ESPERIENZA 2

Passaggio di cellule in coltura 2D

Staccare, contare e riseminare una coltura in adesione

CERCHIA LE CELLULE CHE UTILIZZI

HEK293T	U2OS
linea epiteliale trasformata in vitro	linea mesenchimale (osteosarcoma)

entrambe in adesione · flask da 25 cm²

1 Osserva · 2 Lava · 3–4 Stacca · 5 Neutralizza · 6–7 Centrifuga · 8–9 Conta · 10 Diluisci · 11 Semina

● A · Staccare ● B · Recuperare ● C · Contare ● D · Diluire e seminare

Strumentazione e materiale

STRUMENTI
- ☐ Incubatore per colture cellulari
- ☐ Microscopi ottici rovesciati
- ☐ Centrifuga

SOLUZIONI
- ☐ PBS (Phosphate Buffer Saline) sterile
- ☐ Tripsina/EDTA 1x
- ☐ DMEM completo: 10% siero fetale bovino, penicillina/streptomicina

PLASTICA E PIPETTE
- ☐ Capsule Petri per colture cellulari, Ø 60 mm
- ☐ Pipette sterili da 5 ml e pipettatore automatico
- ☐ Provette Falcon sterili da 15 ml
- ☐ Micropipette p1000 e p20, puntali sterili

CONTA CELLULARE
- ☐ Cameretta contacellule di Neubauer
- ☐ Automated cell counter

A Staccare le cellule dalla flask

passaggi 1–5

1 Osservare le cellule

Prelevare la flask dall'incubatore, **chiudere il tappo** e osservare al microscopio il grado di confluenza e la morfologia delle cellule.

Ingrandimento 100–200×

2 Lavare le cellule · per eliminare gli inibitori della tripsina

Sul banco, aspirare il terreno con una pipetta da 5 ml e versarlo nel becher. Aggiungere **5 ml di PBS sterile** per lavare i residui di terreno. **Ripetere** l'operazione.

PBS 5 ml · 2 lavaggi · ⚠ **Attenzione: non staccare le cellule**

3 Dissociare le cellule

Aspirare il PBS e trasferirlo nel becher. Con la p1000 aggiungere **1 ml di tripsina/EDTA**. Rimettere la flask nell'incubatore.

Tripsina/EDTA 1 ml · Incubatore · 5 min

4 Verificare il distacco

Scuotere la flask per staccare le cellule dal recipiente e osservare al microscopio.

PRONTE
Cellule tondeggianti e in sospensione → passaggio 5. I piccoli gruppi si separano risospendendo.

NON ANCORA
Cellule adese alla plastica o in grandi colonie → incubare più a lungo e ripetere.

5 Neutralizzare la tripsina

Aggiungere nella flask **4 ml di terreno completo** con una pipetta sterile da 5 ml. Risospendere le cellule spipettando con la stessa pipetta.

Terreno completo 4 ml · Spipettare 5–10 volte

B Recuperare le cellule

passaggi 6–7

6 Centrifugare

Con una pipetta sterile da 5 ml, trasferire la sospensione cellulare in una **Falcon da 15 ml** e centrifugare.

1000 rpm · 5 min

7 Risospendere il pellet

Aspirare il surnatante (terreno + tripsina) e trasferirlo nel becher. Risospendere il pellet dando **colpetti al fondo** della provetta, come mostrato dal docente. Aggiungere **5 ml di terreno** e risospendere spipettando.

Terreno 5 ml · ⚠ **Attenzione: risospendere delicatamente**

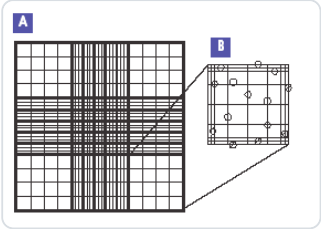
C Contare le cellule

passaggi 8–9

8 Caricare la camera e contare

Con la p20 e un puntale sterile, trasferire circa **20 µl** di sospensione nell'emocitometro (camera di Neubauer). Contare al microscopio **almeno 2 quadrati esterni** e calcolare il numero medio di cellule.

20 µl · Ingrandimento 100× · ≥ 2 quadrati esterni



9 Calcolare la concentrazione iniziale

cellule / ml = media delle cellule per quadrato × 10^4

Quadrato 1: _____ Quadrato 2: _____ Media: _____

Concentrazione: _____ cellule/ml

Poi confrontare il risultato con la misura dell'**automated cell counter**: _____ cellule/ml

D Diluire e seminare

passaggi 10–11

10 Diluire le cellule

CONCENTRAZIONE FINALE

HEK293T	**$1{,}0 \times 10^5$ cellule/ml**
U2OS	**$0{,}5 \times 10^5$ cellule/ml**

VOLUME FINALE

5 ml in Petri da 60 mm

Se voglio preparare 5 ml di sospensione finale alla concentrazione indicata per le mie cellule (_____ cellule/ml), quanti ml (= X ml) della sospensione iniziale contenente _____ cellule/ml dovrò usare?

X = _____ ml

11 Seminare nel nuovo recipiente

In una Falcon da 15 ml preparare la diluizione:

X ml sospensione dal passaggio 7 + **5 − X ml** terreno → **5 ml** in Petri da 60 mm

Prima di seminare, scrivere sul **fondo** della Petri:

nome / sigla · linea cellulare · data dell'esperimento

OPZIONALE · VERIFICARE L'EFFETTO DELLA PLASTICA TRATTATA

Seminare un'aliquota della sospensione in un recipiente **non funzionalizzato** per l'adesione delle cellule, e confrontarlo con quello trattato.