

Protocollo del saggio di Adesione

PARTE I

- 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 0,1% BSA in terreno di coltura
- 4-Incubare con soluzione 0,5% BSA in terreno di coltura per 60 minuti
- 5-Lavaggio con soluzione 0,1% BSA in terreno di coltura
- 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 5x10⁵ /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 0,1% BSA in terreno di coltura per 3 volte
- 11-Fissare con paraformaldeide al 4% per 10 minuti a temperatura ambiente
- 12-sostituire la paraformaldeide con PBS
- 13-conservare a 4°C

Protocollo del saggio di Adesione

PARTE II

14-Togliere il PBS dalle piastre

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

16- 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)

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

18- Aggiungere un volume uguale di soluzione di solubilizzazione per pozzetto.

18- Diluire in maniera appropriata con soluzione di solubilizzazione 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

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

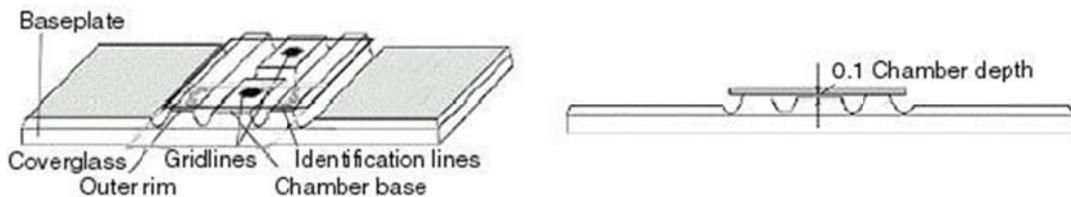
Soluzione di solubilizzazione - 1% SDS in una soluzione al 50% in metanolo in acqua

Procedura di conta di vitalità con Trypan blue

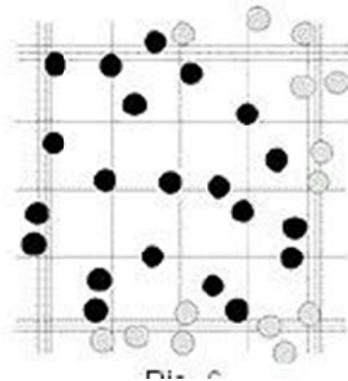
- 1-Centrifugare e recuperare il pellet cellulare
- 2- Risospingere in un piccolo volume di terreno completo (1-5ml)
- 3- Prelevare 500 ul di sospensione
- 4- Aggiungere un ugual volume di Trypan Blue (0,4%)
- 5- Riempire le camere del vetrino (5-10 ul)
- 6- Osservare al microscopio ad ingrandimento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

$1 \text{ mm}^2 = 0,1 \text{ mm}^3 \Rightarrow$ 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= $A * C * D$ (n° di cellule/ml sospensione di partenza)
Concentrazione cellule morte= $B * C * D$ (n° di cellule/ml sospensione di partenza)

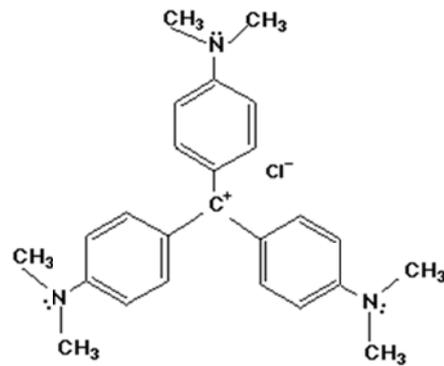
A= media delle cellule vive (su almeno 3 quadrati)

B= media delle cellule morte (colorate in blu, su almeno tre quadrati)

C= fattore di diluizione (2 nel caso si sia diluito 1:1 con trypan blue)

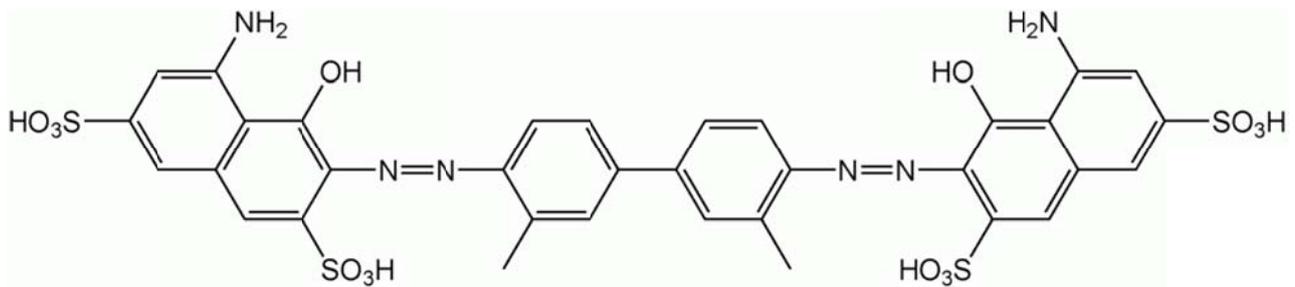
D= fattore di conversione (10.000 nel caso della camera di Burkler)

Crystal Violet



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 tenendo però presente che non può discriminare tra cellule vive e morte.

Trypan Blue



Il Trypan Blue (Blu benzamina, Blu naftilamina, 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).