

**Corso di laurea magistrale in
BIOTECNOLOGIE DELLA RIPRODUZIONE**

UNIVERSITA'
DEGLI STUDI
DI **TERAMO**

Corso di recupero
**Fisiologia cellulare/
Laboratorio di colture
cellulari**

Prof.ssa Luisa Gioia

**STRUMENTAZIONE/GESTIONE
LAB COLTURE CELLULARI**

Laboratorio Colture cellulari

Le colture cellulari vanno allestite in un ambiente **STERILE** e privo di effetti tossici o inibitori

Specifica strumentazione di laboratorio garantisce alle cellule in coltura le **RICHIESTE FISIOLOGICHE** (temperatura, pH, umidità) necessarie per la loro sopravvivenza e la loro crescita

Organizzazione laboratorio colture cellulari



Inoltre.....

Indumenti operatori

Preparazione materiale biologico

Preparazione soluzioni/medium

Stoccaggio reagenti

Area valutazione

Rifiuti speciali

AREA STERILE

•Cappa a flusso Laminare

(Stereomicroscopio)

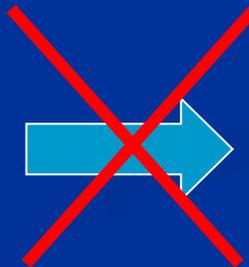
•Incubatore a CO₂



Operare in sterilità

- Area sterile
- Guanti sterili
- Camice
- Ordine
- Pulizia
- Metodo

tossicità



**Lab colture
cellulari**

Principali strumenti del laboratorio di colture cellulari

Cappa a flusso laminare per colture cellulari

È necessario allestire le colture lavorando in condizioni di **sterilità**.

Questo tipo di cappa elimina i microrganismi presenti nell'aria dall'ambiente di lavoro mediante un **filtro HEPA** (*high efficiency particulate hair*)

Il flusso laminare discendente limita l'ingresso di microrganismi dall'esterno.



colture cellulari:
cappe **classe II**

Principali strumenti del laboratorio di colture cellulari

Stereomicroscopi

- Per preparazione tessuti
- Per osservazione/spostamento cellule di grandi dimensioni (es. ovociti)



Visione 3D

Fino a circa 50-100 ingrandimenti

Microscopio ottico

**OSSERVAZIONE AL
MICROSCOPIO OTTICO DELLE
CELLULE/COLTURE
CELLULARI**

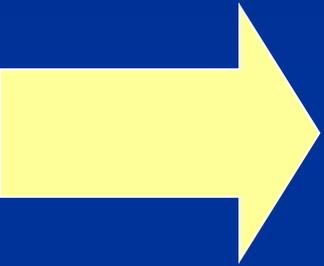
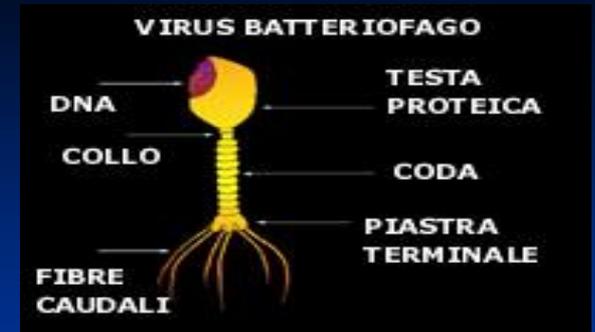
(cellule somatiche)

per valutare: stato di proliferazione,
stato di salute, parametri morfologici,
parametri fisiologici

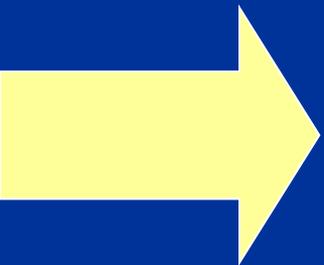
**Circa 1000 - 1500
ingrandimenti**



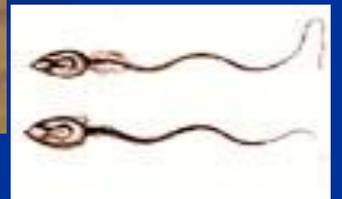
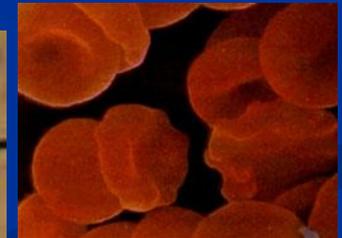
dimensione: 0,1 micrometri
(10^{-7} metri)
virus



dimensione: 1 micrometro
(10^{-6} metri)
Organelli, cellule procariotiche, batteri

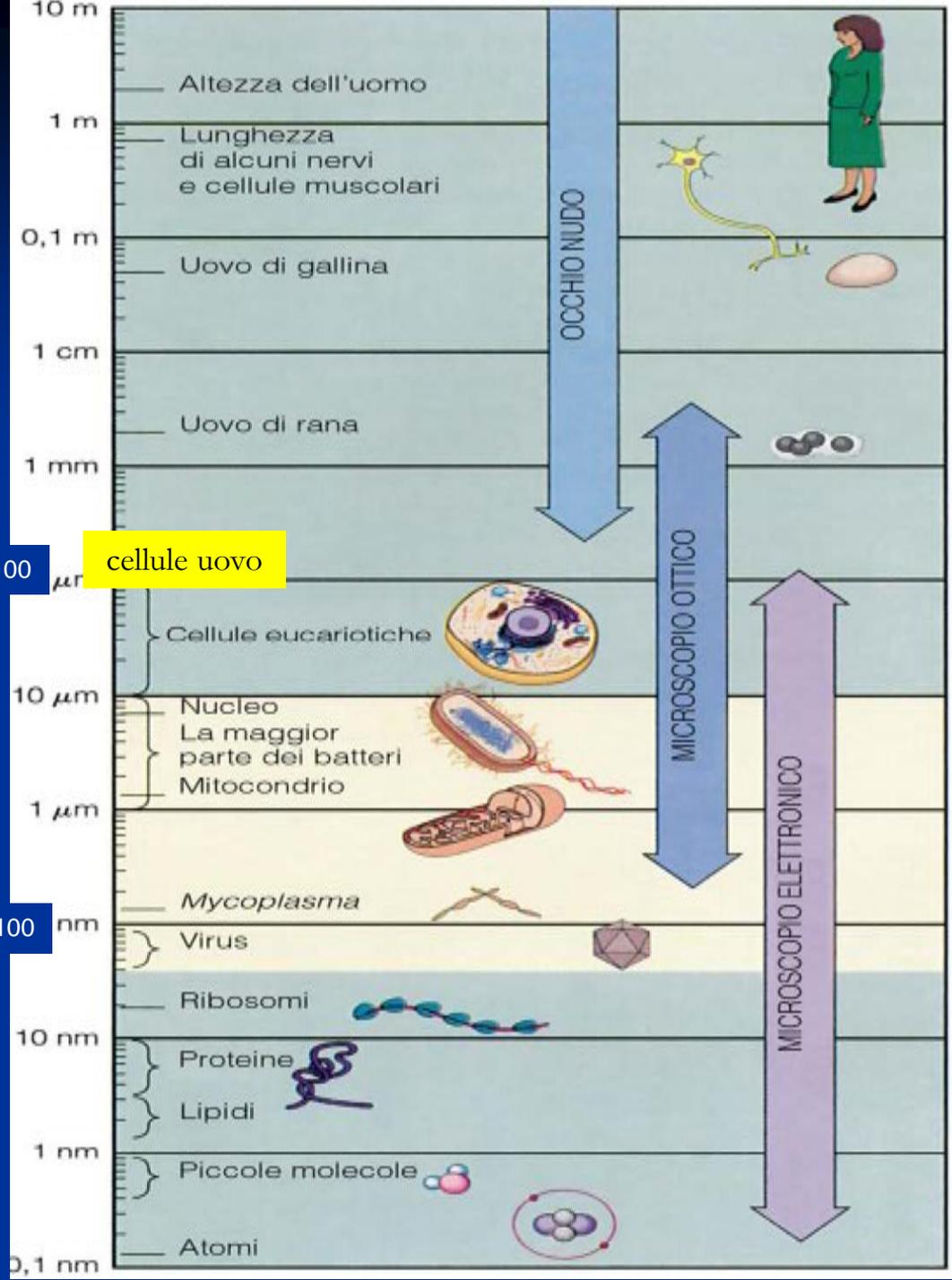


dimensione: 10 micrometri
(10^{-5} metri)
cellule eucariotiche



Stereomicroscopio

Microscopio ottico



VETRERIA



normale/PIREX



beuta

*graduata/non
graduata*

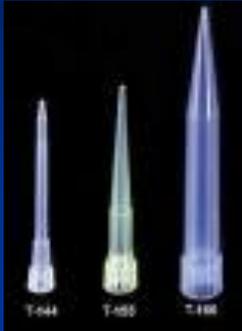
matraccio



becher

cilindri

Materiale monouso plastica (polistirene)



puntali



provette



eppendorf

recipienti per colture cellulari



Capsule
petri



Flask



Piaste
multi-wells



pipette
monouso



siringhe

Materiali monouso per le colture

Sistemi ventilati

- Petri dish (capsule petri)
- Piastre multi-wells (multi-pozzetto)



Sistemi chiusi

- Flask (fiasche)



Principali strumenti del laboratorio di colture cellulari

Centrifuga

Con la centrifuga si puo' generare un aumento di gravità rispetto alla gravità terrestre accelerando il processo di sedimentazione



L'obiettivo è la separazione di una sospensione di particelle in un liquido in *due distinte fasi*:

- Sedimento (**Pellet**)

- **Surnatante**

- Per le subcolture
- Per la preparazione di cellule per la crioconservazione
- Rischio: aerosol
- Coperchio (trasparente)
- Non riempire i tubi/ependorf fino all'orlo
- Bilanciamento
- Pulizia e manutenzione (segni di corrosione)

Microcentrifughe

- **Centrifughe da banco** per microprovette da 0,2 ml fino a 2 mL
- Nelle microcentrifughe per la centrifugazione di provette standard tipo Eppendorf la **velocità di rotazione è selezionabile tra 1.000 e 14.000 rpm**
- I rotori per la microcentrifuga standard sono in genere da 24 posizioni per provette da 1,5 mL e 2,0 mL, mentre per provette da 0,5 mL si possono usare rotori da 36 posizioni.



RPM e RFC (o g): DUE SIGLE COMUNI NELLA CENTRIFUGAZIONE

rpm - indica il **numero di rivoluzioni al minuto**, che viene comunemente usato per indicare la velocità di centrifugazione;

non esprime il valore della forza centrifuga a cui è sottoposta una particella, in quanto **dipende anche dal raggio del rotore**.

Quindi le modalità di centrifugazione devono essere espresse riportando la forza centrifuga come le rotazioni al minuto insieme al raggio del rotore oppure - più comunemente - come multiplo della forza di gravità, cioè come forza centrifuga relativa (RCF).

RCF (detta anche **g**) - indica la **forza centrifuga relativa**, ossia il rapporto tra il peso di una massa nel campo centrifugo e il peso della stessa massa nel solo campo gravitazionale.

La RCF è facilmente calcolabile con la formula:

$$\text{RCF o } g = 1,117 \cdot r \cdot \text{rpm}^2 \cdot 10^{-3}$$

La RCF agente su una qualsiasi particella è quindi funzione della velocità di rotazione (rpm) e della distanza di essa dall'asse di rotazione (r).

BILANCIA

- Controllare sempre che sia “**in bolla**”
- Evitare correnti di aria e vibrazioni
- Navicelle/carta stagnola (**TARA**)
- Usare una spatolina/cucchiaio pulito
- Evitare di ritrasferire il campione non utilizzato al contenitore originale.
- **Accuratezza** della pesata f(quantità da pesare)
- Limpidezza e assenza di precipitati nella soluzione
- **Pulizia** bilancia (pennelli, aria compressa)



Errori procedurali

- Pesata di campioni caldi o riscaldati
- Pesata su una bilancia aperta o capsula aperta di materiale che perde umidità rapidamente o che è altamente igroscopico
- Pesata di materiale od oggetti troppo larghi rispetto al piattello della bilancia
- Materiale non al centro del piattello
- Manipolazione non corretta del campione (il campione è sparso sul piattello della bilancia)
- Pesata su bilancia aperta o capsula aperta di liquidi volatili senza una trappola per solventi
- Pesata di grumi

Richieste di crescita da parte delle cellule in coltura

RICHIESTE FISIOLOGICHE:

- temperatura
- umidità
- pH (atmosfera gassosa)

Principali strumenti del laboratorio di colture cellulari

Incubatore a CO₂

Pulizia regolare
Controllo parametri



- Ambiente stabile e controllato
- Temperatura → 37°C
- CO₂ → 5%
- Umidità → ~ 95%



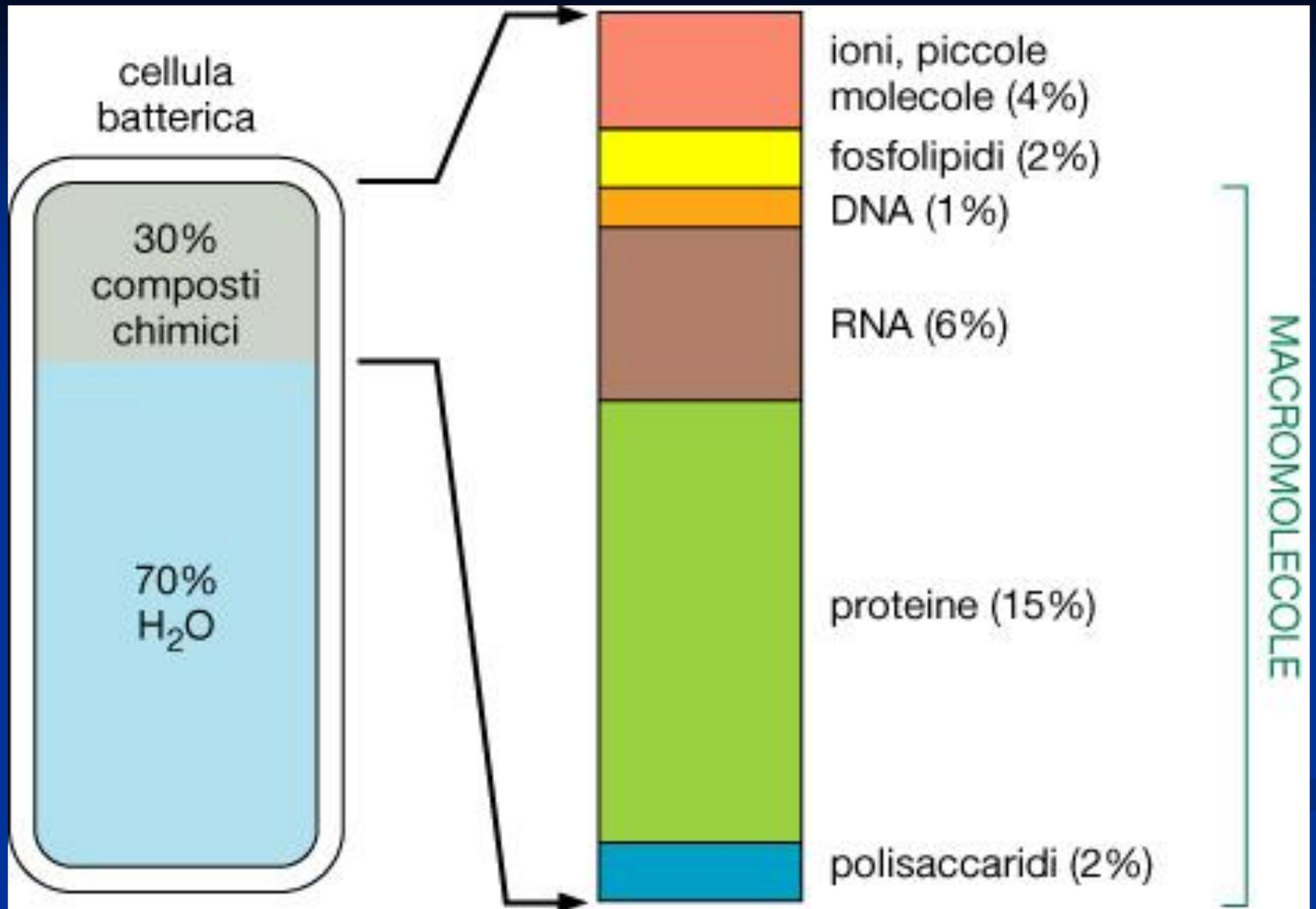
Un incubatore per colture cellulari garantisce la stabilità di alcuni parametri necessari per coltivare le cellule *in vitro*.
Per una coltura di cellule di mammifero in un **sistema ventilato** i parametri corretti generalmente impostati nell'incubatore sono:

A COSA SERVE L'UMIDITA' NELL'INCUBATORE?

L'umidificazione dell'incubatore nel caso di sistemi aperti impedisce l'evaporazione di acqua dal terreno di coltura e quindi la variazione della sua **OSMOLARITÀ**

*Cosa accade se mettiano una petri contenente le cellule nel medium di coltura in un incubatore **privo di acqua?***

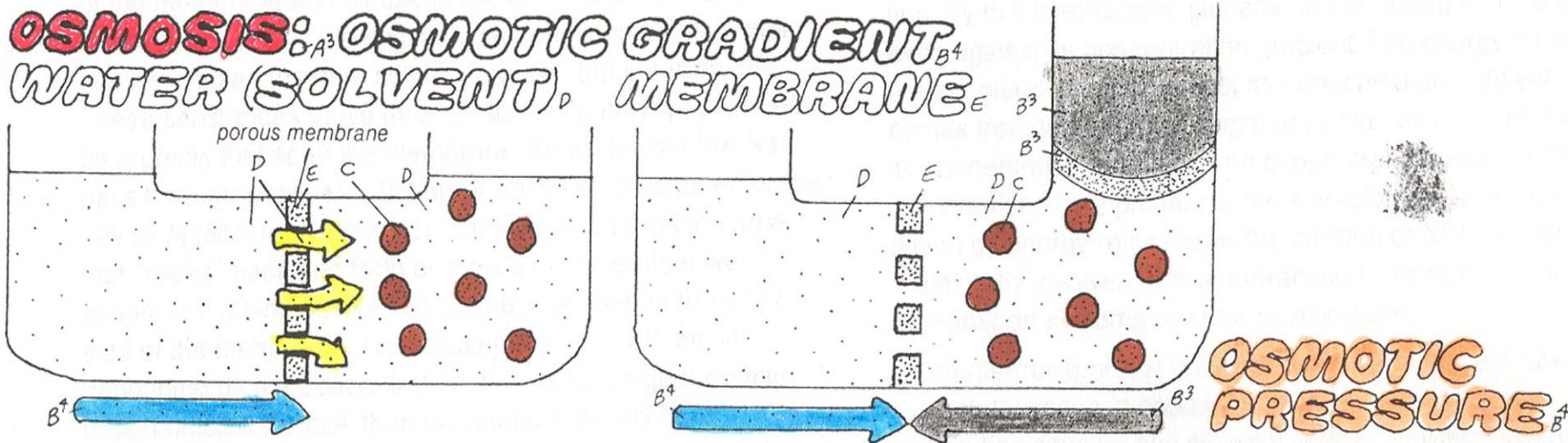
Durante la coltura cellulare deve essere rispettata la condizione di isotonicità del terreno (OSMOLARITA' fisiologica)



OSMOSI

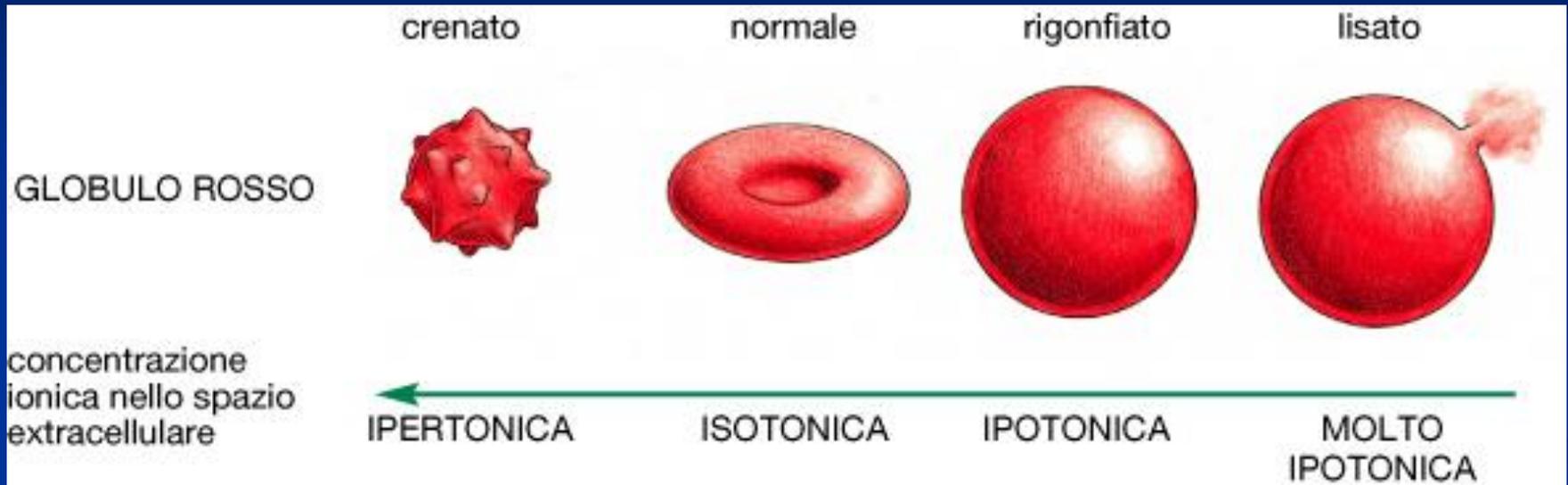


movimento di acqua
attraverso la membrana cellulare



Attraverso una membrana **SEMIPERMEABILE** l'acqua si sposta verso il comparto a maggior concentrazione di soluti: tale processo è detto **OSMOSI**

Le cellule devono stare in soluzioni che hanno osmolarità fisiologica (ISO-OSMOTICHE)



Domanda:

Se ponendo alcune cellule in una soluzione salina esse si restringono e la membrana si corruga, rispetto alle cellule **la soluzione** è probabilmente:

1. isotonica
2. ipotonica
3. ipertonica
4. osmotica
5. a 37°C



Osmolarità fisiologica
280÷310 mOsm/L

OSMOLARITA'

➤ Che molarità deve avere una soluzione di Cloruro di sodio (NaCl) per essere isotonica?

➤ Che molarità deve avere una soluzione di Glucosio ($C_6H_{12}O_6$) per essere isotonica?

➤ Che molarità deve avere una soluzione di Cloruro di Magnesio ($MgCl_2$) per essere isotonica?

OSMOLARITA' SOLUZIONI SALINE

NaCl

Soluzione isotonica: ~300 mOsm/L □ 150 mM

Glucosio

Soluzione isotonica: ~ 300 mOsm/L □ 300 mM

MgCl₂

Soluzione isotonica: ~ 300 mOsm/L □ 100 mM

OSMOLARITA' SOLUZIONI SALINE



Soluzione isotonica: ~ 300 mOsm/L □ 150 mM

Soluzione ipotonica: ~ 50 mOsm/L □ 25 mM

Soluzione ipertonica: ~ 600 mOsm/L □ 300mM

OSMOLARITA' SOLUZIONI SALINE

Glucosio

Soluzione isotonica: ~ 300 mOsm/L □ 300 mM

Soluzione ipotonica: ~ 150 mOsm/L □ 150 mM

Soluzione ipertonica: ~ 600 mOsm/L □ 600mM

OSMOLARITA' SOLUZIONI SALINE



Soluzione isotonica: ~ 300 mOsm/L □ 100 mM

Soluzione ipotonica: ~ 150 mOsm/L □ 50 mM

Soluzione ipertonica: ~ 900 mOsm/L □ 300mM

INCUBATORE A CO₂

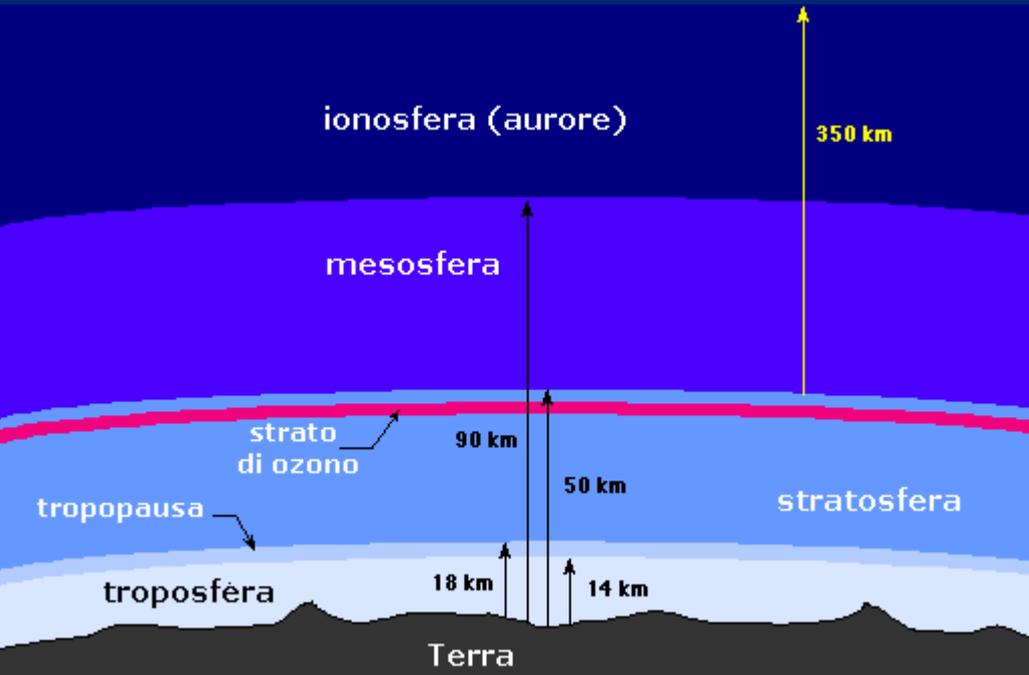
RICHIESTE FISIOLOGICHE:

- temperatura

- umidità

- • **pH** (atmosfera gassosa)

■ Composizione dell'atmosfera terrestre



L'atmosfera (gassosa) è così composta:

78% da azoto,

21 % da ossigeno e il restante

1% da argon, anidride carbonica ed altri gas

■ Composizione della fase gassosa nell'incubatore



L'atmosfera gassosa all'interno dell'incubatore è così composta:

5% CO₂

95% aria atmosferica (78% N₂, 21 % O₂, 1% ar, CO₂ ed altri gas)

Sistemi tampone

- Per i sistemi biologici, uno dei parametri più importanti di una soluzione acquosa è la **concentrazione dei protoni, [H+]**. Benchè la sua concentrazione è solitamente bassa dell'ordine da 10^{-6} a 10^{-8} M, deve essere mantenuta in questo campo di valori affinché possa esserci la vita.

- Gli acidi deboli si dissociano in acqua secondo l'equilibrio



- che viene riscritta come la seguente perchè la $[\text{H}_2\text{O}]$ può ritenersi costante



- La Costante di detto equilibrio è **$K_a = \frac{[\text{A}^-][\text{H}^+]}{[\text{HA}]}$** .

I valori di dette costanti per i sistemi biologici sono molto minori di 1 e vengono riportati come **pKa** = $-\log K_a$.

Hanno potere **tampone** le soluzioni contenenti:

- a) un **acido debole** e il suo sale con una **base forte**;
- b) una **base debole** e il suo sale con un **acido forte**.

Generalmente un sistema tampone lavora bene, ossia mantiene costante il pH, quando il **pH=pKa ±1**.

I sistemi tampone FISIOLOGICI sono solo quelli che hanno potere tampone nel range del pH fisiologico

ad es. il TAMPONE ACIDO ACETICO/ACETATO è un tampone utile a mantenere il pH di una soluzione intorno a 5, e non al valore fisiologico di 7,2 -7,4 → quindi non è adatto all'utilizzo negli organismi viventi!

SISTEMI TAMPONE FISIOLOGICI

Il pH dei fluidi dell'organismo, in particolare del sangue, è regolato attraverso un complesso meccanismo omeostatico.

Dal punto di vista chimico, ad esso concorrono principalmente tre **sistemi tampone**:

1. **SISTEMA FOSFATO (diidrogenofosfato – idrogenofosfato)**
2. **SISTEMA BICARBONATO (acido carbonico – idrogenocarbonato)**
3. **SISTEMA PROTEICO (proteine - anioni proteinato)**

*Valori di pH inferiori a 7 e superiori a 7.8
sono incompatibili con la vita*

**Il controllo del pH è essenziale per numerose
funzioni fisiologiche**

TAMPONE PROTEINA / PROTEINATO

Nell'organismo ci sono tre tipi differenti di tampone proteico:

1. **Tampone costituito da: proteine intracellulari**
2. **Tampone costituito da: proteine plasmatiche**
3. **Tampone costituito da: proteine del globulo rosso (emoglobina)**

Di questi tre tamponi i più importanti sono il primo ed il terzo.

Anche le proteine plasmatiche fungono da tampone allo stesso modo delle proteine intracellulari e dell'emoglobina, ma non sono così importanti perché sono molto poche.

Come mai le proteine possono fungere da sistemi tampone?

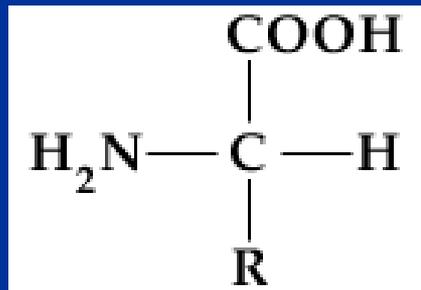
Ciò dipende dal loro pH isoelettrico, che è il punto per il quale il numero di gruppi anionici è uguale al numero dei gruppi cationici.

Questo concetto è applicabile anche agli amminoacidi. Infatti possiamo scrivere una proteina semplificando a: **NH₂-R-COOH**

IL SISTEMA TAMPONE PROTEICO

- Dipende dalla capacità degli **aminoacidi** che costituiscono le proteine di rispondere alle variazioni di pH accettando o cedendo uno ione H^+ .

ad un pH = 5.5 si ha la neutralità della proteina



Se pH aumenta il gruppo carbossilico (-COOH) cede un H^+ diventando $-\text{COO}^-$

Se pH diminuisce il radicale aminico (-NH₂-) accetta un H^+ diventando $-\text{NH}_3^+$

TAMPONE BICARBONATO

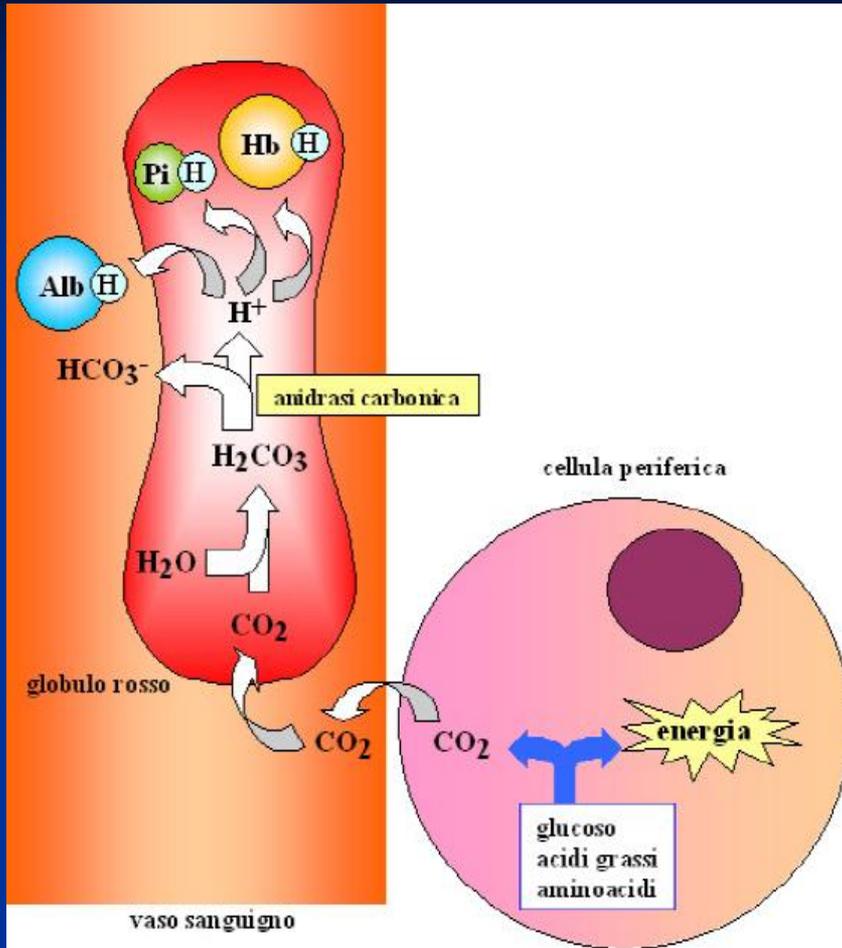
L'equilibrio del **tampone bicarbonato** è il seguente:



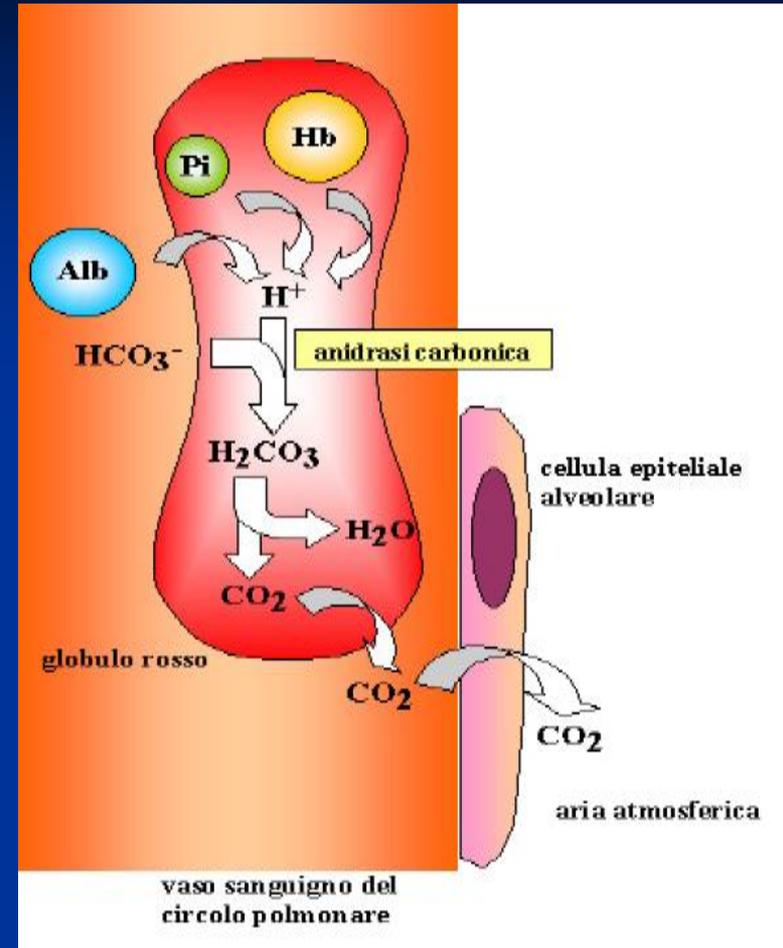
Il potere tampone di questa coppia è al limite dell'efficienza (pKa circa 6.1), tuttavia il tampone bicarbonato nell'organismo si trova in una posizione del tutto speciale, in quanto i suoi due componenti sono sotto stretta regolazione da parte di due processi omeostatici fisiologici:

respirazione e funzione renale

TAMPONE $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ NELL'ORGANISMO



La CO₂ va dai tessuti al sangue venoso



l'acido carbonico può essere eliminato con la respirazione in forma gassosa di anidride carbonica

Buffering Systems in LAB: BICARBONATE

- a "natural" buffering system where gaseous CO_2 balances with the H_2CO_3 / HCO_3^- content of the culture medium
- low cost
- non-toxic

Buffering Systems in Lab: BICARBONATE

Cultures using natural bicarbonate/ CO_2 buffering systems need to be maintained in an **atmosphere** of 5-10% CO_2 in air usually supplied in a **CO_2 incubator**

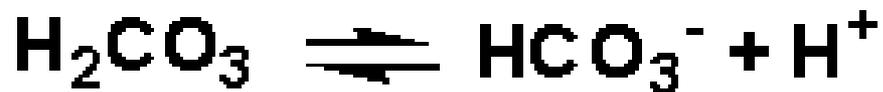
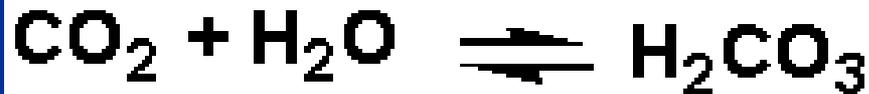
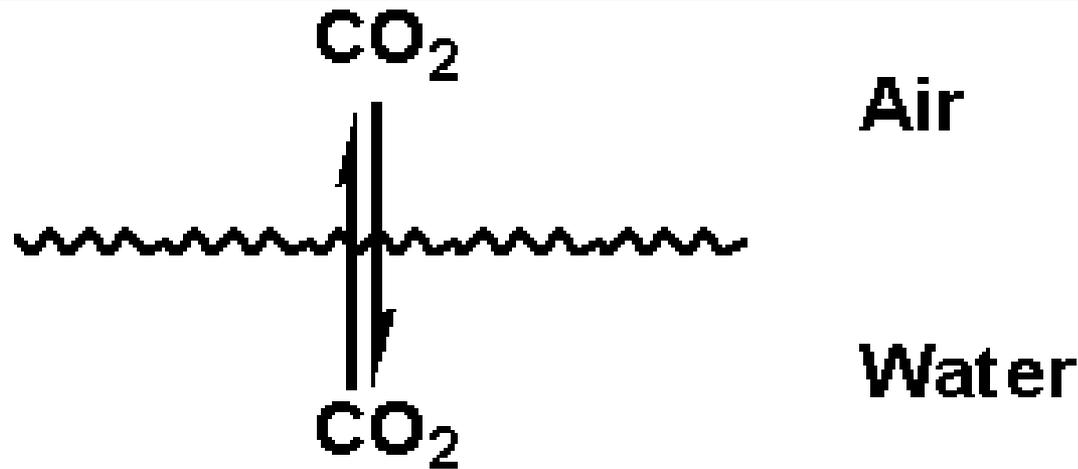


Table 2. Some commonly used CELL CULTURE MEDIA with the amounts of sodium bicarbonate used for buffering. Higher levels of sodium bicarbonate usually require higher levels of CO₂ added to the incubator.

Cell culture media	Sodium bicarbonate levels (g/L)	Extra CO ₂ needed
Leibovitz's L-15 Medium	None	No
Eagle's MEM with Hanks' salts	0.35	No
Medium 199 with Hanks' salts	0.35	No
Ham's F12	1.176	Yes
DMEM/F12	1.2 to 2.438	Yes
RPMI 1640	2.0	Yes
Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) with Earle's salts	2.2	Yes
McCoy's 5A	2.2	Yes
Medium 199 with Earle's salts	2.2	Yes
MEM Medium with Earle's salts	2.2	Yes
CMRL 1066 Medium with Earle's salts	2.2	Yes
Iscove's Modified Dulbecco's medium	3.024	Yes
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	3.7	Yes



è necessario incubare il terreno di coltura tamponato con bicarbonato nell'incubatore in cui è presente CO₂ ad elevate concentrazioni (5%) !!!

DOMANDA:

I terreni di coltura contengono sempre un sistema tampone avente il ruolo di mantenere il pH entro valori fisiologici (7.2-7.4).

E' corretto utilizzare nell'incubatore per colture cellulari una soluzione salina bilanciata contenente SISTEMA TAMPONE FOSFATO?

Il **tampone fosfato**

(coppia monoidrogenofosfato/diidrogenofosfato)
funziona attraverso il seguente equilibrio:



La **pKa** di questo tampone (**6.8**)
è molto prossima al pH fisiologico del sangue
e il suo **potere tampone** è **pertanto abbastanza elevato.**

tuttavia questo tampone è scarsamente
utilizzato nel sangue (la concentrazione
dei fosfati nel sangue è bassa)

TAMPONE FOSFATO IN LAB.

- È presente nelle **SOLUZIONI SALINE BILANCIATE** (es. “*Dulbecco-PBS*” dove *PBS*=*phosphate buffered saline*) che generalmente si usano nelle **fasi di preparazione delle cellule** (dissezione/lavaggi), prima che le cellule vengano messe in coltura

Soluzioni saline bilanciate

D-PBS (DULBECCO'S PHOSPHATE BUFFERED SALINE)	
Componenti	molarità
NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	1.1 mM
KH ₂ PO ₄	1.5 mM
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0.9 mM
MgCl ₂ anidro	0.5 mM
Na-piruvato	0.33mM
D-glucosio	5.5 mM
pH= 7.2-7.4	
NOTA: al Dulbecco-PBS è possibile aggiungere alcuni componenti utili le per fasi di utilizzo, quali: Kanamicina: [70 mg/L] (Bovine serum albumin) BSA 0.4%	

Buffering Systems used in Lab

*Most cells require pH conditions in the range 7.2 - 7.4
and close control of pH is essential for optimum culture conditions*

- Sistema BICARBONATO (bicarbonate)
- Sistema FOSFATO (phosphate)



HEPES

- **HEPES:** chemical buffering using a zwitterion
- superior buffering capacity in the pH range 7.2 - 7.4
- relatively expensive
- can be toxic to some cell types at higher concentrations

**HEPES buffered cultures do not require
a controlled gaseous atmosphere**

Hepes → Incubatori senza CO₂

Sistema tampone misto Hepes/bicarbonato

→ Fasi fuori dall'incubatore