

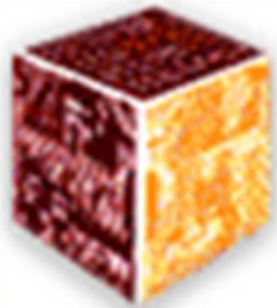


UNIVERSITA'  
DEGLI STUDI  
DI **TERAMO**

*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  $\mu\text{m}$
2. **Cellule eucariotiche:** dimensioni da 5 a 100  $\mu\text{m}$  (mediamente 20  $\mu\text{m}$ )

Viruses are submicroscopic particles 50–100 nm



Prokaryotes are the smallest true cells. Most are 1–2  $\mu\text{m}$



Most eukaryotic cells are in the range 5  $\mu\text{m}$ –100  $\mu\text{m}$



Yeast 5  $\mu\text{m}$



Human cell  
20  $\mu\text{m}$

Nella filtrazione il diametro di esclusione usato più frequentemente nel lab di colture cellulari è di **0.2  $\mu\text{m}$**

# 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

legami covalenti

MACROMOLECOLE

legami non covalenti

COMPLESSI  
MACROMOLECOLARI



ad esempio,  
zuccheri, amminoacidi  
e nucleotidi



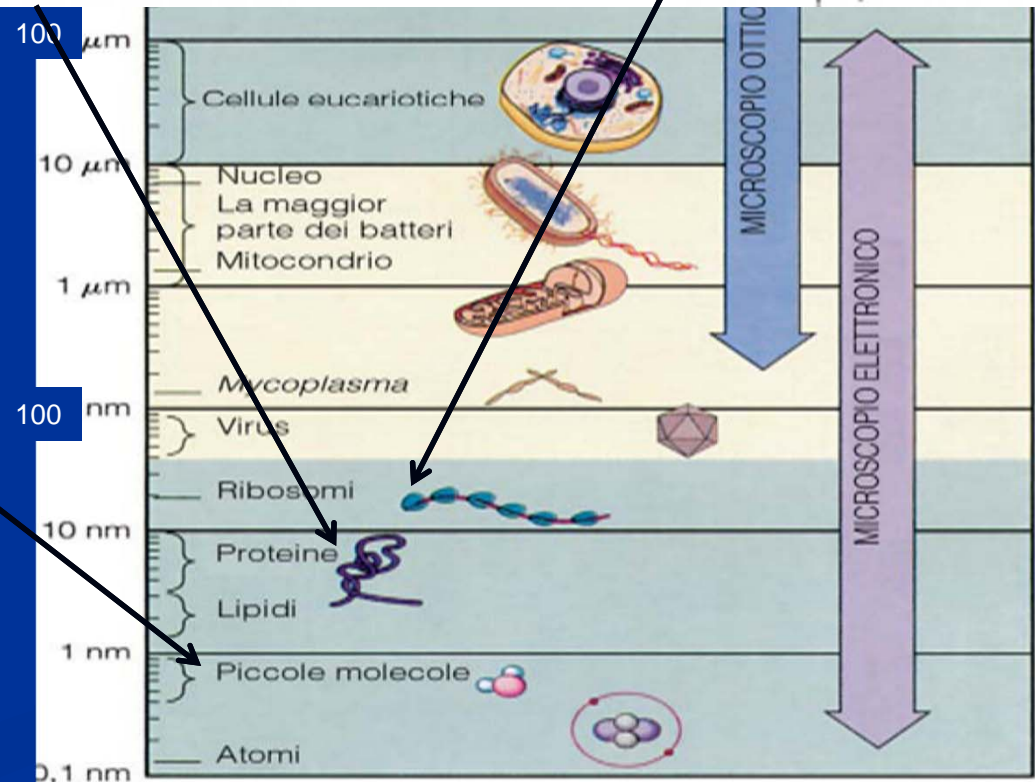
ad esempio,  
proteine globulari e RNA



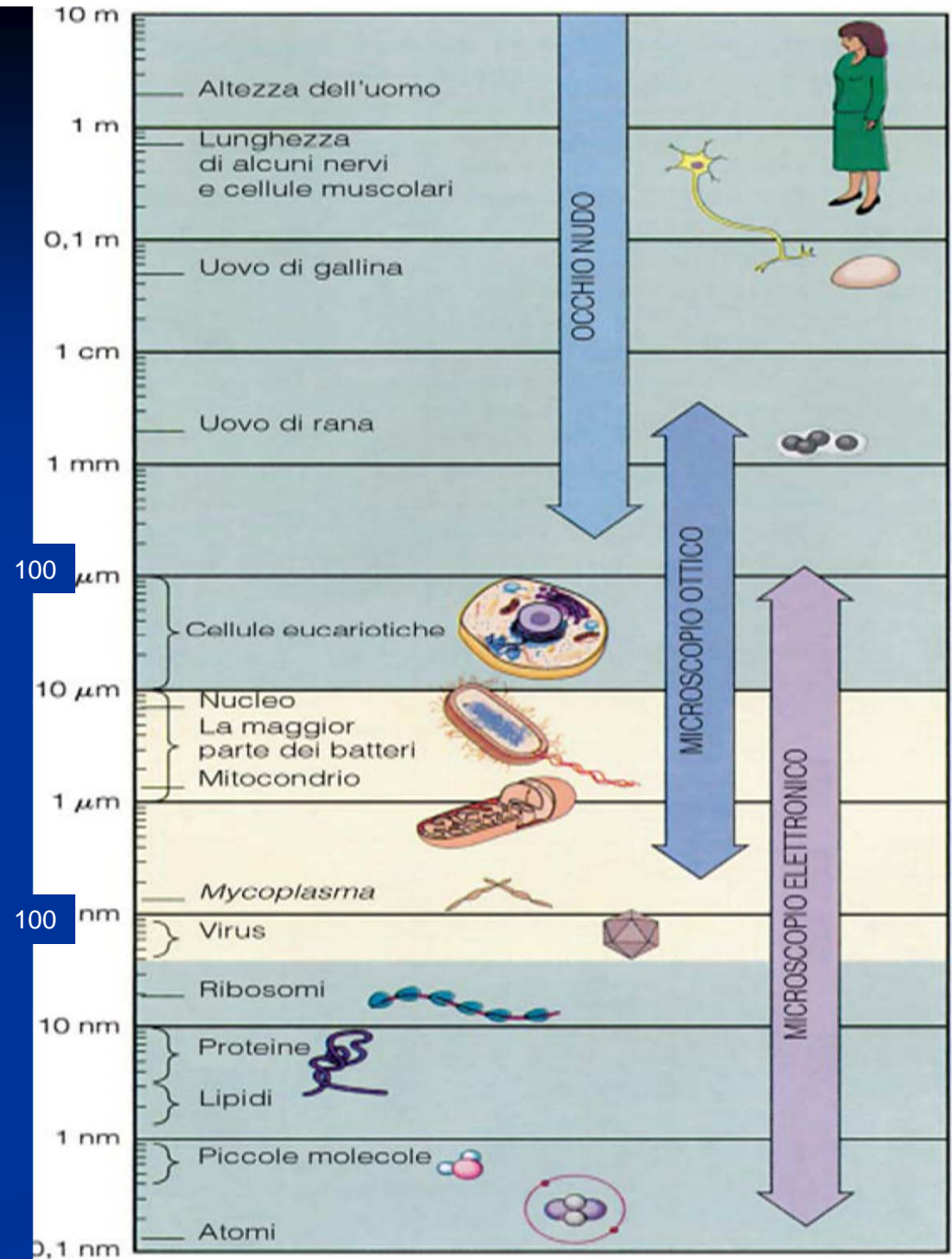
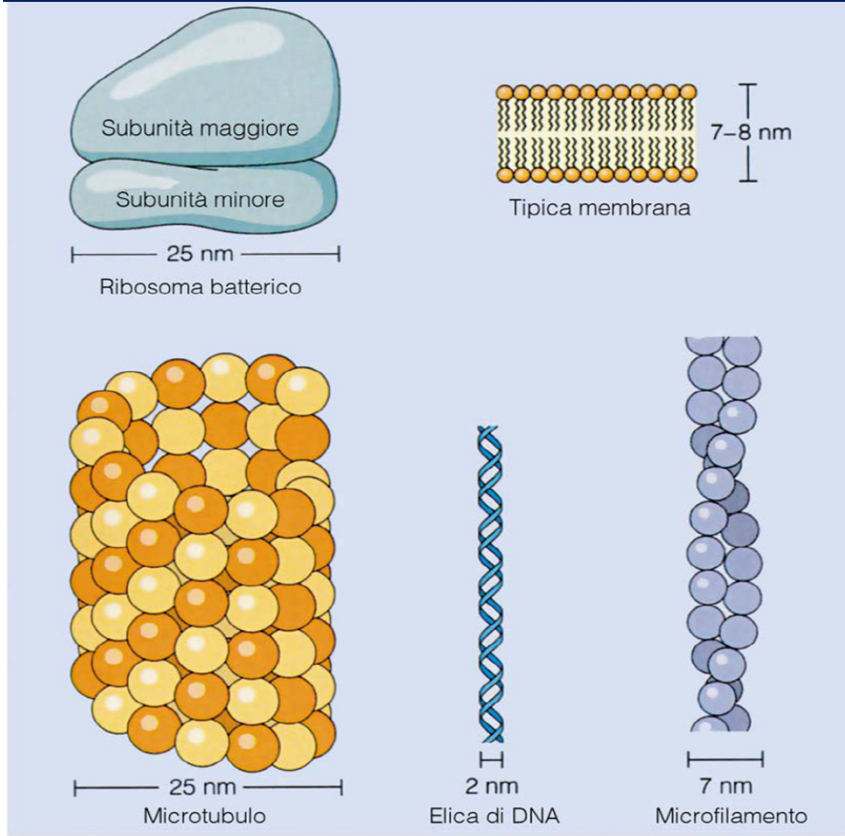
30 nm

ad esempio, ribosoma

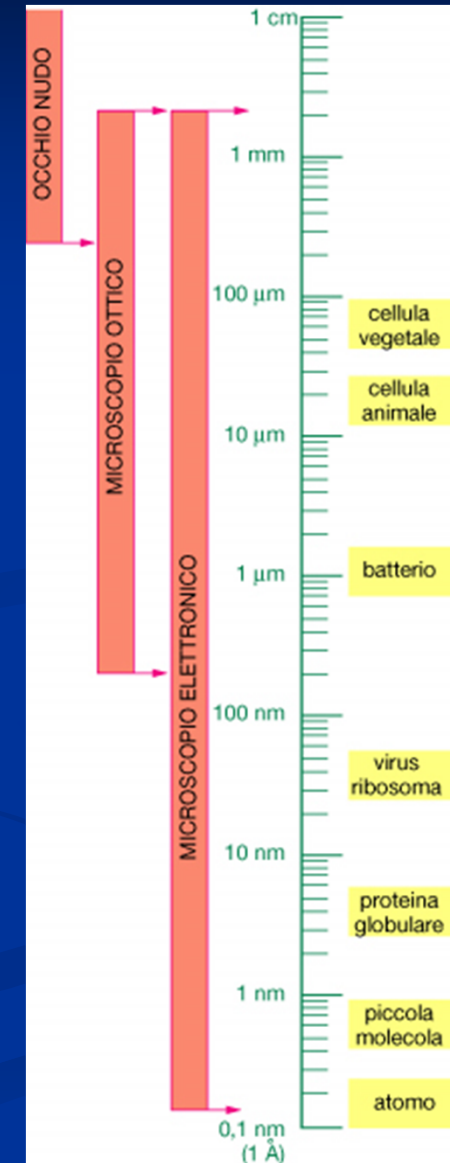
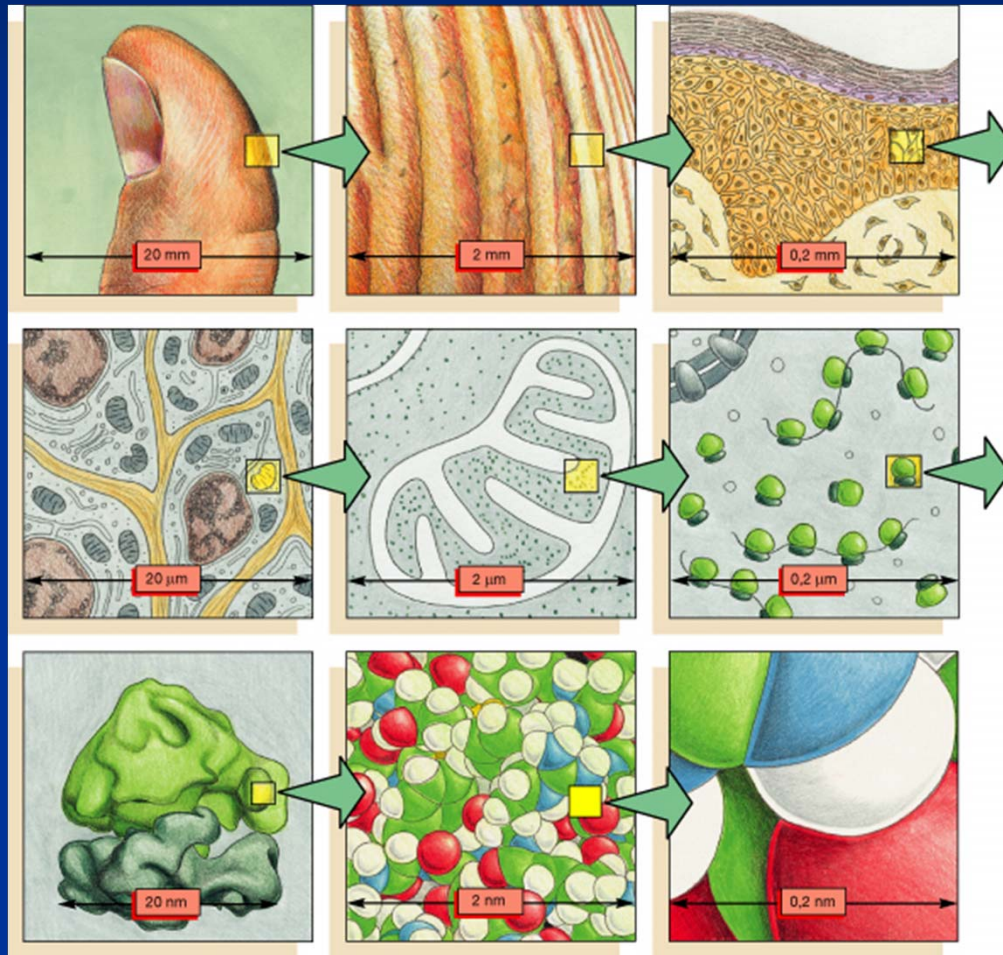
Filtrazione 0,2  $\mu\text{m}$



# 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*