



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)

Valutazione della vitalità cellulare

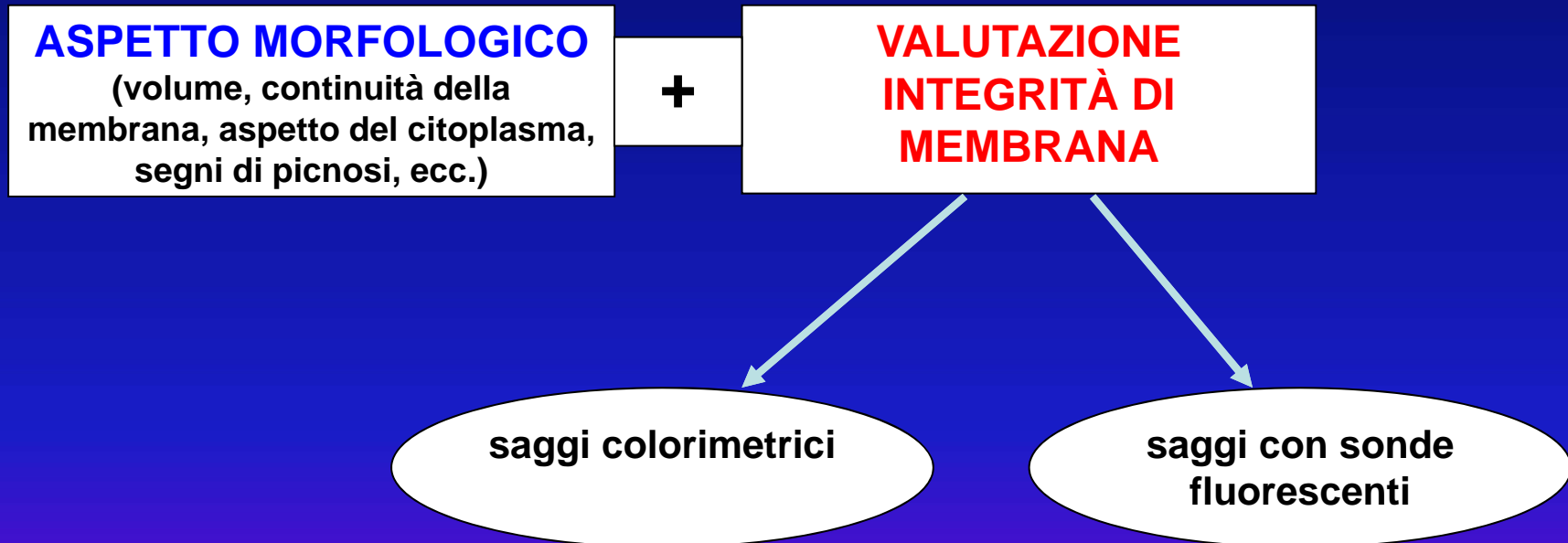
Valutazione della vitalità cellulare

VALUTAZIONE DELLA INTEGRITA' DI MEMBRANA

- **Osservazione al microscopio** (*cellule di grandi dimensioni*)
- **Metodi colorimetrici**
- **Probes fluorescenti** (*kit Dead/Live*)

VALUTAZIONE DELLA VITALITA' CELLULARE

La valutazione della vitalità deve essere fatta utilizzando in modo combinato un'analisi morfologica e delle colorazioni sopravitali



Gestione delle colture cellulari

➤ **Esaminare regolarmente la MORFOLOGIA delle cellule in coltura (es. forma e aspetto) è indispensabile per ottenere buoni risultati.**

-Oltre a confermare lo stato di salute delle cellule, la continua valutazione ad occhio della coltura e delle cellule al microscopio consente di rilevare **segni di contaminazione** prima che il processo sia andato troppo avanti.

-**Segni di deterioramento** nelle cellule sono: granularità intorno al nucleo, distacche delle cellule dal substrato, presenza di vacuoli nel citoplasma. Segni di deterioramento nelle cellule possono essere presenti per diverse ragioni, tra cui: contaminazione della coltura, senescenza della linea cellulare, presenza di sostanze tossiche nel medium, o semplicemente perchè le cellule richiedono un rinnovo del terreno. Se il deterioramento va troppo avanti diviene un processo irreversibile.

La maggior parte delle cellule di Mammifero possono essere suddivise in 3 principali categorie in base allo loro **MORFOLOGIA**:

- 1. FIBROBLAST-LIKE CELLS** (bipolari o multipolari, di forma allungata; crescono in adesione)
- 2. EPITHELIAL-LIKE CELLS** (poligonali con dimensioni più regolari; crescono in adesione formando aggregati discreti)
- 3. LYMPHOBLAST CELL** (sferiche; crescono in sospensione senza aderire al substrato)

In aggiunta a queste 3 categorie, alcune cellule hanno morfologie specifiche in funzione del loro specifico ruolo



es. cellule
neuronal

VALUTAZIONE DELLA VITALITA' CELLULARE \Rightarrow integrità di membrana

Al microscopio è possibile valutare l'integrità della membrana solo in cellule di grandi dimensioni, come la cellula uovo (il gamete femminile)



Valutazione morfologica della cellula uovo allo stereomicroscopio

ESCLUSIONE DEL TRYPAN BLUE

(il colorante entra solo nelle cellule morte)

Incubazione →

Stock solution 0.4% (w/v) trypan blue : sospensione cellulare = 1:1

Mescolare e lasciare in incubazione per 5-15 minuti

Trasferimento aliquota sospensione cellulare nella camera di **Burker** → valutazione vitalità al microscopio ottico e conteggio cellule vive

N.B:

***non prolungare
l'incubazione!!!***

Conteggio cellule vitali

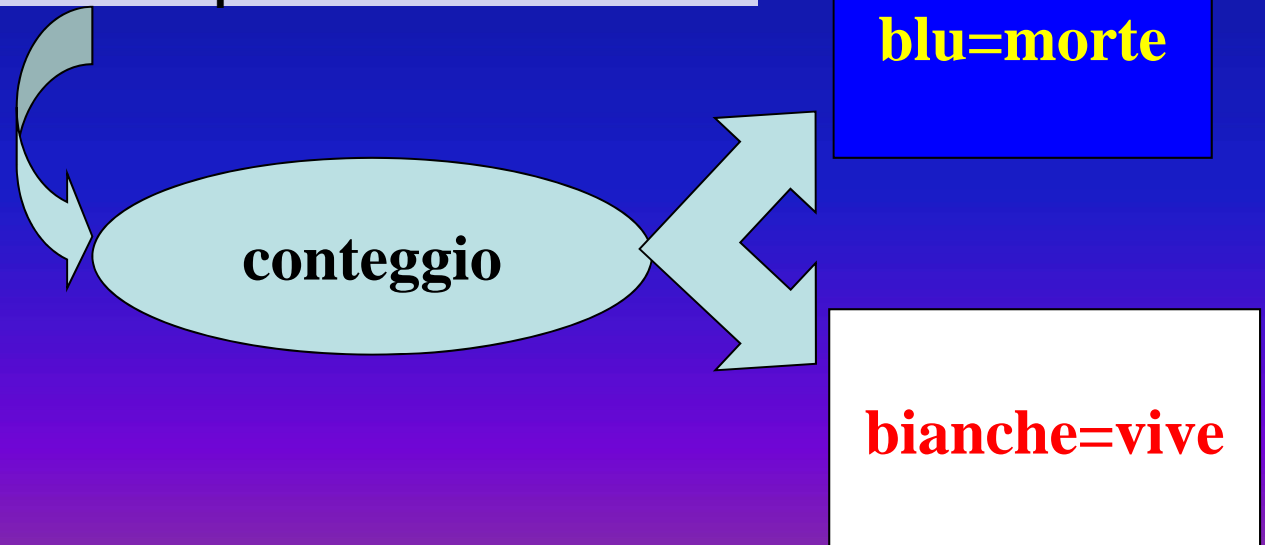
- TRYPAN BLUE 0,4% (w/v)

Incubazione trypan:sospensione cellulare (1:1)

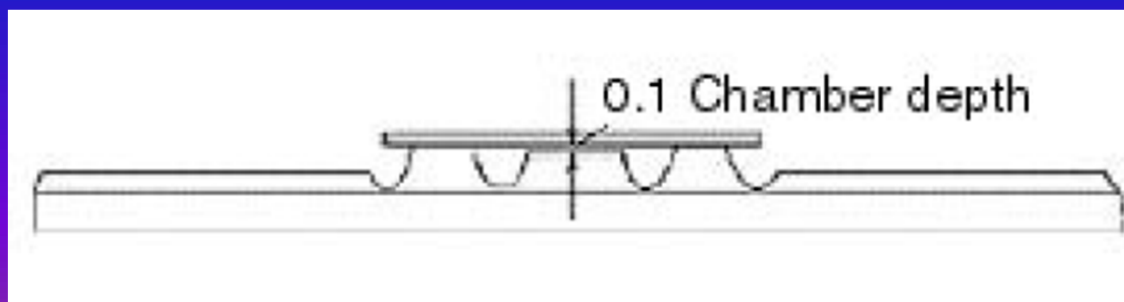
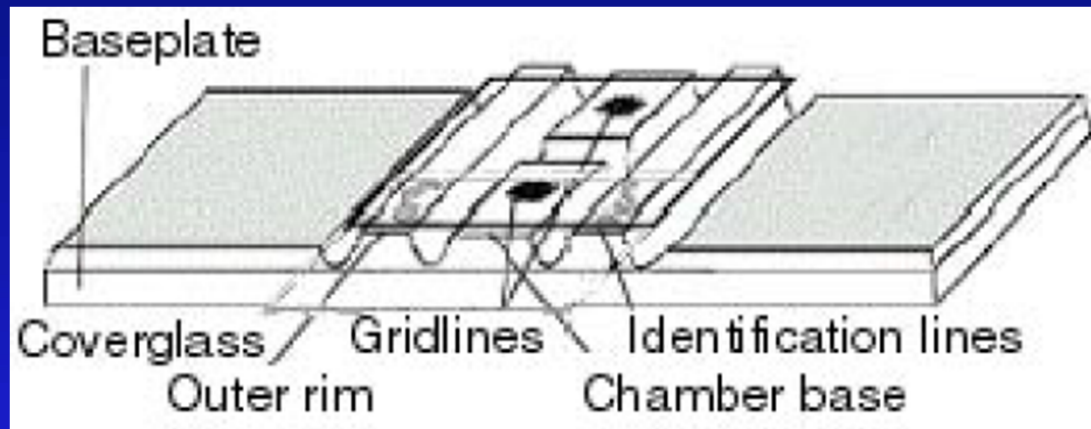
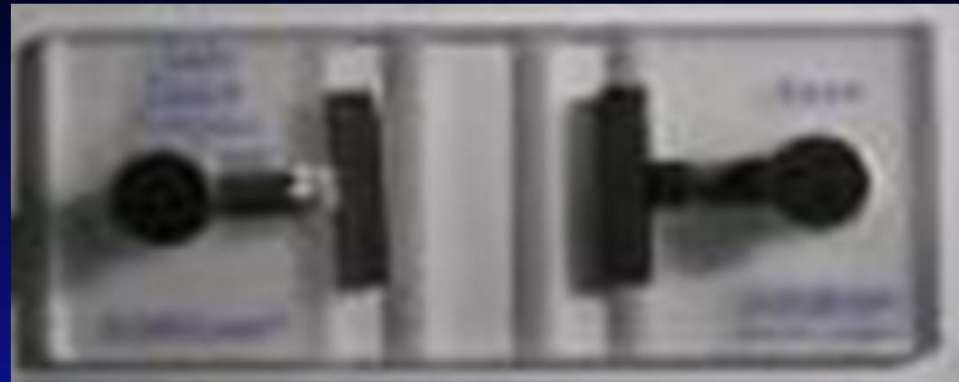
- 5-15 minuti

non di più!!!

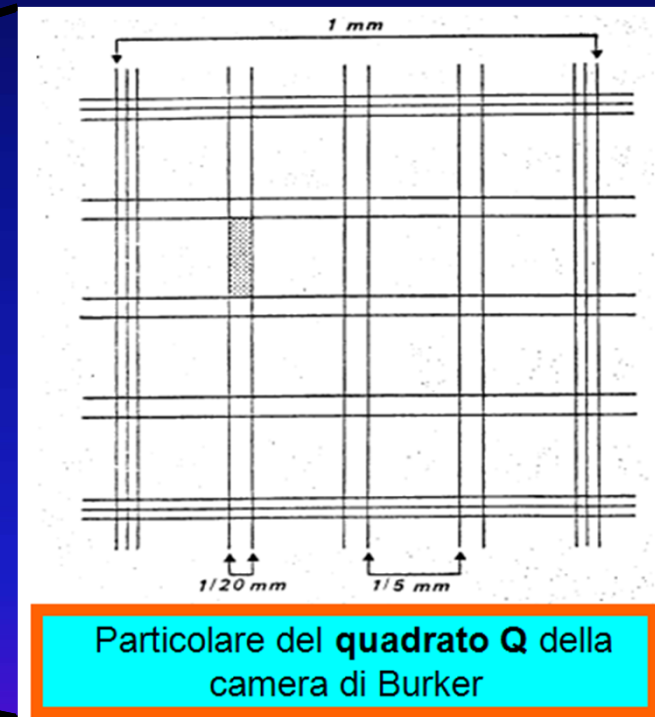
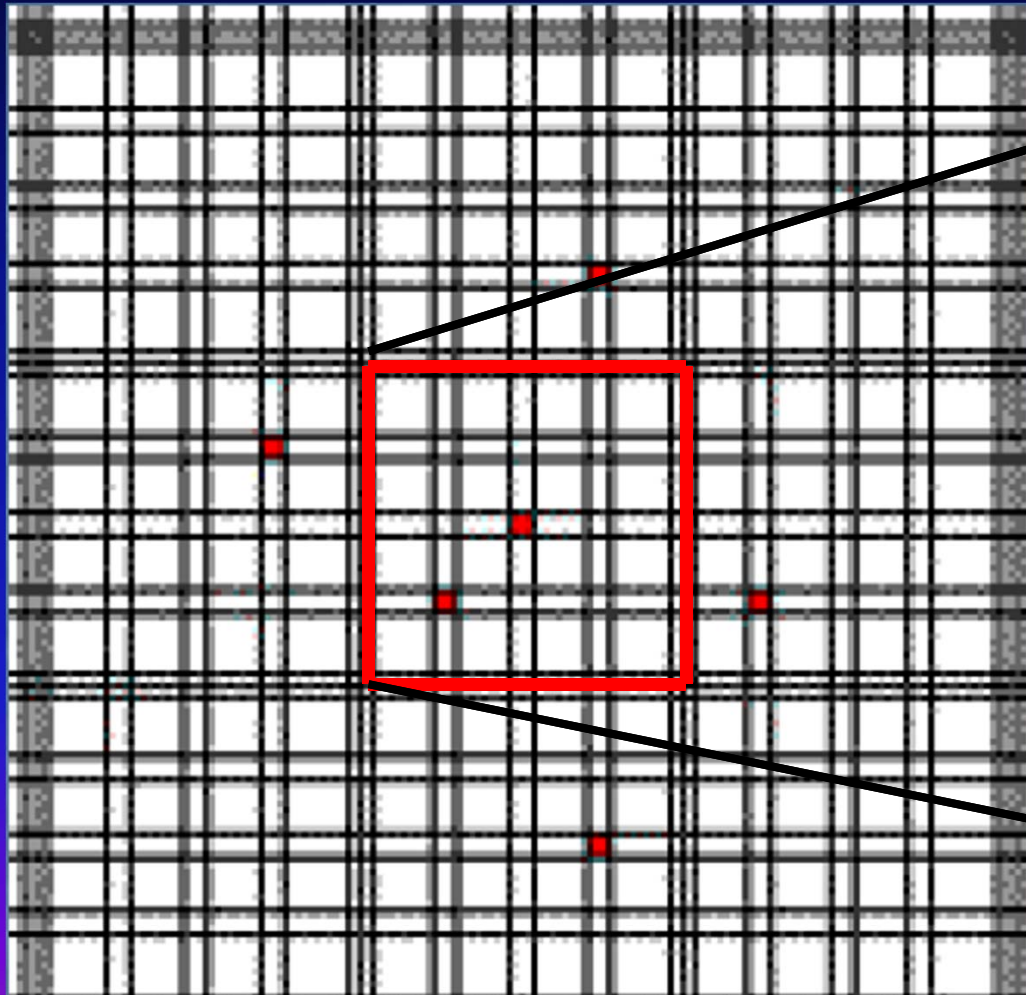
- Mescolare/mettere in camera emocitometro coperta da coprioggetto/osservare al microscopio ottico



camera di Burker



Conta delle cellule mediante emocitometro o camera di Burker



Conteggio delle cellule nel **quadrato Q**

Conta delle cellule mediante emocitometro o camera di Burker

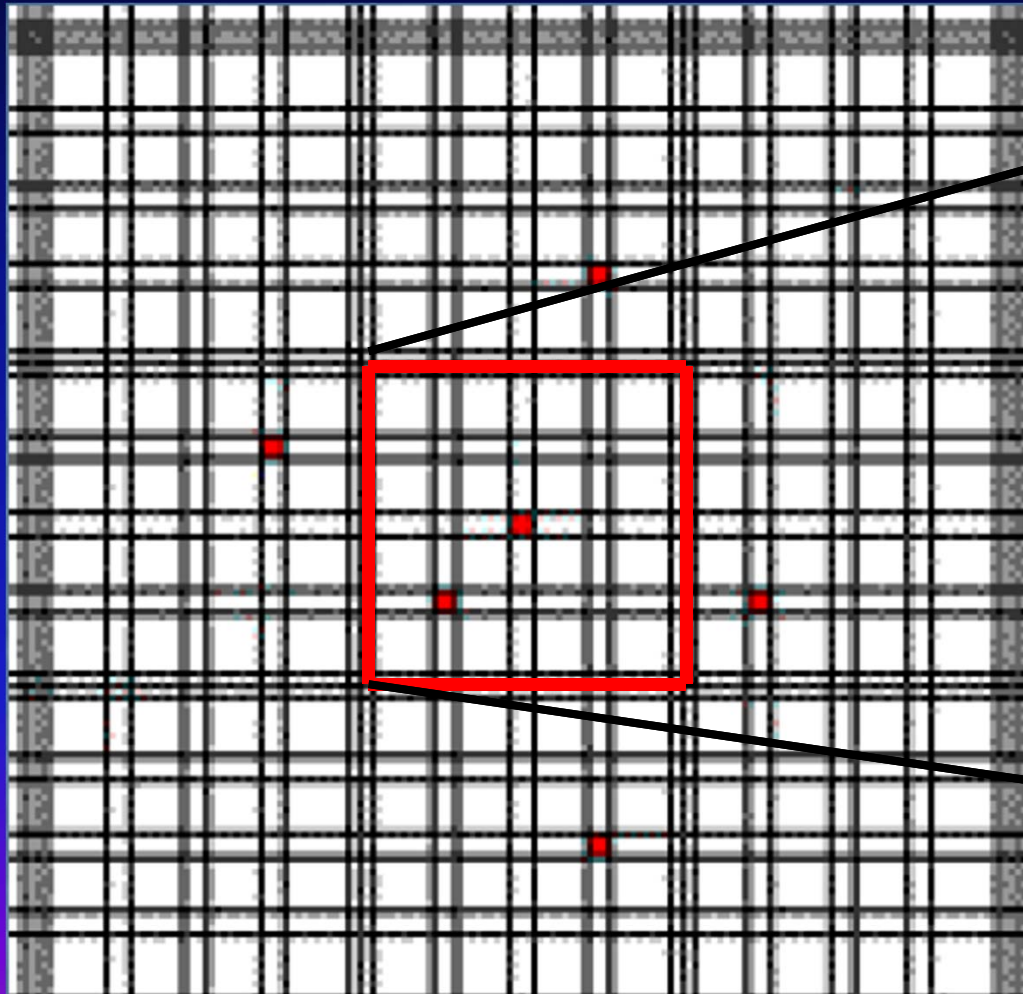
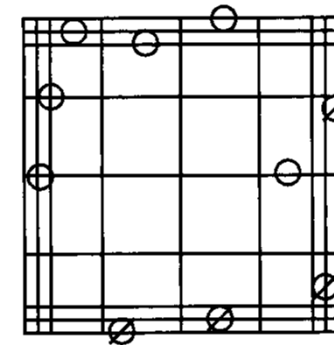


DIAGRAM II
CORNER SQUARE (ENLARGEMENT)

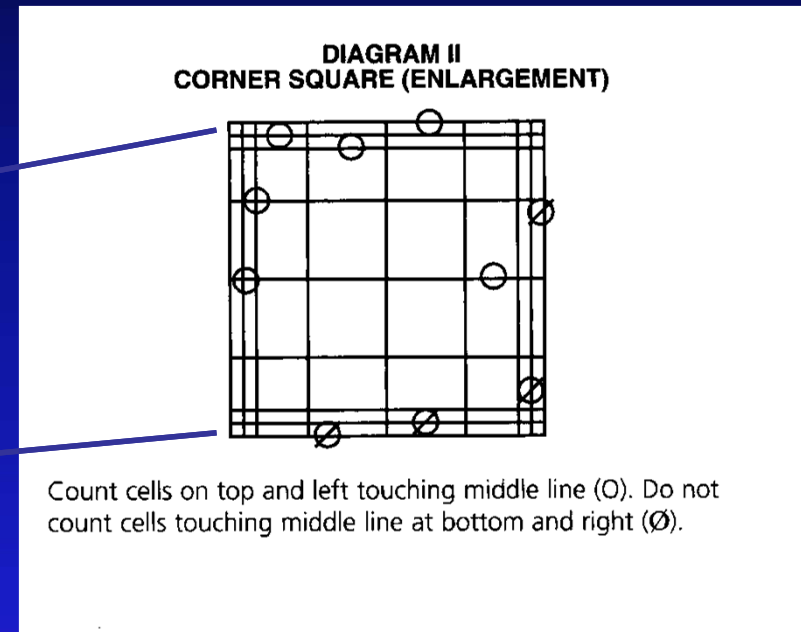
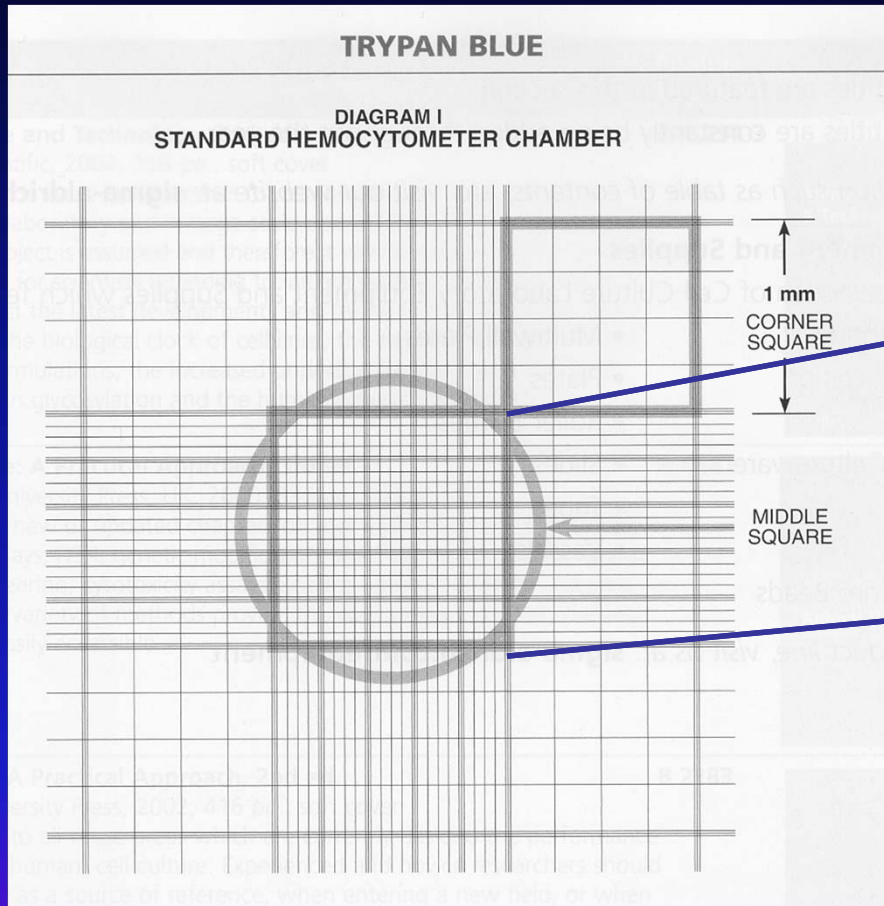
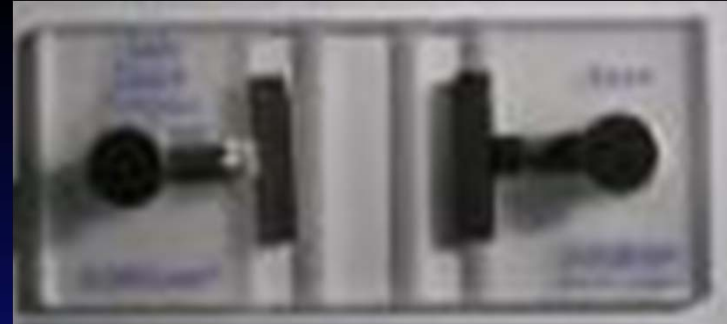


Count cells on top and left touching middle line (O). Do not count cells touching middle line at bottom and right (Ø).

Le cellule sui bordi del quadrato Q vanno conteggiate?

Conteggio delle cellule nel **quadrato Q**

Conta delle cellule mediante emocitometro o camera di Burker



Conteggio delle cellule in un numero di almeno 4-5 quadrati Q per poi calcolare il valore medio (n medio Q)

$$\text{Cells vive per ml} = n \text{ medio } Q \times \text{fattore diluizione} \times 10^4$$

COLORAZIONE CON PROBES FLUORESCENTI

- *Fluoresceina diacetato (FDA)*: esce rapidamente dalle cellule
- *Carbossifluoresceina diacetato (CFDA)*
- *Calceina AM*

KIT LIVE/DEAD

Integrità di membrana

- ritenzione intracellulare

+

Attività enzimatica endogena

- rimozione gruppo lipofilo AM
- attivazione fluorescenza (solo in alcuni casi)

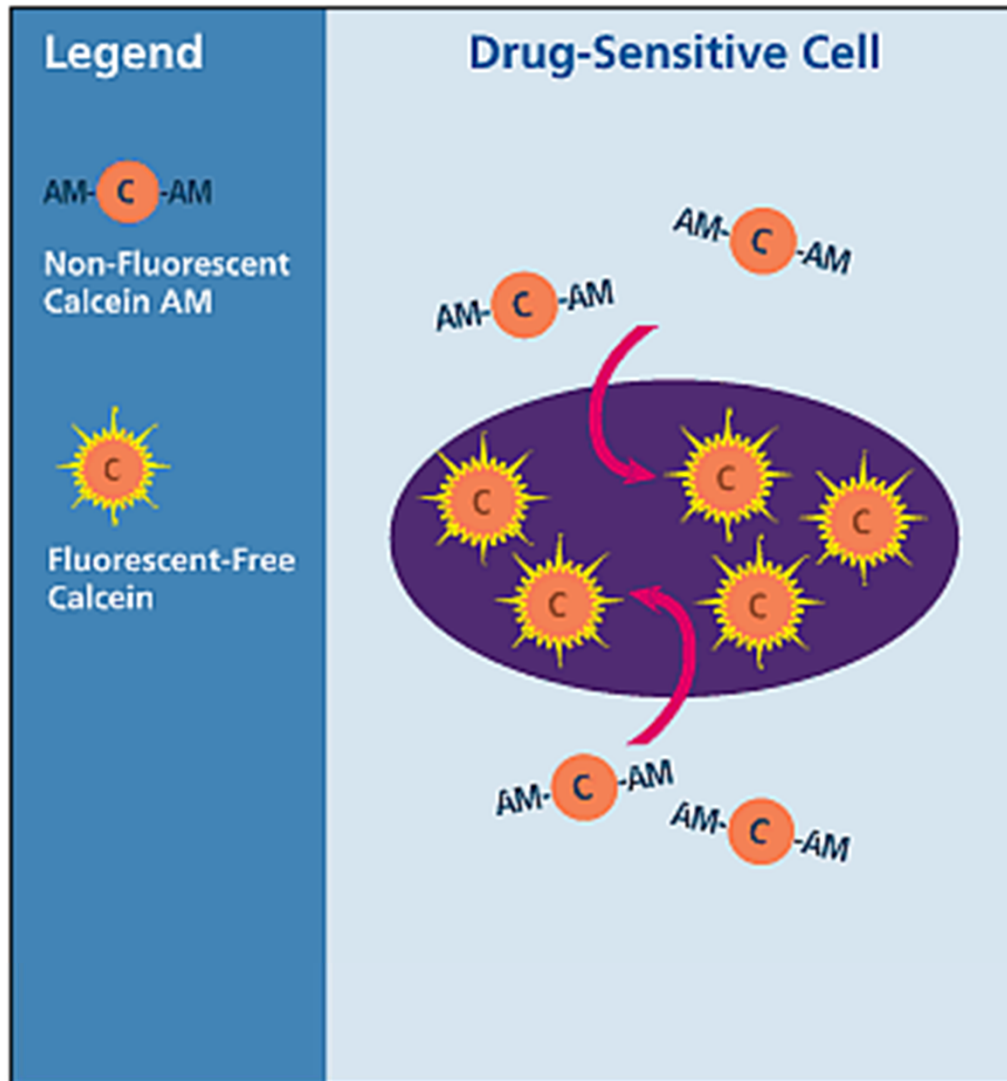


Figure 6. The basic principle of the Calcein assay.

1. Calcein AM rapidly penetrates into cell
2. Inside the cell is converted by intracellular esterases to free Calcein, a fluorescent and polar molecule

Calcein fluorescence is practically insensitive to pH and intracellular ion concentrations

Perché le cellule si colorano?

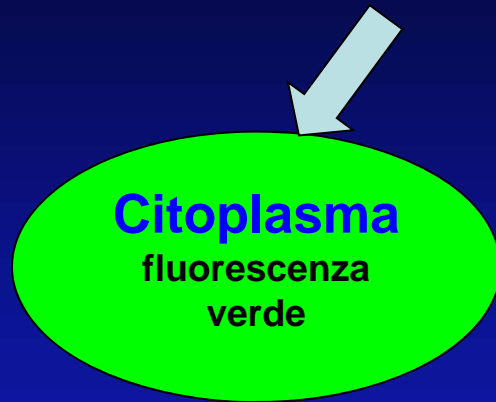
- **Gradiente di concentrazione**
- **Caratteristiche del colorante**

esterasi intracellulari

- Stock solution in DMSO → **1-10 mM**
- Diluizione in medium cellulare alla concentrazione finale → **1-25 μM**
- **Pluronic F-127** → detergente non ionico
- Incubazione per **15-60 minuti**, (37°- 38°C), al buio
- Lavaggio
- Osservazione microscopio ottico a **fluorescenza**

Kit LIVE/DEAD

CALCEIN AM / ETHIDIUM BROMIDE 1 (o Propidium Iodide)

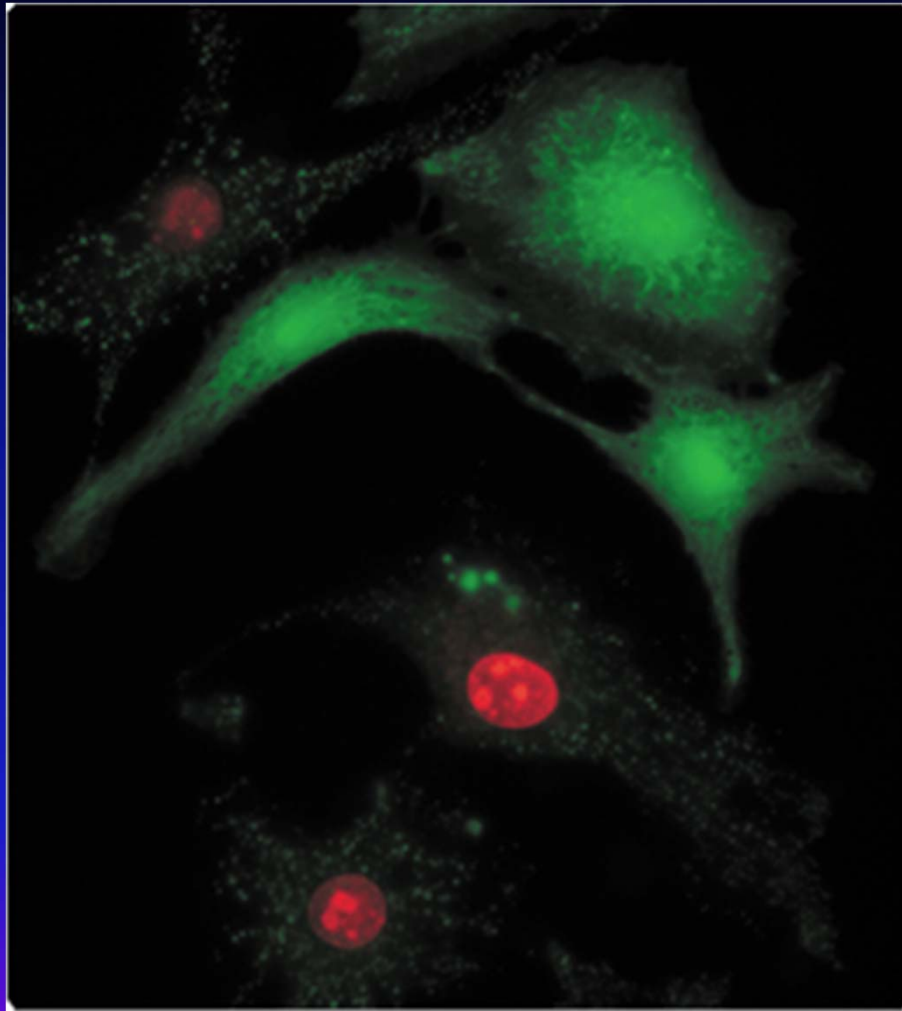


Cellule verdi nel citoplasma + incolori nel DNA → VIVE

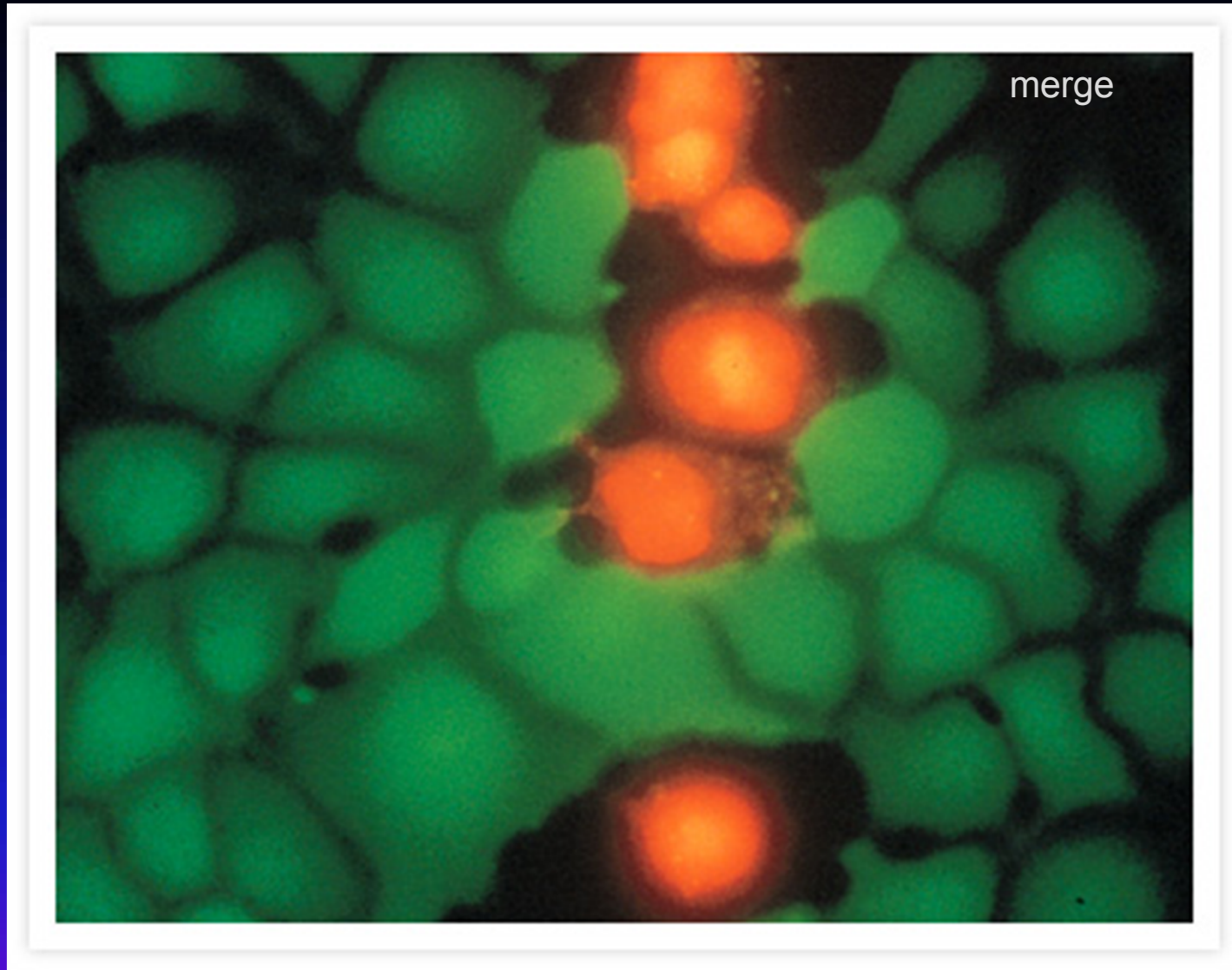
Cellule DNA rosso + citoplasma poco (o assente) verde → MORTE

valutazione al microscopio ottico a fluorescenza

Live cells fluoresce bright green
Dead cells with compromised
membranes fluoresce red-orange

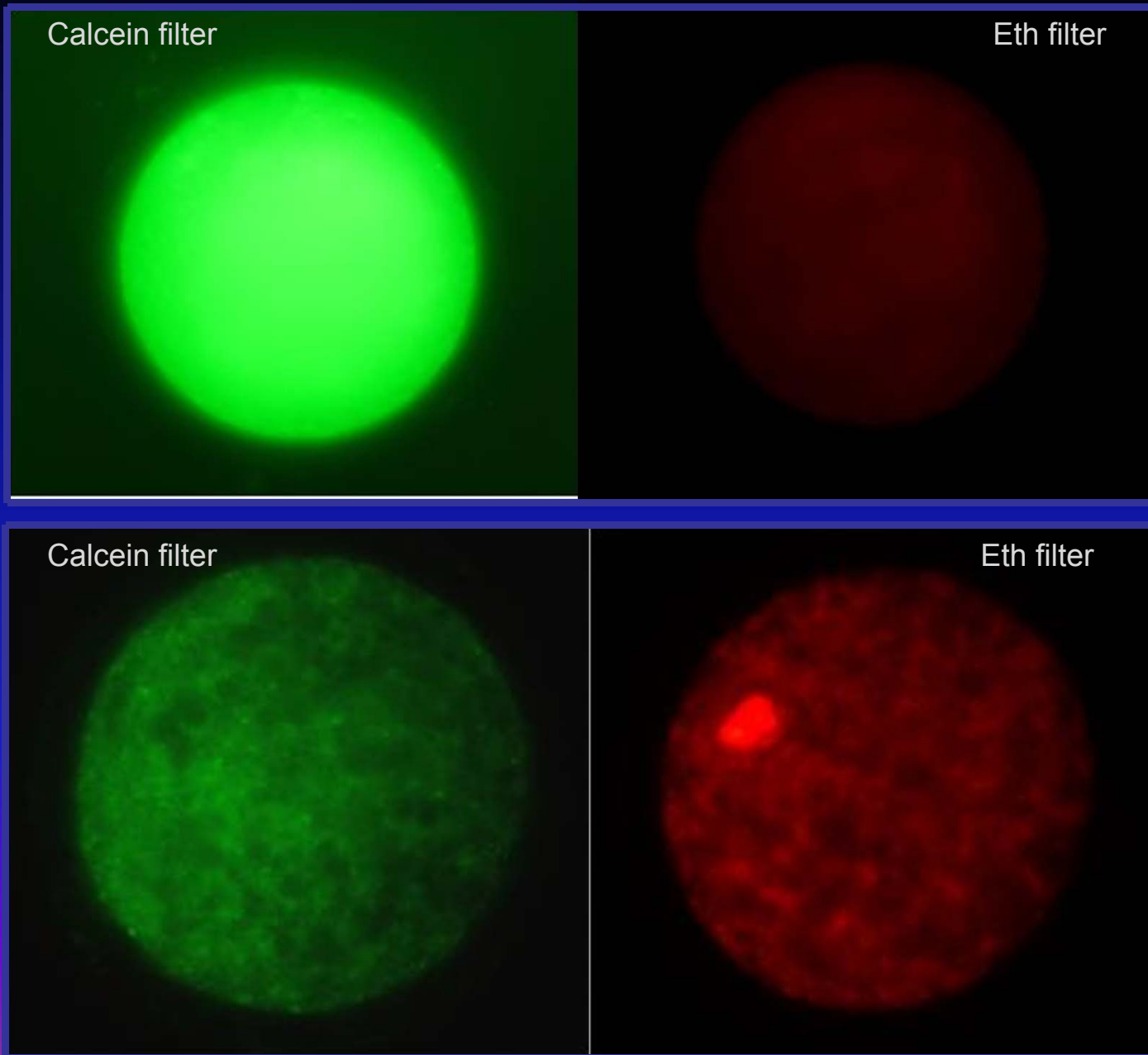


bovine pulmonary artery epithelial cells stained with
the reagents in **LIVE/DEAD®** Cell
Viability/Cytotoxicity Assay Kit
(Invitrogen)



Live and dead kangaroo rat (PtK2) cells stained with **ethidium homodimer-1** and the esterase substrate **calcein AM** (kit LIVE/DEAD®
(www.invitrogen.com))

Valutazione integrità di membrana nell'oocita: test "LIVE/DEAD"



Kit LIVE/DEAD

(sonde nucleari
per il DNA)

→ **SYBR 14/ Propidium Iodide**

DNA
fluorescenza
verde

DNA
fluorescenza
rossa

***Cellule con fluorescenza nucleare verde e assenza
segnale rosso nel nucleo → VIVE***

***Cellule con fluorescenza nucleare rossa e assenza (o lieve)
segnale verde nel citoplasma → MORTE***

valutazione al microscopio ottico a fluorescenza

Valutazione integrità di membrana negli spermatozoi: test "LIVE/DEAD"



Live sperm with intact membranes are labeled with cell-permeant nucleic acid stain, **SYBR® 14**, and fluoresce **green**.

Dead sperm, which have been killed by unprotected freeze-thawing, are labeled with **propidium iodide** and fluoresce **red-orange**.

VALUTAZIONE DELLE FUNZIONI BIOFISICHE DELLA MEMBRANA

➤ *ad es. Potenziale di membrana*

- **Metodi elettrofisiologici**

- *metodiche invasive*
- *metodiche difficili*
- *valutazione su singola cellula*

- **Microscopio confocale: sonda fluorescente per il potenziale (*Bis-Oxonol*)**

- *non invasiva*
- *valutazione su più cellule*
- *LSCM: strumentazione costosa*