

Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2020-2021

Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

Lezione 2

Generazione

di colture cellulari 2D in vitro

Mantenimento della STERILITÀ

assenza di microorganismi inquinanti = batteri, lieviti, muffe, micoplasmi (archibatteri endocellulari), virus e protozoi.

Microbial Contamination



Bacteria



Fungi

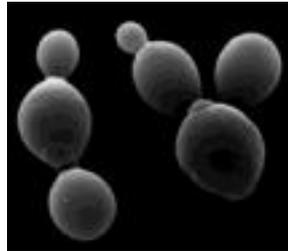


Mycoplasma

Mantenimento della STERILITÀ

assenza di microorganismi inquinanti = batteri, lieviti, muffe, micoplasmi (archibatteri endocellulari), virus e protozoi.

Lieviti

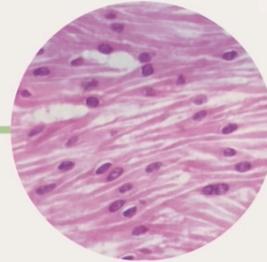


Trattamenti:

- ✓ calore (autoclave, stufa a secco)
- ✓ irraggiamento con lampade germicide (UV, gamma)
- ✓ ultrafiltrazione (membrane a porosità calibrata: 0.4-0.2 μm)
- ✓ manipolazione in atmosfera sterile: cappe a flusso laminare
- ✓ disinfettanti per superfici
- ✓ uso di guanti
- ✓ antibiotici nel terreno di coltura

Colture primarie e linee cellulari stabilizzate

Colture primarie

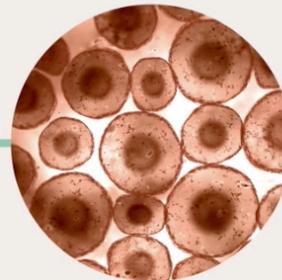


Possono dividersi un numero limitato di volte



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**



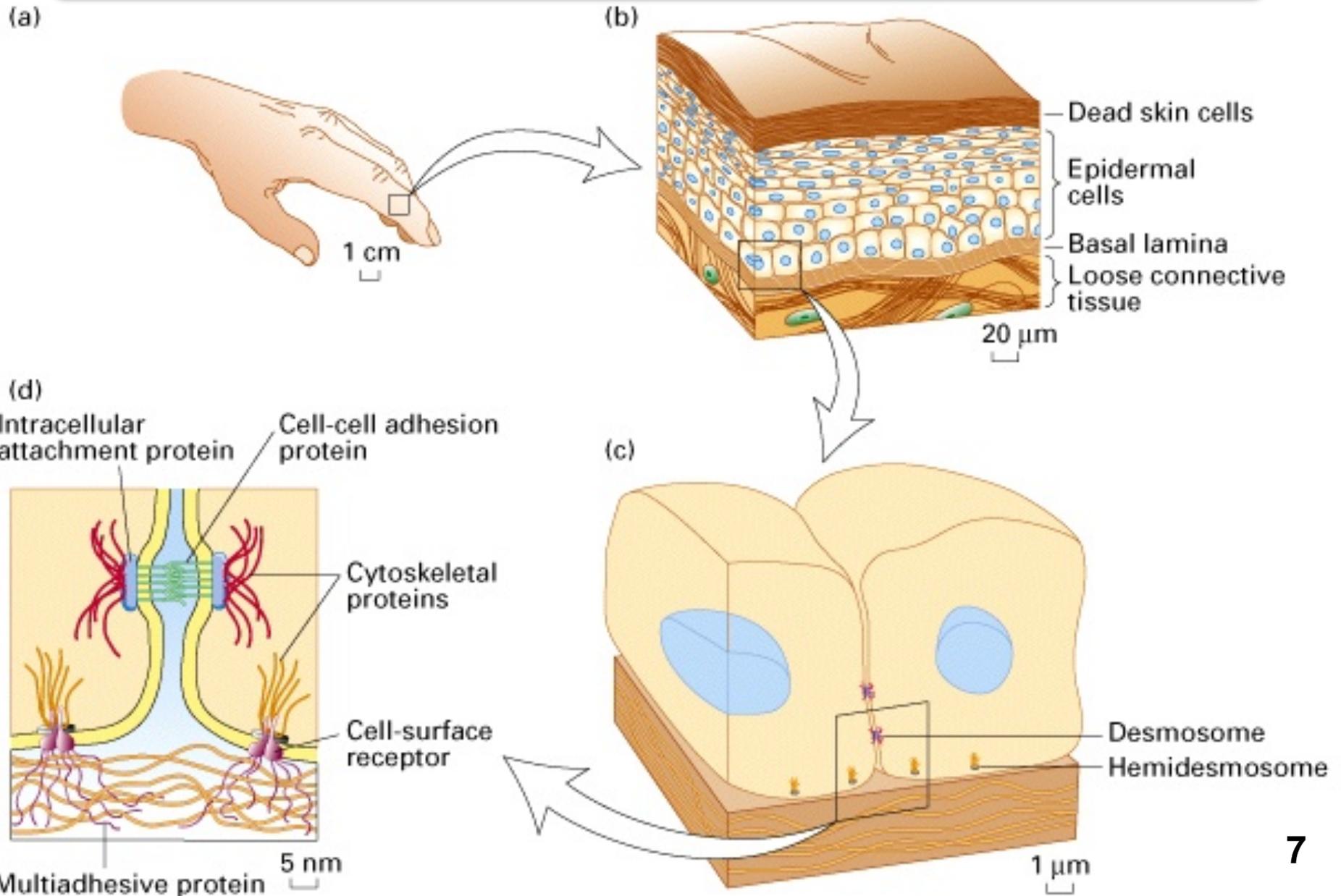
Generazione di una coltura primaria di cellule isolate partendo da un espianto di tessuto

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:



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.

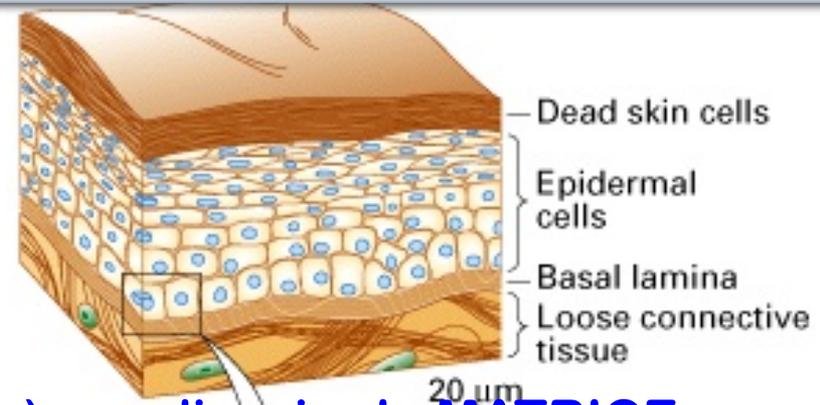
In seguito l'omogeneizzato viene sottoposto a dei trattamenti chimici ed enzimatici, che possono essere effettuati anche utilizzando uno strumento da banco detto dissociatore (slide 7).

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 Ca^{++} e 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)

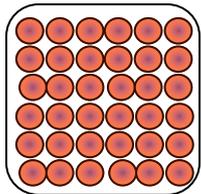
chelanti dei cationi bivalenti (Ca^{2+}) che stabilizzano le giunzioni
cellulari

DISSOCIATORE cellulare da banco

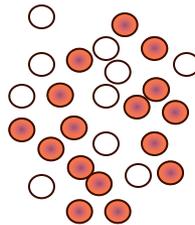


ALLESTIMENTO DI UNA CULTURA CELLULARE

da un tessuto



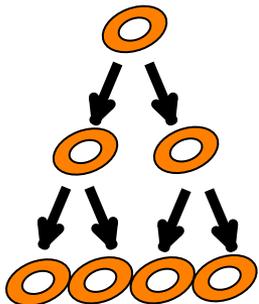
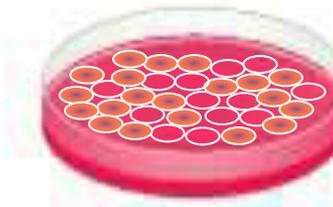
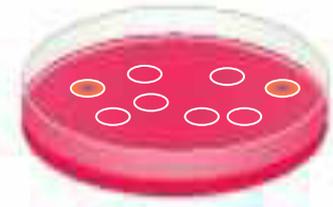
si dissociano singole cellule



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**)

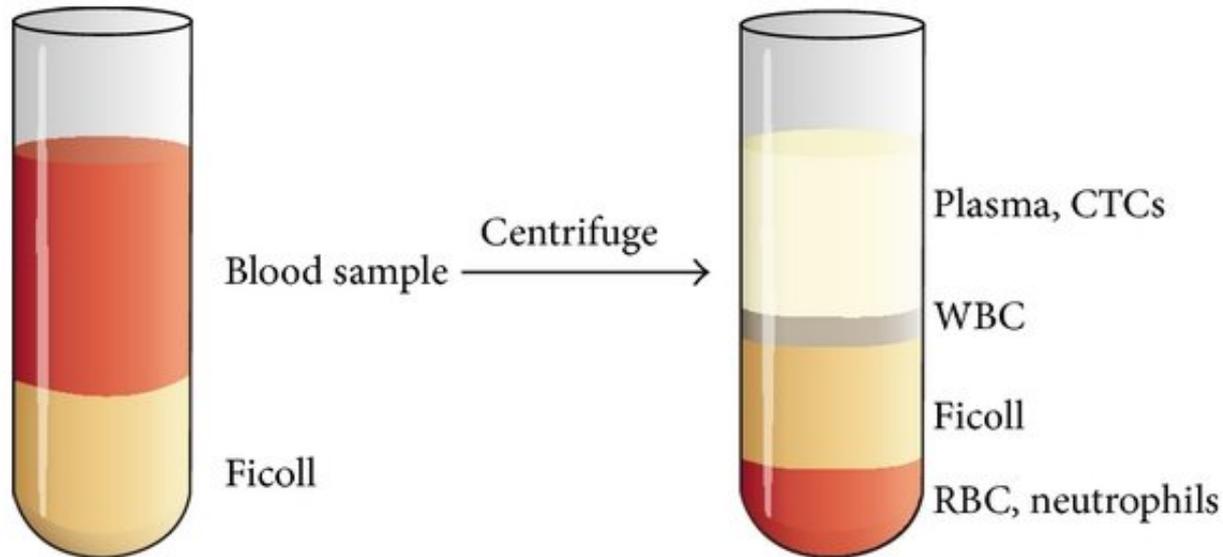
SEPARAZIONE di diverse popolazioni cellulari:



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.

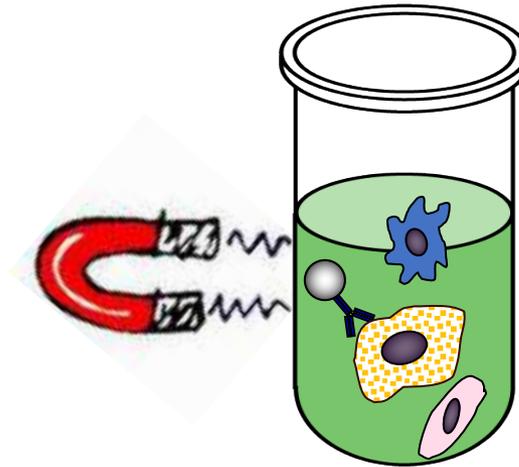
Separazione in base alla densità

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.

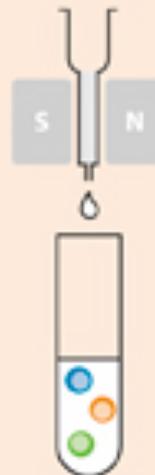
Separazione mediante coniugazione di beads magnetiche a molecole di superficie cellulare



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).

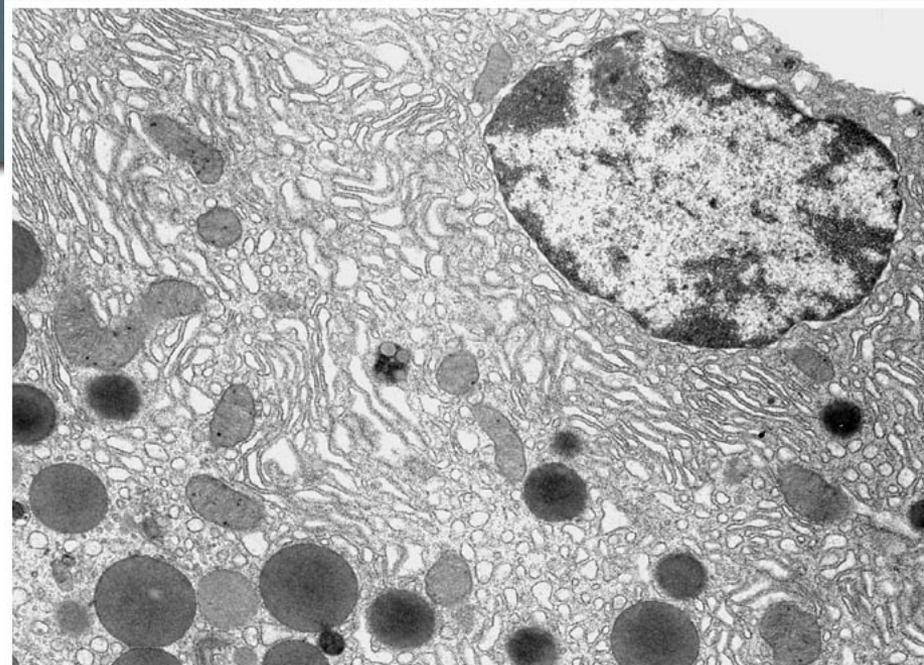
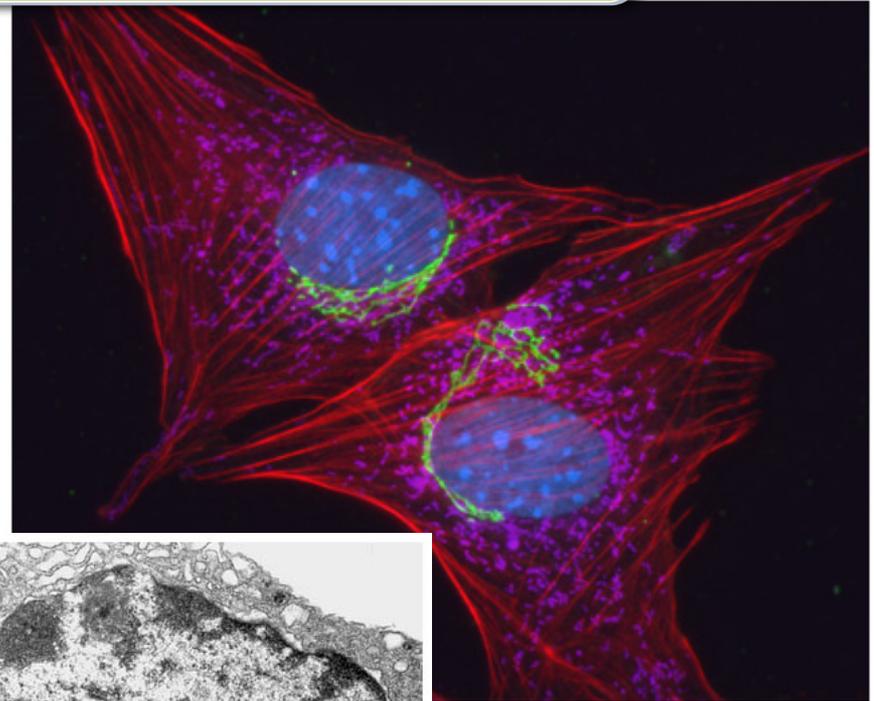
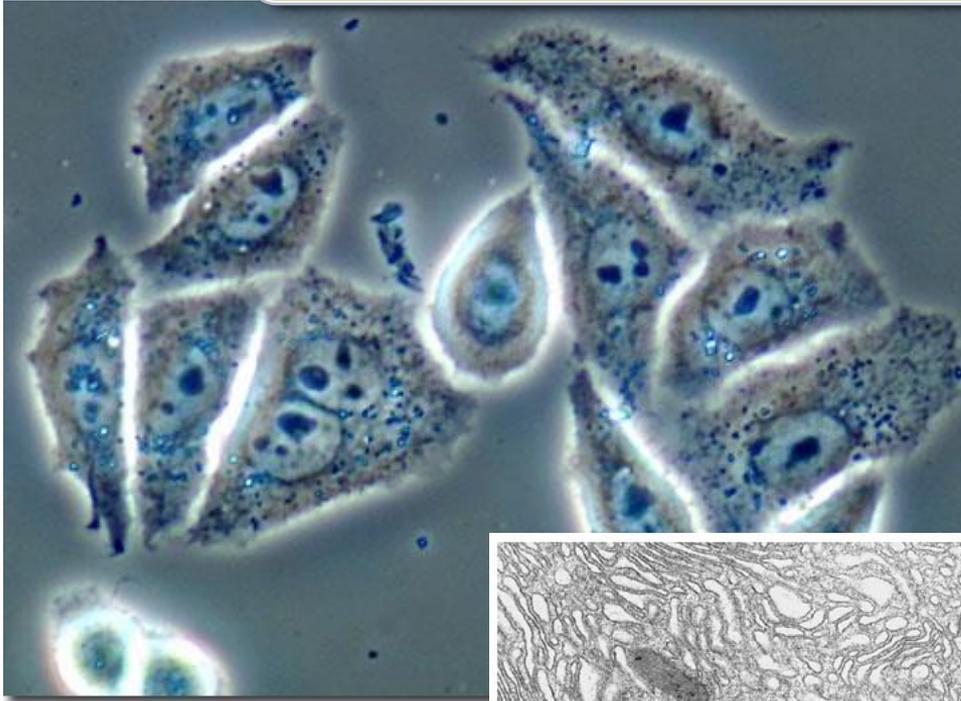
È necessario quindi operare con cautela, in particolare con **colture primarie** che derivano direttamente da **tessuti animali** (specialmente **umani**).

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

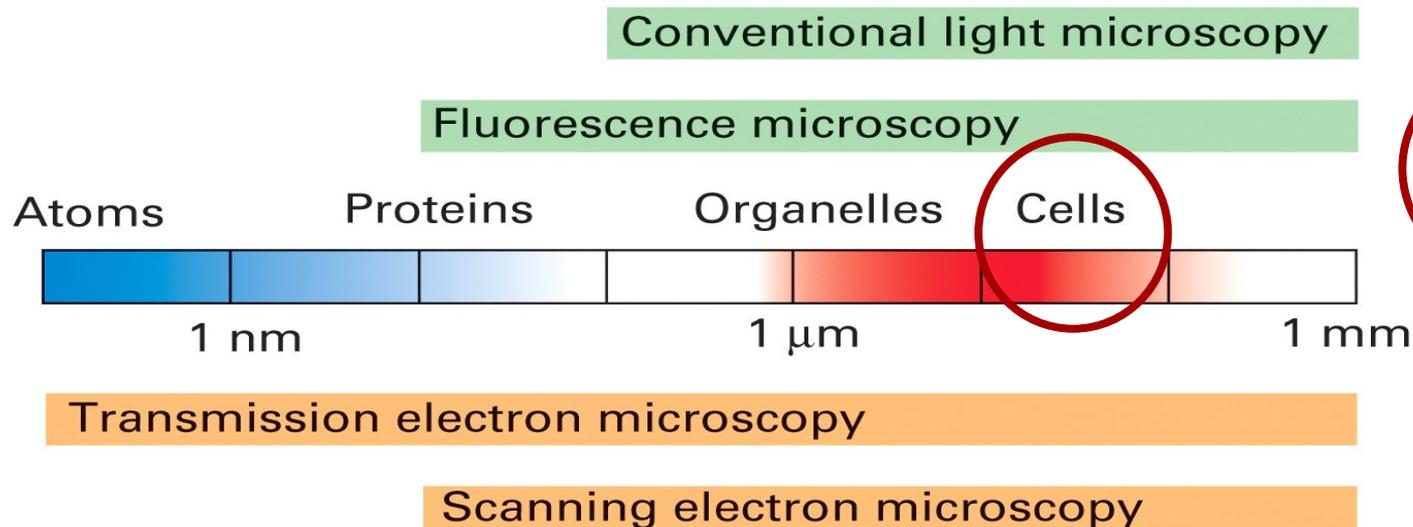


INGRANDIMENTO: prodotto dell'ingrandimento delle singole lenti utilizzate nel percorso ottico (obiettivo x oculare)

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

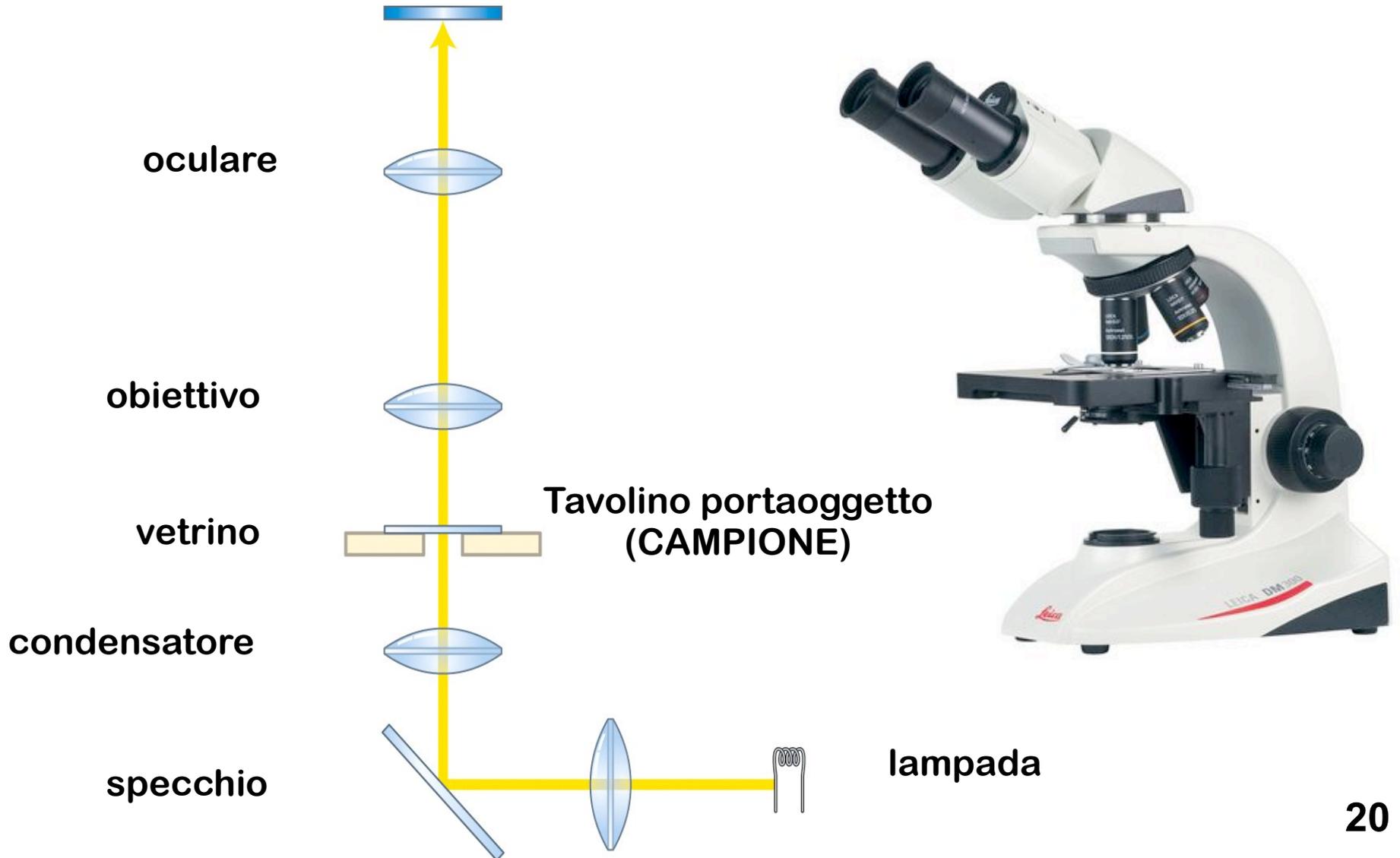


cellule di
mammifero:
10-100 micron

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

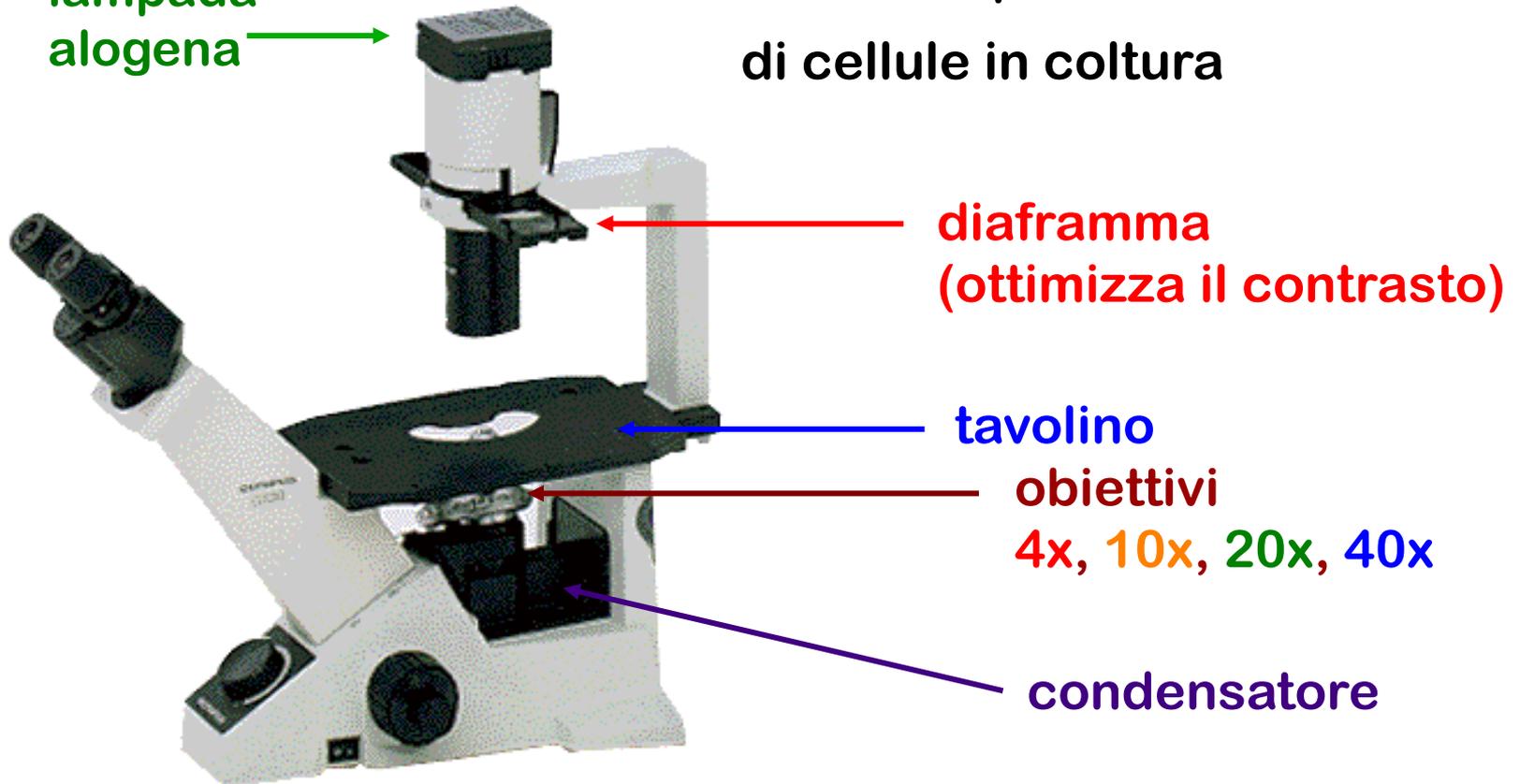
Cammino ottico del MICROSCOPIO OTTICO DIRITTO (microscopio da istologia)



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**

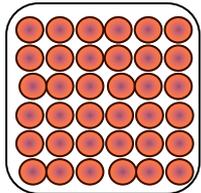
le cellule si disidratano con alcoli (metanolo-acetone)

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

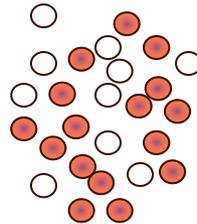
Per aumentare il contrasto tra le diverse parti del preparato o i diversi organelli cellulari si può **colorare il campione**.

ALLESTIMENTO DI UNA COLTURA CELLULARE 2D

da un tessuto



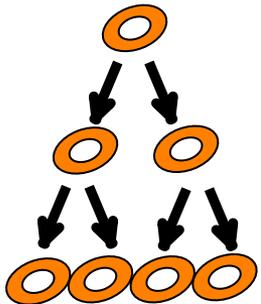
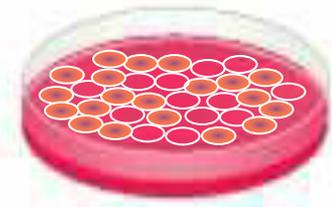
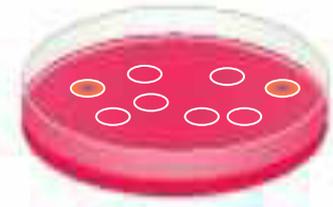
si dissociano singole cellule



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

QUIESCENZA

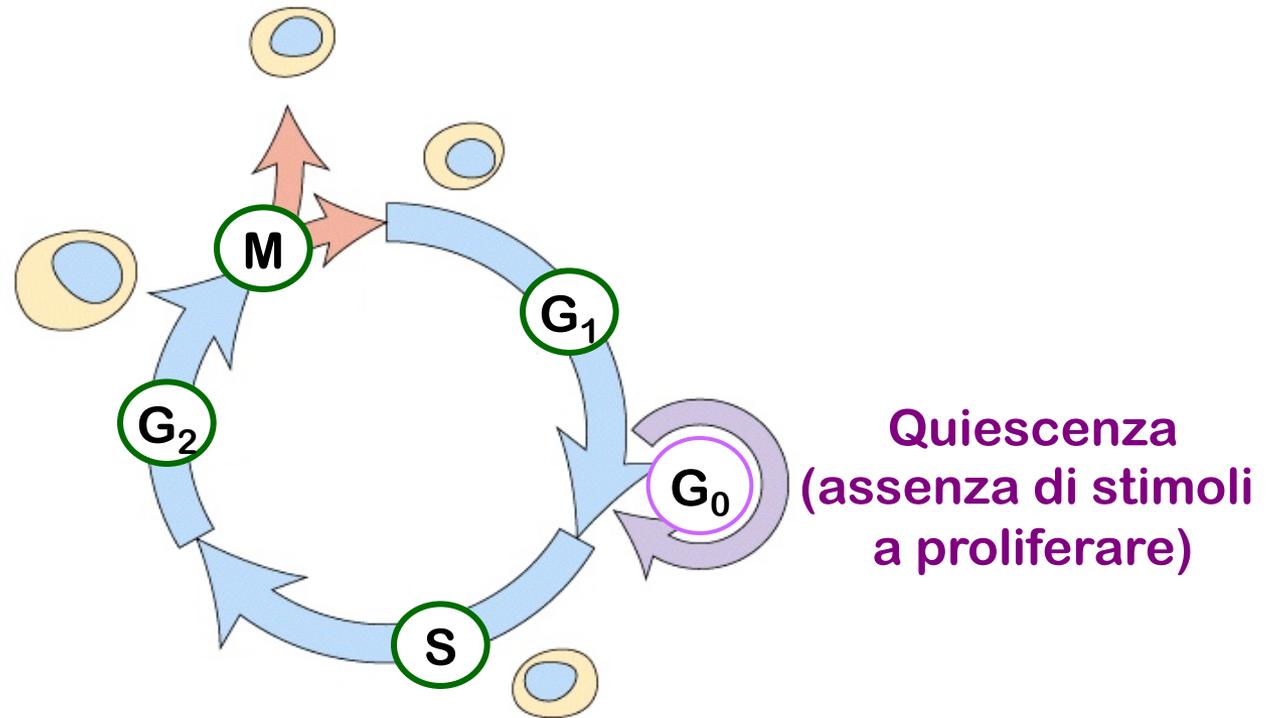
e si seminano in terreno:



Se **stimolate** con siero, le cellule
proliferano finchè occupano tutta la
superficie del recipiente
(**CONFLUENZA**) poi SMETTONO DI
PROLIFERARE: **QUIESCENZA**

ARRESTO PROLIFERATIVO DI CELLULE IN COLTURA (1): QUIESCENZA

In assenza di fattori di crescita = deprivazione da siero
le cellule non proliferano

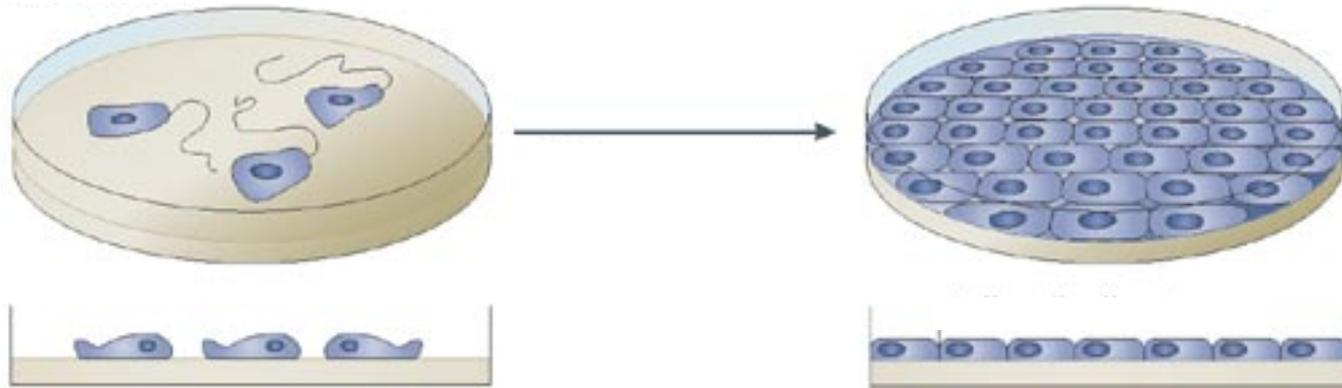


Le cellule quiescenti sono **arrestate reversibilmente** alla fase G₀ del ciclo cellulare

Rientrano in ciclo dopo stimolazione con fattori mitogeni (= siero)

ARRESTO PROLIFERATIVO DI CELLULE IN COLTURA (2): INIBIZIONE DA CONTATTO

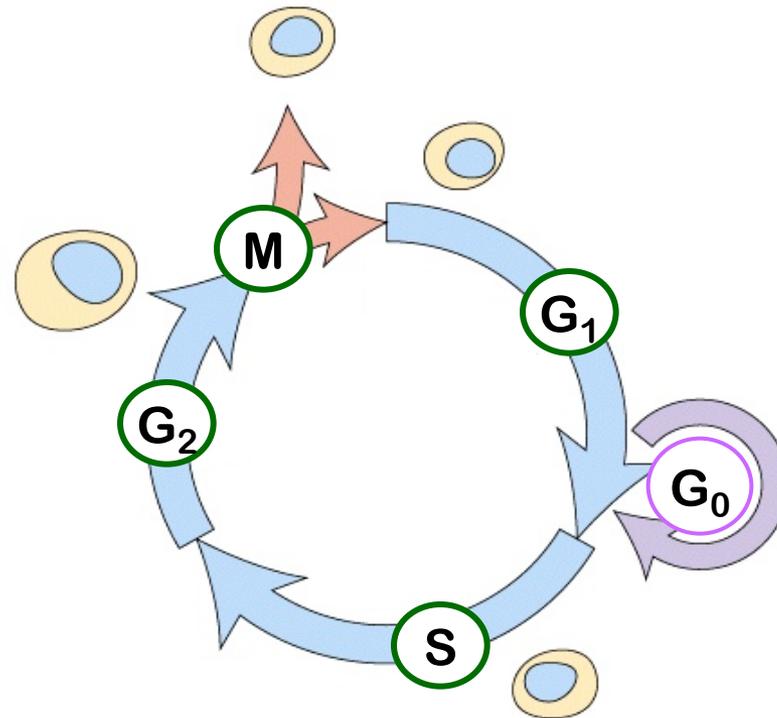
Le cellule proliferano fino ad occupare tutta la superficie del recipiente = raggiungono la **CONFLUENZA**



Quindi smettono di proliferare = **INIBIZIONE DA CONTATTO**.

Se però vengono diluite (**PASSAGGIO IN COLTURA**)
in modo da fornire loro nuovo spazio, ricominceranno a proliferare.

ARRESTO PROLIFERATIVO DI CELLULE IN COLTURA (2): INIBIZIONE DA CONTATTO



Quiescenza =
Segnali citostatici es.
inibizione da contatto

Le cellule che subiscono **l'inibizione da contatto** sono arrestate **reversibilmente** alla **fase G₀** del ciclo cellulare (= **quiescenza**)
Rientrano in ciclo dopo diluizione.

L'arresto del ciclo cellulare può avvenire in risposta a diversi stimoli e di conseguenza le cellule arrestate possono subire destini diversi. Possono uscire dal ciclo di divisione in maniera transitoria o comunque reversibile, oppure arrestare il ciclo cellulare in maniera permanente ed irreversibile. Questi fenomeni che si osservano in vitro, cioè in coltura, rispecchiano ciò che avviene in vivo, cioè nell'organismo di origine.

Quando ad esempio mancano gli **stimoli a dividersi**, le cellule entrano in una fase di **quiescenza, detta G₀**, dalla quale possono rientrare nella fase S se opportunamente stimolate con fattori di crescita (il siero in coltura, i fattori secreti da altre cellule in vivo). Una situazione diversa è data **dall'inibizione a dividersi** esercitata dal contatto con altre cellule (**inibizione da contatto**), che avviene anche se lo stimolo da siero è presente. Anche in questo caso le cellule sono arrestate reversibilmente alla fase **G₀** del ciclo cellulare. La rimozione dell'inibizione (ad esempio dopo diluizione mediante **passaggio in coltura**) permette alle cellule di riprendere la proliferazione.

In alcuni casi le cellule smettono di dividersi perché vanno incontro a differenziamento terminale, oppure a causa di danni al DNA. In questo caso vi sarà un arresto (reversibile oppure irreversibile) nel quale il ciclo cellulare si ferma **permanentemente** nella fase G₁ (oppure G₂).

Ad esempio cellule di una coltura primaria possono andare incontro al processo di **senescenza a causa dell'accorciamento dei telomeri (vedi più avanti)**.

ESPERIENZA #1: PASSAGGIO DI CELLULE IN CULTURA

SCOPO:

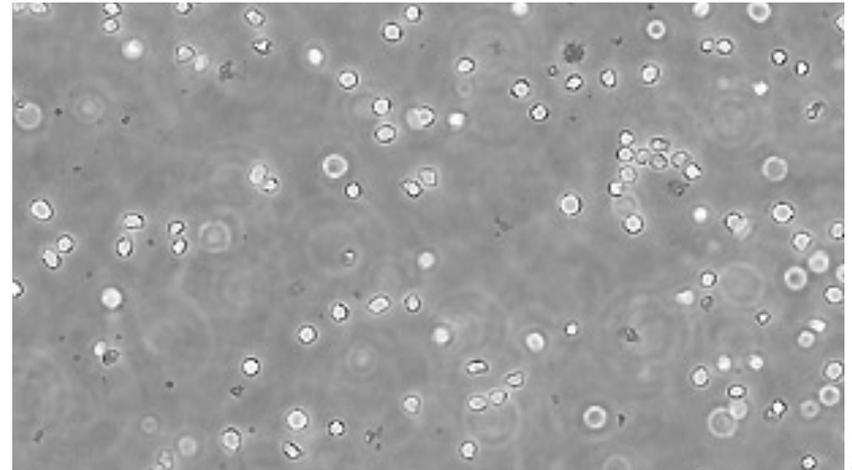
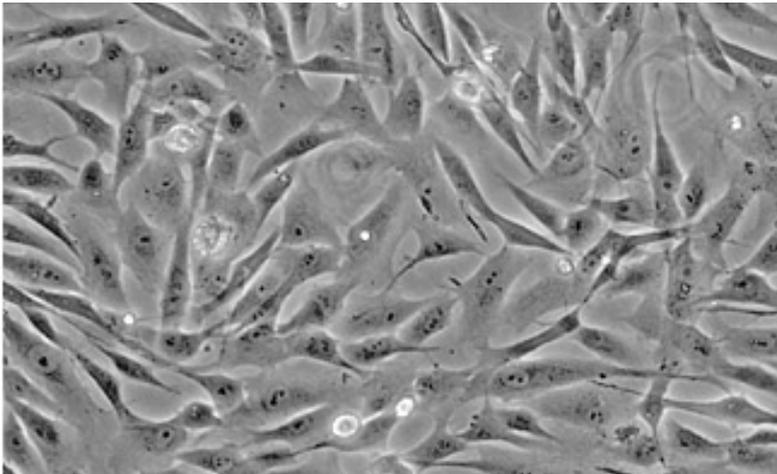
**diluire una coltura di cellule che crescono in adesione
ed hanno raggiunto una elevata confluenza
in modo da consentirne la proliferazione
e mantenerle in coltura per l'osservazione successiva**

Si consiglia la visione dei seguenti video:

Passaggio cellule in coltura <https://www.youtube.com/watch?v=CMRKKI9XSDU>

Conta cellule all'emocitometro <https://www.youtube.com/watch?v=pP0xERLUhyc>

- 1** Prendere la flask contenente le cellule dall'incubatore, chiudere il tappo ed **osservare** il grado di **confluenza** delle cellule al microscopio
- 2** Sotto la cappa a flusso laminare, rimuovere il terreno e mettere nella flask 5 ml di **PBS (SOLUZIONE FISIOLÓGICA)** sterile per **lavare** via il terreno che contiene inibitori della tripsina. Ripetere l'operazione.
- 3** Aspirare il PBS e mettere nella flask **1 ml di tripsina/EDTA**. Rimettere la flask nell'incubatore e attendere 5 minuti che la tripsina agisca.
- 4** Sbattere leggermente la flask per **staccare** bene le cellule dal fondo, **osservare** al microscopio: le cellule appariranno **TONDEGGIANTI E GALLEGGIANTI**.

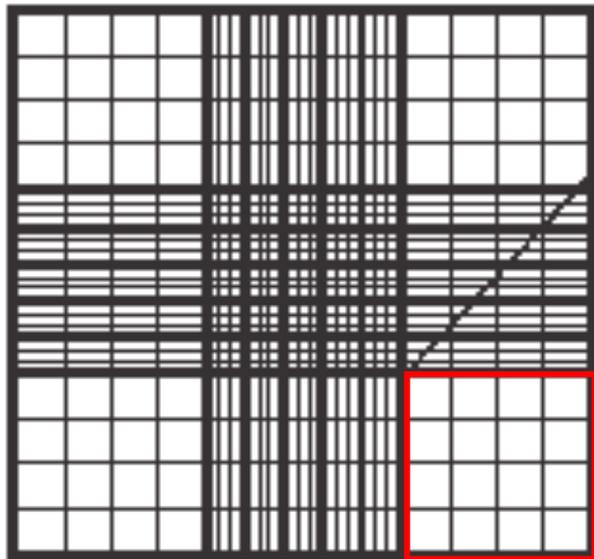


- 5 Mettere nella flask 4 ml di terreno completo in modo da **neutralizzare** la tripsina.
Risospendere bene le cellule spipettando.
- 6 Trasferire la sospensione cellulare in provetta Falcon da 15 ml
Centrifugare 5 minuti a 1000 rpm.
- 7 Aspirare il terreno + tripsina, **risospendere** DELICATAMENTE il pellet. Mettere nella provetta 5 ml di terreno e risospendere spipettando.
- 8 Si dovranno **diluire** le cellule ad una concentrazione stabilita, pertanto andranno prima **contate**.

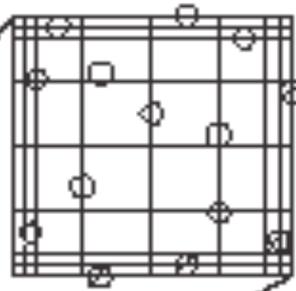
Conta delle cellule all' emocitometro (cameretta di Neubauer)

Un emocitometro contiene 2 camere (A), ciascuna divisa in 9 quadrati (B) principali del volume di $0.1 \text{ mm}^3 = 1 \times 10^{-4} \text{ ml}$ ciascuno

A



B



La **concentrazione** delle cellule (n di cellule in 1 ml di sospensione) viene ricavata contando il **numero** di cellule in un'area definita di **volume** noto.

Quindi:

n° di cellule in 1 ml di sospensione
= n° di cellule in un quadrato (B)
(di vol $1 \times 10^{-4} \text{ ml}$)
moltiplicato per 10^4

8 Con la micropipetta (p200), trasferire una goccia della sospensione cellulare nell'**emocitometro**

9 Procedere alla **conta** delle cellule al **microscopio** ricordando:

$$\begin{aligned} \text{n}^\circ \text{ di cellule in 1 ml di sospensione} &= \\ \text{n}^\circ \text{ di cellule in un quadrato grande} &\times 10^4 \end{aligned}$$

10 •Decidere la **CONCENTRAZIONE finale** (= **numero** di cellule per ml di terreno), ad es. $5 \times 10^4/\text{ml}$.

•Decidere il **volume finale** della coltura, in questo caso **5 ml** in 1 capsula Petri da 60 mm di diametro

•Procedere quindi alla **diluizione** della sospensione madre

11 Controllare le cellule al **microscopio** ed infine mettere la capsula Petri (**SCRIVERE NOME E DATA**) **nell'incubatore**.

PROBLEMA: LA DILUIZIONE

Se ho una sospensione contenente 2×10^5 cellule/ml
quanti ml dovrò usarne per preparare 5 ml
di una sospensione con 2×10^4 cellule/ml?

Se ho una sospensione
contenente 2×10^5 cellule/ml (**concentrazione INIZIALE**),
quanti ml (volume INIZIALE = X) dovrò usarne
per preparare 5 ml (**volume FINALE**)
di una sospensione con 2×10^4 cellule/ml (**concentrazione FINALE**)?

SOLUZIONE:

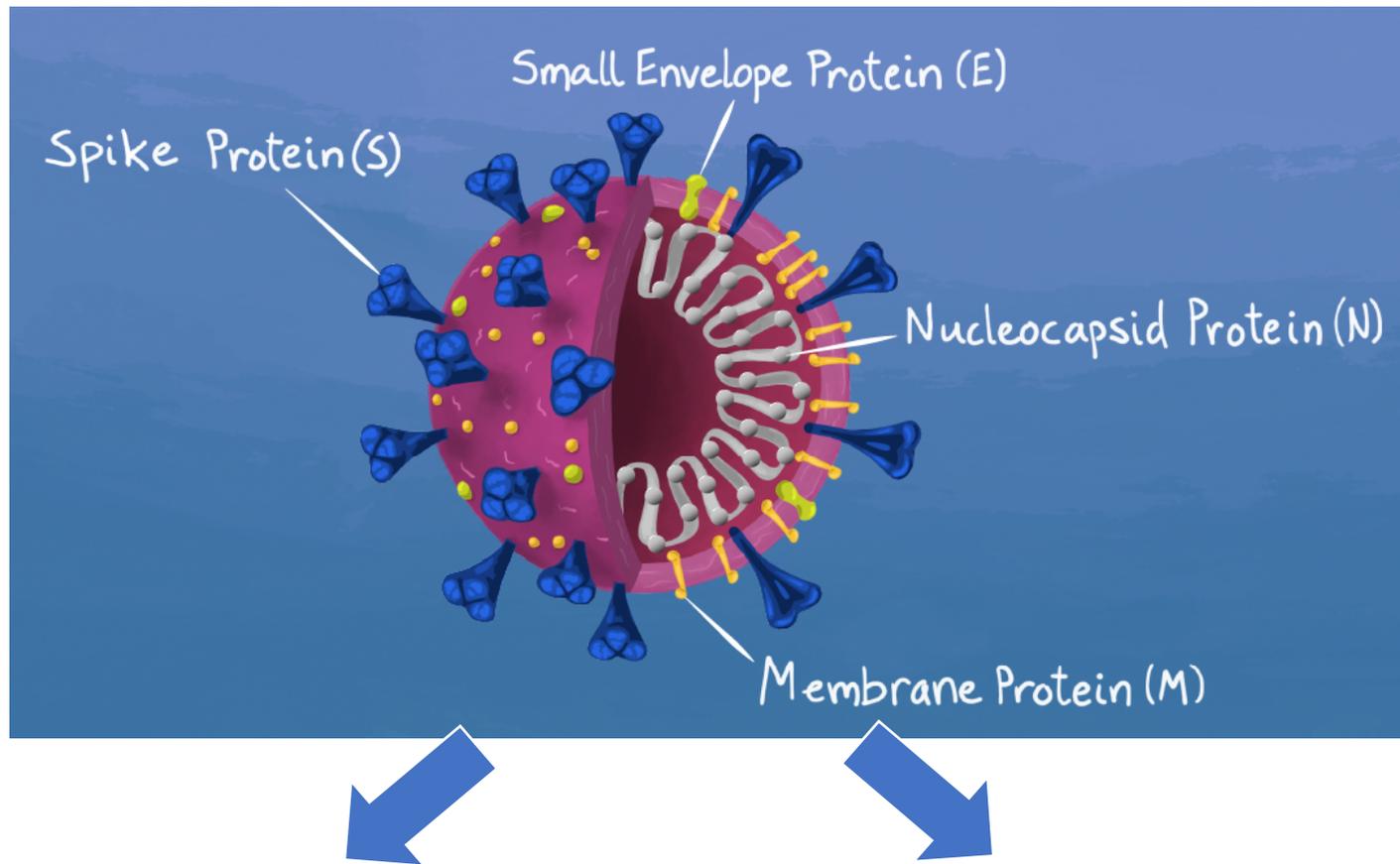
$$V_f \times C_f = V_i \times C_i$$

$$X \text{ ml} \times 20 \times 10^4 \text{ cellule/ml} = 5 \text{ ml} \times 2 \times 10^4 \text{ cellule/ml}$$

$$X = \frac{10 \times 10^4 \text{ cellule}}{20 \times 10^4 \text{ cellule/ml}} = 0,5 \text{ ml}$$

Piano sperimentale:

Sovraespressione transiente di proteine del virus SARS-CoV-2 allo scopo di individuare gli organelli cellulari e le proteine cellulari coinvolte nell'infezione.

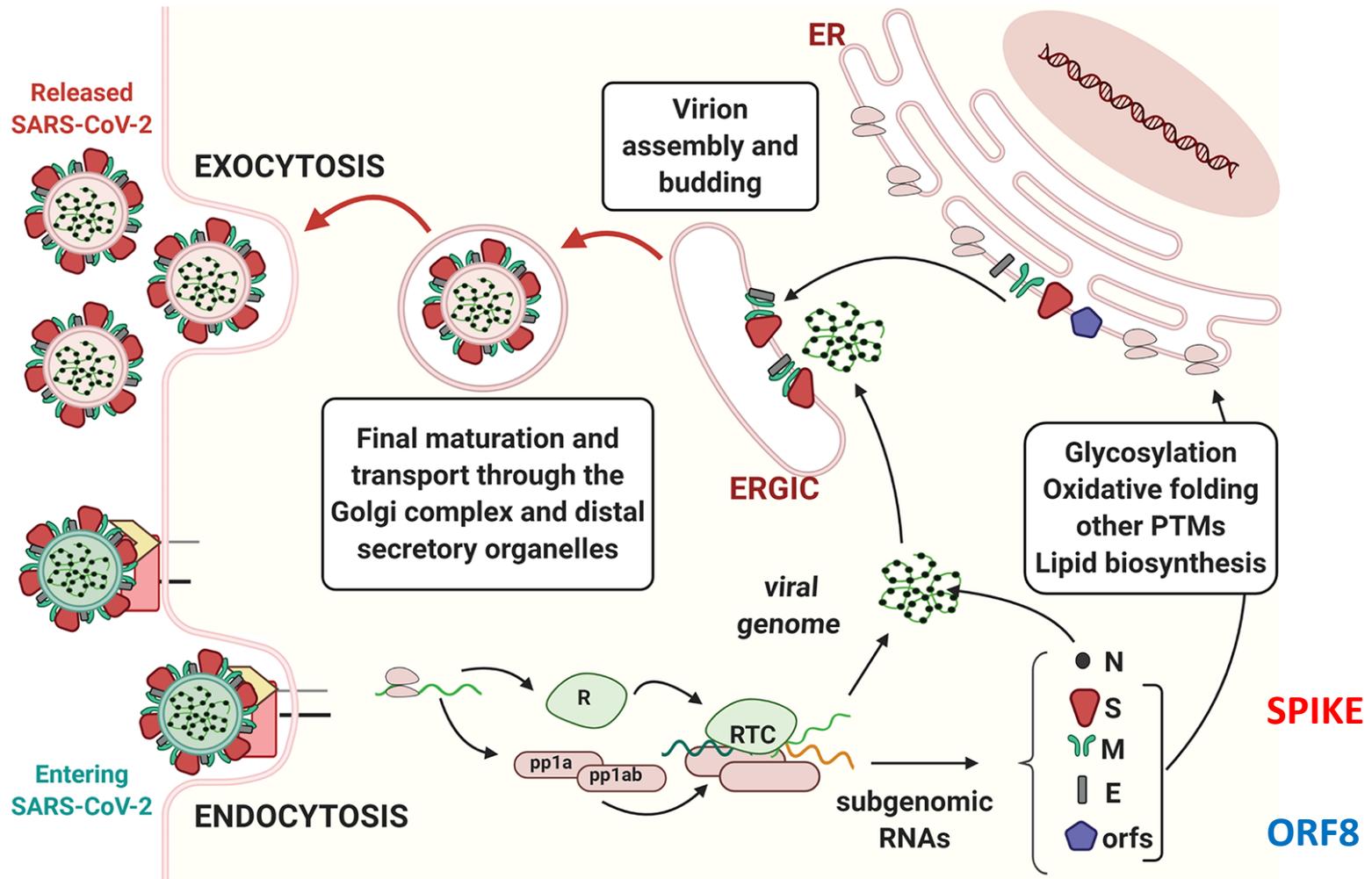


Localizzazione subcellulare

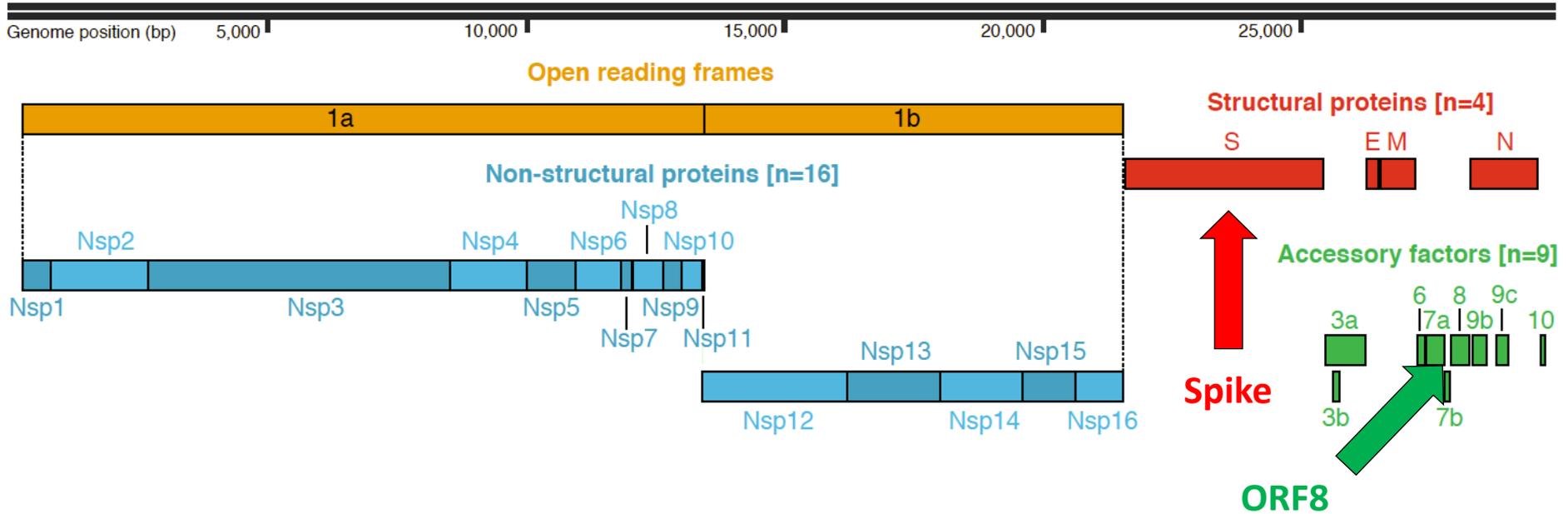
Interazione con proteine cellulari

Esperimento 1:

Sovraespressione transiente di proteine del virus SARS-CoV-2 allo scopo di visualizzarne la distribuzione agli organelli cellulari coinvolti nel ciclo del virus.



SARS-CoV-2 Genome



Come procedo per procurarmi i cDNA da esprimere?

1a. Dalla letteratura, ottengo i riferimenti degli autori di pubblicazioni rilevanti e scrivo una **richiesta agli autori**

A SARS-CoV-2-Human Protein-Protein Interaction Map Reveals Drug Targets and Potential Drug-Repurposing

David E. Gordon^{1,2,3,4}, Gwendolyn M. Jang^{1,2,3,4}, Mehdi Bouhaddou^{1,2,3,4}, Jiewei Xu^{1,2,3,4}, Kirsten Obernier^{1,2,3,4},

ABSTRACT

An outbreak of the novel coronavirus SARS-CoV-2, the causative agent of COVID-19 respiratory disease, has infected over 290,000 people since the end of 2019, killed over 12,000, and caused worldwide social and economic disruption^{1,2}. There are currently no antiviral drugs with proven efficacy nor are there vaccines for its prevention. Unfortunately, the scientific community has little knowledge of the molecular details of SARS-CoV-2 infection. To illuminate this, we cloned, tagged and expressed 26 of the 29 viral proteins in human cells and identified the human proteins physically associated with each using affinity-purification mass spectrometry (AP-MS), which identified 332 high confidence SARS-CoV-2-human protein-protein interactions (PPIs). Among these, we identify 67 druggable human proteins or host factors targeted by 69 existing FDA-approved drugs, drugs in clinical trials and/or preclinical compounds, that we are currently evaluating for efficacy in live SARS-CoV-2 infection assays. The identification of host dependency factors mediating virus infection may provide key insights into effective molecular targets for developing broadly acting antiviral therapeutics against SARS-CoV-2 and other deadly coronavirus strains.

¹QBI COVID-19 Research Group (QCRG), San Francisco, CA, 94158, USA

²University of California San Francisco, Quantitative Biosciences Institute (QBI), San Francisco, CA, 94158, USA

³J. David Gladstone Institutes, San Francisco, CA 94158, USA

⁴University of California San Francisco, Department of Cellular and Molecular Pharmacology, San Francisco, CA, 94158, USA

Come procedo per procurarmi i cDNA da esprimere?

1b. In alternativa, cerco il clone in una “banca” o repository

 addgene

[Browse Catalog -](#)

[Deposit -](#)

[Education & Tools -](#)

[Help Center -](#)



e.g. 74218, Cas9, transformation protocol

Search

A Better Way to Share Science

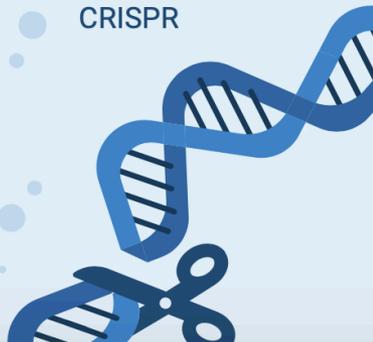
We distribute 97,124 plasmids on behalf of 4,596 labs from around the world. We also produce 588 ready-to-use viral vectors from our plasmid collection. Find what you need for your next experiment.

[View Collections](#)

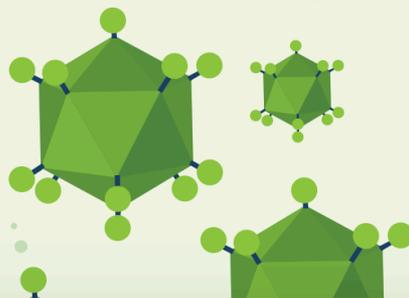
[Deposit a Plasmid](#)



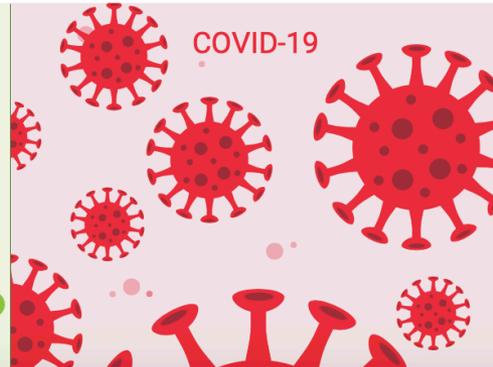
CRISPR



AAV



COVID-19



All Collections



38

[Help Center](#)

Come procedo per procurarmi i cDNA da esprimere?

2. **Ottingo il cDNA** inserito in un vettore “shuttle” e lo utilizzo per trasformare un ceppo batterico in modo da **amplificare ed estrarre il costrutto**
3. Controllo il costrutto mediante **analisi di restrizione** ed eventualmente sequenziamento del DNA
4. Procedo al **subclonaggio (spostamento)** in un **vettore** adatto al mio scopo
5. Scelgo la **tecnica di trasfezione** appropriata per inserire il costrutto nelle cellule scelte per l’esperimento

Subclonaggio del master clone da un vettore shuttle

