

CdS in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2025-2026

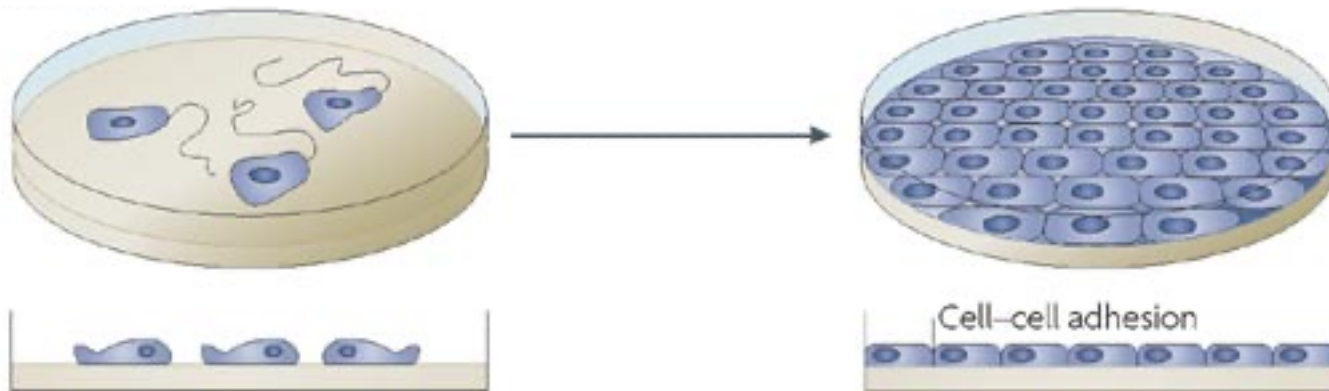
Corso di Biotecnologie Cellulari

ESPERIENZA #2

**MANTENIMENTO DI CELLULE IN
COLTURA**

MANTENIMENTO DI UNA CULTURA CELLULARE 2D

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** in modo da fornire loro spazio,
ricominceranno a proliferare

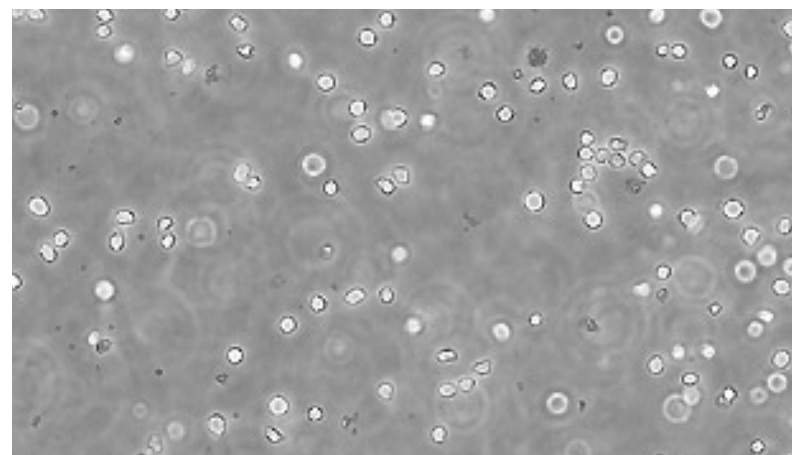
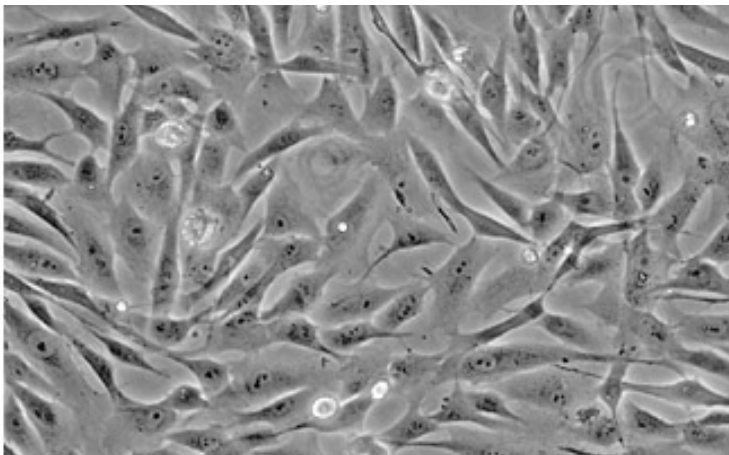
(operazione di **PASSAGGIO IN CULTURA**)

ESPERIENZA #1: PASSAGGIO DI CELLULE IN CULTURA

SCOPO:

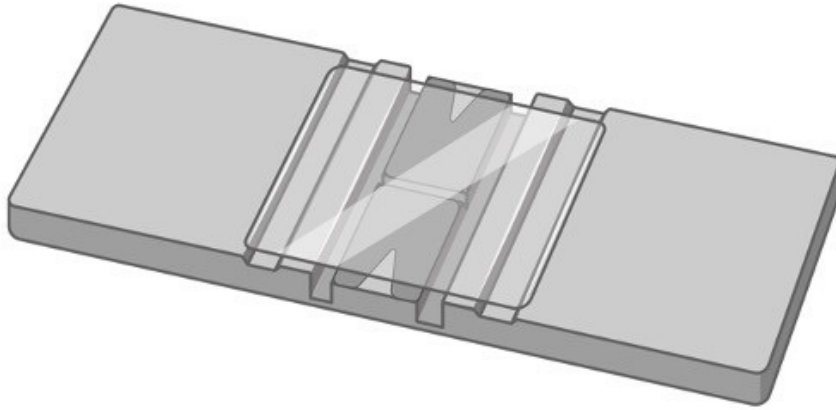
Propagare una coltura di cellule che crescono in adesione effettuando un'**operazione di diluizione** quando esse hanno raggiunto una elevata confluenza, in modo da consentirne la proliferazione e mantenerle in coltura per successivi esperimenti.

- 1 osservare il grado di **confluenza** delle cellule al microscopio
- 2 rimuovere e **lavare** il terreno che contiene inibitori della tripsina.
- 3 **dissociare** le cellule con **tripsina/EDTA**
- 4 **staccare** bene le cellule dal fondo della flask e tra loro: appariranno **TONDEGGIANTI E GALLEGGIANTI**.

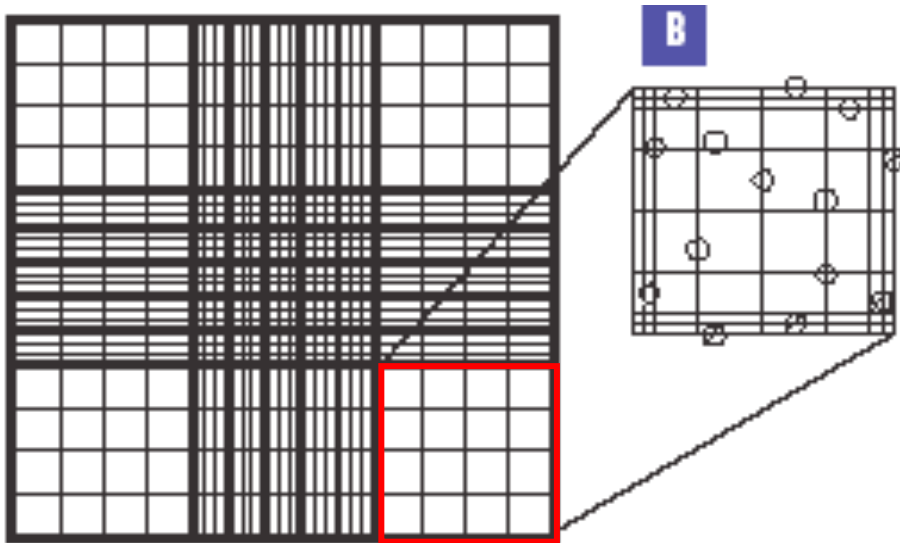


- 5 neutralizzare la tripsina con il terreno completo
- 6 centrifugare la sospensione cellulare per recuperare le cellule
- 7 risospendere le cellule in terreno nuovo
- 8 contare le cellule per stabilirne la concentrazione iniziale e quindi diluirle alla concentrazione stabilita.

8 Contare le cellule all'emocitometro (cameretta di Neubauer)



La **concentrazione** delle cellule (numero di cellule in 1 ml di sospensione) viene ricavata contando il **numero** di cellule in un **volume** noto ($1 \times 10^{-4} \text{ cm}^3$).



9 CALCOLARE LA CONCENTRAZIONE INIZIALE DELLE CELLULE:

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

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 la sospensione iniziale contiene cellule/ml, quanti ml (= X)
dovrò usarne per preparare 5 ml di sospensione finale contenente 1.0×10^5 cellule/ml?*

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>