

ESPERIENZA #2: Passaggio di cellule in coltura 2D.

STRUMENTAZIONE E MATERIALE:

- Coltura 2D di cellule HEK293T (linea cellulare epiteliale trasformata in vitro) mantenuta in adesione in flask da 25 cm²
- Incubatore per colture cellulari
- Microscopi ottici rovesciati
- Centrifuga
- Soluzione PBS (Phosphate Buffer Saline) sterile
- Soluzione di tripsina/EDTA 1x
- Terreno DMEM completo di siero fetale bovino (10%) e antibiotici (Penicillina/Streptomicina)
- Capsule Petri per colture cellulari da 60 mm di diametro
- Pipette sterili da 5 ml e pipettatore automatico
- Provette Falcon sterili da 15 ml
- Micropipette p1000 e p20 e puntali sterili
- Cameretta contacellule Neubauer
- Automated cell counter

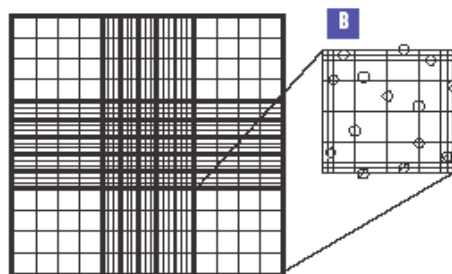
PROCEDIMENTO:

1. Prelevare dall'incubatore una flask contenente le cellule, chiudere il tappo ed **osservare** il grado di confluenza e la morfologia delle cellule **al microscopio** (ingrandimento consigliato 100-200X).
2. **LAVARE LE CELLULE PER ELIMINARE GLI INIBITORI DELLA TRIPSINA.**
Sul banco, aspirare il terreno dalla flask con una pipetta da 5 ml e versarlo in un becher, poi mettere nella flask **5 ml di PBS sterile** per lavare i residui di terreno (facendo attenzione a non staccare le cellule). **Ripetere** l'operazione.
3. **DISSOCIARE LE CELLULE.**
Aspirare il PBS e trasferirlo nel becher e inserire nella flask **1 ml di soluzione tripsina/EDTA usando la p1000. Rimettere la flask nell'incubatore** e attendere 5 minuti.
4. **Scuotere la flask** per staccare le cellule dal recipiente e **osservare** al microscopio: le cellule devono apparire **tondeggianti e in sospensione**. Se appaiono ancora adese alla plastica, oppure rimangono associate tra loro in grandi colonie, incubare più a lungo e ripetere l'operazione. I piccoli gruppi di cellule possono essere separati mediante risospensione (punto 5).
5. **NEUTRALIZZARE LA TRIPSINA.**
Porre nella flask **4 ml di terreno completo** con una pipetta sterile da 5 ml. **Risospendere** le cellule spipettando 5-10 volte con la stessa pipetta.
6. **RECUPERARE LE CELLULE MEDIANTE CENTRIFUGAZIONE.**
Utilizzando una pipetta sterile da 5 ml, **trasferire** la sospensione cellulare in una provetta **Falcon da 15 ml. Centrifugare** 5 minuti a 1000 rpm.
7. **Aspirare il surnatante** (che contiene terreno + tripsina) e trasferirlo nel becher, poi

risospendere DELICATAMENTE il pellet di cellule dando dei colpetti al fondo della provetta come mostrato dal docente. Porre nella provetta **5 ml** di terreno e risospendere spipettando.

8. CONTARE LE CELLULE.

Con la micropipetta **p20** e un puntale sterile, trasferire circa 20 microlitri della sospensione cellulare nell'**emocitometro (cameretta di Neubauer)**. Procedere alla **conta** delle cellule al **microscopio** (ingrandimento 100X), contando almeno 2 quadrati esterni e calcolando il numero medio di cellule.



9. CALCOLARE LA CONCENTRAZIONE INIZIALE DELLE CELLULE:

n° di cellule in 1 ml di sospensione = n° di cellule in un quadrato $\times 10^4$

In seguito è possibile utilizzare l'**automated cell counter** per confrontare la misura della concentrazione della sospensione cellulare effettuata dallo strumento.

10. DILUIRE LE CELLULE

La **concentrazione finale** di cellule che si vuole seminare è **1.0×10^5 /ml**.

Il **volume finale** di cellule che si vuole porre nel nuovo recipiente (capsula Petri da 60 mm di diametro) è **5 ml**.

Per effettuare la diluizione seguire il seguente procedimento:

*Se voglio preparare **5 ml** di sospensione finale contenente **1.0×10^5 cellule/ml**,*

*quanti ml (= **X ml**) della sospensione iniziale contenente cellule/ml dovrò usare?*

11. SEMINARE LE CELLULE NEL NUOVO RECIPIENTE.

Procedere alla **diluizione** delle cellule ponendo in una provetta Falcon da 15 ml:

X ml della sospensione cellulare ottenuta al punto precedente e **5 – X ml di terreno**.

Seminare la sospensione diluita così ottenuta in una capsula Petri per colture cellulari da 60 mm di diametro, sul fondo della quale avrete scritto il vostro **nome/sigla**, quello della linea cellulare e la **data** dell'esperimento.

OPZIONALE: per verificare l'effetto della funzionalizzazione della plastica per colture cellulari, seminare un'aliquota di sospensione cellulare in una capsula Petri **non** funzionalizzata per l'adesione delle cellule epiteliali.