

Tecniche di colorazione per colture cellulari

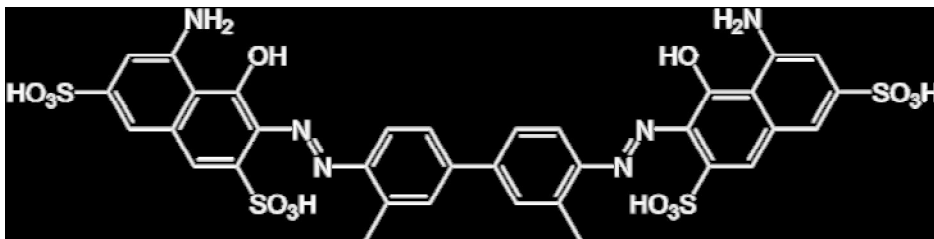
Le tecniche di colorazione sono un indispensabile supporto per la visualizzazione delle cellule e tessuti in microscopia. I coloranti sono frequentemente usati in biologia e medicina per evidenziare le strutture proprie del tessuto (es. fibre muscolari o tessuto connettivo), i tipi cellulari (es. granulociti, basofili, eosinofili) o le strutture all'interno delle cellule (es. nucleo, mitocondri). Molte di tali colorazioni sono ugualmente applicabili ai tessuti e alle colture cellulari. Per queste ultime le colorazioni possono essere usate oltre che per scopi qualitativi anche per quantificare il numero di cellule.

Un'importante distinzione va fatta tra colorazioni "vitali" e "non vitali". Le colorazioni vitali sono fatte su cellule vive e hanno come finalità quella di svelare particolari morfologici altrimenti non visibili oppure di indicare lo stato metabolico della cellula. Sono vitali quelle colorazioni che mirano a scoprire il rapporto tra cellule vive e morte. Le colorazioni non vitali sono eseguite su cellule morte dopo opportuna preparazione del campione, detta fissazione. Nelle colorazioni vitali le cellule devono essere modificate il meno possibile prima dell'osservazione e bisogna fare molta attenzione alla tossicità del colorante usato. Per questo motivo spesso i coloranti vitali sono usati come soluzioni molto diluite (1:5000 – 1:500000).

La preparazione del campione nelle colorazioni non vitali prevede l'eliminazione del terreno di coltura e la fissazione. Quest'ultima serve a preservare il più possibile la forma iniziale delle cellule e tessuti bloccandone tutte le funzioni vitali. I metodi di fissazione più comuni prevedono l'uso di formaldeide o alcoli (etanolo e metanolo). Ambedue mirano a bloccare l'attività delle proteine denaturandole e facendole precipitare. La differenza principale tra i due metodi risiede nella capacità di bucare la membrana cellulare: gli alcoli sono permeabilizzanti e la formaldeide no. La permeabilizzazione può essere necessaria quando si usano coloranti di grandi dimensioni, e può essere ottenuta anche a valle della fissazione con formaldeide, operando un'incubazione con detergenti (SDS, TritonX-100, Tween), o con alcoli.

Colorazione vitale con Trypan blue

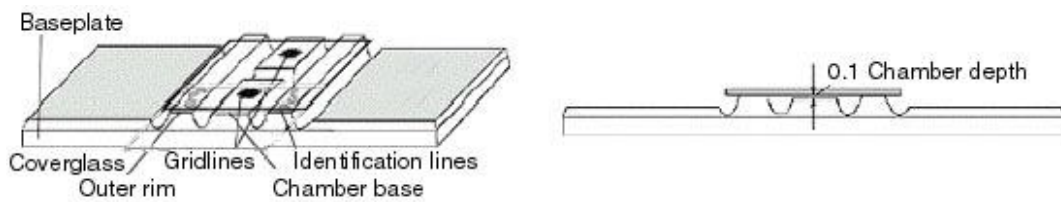
Il Trypan Blue (Blu benzamina, Blu naftilammina, Blu Niagara) è stato sintetizzato agli inizi del novecento come derivato del toluene, e deve il suo nome alla proprietà di essere tossico per il parassita tripanosoma (analoghi del trypan blue sono attualmente usati come agenti farmacologici). Il Trypan Blue viene comunemente usato nella colorazione vitale con un metodo definito come colorazione per esclusione. Infatti, le membrane cellulari sono normalmente impermeabili a tale colorante, mentre le cellule morte, sia apoptotiche che necrotiche, si colorano di blu (senza possibilità di distinzione).



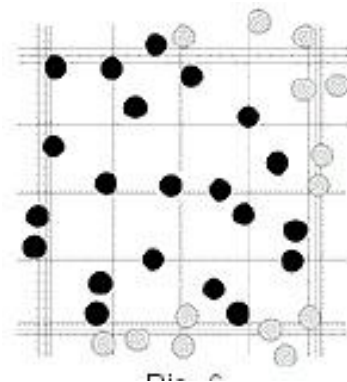
Procedura di conta di vitalità con Trypan blue

- 1-Centrifugare e recuperare il pellet cellulare
- 2- Risospendere in un piccolo volume di terreno completo (1-5ml)
- 3- Prelevare 500 ul di sospensione
- 4- Aggiungere un ugual volume di Trypan Blue (0,4%)
- 5- Riempire le camere del vetrino (5-10 ul)
- 6- Osservare al microscopio ad ingrandimento 20x
- 7- Calcolare il numero di cellule secondo le specifiche del vetrino di conta

Camera di conta di Burkler: Volume della conta (quadrato delimitato da tre linee parallele)= $0,1 \times 1 \text{ mm}^2 = 0,1 \text{ mm}^3 \Rightarrow$ Fattore di conversione= 10^4 ($0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \text{ ul} = 10^{-4} \text{ ml}$)



Modalità di conta (punti neri= cellule da contare, punti chiari= cellule da non contare)



Concentrazione cellule vive= $A * C * D$

Concentrazione cellule morte= $B * C * D$

A= media delle cellule vive

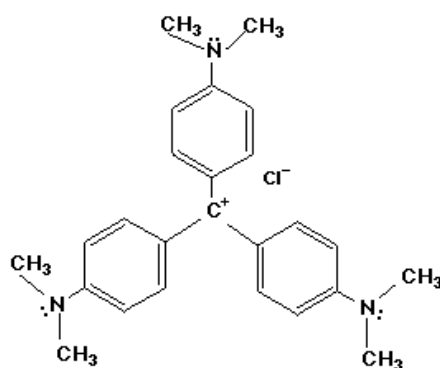
B= media delle cellule morte (colorate in blu)

C= fattore di diluizione

D= fattore di conversione in ml

Colorazione con Crystal Violet

L'uso del Crystal Violet (Gentian Violet) come colorante cellulare è stato indicato per la prima volta da Robert Koch per la visualizzazione dei bacilli della tubercolosi. Un'evoluzione di tale colorazione, con il fondamentale apporto di Hans Christian Gram (1884), è ancora alla base della distinzione dei batteri Gram positivi dai Gram negativi. I dettagli del meccanismo chimico alla base della capacità discriminante di tale colorazione sono stati chiariti solo un secolo dopo e si basano sulla proprietà dei complessi ionici formati dal Crystal Violet di rimanere intrappolati nella spessa parete di peptidoglicani dei batteri Gram positivi. Solo più recentemente è stata sfruttata una diversa proprietà del Crystal Violet, cioè quella di legare il DNA in maniera del tutto simile a quella di ben conosciuti intercalanti quali il bromuro di etidio.



Il Crystal Violet lega il DNA in maniera proporzionale alla quantità di DNA rendendo possibile quindi la sua quantificazione. L'uso del Crystal Violet è stato quindi proposto anche per la quantificazione del numero di cellule in una coltura, a patto che la coltura sia pura e che non si confrontino linee cellulari diverse o punti sperimentali con quantità di mitosi troppo diversa. Il Crystal Violet può essere usato quindi per dosaggi colorimetrici sia vitali sia non vitali tenendo però presente che non può discriminare tra cellule vive e morte.

LABORATORIO DI TECNICHE CELLULARI E MOLECOLARI APPLICATE
Esperienza di fisiopatologia (Prof. Adriano Angelucci)
PARTE I

Protocollo del saggio di Adesione

1-Rivestire piastra da 24 pozzetti con collagene (1ug/ml) e fibronectina (1ug/ml)

2-Incubare a 37°C per 1 ora oppure a 4°C per 12 ore

3-Due lavaggi con soluzione A

4-Incubare con soluzione B per 60 minuti

5-Lavaggio con soluzione A

6-preparazione cellule da seminare:

6a-togliere il terreno di coltura

6b-lavare con tampone PBS

6c-aggiungere tripsina/EDTA (1ml/25cm²)

6d-incubare a 37°C per massimo 5 minuti

6e-recuperare le cellule e neutralizzare con terreno completo

6f-centrifugare a 300 g per 5 minuti

6g-risospendere in 2 ml di terreno e caricare 8 ul nella cameretta di Burker

6h-contare al microscopio e aggiustare alla densità di 5×10^5 /ml

7-aggiungere un ugual volume di sospensione cellulare nei pozzetti (200-500 ul)

8-incubare per 30 minuti a 37°C

9-agitare leggermente la piastra per facilitare il distacco delle cellule debolmente adese

10-Lavare con soluzione A per 3 volte

11-Fissare con paraformaldeide al 4% per 10 minuti a temperatura ambiente

12-sostituire la paraformaldeide con PBS

SOLUZIONI

Soluzione A: 0,1% BSA in terreno di coltura

Soluzione B: 0,5% BSA in terreno di coltura

LABORATORIO DI TECNICHE CELLULARI E MOLECOLARI APPLICATE
Esperienza di fisiopatologia (Prof. Adriano Angelucci)
PARTE II

Colorazione con Crystal violet

13-Togliere il PBS dalle piastre

14-Aggiungere la soluzione di colorazione (soluzione C, volume 200-500ul) e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente.

15- Lavare almeno 6 volte con acqua di rubinetto facendo attenzione a non far staccare le cellule (lavare con acqua pulita fino a quando non vi è più colorazione di sottofondo)

16-Dopo l'ultimo lavaggio lasciar asciugare la piastra capovolta su carta assorbente

17- Aggiungere un volume uguale di soluzione di solubilizzazione per pozzetto (D).

18-Diluire in maniera appropriata con soluzione D e leggere allo spettrofotometro (tra 540 e 600 nm)

19-Calcolare la percentuale relativa di cellule prendendo un punto sperimentale come riferimento (fissato come 100%)

SOLUZIONI

C- Crystal Violet 12mM in una soluzione al 20% di metanolo in acqua

D- 1% SDS in una soluzione al 50% in metanolo in acqua