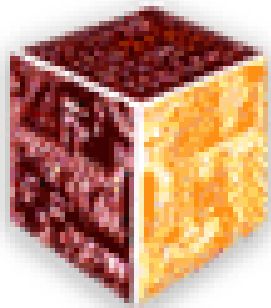


UNIVERSITA'  
DEGLI STUDI  
DI **TERAMO**

*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)

**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)

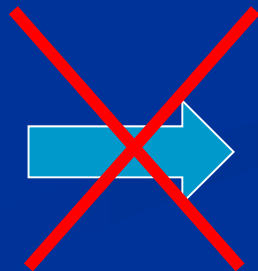
- Incubatore a CO<sub>2</sub>



# *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**

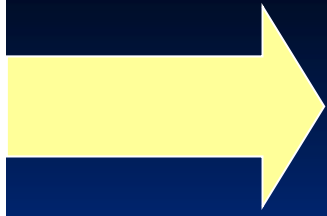
(cellule somatiche)

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

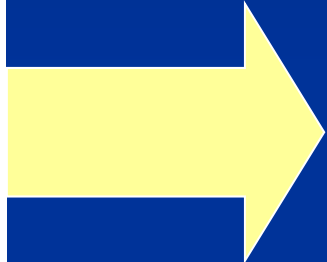
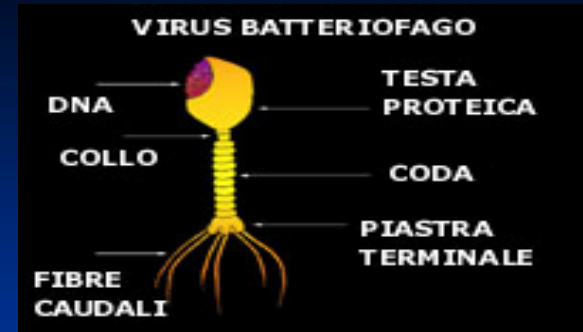
**Circa 1000 - 1500  
ingrandimenti**



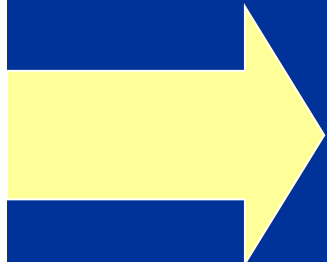
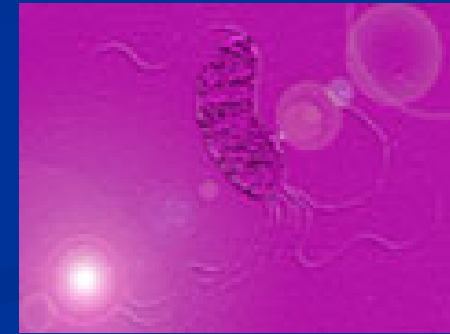
*Alcune dimensioni nel mondo biologico....*



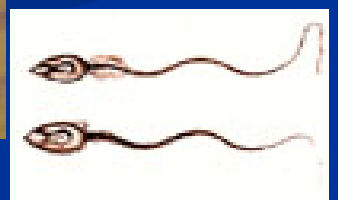
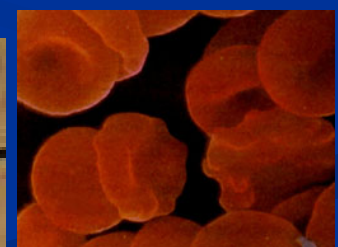
**dimensione: 0,1 micrometri**  
**( $10^{-7}$  metri)**  
**virus**



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

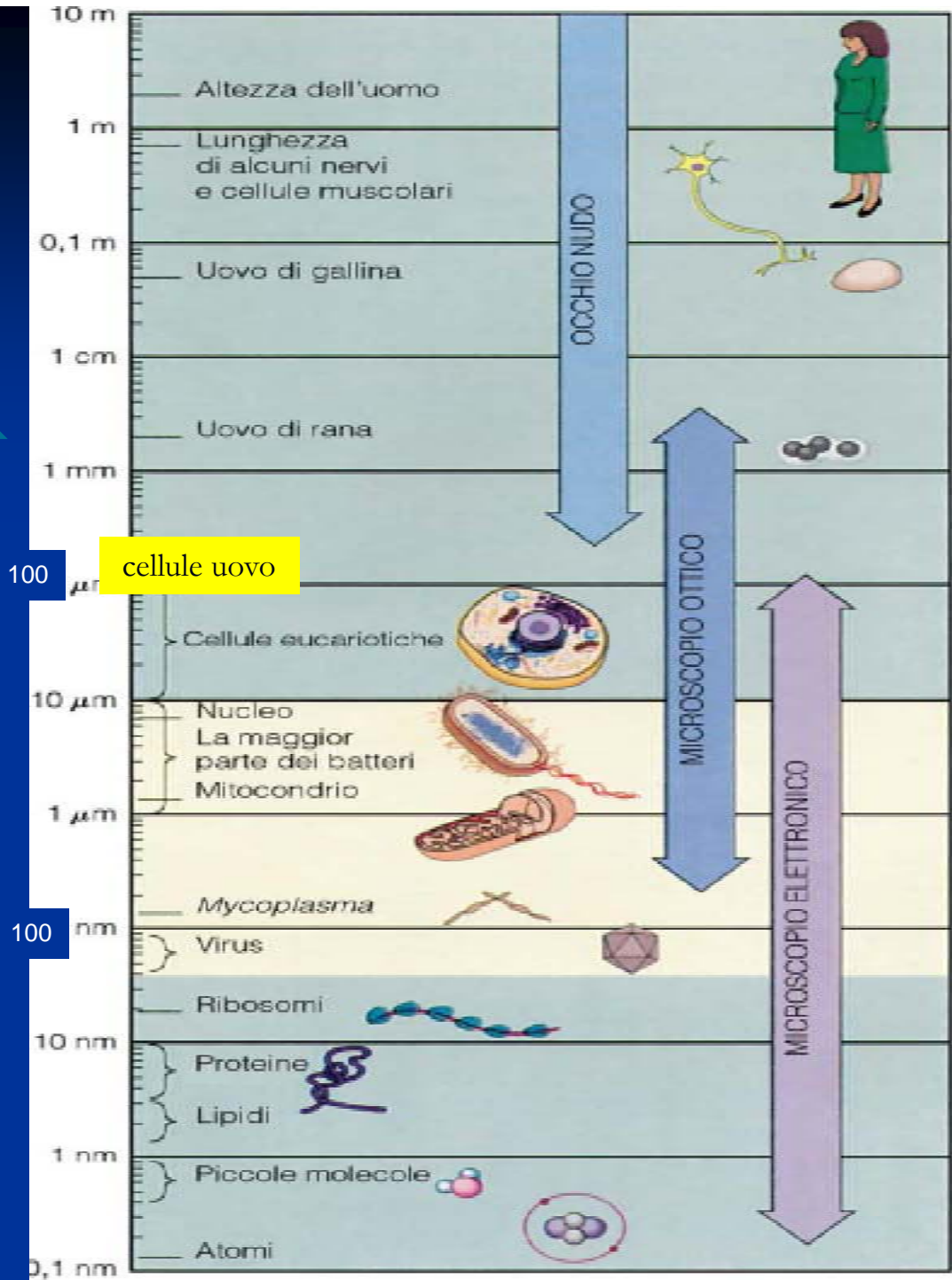


**dimensione: 10 micrometri**  
**( $10^{-5}$  metri)**  
**cellule eucariotiche**



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

# Materiale 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 CO<sub>2</sub>

Pulizia regolare  
Controllo parametri



• Ambiente stabile e controllato

• Temperatura → 37°C

• CO<sub>2</sub> → 5%

• Umidità → ~ 95%



Un incubatore per colture cellulari garantisce la stabilità di alcuni parametri necessari per coltivare le cellule *in vitro*.

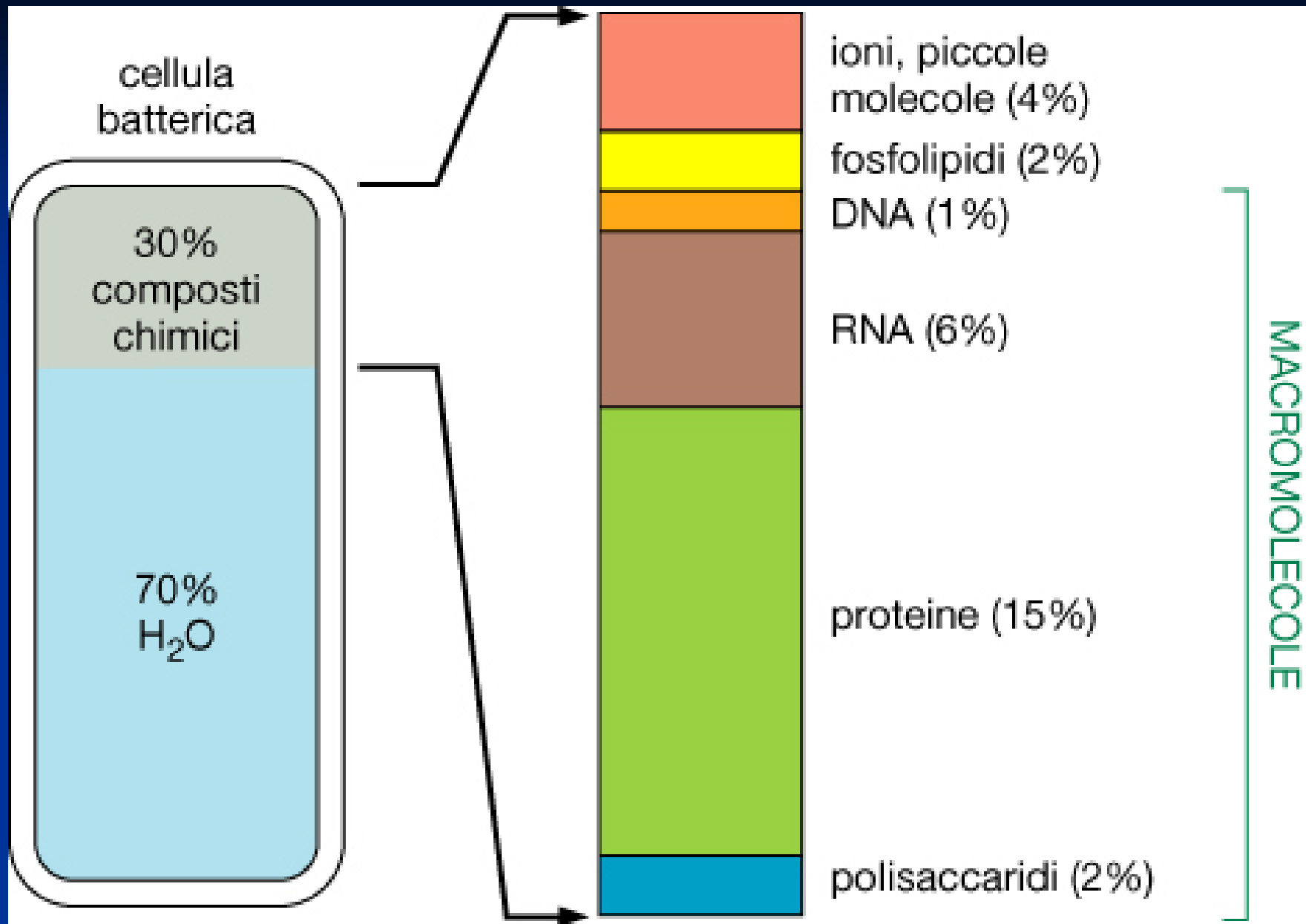
Per una coltura di cellule di mammifero in un **sistema ventilato** i parametri corretti generalmente impostati nell'incubatore sono:

## 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?***

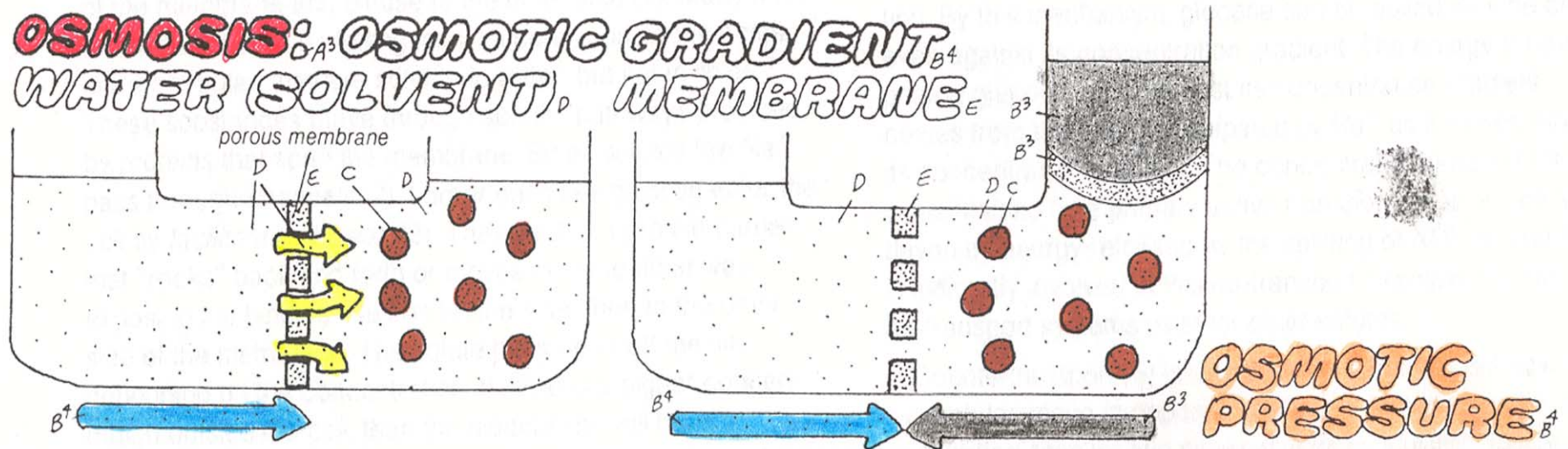
**Durante la coltura cellulare deve essere rispettata la condizione di isotonicità del terreno (OSMOLARITA' fisiologica)**



OSMOSI



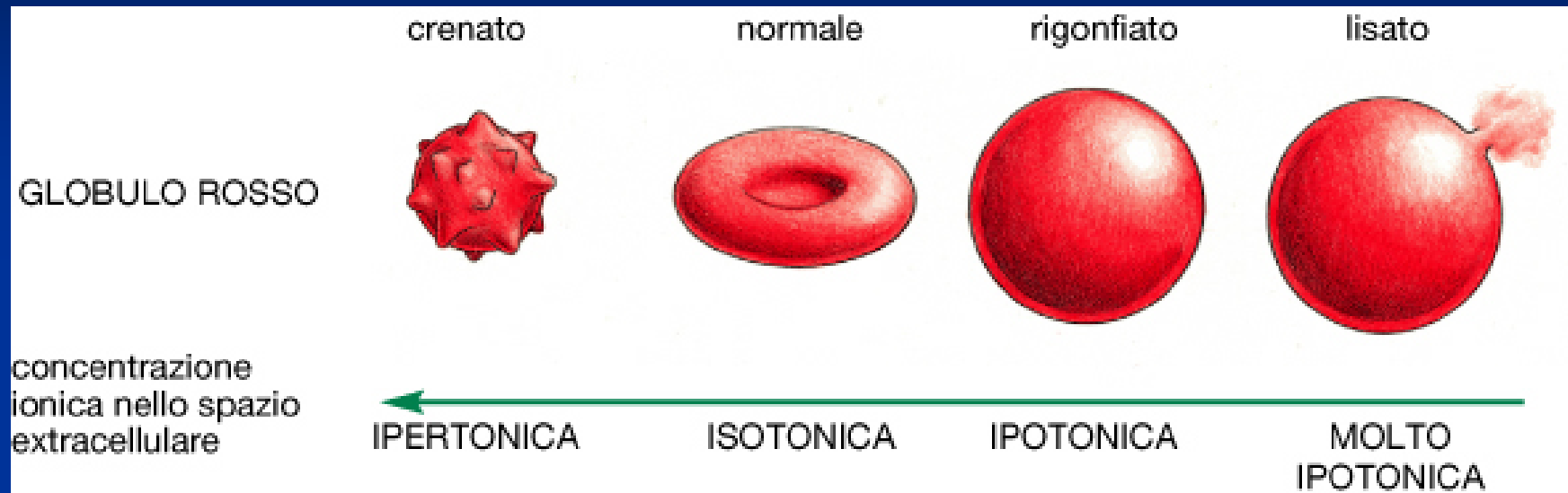
movimento di acqua  
attraverso la membrana cellulare



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**

**MgCl<sub>2</sub>**

**Soluzione isotonica:** ~ 300 mOsm/L □ **100 mM**

## OSMOLARITA' SOLUZIONI SALINE



Soluzione isotonica di NaCl: ~ 300 mOsm/L □ 150 mM

Soluzione ipotonica di NaCl: ~ 50 mOsm/L □ 25 mM

Soluzione ipertonica di NaCl: ~ 600 mOsm/L □ 300mM

# OSMOLARITA' SOLUZIONI SALINE

## Glucosio

Soluzione isotonica di glucosio: ~ 300 mOsm/L □ 300 mM

Soluzione ipotonica di glucosio: ~ 150 mOsm/L □ 150 mM

Soluzione ipertonica di glucosio: ~ 600 mOsm/L □ 600mM

## OSMOLARITA' SOLUZIONI SALINE



Soluzione isotonica di  $\text{MgCl}_2$ : ~ 300 mOsm/L  100 mM

Soluzione ipotonica di  $\text{MgCl}_2$ : ~ 150 mOsm/L  50 mM

Soluzione ipertonica di  $\text{MgCl}_2$ : ~ 900 mOsm/L  300mM

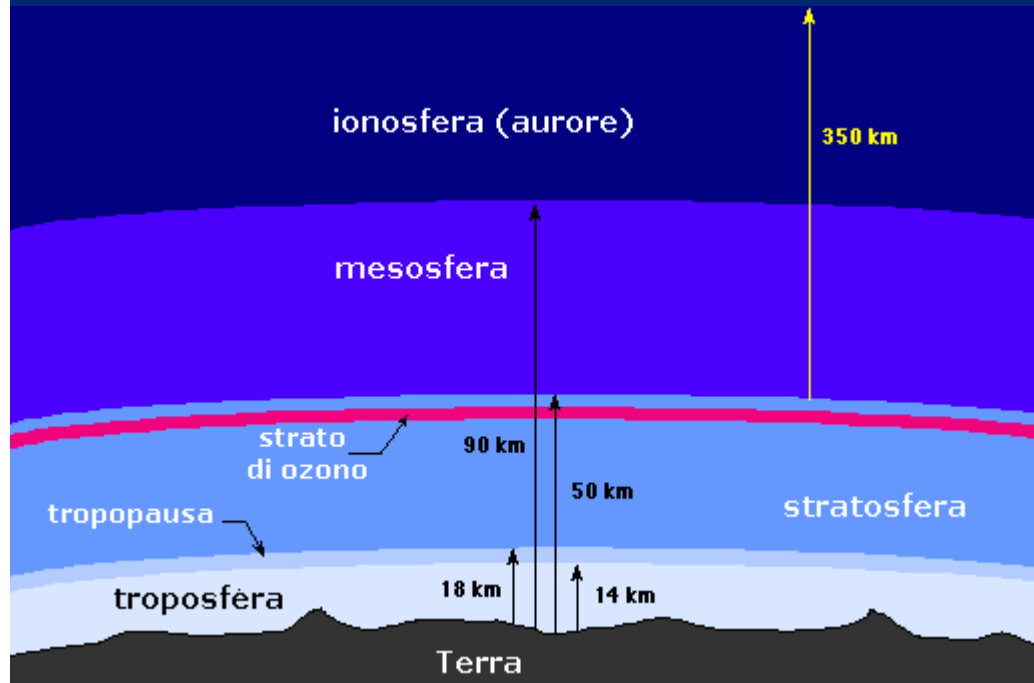
# INCUBATORE A CO<sub>2</sub>

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% CO<sub>2</sub>**  
**95% aria atmosferica** (78% N<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub>, 1% ar, CO<sub>2</sub> ed altri gas)



# Sistemi tampone

- Per i sistemi biologici, uno dei parametri più importanti di una soluzione acquosa è la **concentrazione dei protoni, [H<sup>+</sup>]**. Benchè la sua concentrazione è solitamente bassa dell'ordine da 10<sup>-6</sup> a 10<sup>-8</sup> 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 [H<sub>2</sub>O] può ritenersi costante



- La Costante di detto equilibrio è **K<sub>a</sub> = [A<sup>-</sup>][H<sup>+</sup>]/[HA]**.

I valori di dette costanti per i sistemi biologici sono molto minori di 1 e vengono riportati come **pK<sub>a</sub> = -logK<sub>a</sub>**.

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  $\pm$ 1**.

**I sistemi tampone FISIOLGICI  
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?**

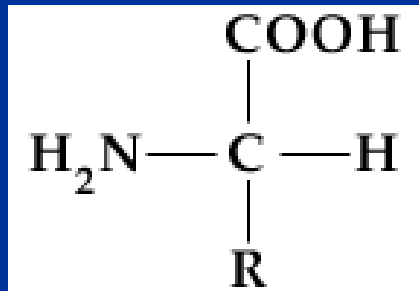
Ciò dipende dal loro pH isoelettrico, che è il punto per il quale il numero di gruppi anionici è uguale al numero dei gruppi cationici.

Questo concetto è applicabile anche agli amminoacidi. Infatti possiamo scrivere una proteina semplificando a: **NH<sub>2</sub>-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(-NH<sub>2</sub>-) accetta un  $H^+$   
diventando  $-\text{NH}_3^+$

## TAMPONE BICARBONATO

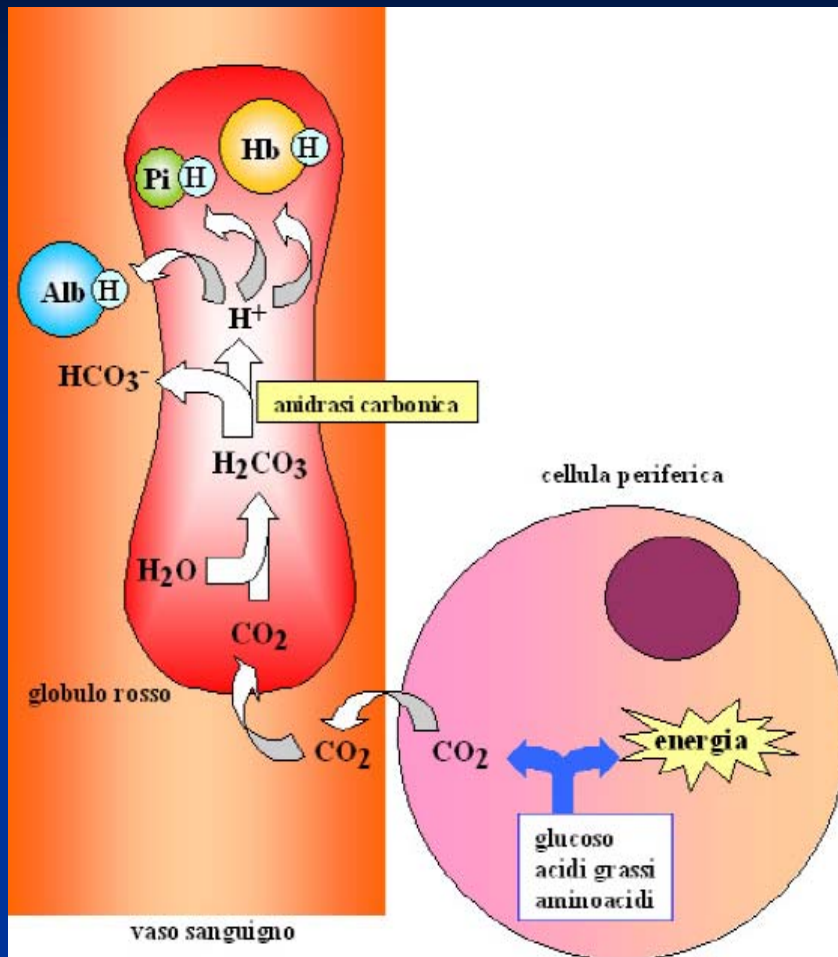
L'equilibrio del **tampone bicarbonato** è il seguente:



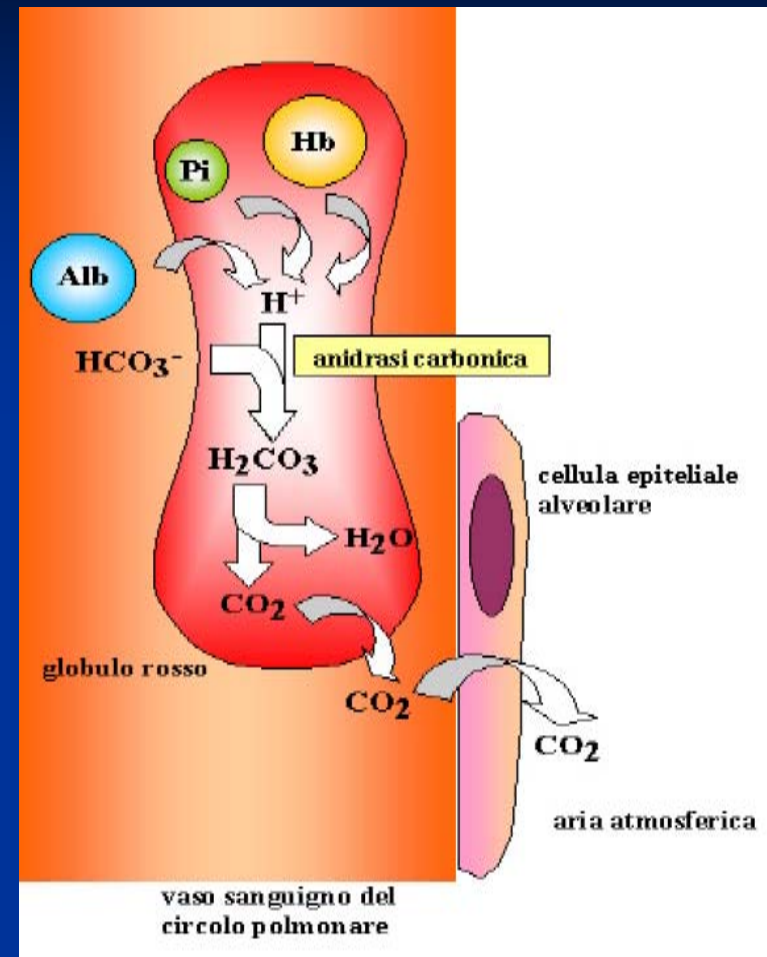
*Il potere tampone di questa coppia è al limite dell'efficienza (pKa circa 6.1),  
tuttavia il tampone bicarbonato nell'organismo si trova in una posizione del tutto speciale,  
in quanto i suoi due componenti sono sotto stretta  
regolazione da parte di due processi omeostatici fisiologici:*

*respirazione e funzione renale*

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



La  $\text{CO}_2$  va dai tessuti al sangue venoso



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

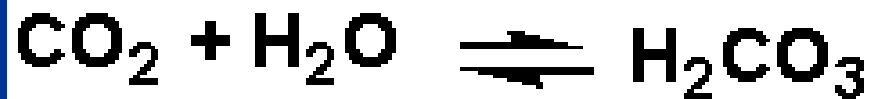
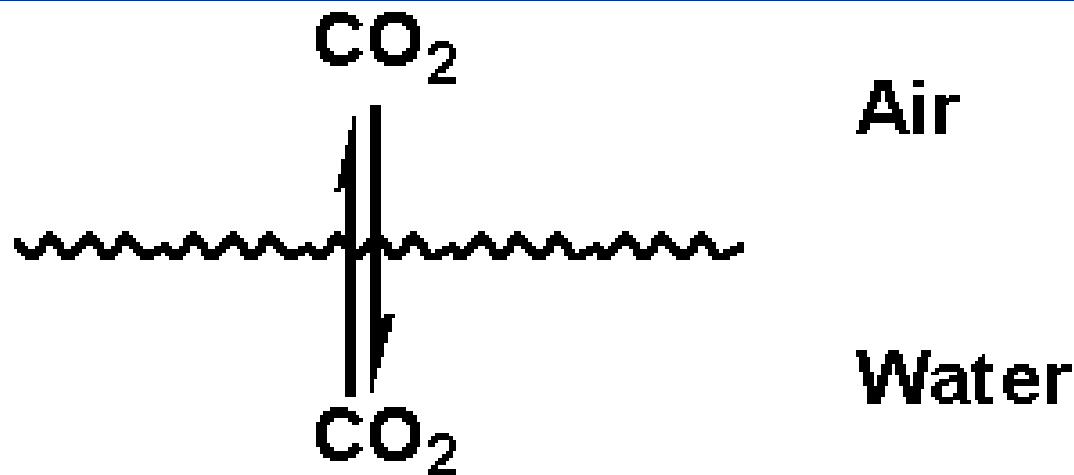


# Buffering Systems in LAB: BICARBONATE

- a "natural" buffering system where gaseous  $\text{CO}_2$  balances with the  $\text{H}_2\text{CO}_3$  /  $\text{HCO}_3^-$  content of the culture medium
- low cost
- non-toxic

# Buffering Systems in Lab: BICARBONATE

Cultures using natural bicarbonate/ $\text{CO}_2$  buffering systems need to be maintained in an **atmosphere** of 5-10%  $\text{CO}_2$  in air usually supplied in a  **$\text{CO}_2$  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 CO<sub>2</sub> added to the incubator.**

Cell culture media	Sodium bicarbonate levels (g/L)	Extra CO <sub>2</sub> needed
<b>Leibovitz's L-15 Medium</b>	<b>None</b>	<b>No</b>
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
<b>Medium 199 with Earle's salts</b>	<b>2.2</b>	<b>Yes</b>
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 ( <b>DMEM</b> )	3.7	Yes



*è necessario incubare il terreno di coltura tamponato con bicarbonato nell'incubatore in cui è presente CO<sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.1 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 mM
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0.9 mM
MgCl <sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub>

Sistema tampone misto Hepes/bicarbonato

→ Fasi fuori dall'incubatore