



UNIVERSITA'
DEGLI STUDI
DI **TERAMO**

Corso di laurea BIOTECNOLOGIE

Fisiologia cellulare e Laboratorio di Colture cellulari

Prof.ssa Luisa Gioia



Corso di laurea BIOTECNOLOGIE

Fisiologia cellulare e Laboratorio di Colture cellulari

UNIVERSITA'
DEGLI STUDI
DI TERAMO

**IL MATERIALE CONTENUTO IN QUESTE
DIAPOSITIVE E' AD ESCLUSIVO USO DIDATTICO PER
L'UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TERAMO.**

ALCUNE IMMAGINI CONTENUTE SONO STATE TRATTE DAI
SEGUENTI LIBRI:

“Biologia molecolare della cellula” – Bruce Alberts *et al.* (Ed. Zanichelli)

“FISIOLOGIA Molecole, cellule e sistemi” – Egidio D'Angelo e Antonio Peres (Edi-ermes)

“Introduzione alle colture cellulari” - G.L. Mariottini *et al.* (Ed. Tecniche nuove)

“Cell Biology: a short course” – S.R. Bolsover *et al.*
(Ed. Wiley-Blackwell)

Preparazione soluzioni

Un biotecnologo che si dedica a **COLTURE CELLULARI** dovrà utilizzare soluzioni saline e terreni di coltura **STERILI**.

Pertanto per preparare le soluzioni e i terreni di coltura dovrà utilizzare come solvente acqua priva di microrganismi e pirogeni

Inoltre anche tutti i materiali e la strumentazione utilizzati per l'allestimento delle colture devono essere **STERILI**.

Microrganismi, pirogeni e virus

I microrganismi (batteri, muffe e alghe) e i virus oltre a **moltiplicarsi a velocità logaritmica, producono pirogeni (endotossine)**, secernono enzimi che degradano le proteine ed anche gli acidi nucleici.

I **pirogeni, che sono frammenti di parete cellulare batterica**, causano febbre nei mammiferi ed ostacolano la crescita di cellule e tessuti in coltura.

Microrganismi, pirogeni e virus

Nel laboratorio di colture cellulari mediante alcune semplici **TECNICHE DI STERILIZZAZIONE** può essere garantita la rimozione dei microorganismi (soprattutto batteri) dalle soluzioni e dai terreni di coltura e da tutti i materiali e la strumentazione necessari per l'allestimento delle colture.

Virus e pirogeni devono invece essere rimossi mediante tecniche più complesse (osmosi inversa, adsorbimento su carboni attivi e ultrafiltrazione)

Colture cellulari

- 1. Coltura a breve o a lungo termine
- 2. Coltura in monostrato o in sospensione

Richieste di crescita da parte delle cellule in coltura

L'intero sistema di coltura deve essere
STERILE e privo di effetti
tossici o inibitori

Sterilità:
principali metodi di sterilizzazione in lab
colture cellulari

STERILIZZAZIONE

***COMPLETA ELIMINAZIONE DI TUTTI I
MICRORGANISMI PRESENTI IN UN DATO
AMBIENTE***

può essere ottenuta utilizzando:

- **calore**
- **mezzi fisici**

Lab colture cellulari

- Radiazioni (es. raggi UV)
- agenti chimici

non è possibile utilizzare
tecniche di sterilizzazione
nocive per le cellule!!!!

*Dato che la sterilizzazione prevede la distruzione di tutti i microrganismi presenti, una volta che un prodotto è stato sterilizzato se viene **correttamente sigillato** rimarrà sterile indefinitamente*

STERILIZZAZIONE MEDIANTE CALORE

Autoclave (vapore sotto pressione o pentola a pressione):

121°C per 15-20' minuti, pressione:1atm.

Non adatto per le sostanze termolabili che vengono denaturate o distrutte.

N.B. soluzioni saline contenenti glucosio (es. Dulbecco-PBS) non possono essere autoclavate (*il glucosio formerebbe caramello!*)

ACCORGIMENTI

Tappo delle bottiglie leggermente svitato

Nastro adesivo che cambia colore

Vapore acqueo residuo sui materiali autoclavati: necessario step di asciugatura al calore

Controllo periodico dell'autoclave/personale qualificato

Calore secco (stufa/forno ad aria calda):

160°-180°C per almeno 1 o 2 ore

Usata per vetreria pirex, metallo, e oggetti che non fondono.

AUTOCLAVE

Assicura l'uccisione dei microrganismi, incluse le endospore, mediante l'utilizzazione di **calore umido**.

Per ottenere questi risultati è necessario raggiungere temperature superiori al punto di ebollizione dell'acqua, e ciò viene ottenuto immettendo **vapore saturo sotto pressione** nella camera a chiusura ermetica dell'autoclave

La pressione usualmente utilizzata per la sterilizzazione in autoclave corrisponde a **1 atm di sovrappressione**, che permette di raggiungere una **temperatura di 121°C**; a questa temperatura il tempo di trattamento è generalmente di **15-20 minuti**.

*Non è la pressione che si raggiunge all'interno dell'autoclave che provoca la morte dei microrganismi; il fattore letale è, infatti, l'elevata temperatura che si può raggiungere a pressioni superiori a quella atmosferica
Il vapore è il vettore del calore.*

La tecnica di sterilizzazione da utilizzare va scelta caso per caso in base a:

- 1. efficacia**
- 2. costi**
- 3. praticità (tempi, semplicità)**

**disinfezione mani
operatore: sapone
germicida**

- soluzione fisiologica
- soluzioni saline bilanciate (es. Dulbecco-PBS)
- medium per colture cellulari

- puntali
- eppendorf
- tappi plastica
- pinzette
- forbici
- garze
- vetreria pirex

quale tecnica di sterilizzazione?

DOMANDA :

Un metodo di sterilizzazione comunemente utilizzato in un laboratorio di colture cellulari prevede un ciclo di **sterilizzazione in autoclave**. Mediante questo metodo tuttavia **NON È POSSIBILE sterilizzare:**

1. Soluzione fisiologica (0,9% NaCl in acqua)
2. Terreni di coltura 
3. Vetreria pirex
4. Garze
5. Strumentazione chirurgica di acciaio



Il Dulbecco/PBS può essere sterilizzato in autoclave?

Sterilizzazione con mezzi fisici

FILTRAZIONE

*Il calore, pur essendo il mezzo più comune e più efficiente per sterilizzare i liquidi, non può però essere utilizzato per sterilizzare soluzioni contenenti **sostanze termolabili**.*

Una tecnica molto valida per sterilizzare soluzioni/terreni liquidi contenenti sostanze termolabili è la **FILTRAZIONE**.

Un filtro è costituito da materiale poroso (acetato di cellulosa o nitrato di cellulosa) attraverso il quale viene fatta passare la soluzione da sterilizzare

Nella filtrazione il diametro dei pori deve essere tale da permettere il passaggio dei componenti della soluzione, ma impedire il passaggio dei microrganismi.

Quali sostanze attraversano il filtro e quali vengono trattenute?

DIMENSIONI DELLE CELLULE

Ci sono solo 2 tipi di cellule:

1. **Cellule procariotiche:** dimensioni 1-2 μm
2. **Cellule eucariotiche:** dimensioni da 5 a 100 μm (mediamente 20 μm)

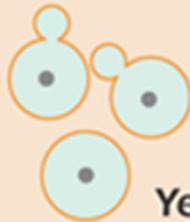
Viruses are submicroscopic particles 50–100 nm



Prokaryotes are the smallest true cells. Most are 1–2 μm



Most eukaryotic cells are in the range 5 μm –100 μm



Yeast 5 μm



Human cell
20 μm

Nella filtrazione il diametro di esclusione usato più frequentemente nel lab di colture cellulari è di **0.2 μm**

FILTRAZIONE

- Sali
- Ioni ($\text{Na}^+=33\text{Da}$; $\text{Ca}^{++}=40\text{Da}$)
- Zuccheri
- Aminoacidi
- Nucleotidi
- Acidi grassi
- Vitamine
- Proteine (MACROMOLECOLE)

PICCOLE MOLECOLE ORGANICHE:
PM da 100 Dalton a 1.000 Dalton
(corrispondenti a circa 30 atomi di Carbonio):
es. GLUCOSIO=180Da

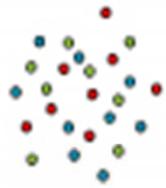
DOMANDA di AUTOVALUTAZIONE :

Utilizzando filtri aventi diametro di esclusione 0,1-0,2 micron, la soluzione filtrata NON conterrà:

- 1.ioni
- 2.sali di calcio e magnesio
- 3.zuccheri
- 4.proteine
- 5.batteri



SUBUNITÀ



ad esempio,
zuccheri, amminoacidi
e nucleotidi

legami covalenti

MACROMOLECOLE



ad esempio,
proteine globulari e RNA

legami non covalenti

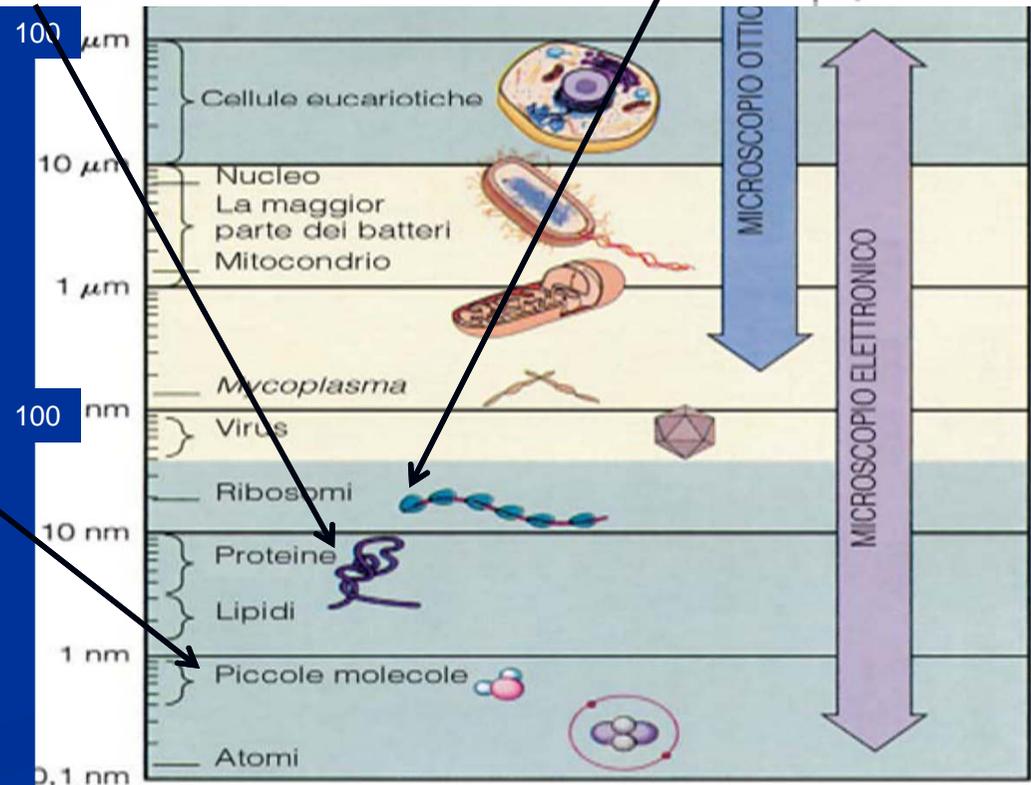
COMPLESSI
MACROMOLECOLARI



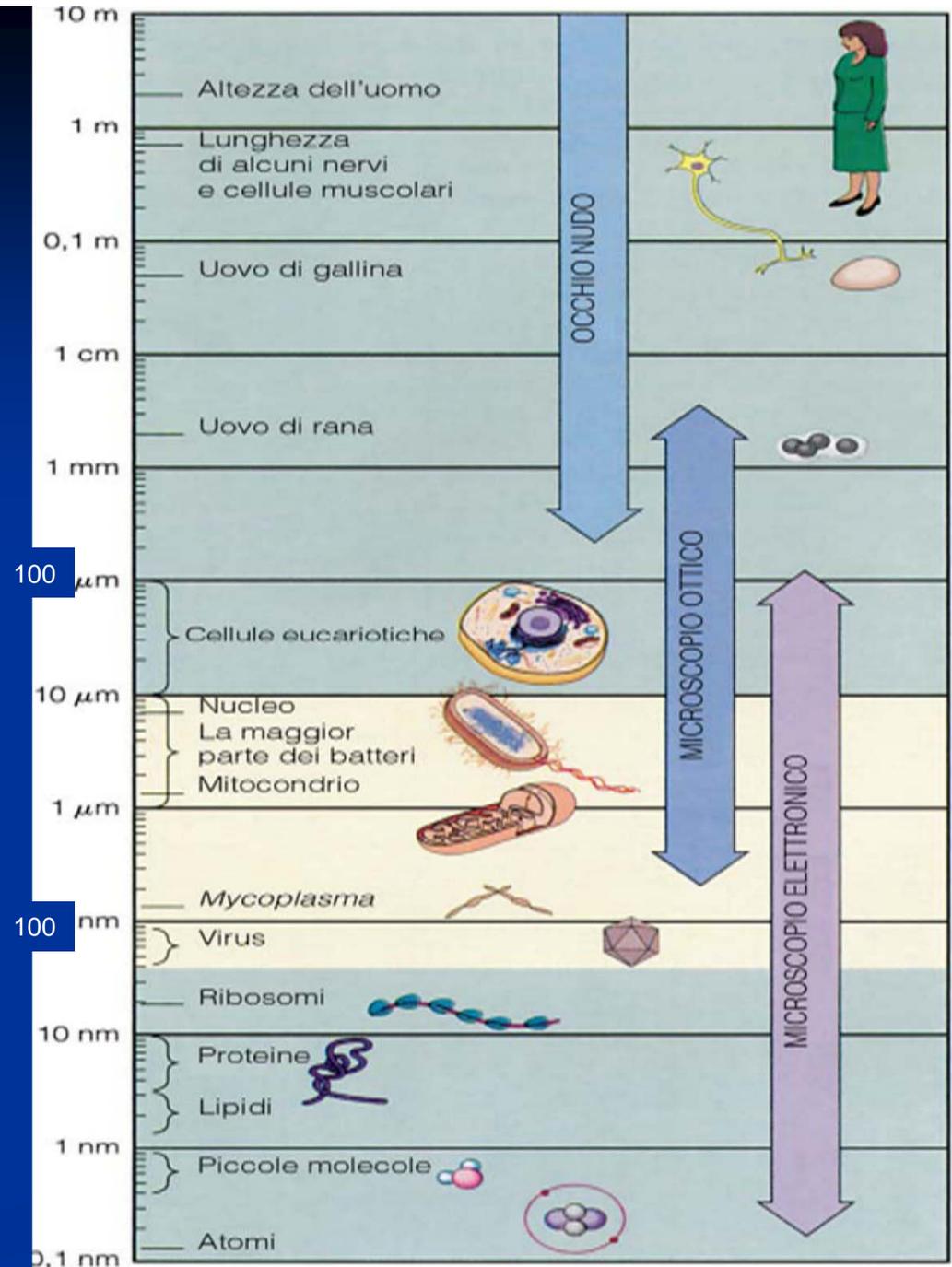
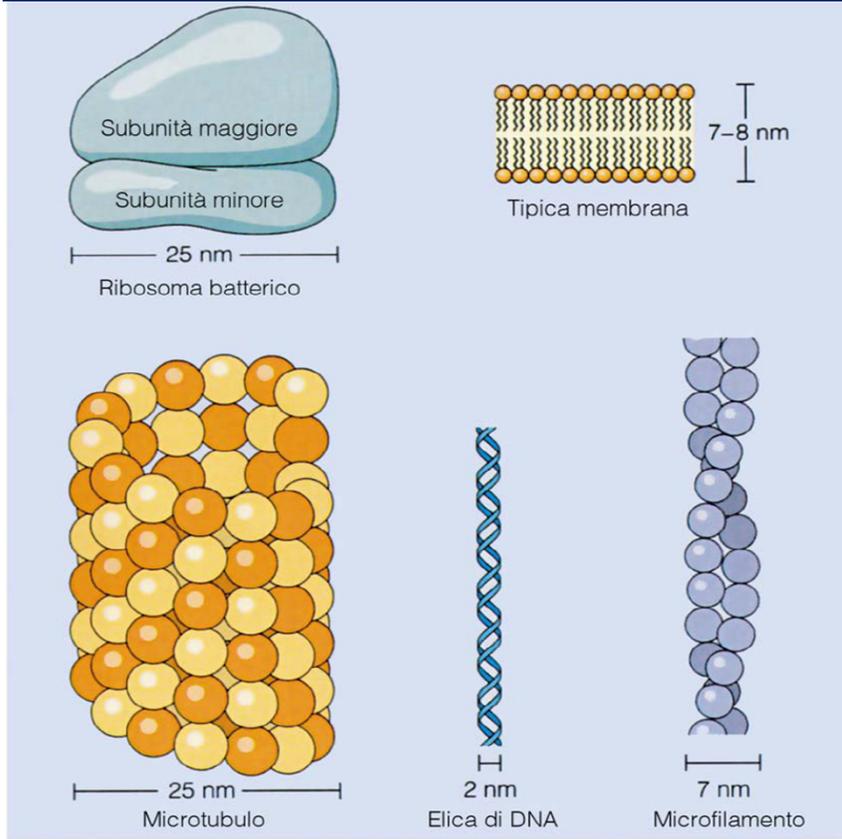
30 nm

ad esempio, ribosoma

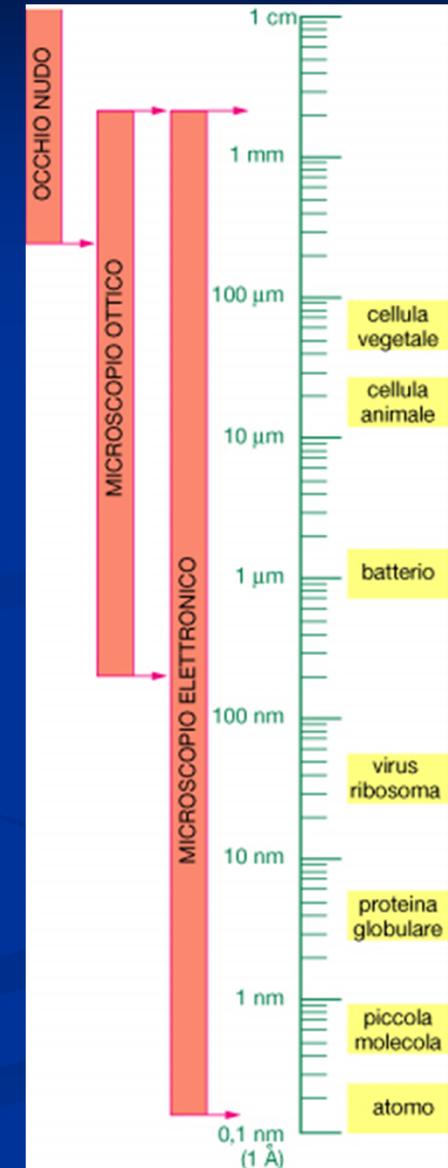
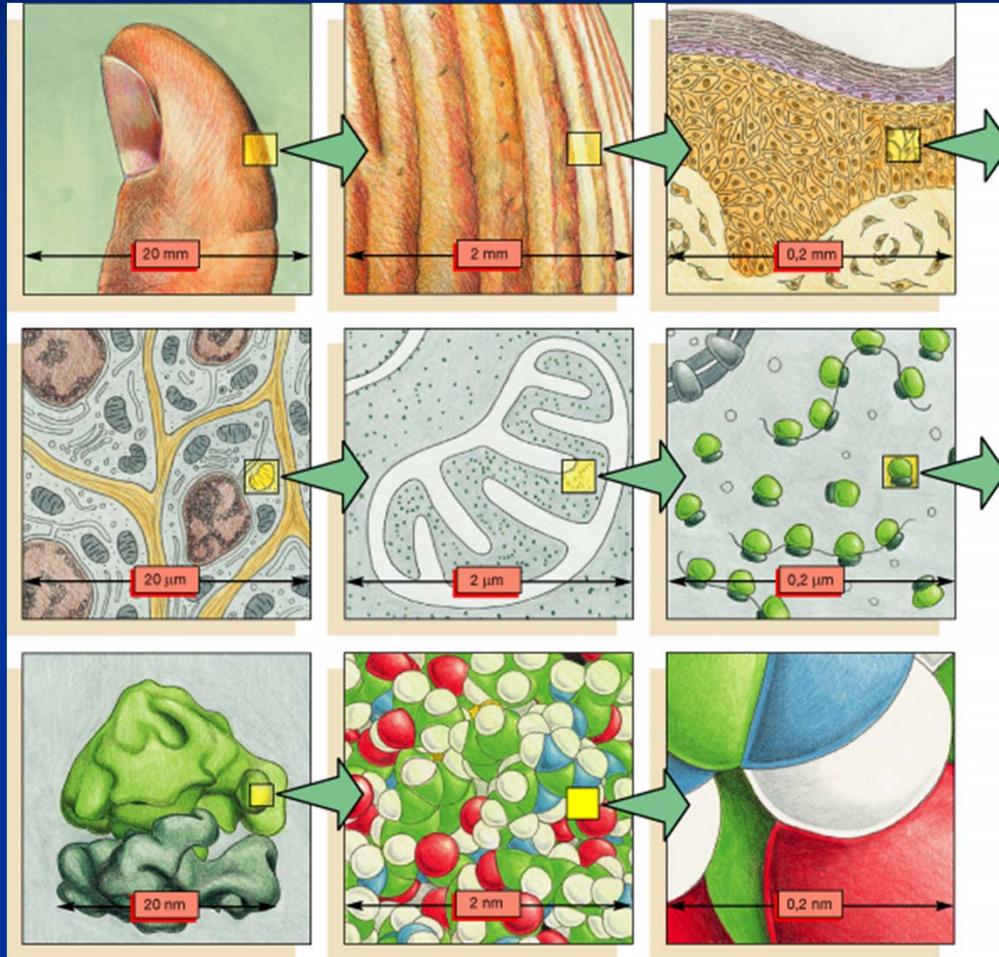
Filtrazione 0,2 μm



DIMENSIONI DELLE CELLULE E DEI LORO COMPONENTI



Scala tra cellule viventi e atomi e tipi di microscopio per la loro visualizzazione



DOMANDA di AUTOVALUTAZIONE:

In base ai loro componenti, dire quali tra le seguenti soluzioni e terreni di coltura devono essere necessariamente sterilizzate tramite la tecnica della **FILTRAZIONE**?

- soluzione «fisiologica»»
- soluzione salina bilanciata di Dulbecco-PBS
- terreno di coltura DMEM
- terreno di coltura TCM 199
- terreno di coltura RPMI

PROTOCOLLO DI STERILIZZAZIONE DEL MEDIUM PER COLTURE CELLULARI

Medium base ⇒ filtrazione volumi da 50 ml a 1L mediante filtro da bottiglia (diametro di esclusione 0,2 micron) utilizzando la pompa da vuoto o la beuta da vuoto

Medium uso completo* ⇒ filtrazione volumi 10-20 ml mediante filtrino da siringa (diametro di esclusione 0,2 micron)

N.B. questi filtri sono sterili e monouso!

Preparazione medium uso completo da usare al momento della coltura*: al medium base aggiungere il 10% FCS (eventualmente altri additivi, quali ITS, glutamina, ecc) e filtrare

* *Valutare il volume necessario per preparare le petri/pozzetti/flask per le colture*