ESPERIENZA 3

Passaggio di organoidi in coltura

Liberare gli organoidi dal Matrigel, frammentarli e riseminarli

ORGANOIDI UTILIZZATI
Organoidi da fegato
crescita 3D in Matrigel · piastra 24-well

1	2	3	4–5	6–9	10–11	12	13–16
Osserva	Blocking	Lava	Disgrega	Centrifuga	Frammenta	Matrigel	Incuba

■ A · Liberare gli organoidi ■ B · Recuperare gli organoidi ■ C · Frammentare ■ D · Seminare

Strumentazione e materiale

STRUMENTI
- ☐ Incubatore per colture cellulari
- ☐ Microscopio rovesciato
- ☐ Centrifuga a 4 °C
- ☐ Ghiaccio

SOLUZIONI
- ☐ PBS sterile
- ☐ Cell Recovery sterile fredda
- ☐ FBS per coating
- ☐ Matrigel **sempre in ghiaccio**

PLASTICA E PIPETTE
- ☐ Piastra 24-well preriscaldata
- ☐ Provetta Eppendorf 1,5 ml
- ☐ Micropipette p20, p200, p1000
- ☐ Puntali sterili

TERRENO **Advanced DMEM/F12** supplementato con 10 mM nicotinamide, *N*-acetyl cysteine, B27, fattori di crescita (recombinant mouse HGF, recombinant human EGF, recombinant human FGF10, human recombinant Gastrin 1, human R-Spondin)

PRIMA DI INIZIARE
Seguire la dimostrazione del docente sull'**osservazione degli organoidi** al microscopio ottico rovesciato, per prendere confidenza con la visualizzazione dei diversi piani usando il fuoco.

A Liberare gli organoidi

passaggi 1–5

1 Osservare gli organoidi

Prendere dall'incubatore la piastra con gli organoidi (**un pozzetto per ogni studente**) e osservare al microscopio la morfologia degli organoidi e il grado di confluenza.

100–200× per la confluenza · 400× per i singoli organoidi

2 Blocking della provetta

Aggiungere **0,5 ml di FBS** in una provetta Eppendorf da 1,5 ml e lasciarla in ghiaccio (nel frattempo procedere al passaggio 3). Al termine rimuovere l'FBS e versarlo nel becher.

FBS 0,5 ml · ghiaccio · 5 min

3 Lavare gli organoidi

Aspirare il terreno dal pozzetto con la p1000 e versarlo nel becher. Aggiungere **1 ml di PBS sterile non freddo** per lavare via il terreno. **Ripetere** l'operazione.

PBS non freddo 1 ml · 2 lavaggi · ⚠ **Non aspirare né staccare la goccia di Matrigel**

4 Disgregare il Matrigel

Eliminare il PBS e aggiungere con la p1000 **0,5 ml di Cell Recovery freddo**. Disgregare le gocce di Matrigel e trasferire la soluzione con gli organoidi nella provetta bloccata con FBS. Rimettere la provetta in ghiaccio, in agitazione.

Cell Recovery freddo 0,5 ml · ghiaccio in agitazione · 30–45 min

Da questo momento in poi tutti i passaggi si eseguono in ghiaccio e a freddo

5 Verificare la disgregazione

Osservare al microscopio se il Matrigel è stato disgregato.

PRONTI	NON ANCORA
Organoidi in sospensione → passaggio 6	Organoidi ancora nel Matrigel → incubare ancora

B Recuperare gli organoidi passaggi 6–9

6 Centrifugare

Centrifugare la provetta con gli organoidi.

2000 rpm · 5 min · 4 °C

7 Lavare con PBS

Con la p1000 aspirare il surnatante (Cell Recovery + Matrigel disgregato) e versarlo nel becher dei rifiuti. Aggiungere **delicatamente 1 ml di PBS**.

PBS 1 ml · ⚠ **Non staccare il piccolo pellet**

8 Centrifugare

2000 rpm · 5 min · 4 °C

9 Risospendere e dividere

Con la p1000 aspirare il surnatante senza staccare il pellet e versarlo nel becher dei rifiuti. Aggiungere **delicatamente 0,2 ml di PBS**. Con un puntale bloccato con FBS risospendere il pellet, **prelevare 0,1 ml** della sospensione e versarli nel becher.

PBS 0,2 ml · eliminare 0,1 ml · puntale bloccato con FBS

C Frammentare passaggi 10–11

10 Disgregazione meccanica

Con la p200 e un puntale sterile bloccato con FBS, **spipettare energicamente** la sospensione per disgregare gli organoidi in piccoli frammenti.

p200 · puntale bloccato con FBS

11 Centrifugare e rimuovere il surnatante

Centrifugare. Con la p200 aspirare il surnatante senza staccare il pellet e versarlo nel becher dei rifiuti. Con la p20 **eliminare tutto il surnatante**.

2000 rpm · 5 min · 4 °C · p200, poi p20

D Seminare passaggi 12–16

12 Risospendere in Matrigel e piastrare

Tenendo la provetta in ghiaccio, risospendere il pellet in **40 µl di Matrigel freddo** con la p200, spipettando **delicatamente senza fare bolle**. Piastrare una goccia di Matrigel con i frammenti al centro di un pozzetto.

con il docente · Matrigel freddo 40 µl · ⚠ **Le bolle nel Matrigel sono irreversibili**

13 Lasciare solidificare il Matrigel

incubatore · 15 min

14 Aggiungere il terreno

terreno di coltura 0,5 ml

15 Etichettare

Sulla piastra: nome / sigla · organoidi · data dell'esperimento

16 Riporre la piastra nell'incubatore