 1 ml di H20 2 nuovi pozzetti (per ogni inserto).
10. Al termine dei 30 minuti prelevare l’inserto, rimuovere l’eccesso di Crystal Violet ed eseguire un primo lavaggio immergendo l’inserto in un pozzetto contenente 1 ml di H20. Prelevare quindi 0,5 ml di H20 con la P1000 e versarli delicatamente all’interno dell’inserto, quindi prelevarli e gettarli. Ripetere un secondo lavaggio immergendo l’inserto nel pozzetto contenente H20.
11. Terminato l’ultimo lavaggio, con la P200 aspirare accuratamente eventuale liquido rimasto, tamponare con della carta assorbente e porre l’inserto in un pozzetto asciutto. Lasciare gli inserti ad asciugare per qualche minuto.
12. **RIMOZIONE DELLA MEMBRANA**. Prelevare l’inserto con le mani e porlo capovolto sul banco. Mentre si tiene fermo l’inserto con una mano, con l’altra separare la membrana dal supporto utilizzando un bisturi.
13. **PREPARAZIONE DEL VETRINO**. Con una pinzetta porre delicatamente la membrana su un vetrino porta-oggetti, ricoprirla con un vetrino copri-oggetto e fissarne i lati con dello smalto. Lasciar asciugare per un paio di minuti, quindi analizzare le membrane al microscopio.
14. **CONTA DELLE CELLULE**. Con l’obbiettivo 40X, contare il numero di cellule migrate (colorate in viola) almeno in 5 quadranti, avendo cura di escludere dall’analisi i bordi delle membrane e le regioni dove le cellule sono distribuite in maniera meno omogenea.