

**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

Valutazione della vitalità cellulare

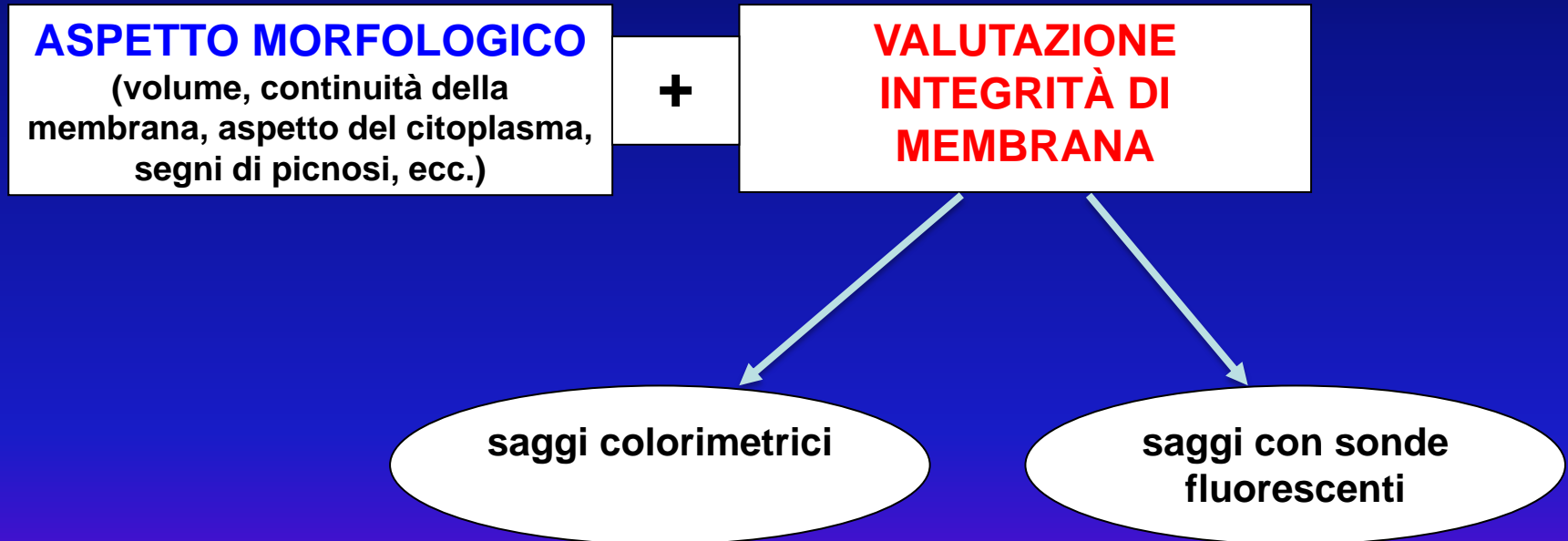
Valutazione della vitalità cellulare

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



VALUTAZIONE DELLA VITALITA' CELLULARE \Rightarrow integrità di membrana



membrana rotta



membrana integra

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

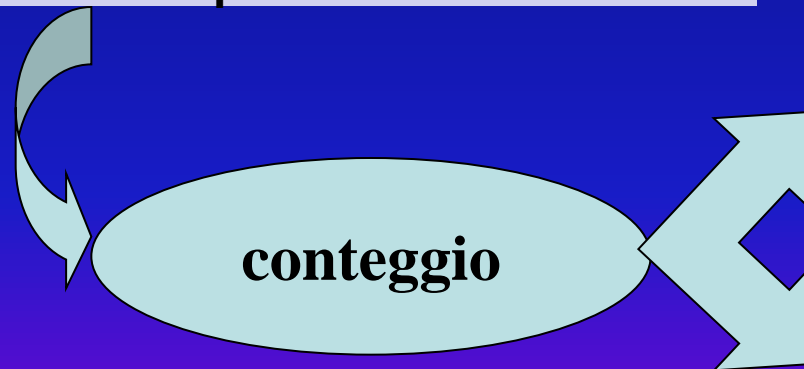
- TRYPAN BLUE 0,4% (w/v)

Incubazione trypan:sospensione cellulare (1:1)

- 5-15 minuti

non di più!!!

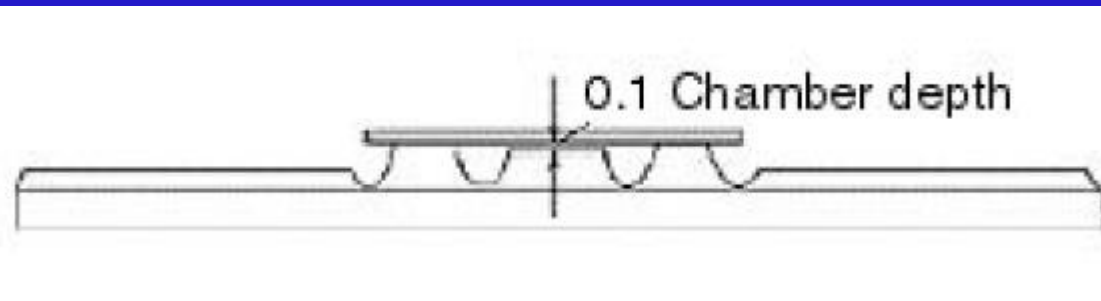
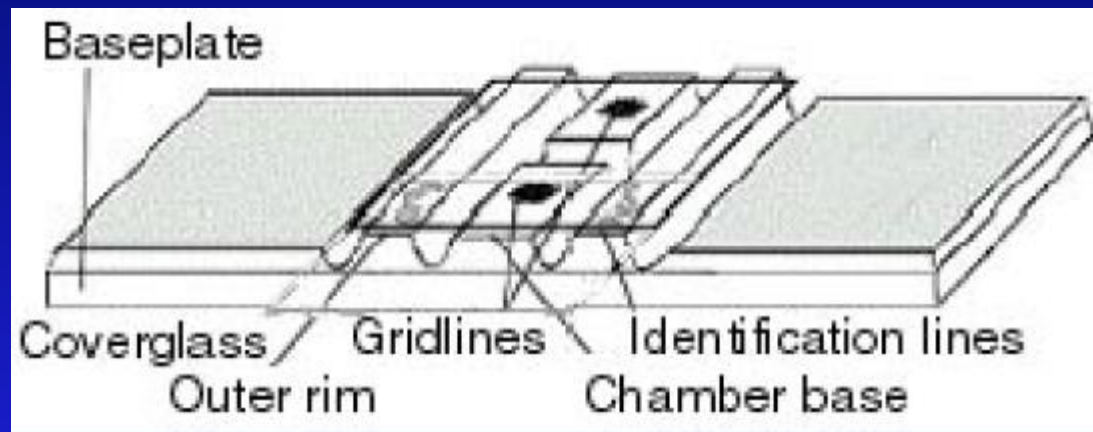
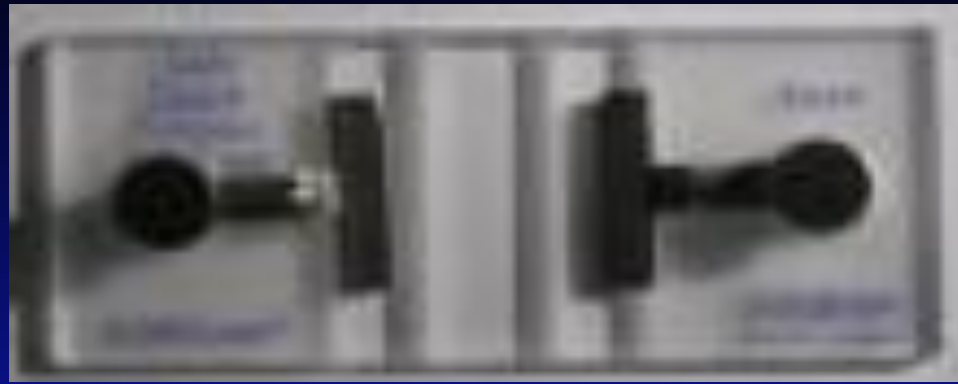
- Mescolare/mettere in camera emocitometro coperta da coprioggetto/osservare al microscopio ottico



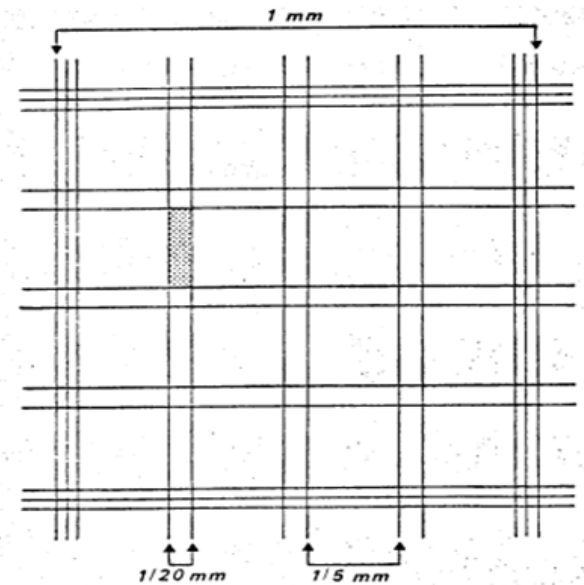
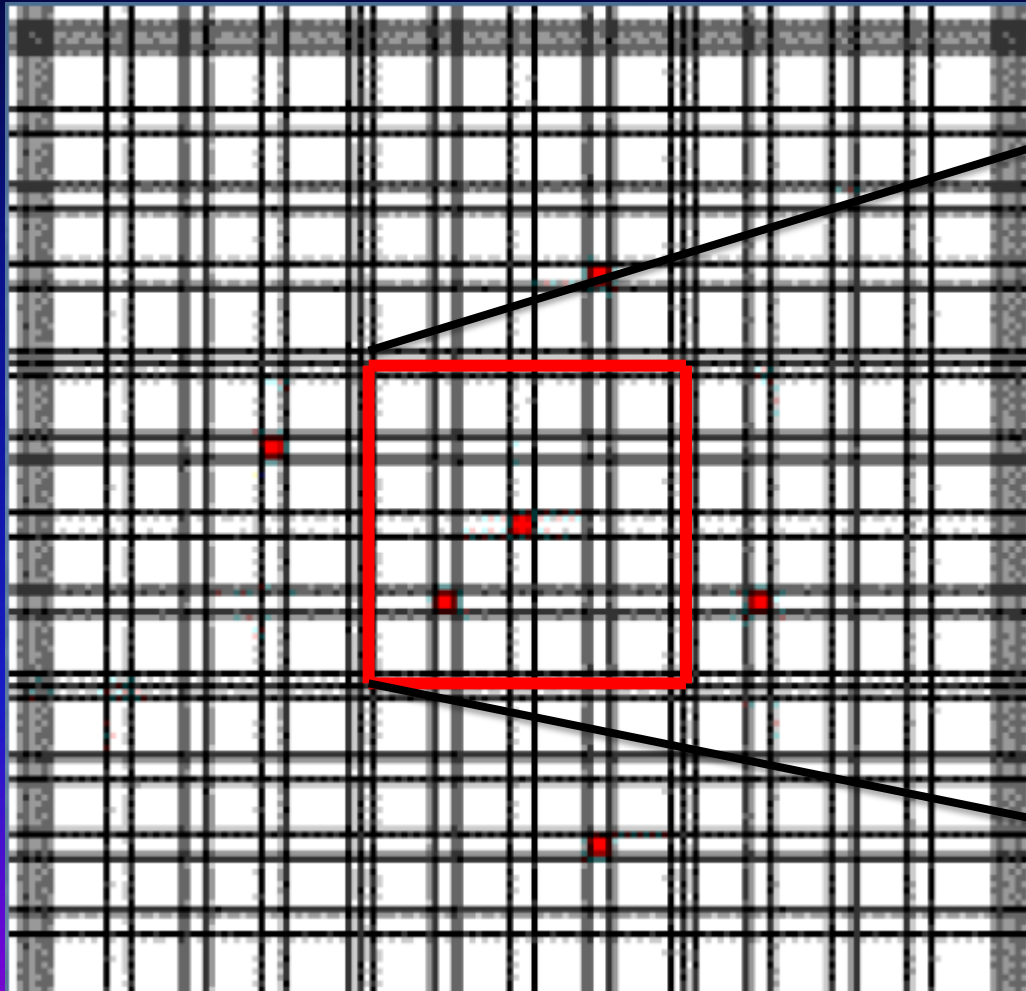
blu=morte

bianche=vive

camera di Burker



Conta delle cellule medianteemocitometro o camera di Burker



Particolare del **quadrato Q** della camera di Burker

Conteggio delle cellule nel **quadrato Q**

Conta delle cellule medianteemocitometro o camera di Burker

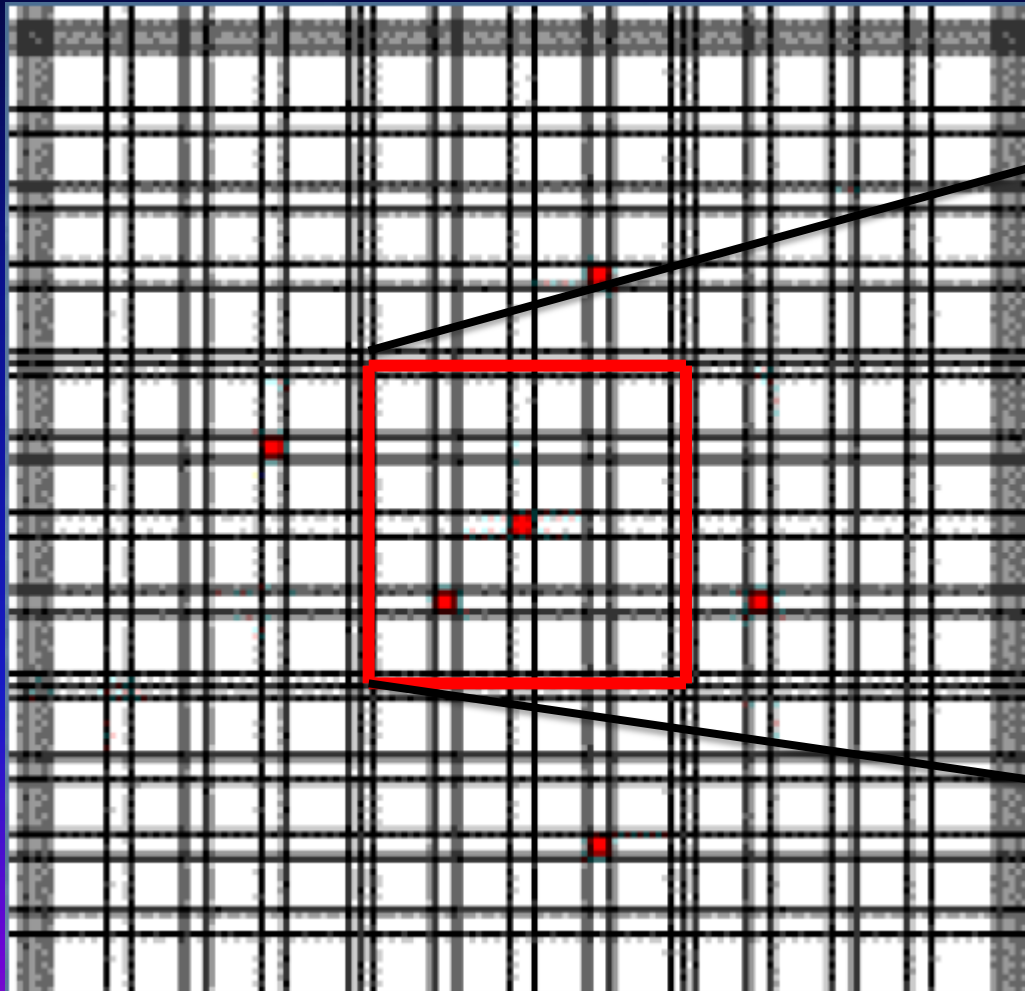
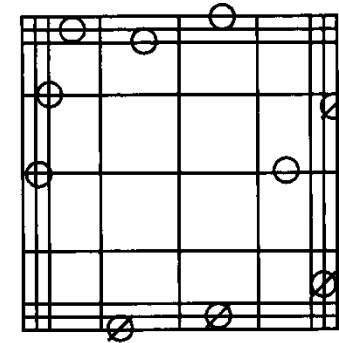


DIAGRAM II
CORNER SQUARE (ENLARGEMENT)

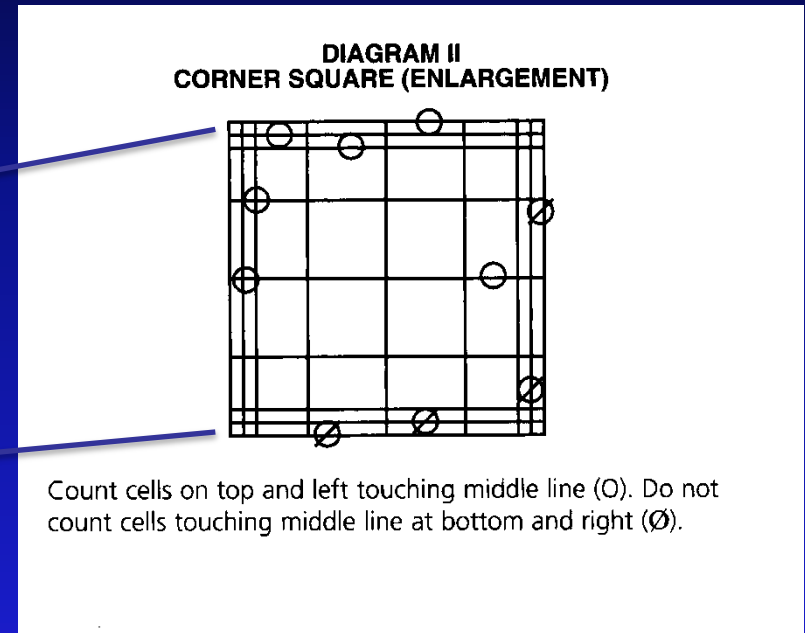
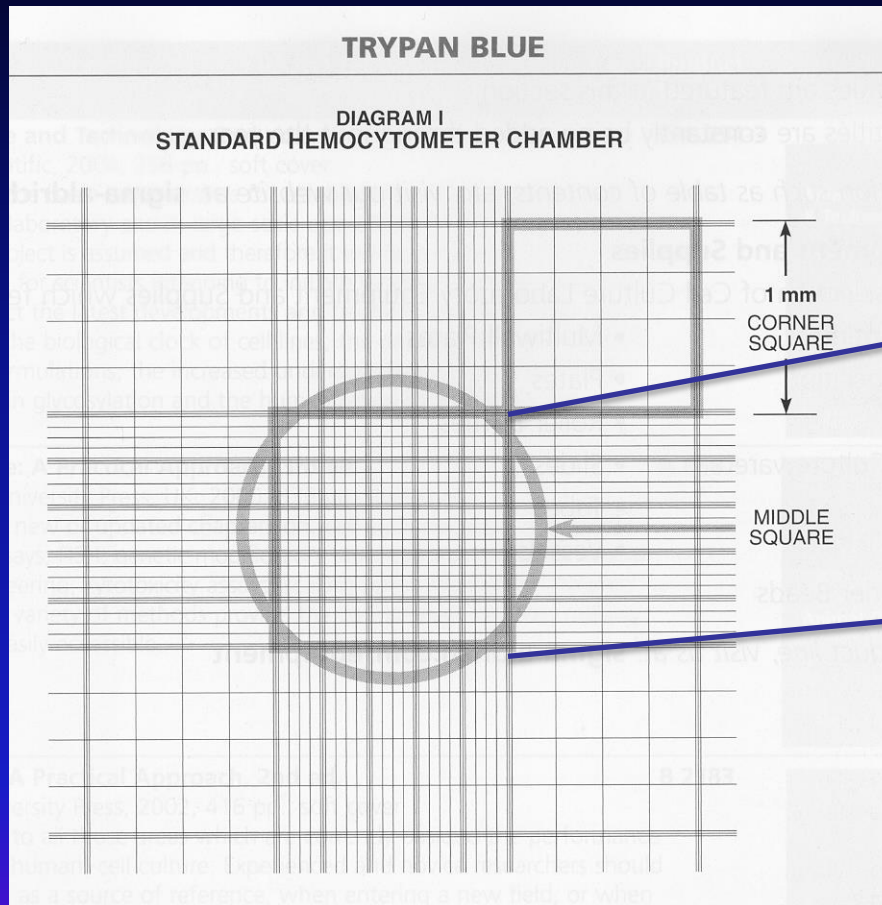


Count cells on top and left touching middle line (O). Do not count cells touching middle line at bottom and right (Ø).

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)

Cells vive per ml = n medio Q x fattore diluizione x 10^4

COLORAZIONE CON PROBES FLUORESCENTI

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

KIT LIVE/DEAD

Integrità di membrana

+

Attività enzimatica endogena

• ritenzione intracellulare

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

Legend

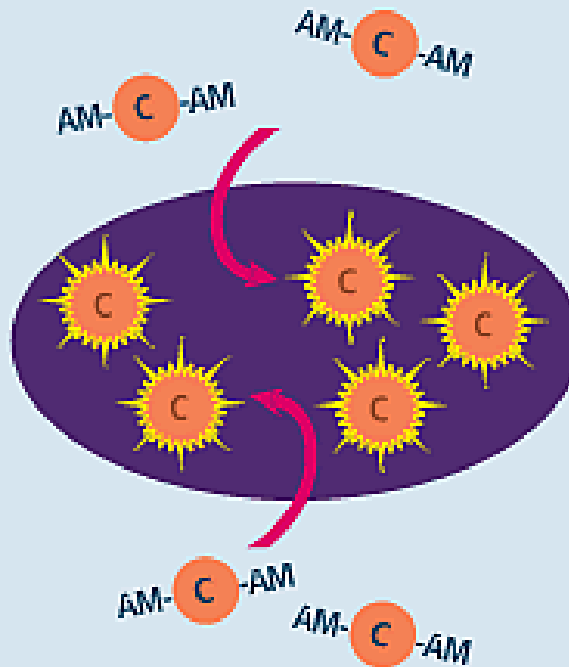


Non-Fluorescent
Calcein AM



Fluorescent-Free
Calcein

Drug-Sensitive Cell



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

Figure 6. The basic principle of the Calcein assay.

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)

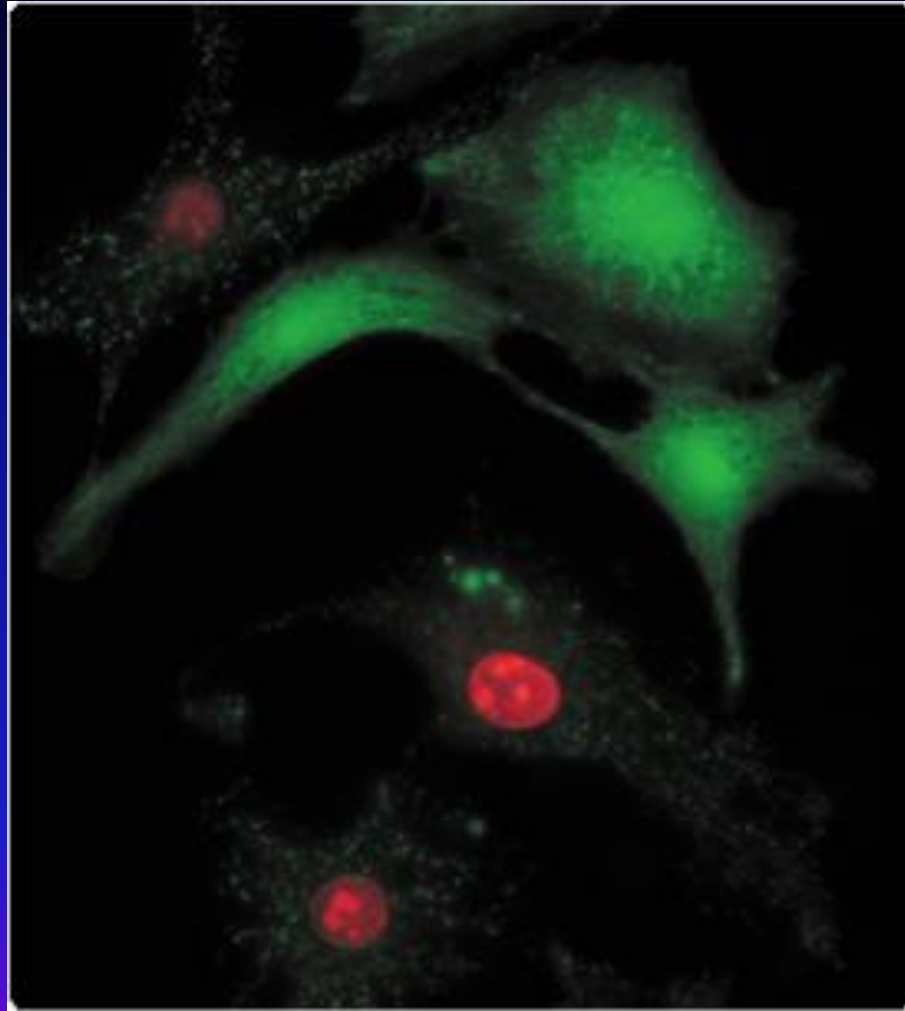


Cellule verdi nel citoplasma + incolori nel DNA → VIVE

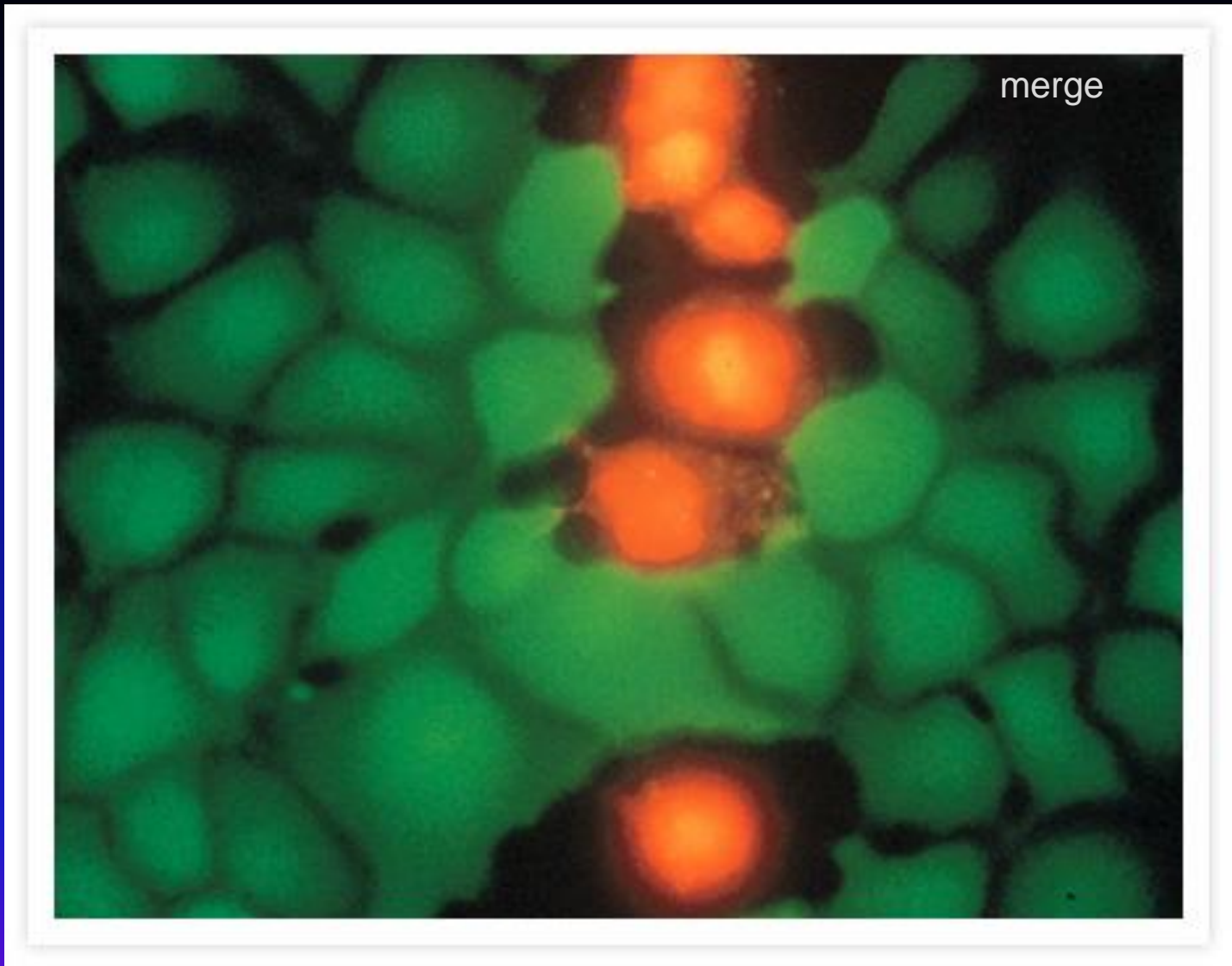
Cellule DNA rosso + citoplasma poco (o assente) verde → MORTE

valutazione al microscopio ottico a fluorescenza

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

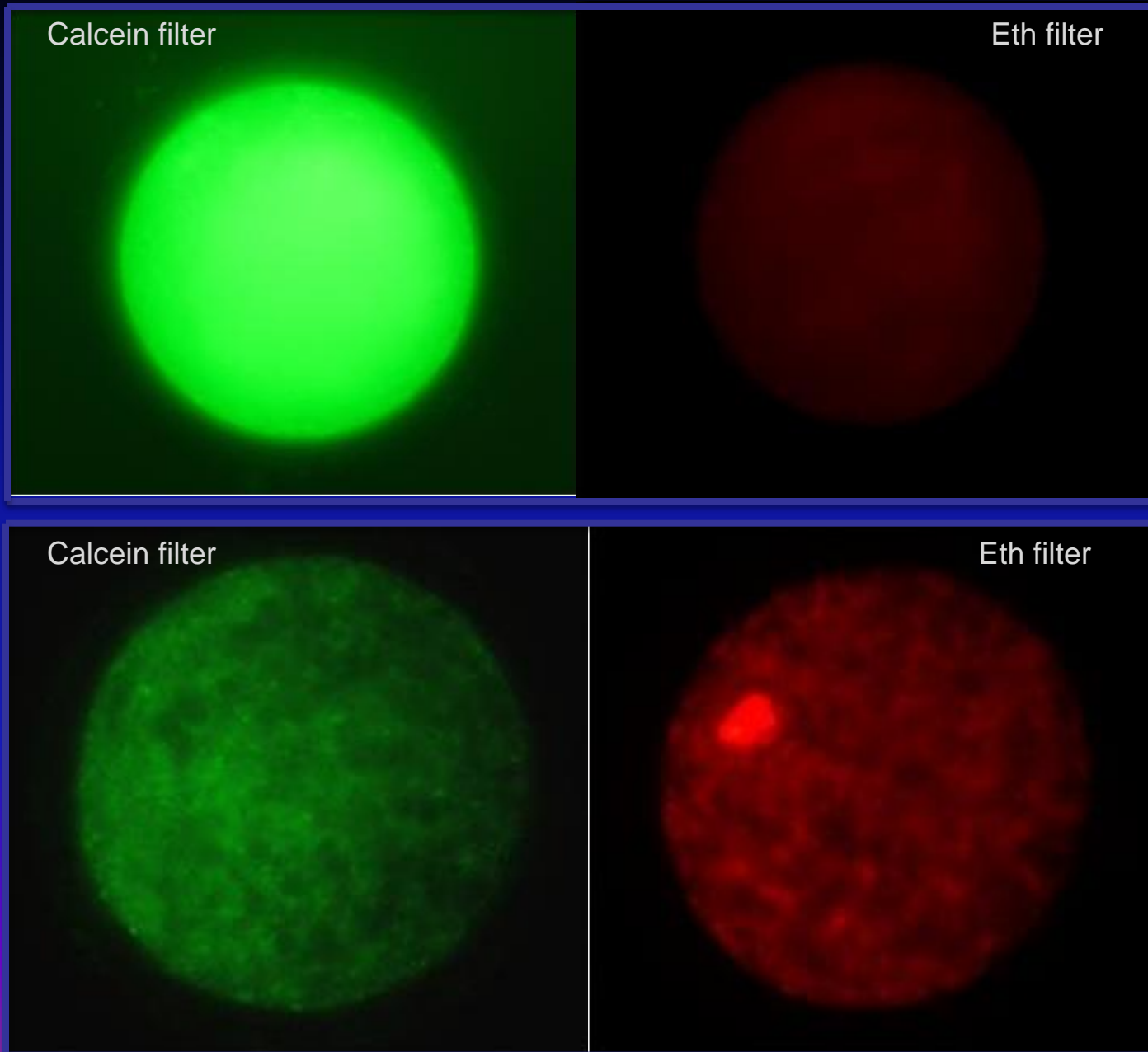


bovine pulmonary artery epithelial cells stained with
the reagents in **LIVE/DEAD**® Cell
Viability/Cytotoxicity Assay Kit
(Invitrogen)



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**



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*