

COLTURA DI CELLULE EUCARIOTICHE

Conoscenze teoriche di base e
tecniche operative

Dott. Adriano Angelucci
Laboratorio integrato II -- Aprile 2010

Obiettivi

- Attraverso l'applicazione di specifiche procedure e tecnologie si occupa:
 - Mantenimento in vitro delle migliori condizioni di sopravvivenza di cellule eucariotiche
 - Permettere la proliferazione delle cellule
 - Preservare da modifiche biologiche le cellule e da contaminazione l'operatore
 - Realizzazione di banche per il mantenimento di campioni cellulari

Colture cellulari: conoscenze di base

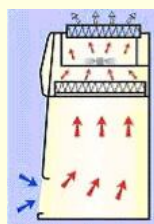
- Caratterizzazione cellulare
- Requisiti di laboratorio e strumentazione
- Terreni di coltura
- Valutazione del rischio e procedure asettiche
- Banca cellulare e crioconservazione

Laboratorio

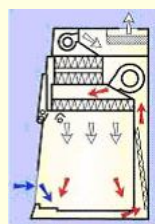
- Area isolata e autosufficiente
- Doppia area fisica o temporale: quarantena e routine
- Linee guida per la disposizione degli strumenti e la sicurezza del personale
- Strumentazione minima:
 - Cappa biologica (Biological Safety cabinet)
 - Incubatore
 - Centrifuga
 - Microscopio a contrasto di fase
 - Contenitore di azoto liquido

Cappe biologiche

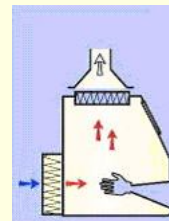
- Si distinguono in base al livello di contenimento in tre classi
- Protezione microbiologica (II e III)
- Vari gradi di protezione per l'operatore
- Filtri HEPA (High Efficiency Particulate Air)



Classe I



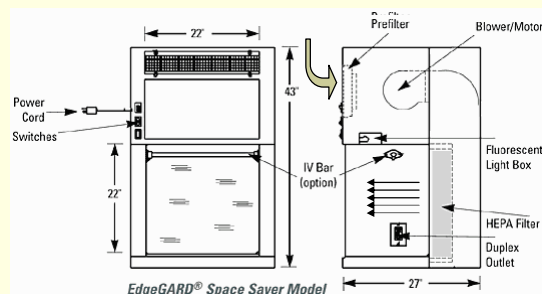
Classe II



Classe III

Cappe biologiche

- Cappa a flusso orizzontale
- Protezione microbiologica per le colture
- Nessuna protezione per l'operatore
- Filtri HEPA in entrata

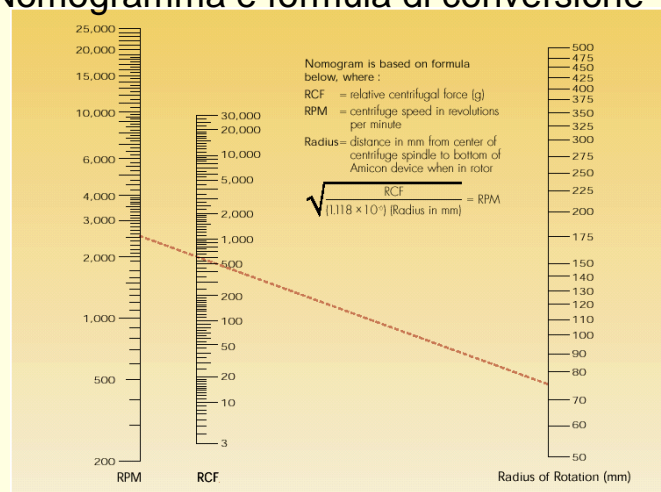


Centrifuga

- Separare le cellule dal liquido
- 300 g x 5 minuti è l'accelerazione per sedimentare le cellule senza danneggiarle
- Raccomandazioni:
 - Localizzazione
 - Bilanciamento
 - Aereosol
 - Rottura delle provette

Centrifuga

- Nomogramma e formula di conversione



Incubatore

- Mantiene le condizioni ambientali ottimali
 - Temperatura 37°C
 - Umidità (circa 98%)
 - pH 7,4 (CO₂ sistema tampone bicarbonato)
- Pulizia regolare
- Controllo dei parametri
- Acqua con disinfettante
 - Solfato di rame
 - Antimicotici

Microscopio a contrasto di fase

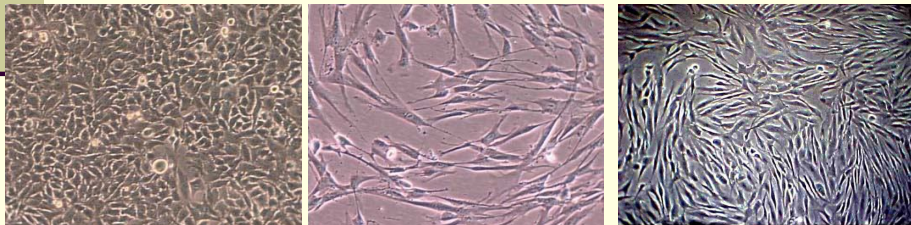
- Permette di osservare cellule non colorate
- Frederick Zernike Premio Nobel Fisica 1953
- Limitazioni:
 - Alone che circonda le cellule
 - Bassa risoluzione (obiettivo 40x)
 - Permette l'osservazione solo di campioni sottili

Caratterizzazione cellulare

- Linea primaria: coltura di cellule prelevate da tessuto (pura o mista)
- Linea cellulare: unico tipo cellulare adattato alla vita in coltura (monoclonale)
- Linea cellulare continua (stabile): coltura in grado di sopravvivere oltre il limite di Hayflick
 - Trasformata (immortalizzate)
 - Tumoreale

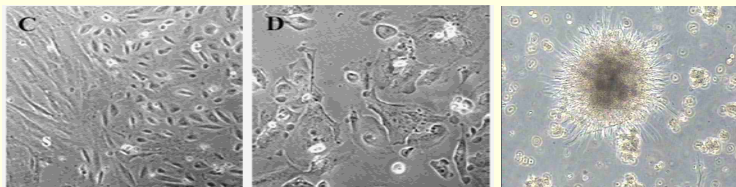
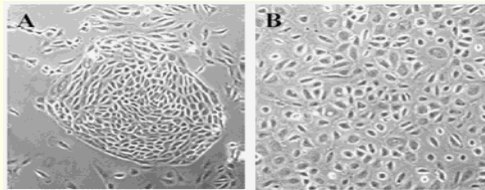
Morfologia

- Le cellule in coltura possono crescere adese o in sospensione
- La morfologia è caratteristica del tessuto di origine



Morfologia

- La morfologia è indicatore dello stato della cellula
- Presenza di contaminazioni



Il terreno di coltura

- Precisa formulazione dei componenti per soddisfare le diverse esigenze di crescita:
 - Sali inorganici
 - Carboidrati
 - Aminoacidi
 - Vitamine
 - Acidi grassi e lipidi
 - Proteine e peptidi
 - Siero

Terreni di coltura

Soluzioni saline bilanciate	PBS Hanks BSS DPBS	Formano la base dei terreni complessi
Terreni base	MEM Minimal essential medium	Colture primarie e cellule diploidi
	DMEM Dulbecco's modified MEM	Maggiori livelli di vitamine e aminoacidi supporta un gran numero di tipi cellulari
Terreni complessi	RPMI1640 Roswell Park Memorial Institute medium	Inizialmente usato per cellule di leucemia supporta un gran numero di tipi cellulari
	Iscoves DMEM	Favorisce la crescita ad alta densità
	Leibovitz L-15	Adatto per atmosfera a bassa CO ₂
Terreni senza siero	Ham F10 Ham F12	Necessitano dell'aggiunta di specifici supplementi (transferrina, insulina, EGF) e contengono HEPES

Sistemi tampone

- Il mantenimento del pH è importante soprattutto nelle colture primarie
- Il pH ottimale è funzione del tipo cellulare (compreso tra 7,0 e 7,7)
- Tampone "fisiologico" CO₂/CO₃²⁻/HCO₃⁻ in atmosfera al 5-10% CO₂
- Tampone HEPES (7,2-7,4) può essere tossico
- Rosso fenolo come indicatore di pH

Siero

- Formulazione aspecifica di fattori di crescita
- Siero bovino fetale (FBS), siero bovino neonatale (NCS), siero di cavallo (HS)
- Sostegno alla crescita per molti tipi cellulari
- Aumenta la capacità tampone
- Protegge dai danni meccanici
- Facilita l'adesione
- Inattivazione del complemento (56°C per 30')
- Apporta circa 5 mg di proteine per ml (10% FBS)

Problematiche

- Rischio per l'operatore
- Contaminazione da microorganismi (batteri, funghi, micoplasma)
- Contaminazione con altre popolazioni cellulari
- Mantenimento dei caratteri biologici di partenza

Valutazione del rischio

- Prevenire danni ad individui ed ambiente
- Direttive e legislazione europee
- Il rischio dipende dal tipo di coltura:
 - Basso rischio=linee continue non umane e linee umane diploidi ben caratterizzate
 - Medio rischio=linee poco caratterizzate
 - Alto rischio=colture primarie, linee con patogeni endogeni, linee infettate
- adeguato contenimento e procedure sempre rispettate

Contaminazione da microorganismi

- I principali tipi di contaminanti microbici
 - Batteri e funghi
 - Micoplasma
 - Virus
- La contaminazione può avvenire:
 - Errore dell'operatore
 - Terreni contaminati
 - Cappa biologica non funzionante
 - Incubatore contaminato
 - Conservazione in azoto liquido contaminato

Disinfettanti

- Principale mezzo per limitare i rischi di contaminazione
- Ipoclorito
 - Disinfettante ad ampio spettro, efficace contro virus
 - Corrosivo per i metalli, non può essere associato ad altri disinfettanti
 - Viene rapidamente inattivato in presenza di composti organici
 - 1000ppm per uso generale e 10000ppm per smaltire terreni
- Fenoli
 - Non attivo su virus
 - Stabile in presenza di composti organici
- Alcoli
 - Efficaci al 70% (etanolo) e 60-70% (isopropanolo)
 - Etanolo attivo contro batteri e virus con capsidi
 - Isopropanolo non efficace contro virus
- Aldeidi (gluteraldeide, formaldeide)
 - Altamente irritanti
 - Possono essere usati su superfici metalliche e in forma gassosa

Metodi di disinfezione

- Lampada UV (germicida)
- Sterilizzazione in autoclave
 - 121°C per almeno 15 minuti
- Vanno regolarmente pulite tutte le superfici di:
 - Cappa biologica
 - Incubatore (alta frequenza)
 - Piano del microscopio
- Si devono smaltire con attenzione:
 - Terreni di coltura (ipoclorito per alcune ore)
 - Consumabile a contatto con le colture (eliminato nei rifiuti appositi)

Contaminazione con altri tipi cellulari

- Più frequente di quanto si immagini
- Avviene quando si lavora contemporaneamente con più linee
- Si ha inizialmente una popolazione mista e in seguito solitamente un tipo cellulare prevale
 - Manipolare un solo tipo cellulare alla volta
 - Mantenere una banca cellulare

Contaminazione batterica e fungina

- Contaminazione ad alta velocità
- Ben evidente ad occhio nudo:
 - Intorbidimento del terreno
 - Il terreno vira verso il giallo
 - Le cellule si staccano dal substrato di crescita
 - Batteri e funghi sono ben visibili al microscopio a contrasto di fase
- L'aggiunta di antibiotici e anti-fungini nel terreno di coltura offre una protezione generica
- Una contaminazione può essere bloccata in fase iniziale con gli appropriati antibiotici
- Si preferisce eliminare prima possibile la coltura contaminata

Contaminazione virale

- Non sempre porta alla morte delle cellule
- Virus non visibili al microscopio a contrasto di fase
- Può causare rallentamento nella crescita
- Modifica i caratteri biologici della cellula
- Non può essere eradicata

Contaminazione da micoplasma

- E' il più piccolo procariota conosciuto (0,35 μ m)
- E' un parassita obbligato che risiede nel citoplasma delle cellule eucariotiche
- Non possiede una parete
- 5 sono le specie che contaminano normalmente le cellule in coltura
- Le conseguenze sul metabolismo cellulare sono evidenti solo in tempi lunghi:
 - Riduzione del tasso proliferativo
 - Cambiamento della morfologia
 - Aberrazioni cromosomiche
 - Alterazione del metabolismo degli aminoacidi e degli acidi nucleici

Contaminazione da micoplasma

- Dato che le alterazioni sono sottili e i metodi di rivelazione complessi la contaminazione da micoplasma è molto diffusa (25%)
- Viene rivelata tramite test specifici che devono essere effettuati periodicamente:
 - Colorazione del DNA nel citoplasma
 - Crescita in agar
 - Amplificazione delle sequenze in PCR
 - Test Elisa

Mantenimento dei caratteri biologici originari

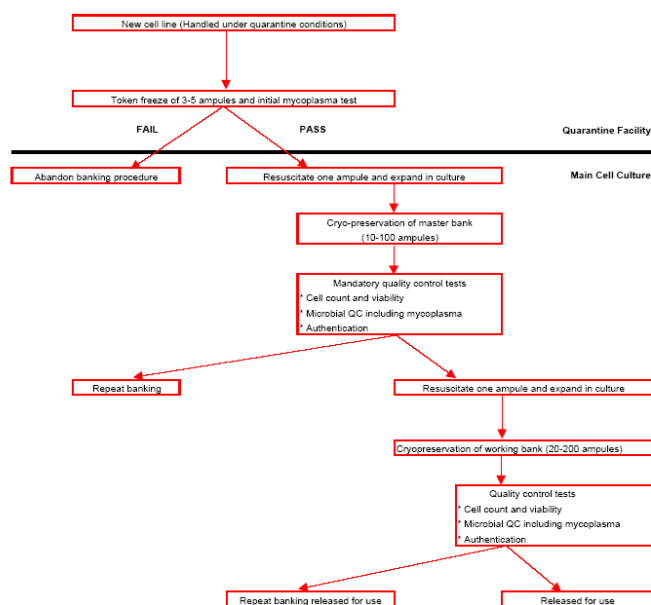
- Lo sperimentatore per offrire significato scientifico ai propri risultati deve assicurare che:
 - Il tipo cellulare usato corrisponda agli standard depositati nelle banche cellulari
 - Non sia in alcun modo contaminato
 - Non abbia subito modificazioni biologiche a seguito delle condizioni di coltura

Pratica della “banca cellulare”



- Non è consigliabile mantenere (o programmare di mantenere) per lungo tempo in coltura una popolazione cellulare:
 - Rischio di contaminazioni
 - Perdita dei caratteri biologici di interesse
 - Deriva genetica
 - Limite di duplicazioni nelle cellule diploidi
 - Costi legati al mancato utilizzo
- Il sistema della banca cellulare assicura:
 - Qualità costante
 - Esperimenti eseguiti ad un numero di passaggi comparabili
 - Le cellule sono coltivate solo quando servono
 - I caratteri biologici iniziali sono preservati

Schema di banca cellulare



Crioconservazione



- Procedura che permette di preparare stock cellulari
- Indicazioni generali:
 - Congelamento lento (pochi gradi al minuto)
 - Scongelamento rapido (subito a 37°C)
 - Vitalità superiore al 90%
 - Cellule in fase di crescita logaritmica
 - Alta percentuale di siero (>20%)
 - Criopreservante: DMSO (10%) o glicerolo
 - Conservazione a $t < -135^{\circ}\text{C}$ (vapori di azoto, o azoto liquido)
 - Sistema di catalogazione

Regole base: cosa fare

- Usare sempre camice e guanti. Protezioni particolari sono necessarie quando si maneggia l'azoto liquido
- Pulire tutte le superfici prima di ogni operazione e tra operazioni diverse (o diverso operatore)
- Identificare in maniera chiara tutti i contenitori che si usano
- Tenere in ordine e mantenere le superfici di lavoro il più possibile sgombre da oggetti
- Maneggiare una sola linea cellulare alla volta
- Controllare i terreni giornalmente per la presenza di contaminazione o di altre alterazioni
- Rispettare le scadenze di pulizia e di controllo di incubatore e cappa biologica

Regole base: cosa non fare

- Permettere l'accesso contemporaneo di più persone nel laboratorio
- Manipolare cellule di dubbia origine nell'area principale di lavoro o contemporaneamente alle altre linee cellulari
- Tenere le cellule in coltura per lungo tempo
- Tenere le cellule per troppo tempo a confluenza
- Usare terreni completi oltre le 6 settimane

Procedura asettica 1



- Disinfettare la cappa con EtOH 70%
- Disinfettare i guanti con EtOH 70% e lasciarli asciugare per 30 sec prima di iniziare
- Disporre i reagenti sotto cappa dopo avere disinfettato le superfici esterne
- L'ingresso delle mani nella cappa deve essere lento
- Disinfettare tutto il materiale usato prima di portarlo fuori cappa

Procedura asettica 2



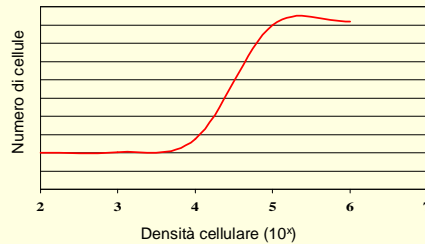
- Avere sempre presente quali sono le superfici e i liquidi sicuramente sterili
- Considerare la direzione del flusso di aria sterile
- I terreni di coltura e gli scarti liquidi vanno neutralizzati con ipoclorito per almeno 2 ore

Colture di cellule adese

- la densità cellulare deve essere mantenuta all'interno di valori limite per:
 - Mantenere costante il tasso di crescita
 - Evitare la selezione di nuovi cloni
- La crescita viene valutata come grado di confluenza
- Solitamente la crescita esponenziale si ha con valori di densità compresi tra 10^4 e 10^5 cellule per cm^2

Colture di cellule adese

- La linea deve essere mantenuta a crescita esponenziale



- Conoscenza della superficie di semina

Protocollo: sottocoltura di cellule aderenti

- Le cellule smettono di crescere quando fino raggiungono il 100% di confluenza o in seguito ad esaurimento dei fattori nutritivi
- Le cellule vanno portate in sospensione
- Si utilizzano proteasi, soluzioni di proteasi e agenti alchilanti o metodi meccanici

Procedura (1)



- Accertarsi della confluenza e dello stato delle cellule
- Rimuovere il terreno
- Lavare lo strato cellulare con PBS senza Ca^{2+} e Mg^{2+} con un volume equivalente a metà volume del terreno usato. Ripetere se le cellule hanno alta capacità adesiva
- Aggiungere 1ml di tripsina/EDTA ogni 25cm² di superficie. Fare in modo che il liquido bagni tutta la superficie
- Mettere il contenitore in incubatore per 2-10 minuti

Procedura (2)



- Osservare le cellule al microscopio per accertarsi che siano in sospensione
- Agevolare il distacco meccanicamente
- Diluire le cellule in terreno contenente siero
- Centrifugare
- Scartare il surnatante e risospendere le cellule in un appropriato volume di terreno completo
- Contare le cellule
- Prelevare il volume contenente il numero di cellule necessario

Punti cruciali



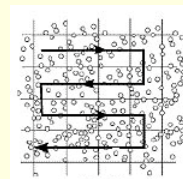
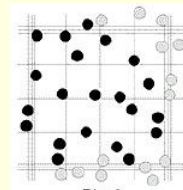
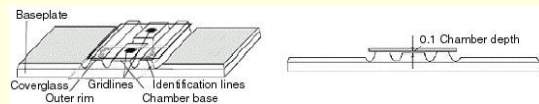
- Diversi tipi cellulari hanno capacità adesive molto diverse
- La presenza di EDTA aiuta il distacco delle cellule
- L'eliminazione di siero è fondamentale per aumentare l'efficacia della tripsina
- L'esposizione prolungata a tripsina può danneggiare irreversibilmente le cellule
- La fase di centrifugazione può essere omessa se si usano elevate quantità di siero
- La tripsina danneggia le proteine di superficie

Procedura di conta



- Centrifugare
- Risospendere in un piccolo volume di terreno completo
- Prelevare 100 μ l di sospensione
- Aggiungere un ugual volume di Trypan Blue (0,4%)
- Riempire le camere del vetrino (5-10 μ l)
- Osservare al microscopio ad ingrandimento 20x
- Calcolare il numero di cellule secondo le specifiche del vetrino di conta (dimensioni del reticolo)

Calcolo del numero di cellule



- A= media delle cellule vive
- B= media delle cellule morte
- C= fattore di diluizione
- D= fattore di conversione in ml
 - Concentrazione cellule vive= $A \cdot C \cdot D$
 - Concentrazione cellule morte= $B \cdot C \cdot D$

Volume della conta= $0,1 \times 1 \text{ mm}^2 = 0,1 \text{ mm}^3$

Fattore di conversione= 10^4
($0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \text{ ul} = 10^{-4} \text{ ml}$)

Punti cruciali



- Un'adeguata accuratezza della misura si ottiene contando almeno 100 cellule
- Il Trypan blue è tossico ed è un potenziale carcinogeno
- Le cellule devono essere ben distinte e uniformemente distribuite
- Evitare la presenza di bolle e detriti
- Non riempire eccessivamente la camera
- Se le cellule sono poche, operare una nuova centrifugazione e risospingere in meno terreno