

Il microscopio ottico

Percorso della luce quando attraversa un preparato colorato (A) e non colorato (B).

preparato colorato

il raggio (rosso) che emerge è modificato sia in ampiezza sia in lunghezza d'onda. L'ampiezza è modificata dal colore che assorbe parte dell'onda mentre la lunghezza dell'onda è modificata dall'indice di rifrazione



preparato non colorato (cellule in colture)

il raggio che emerge (azzurro) è modificato per quanto riguarda la lunghezza d'onda ma non per quanto riguarda l'ampiezza.



La linea tratteggiata in (A) e in (B) rappresenta il percorso del raggio in assenza di modificazioni.

preparato colorato



preparato non colorato
(cellule in colture)

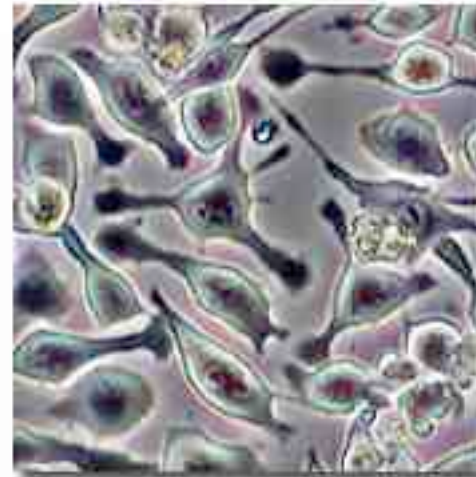
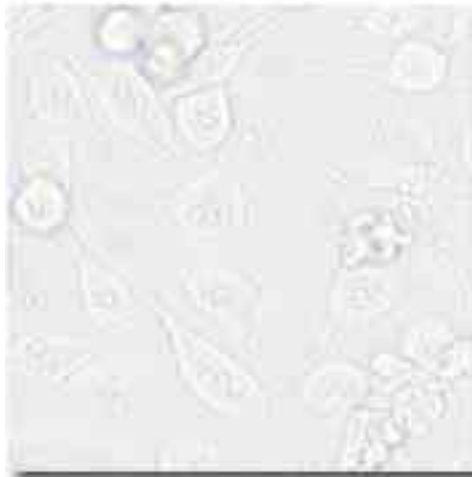


Il microscopio a contrasto di fase converte la differenza di fase (invisibile all'occhio) in differenza di ampiezza (visibile all'occhio) del raggio che li attraversa.

Stesse cellule* osservate in:

campo chiaro

contrasto di fase



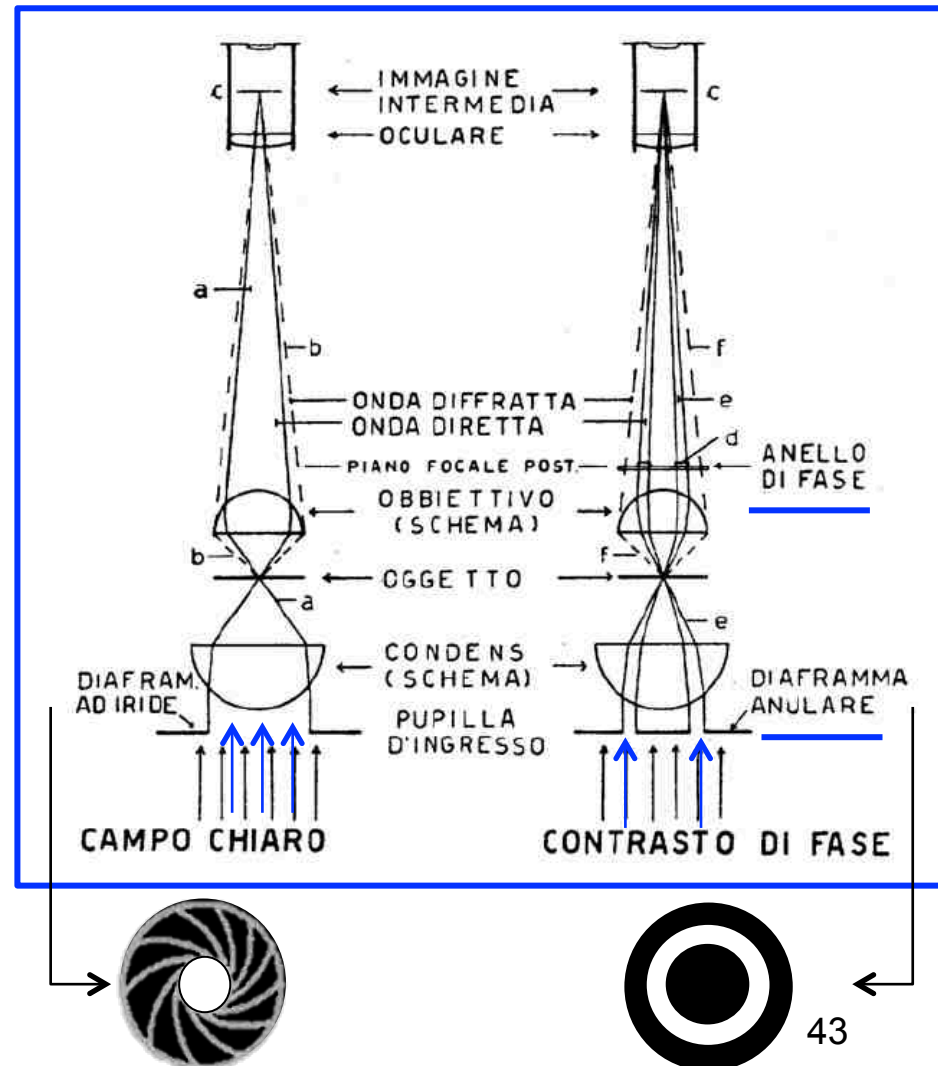
(*) Cellule gliali umane

In campo biologico, la maggior parte dei componenti cellulari è trasparente alla luce visibile, anche a causa dell'elevata presenza di acqua, tuttavia vediamo che le radiazioni luminose una volta oltrepassata una componente o un organello cellulare, subiscono dei **cambiamenti di fase che dipendono sia dallo spessore, sia dal diverso indice di rifrazione della struttura oltrepassata.**

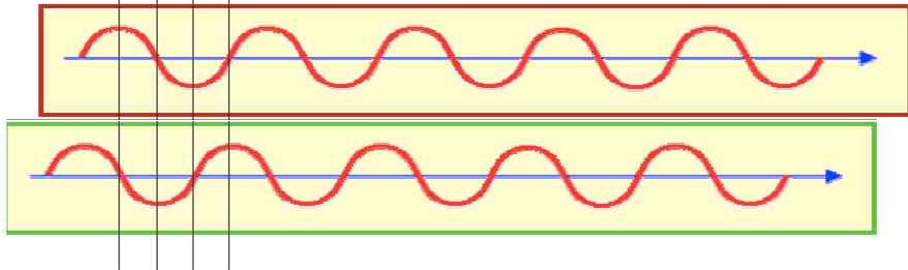
Mediante il microscopio a contrasto di fase è possibile andare a determinare tali cambiamenti e convertirli in differenze di densità così da ottenere delle informazioni utili circa la composizione di cellule e tessuti analizzati. Questa tecnica di microscopia è molto utilizzata per andare ad osservare le cellule mantenute in vita in apposite colture in vitro; infatti tramite la microscopia a contrasto di fase si evita l'utilizzo di coloranti e fissativi che spesso comportano notevoli alterazioni strutturali ottenendo così dei dati molto più reali di quella che è l'organizzazione cellulare.

Contrasto di fase

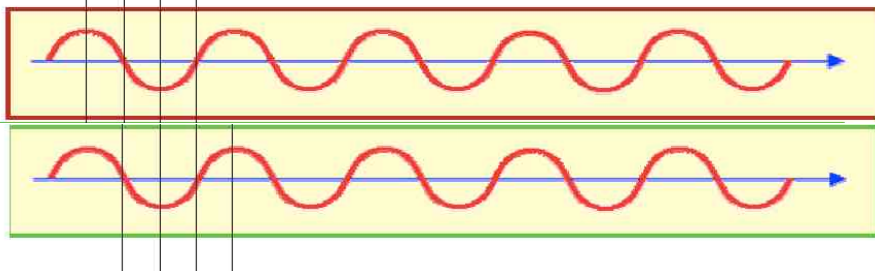
Il preparato viene illuminato da un fascio luminoso in realtà suddiviso a livello del condensatore in due porzioni di fase differente e con diverso angolo di incidenza. Il cambiamento ulteriore di fase dovuto alla porzione di luce che attraversa il campione, andandosi a ricombinare con la luce non rifratta renderà visibili componenti trasparenti ma di indice di rifrazione differente da quello del mezzo.



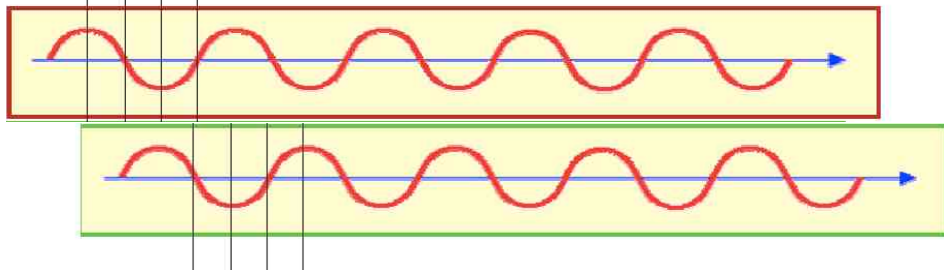
No interferenza:



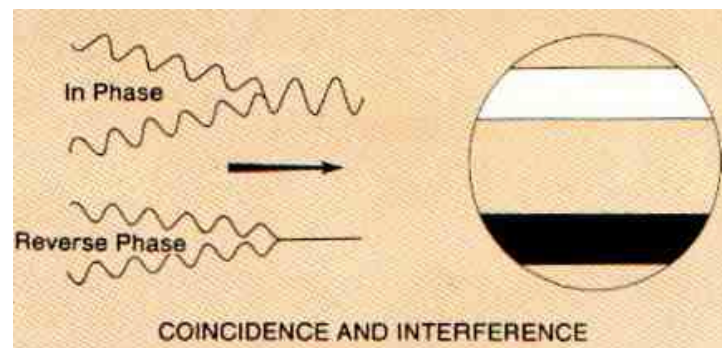
Onda diffratta e onda diretta in fase:



Onda diffratta e onda diretta in fase inversa:



Se il campione ritarda la luce diffratta di circa $\lambda/4$, quando l'onda diffratta andrà ad interferire con l'onda diretta invece di trovarla in quadratura (e quindi non interferire) la troverà ritardata anch'essa di $\lambda/4$ e pertanto le due onde saranno in fase causando un'interferenza positiva e dando una luminosità maggiore di quella dello sfondo



Due raggi luminosi in fase che si incontrano si uniranno a dare un raggio con un'ampiezza uguale alla somma delle ampiezze dei singoli raggi. Due raggi con fase invertita daranno una colorazione scura.

Un microscopio ottico in campo chiaro può essere trasformato in un microscopio a contrasto di fase con la sostituzione/aggiunta di specifici componenti ottici



“torretta” del condensatore

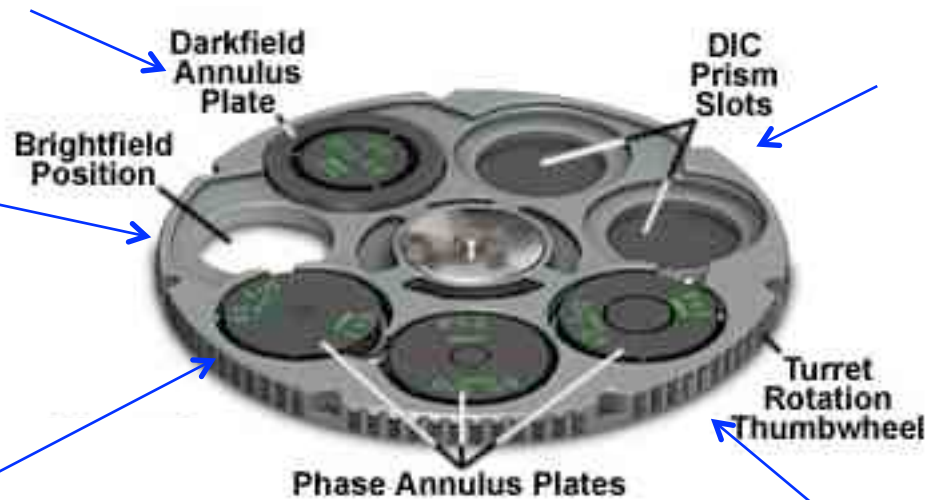
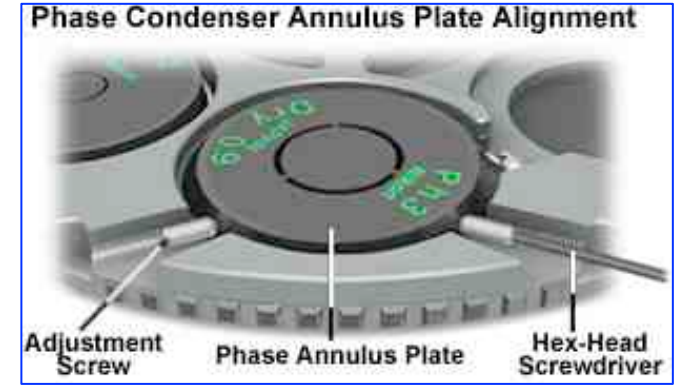
anello “campo scuro”
per preparati fluorescenti

Posizione vuota
“campo chiaro”
per preparati
colorati

Ph1
per obiettivi
10x e 20x

Ph2
per obiettivi
40x e 60x

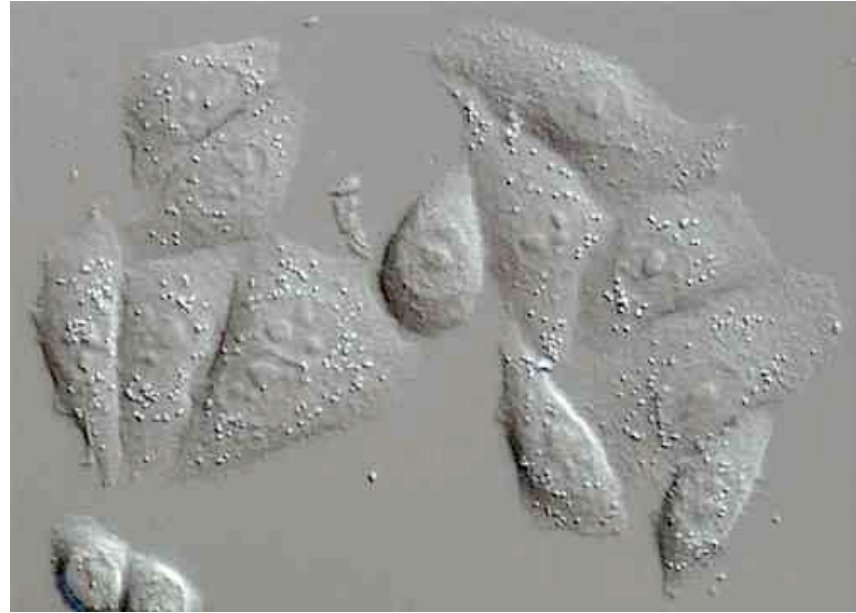
Ph3
per obiettivi
100x



Contrasto di fase



Contrasto differenziale
interferenziale
(DIC o Nomasky)

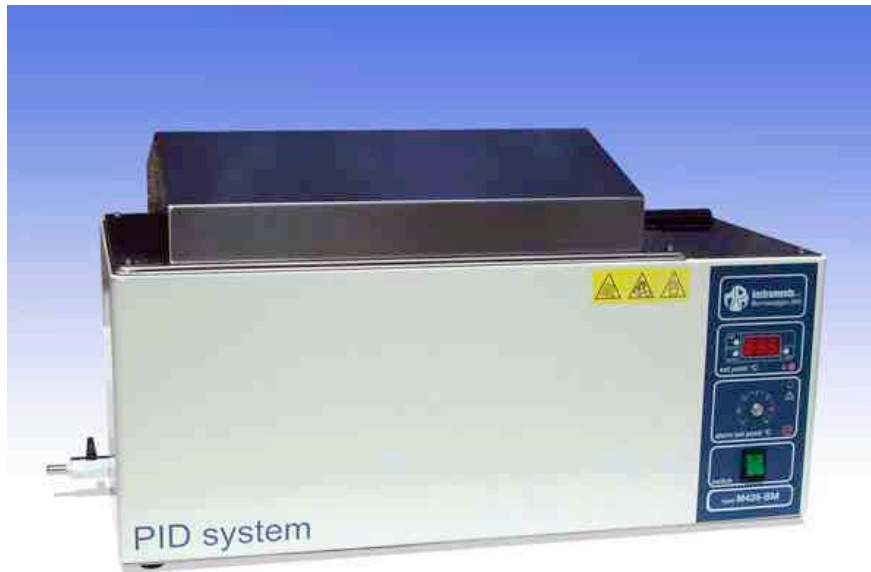


Attrezzature del Laboratorio di Colture Cellulari

- Cappa a flusso laminare
- Incubatore a CO₂
- Microscopio rovesciato a contrasto di fase
- **Centrifuga a bassa velocità, non refrigerata**
- Bagno termostatico
- Frigorifero 4°C
- Congelatore -20°C
- Congelatore -80°C
- Contenitore azoto liquido -180°C



Bagno termostatico



L'acqua dovrebbe essere sostituita con acqua sterile ogni 2 settimane aggiungendo una soluzione disinfettante



Soluzione per la disinfezione dell'acqua nei bagni termostatici* : contiene un disinfettante che non causa danni al vassoio in acciaio, non tossico, non volatile.

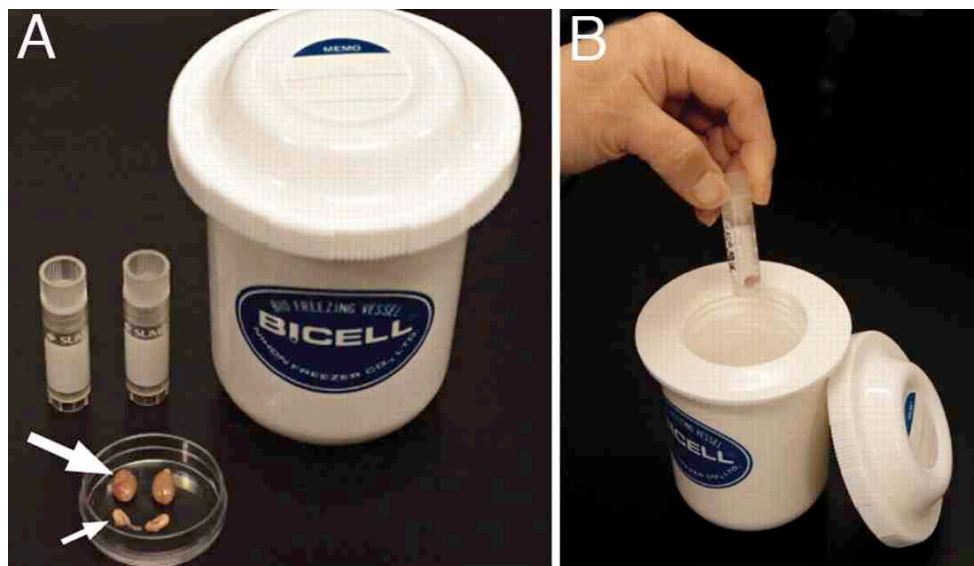
(*) può essere usato anche negli incubatori a CO₂.

Conservazione a lunga scadenza: la crioprotezione

Provette per azoto liquido
(resistenti alle basse
temperature)

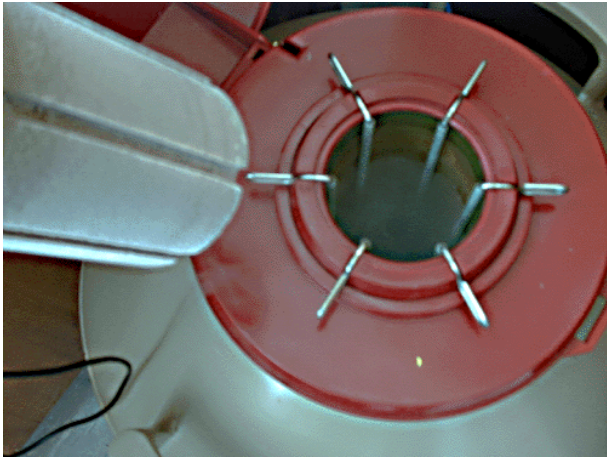


Contenitore per abbassamento
progressivo della temperatura
(1°C/ora)





Contenitori azoto liquido per cellule



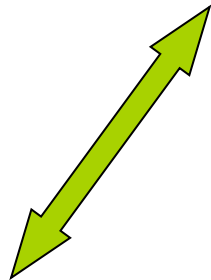
Scaling up della conservazione in azoto liquido (banche di cellule)



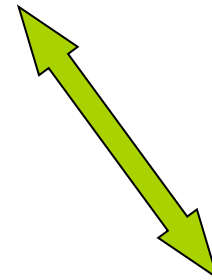
Istrumenti



Colture cellulari



Mezzi



Contenitori

Plastica trattata per
bassa adesione
cellulare

Plastica trattata per
favorire adesione
cellulare

Aggiunta di un
ulteriore substrato di
adesione

Contenitori a bassa adesione

Applications:

- Culture of cells in suspension
- Culture of cells in non-adherent cell clusters (spheroids)
- Measurement of soluble cell products (proteins, etc.)

Examples of cell types:

- Embryonic stem cells/Embryonic bodies
- Neural stem cells/Neurospheres
- Macrophages



Comuni contenitori per colture cellulari

Plastica trattata per favorire l'adesione cellulare



Trattamenti per aumentare l'adesione:

Interazioni
elettrostatiche

Polilisina
Poliornitina

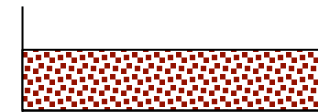
Interazioni mediate
da integrine

Collagene
Laminina
Fibronectina

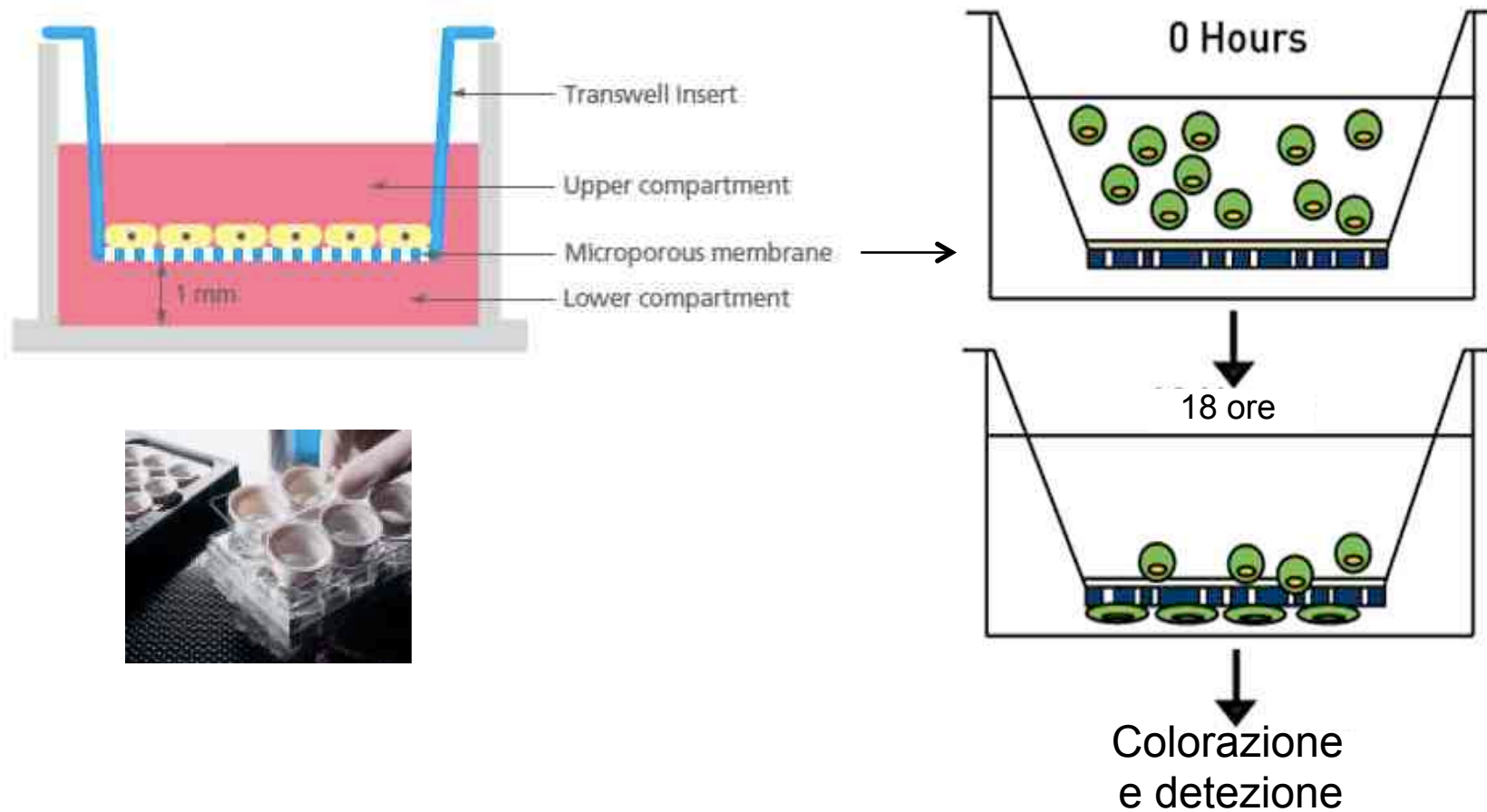


Colture tridimensionali

matrigel

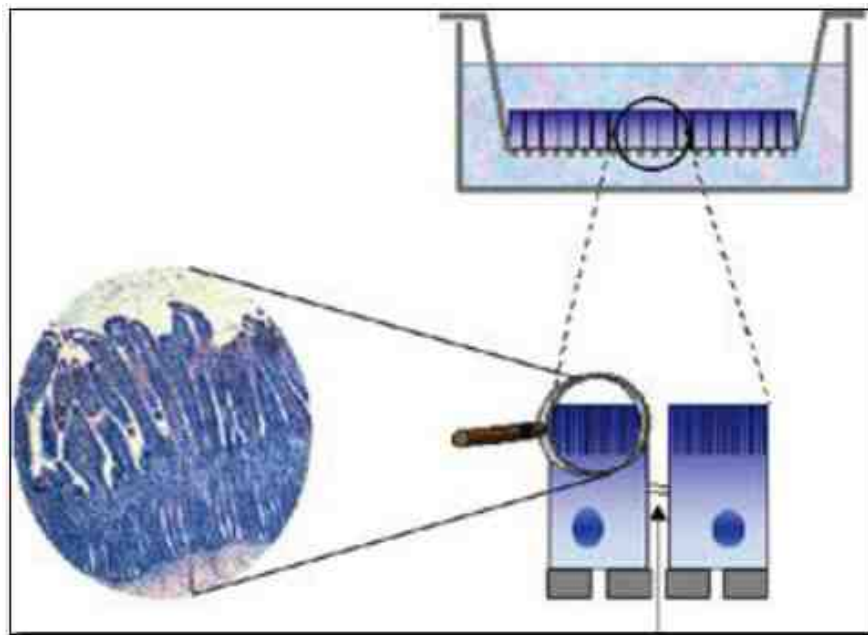
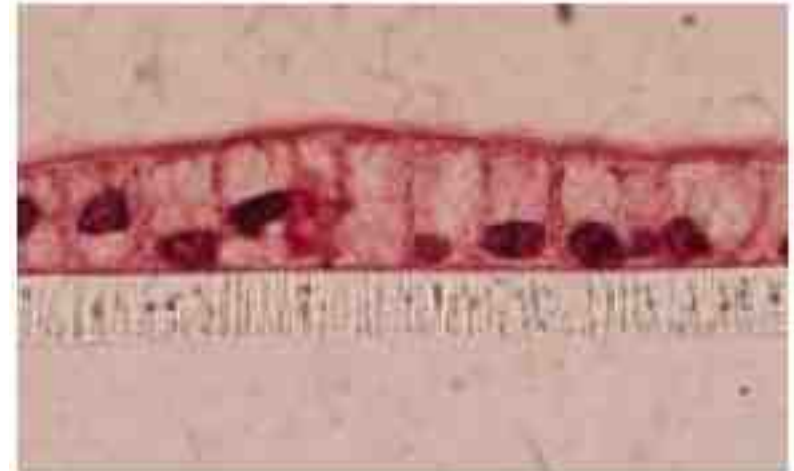


Inserti con membrana microporosa per lo studio della migrazione cellulare



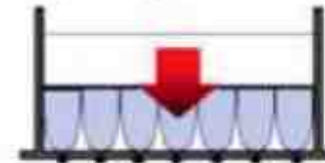
Inserti per lo studio del trasporto epiteliale

Le cellule caco-2 sono in grado di formare in delle giunzioni strette e di riprodurre un"epitelio" monostratificato in vitro.

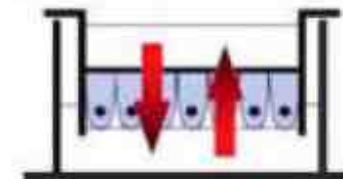


Utilisation de la lignée Caco-2 pour l'étude du transport épithélial

→ culture sur plastique : Accumulation par la face apicale



→ culture sur filtre : Flux transépithéliaux



Pipette monouso sterili

Codice colore*:

50ml: viola

25ml: rosso

10ml: arancione

5ml: blu

2ml: verde

1ml: giallo

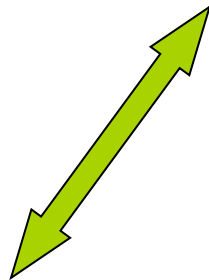
(*) Codice colore comune a tutte le marche di pipette



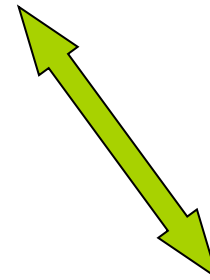
Istrumenti



Colture cellulari



Mezzi



Contenitori

Mezzo di coltura

Table 4-4 Composition of a Typical Medium Suitable for the Cultivation of Mammalian Cells

Amino Acids	Vitamins	Salts	Miscellaneous
Arginine	Biotin	NaCl	Glucose
Cystine	Choline	KCl	Penicillin
→ Glutamine	Folate	NaH ₂ PO ₄	Streptomycin
Histidine	Nicotinamide	NaHCO ₃	Phenol red
Isoleucine	Pantothenate	CaCl ₂	Whole serum
Leucine	Pyridoxal	MgCl ₂	
Lysine	Thiamine		
Methionine	Riboflavin		
Phenylalanine			
Threonine			
Tryptophan			
Tyrosine			
Valine			

Glucose is used at a concentration of 5 to 10 mM. The amino acids are all in the L form and, with one or two exceptions, are used at concentrations of 0.1 or 0.2 mM; vitamins are used at a 100-fold lower concentration, that is, about 1 μM. Serum, which is usually from horse or calf, is added to make up 10% of the total volume. Penicillin and streptomycin are antibiotics added to suppress the growth of bacteria. Phenol red is a pH indicator dye whose color is monitored to assure a pH of about 7.4.

Cultures are usually grown in a plastic or glass container with a suitably prepared surface that allows the attachment of cells. The containers are kept in a incubator at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂, 95% air.

mezzi di coltura molto comuni*:

RPMI 1640

MEM

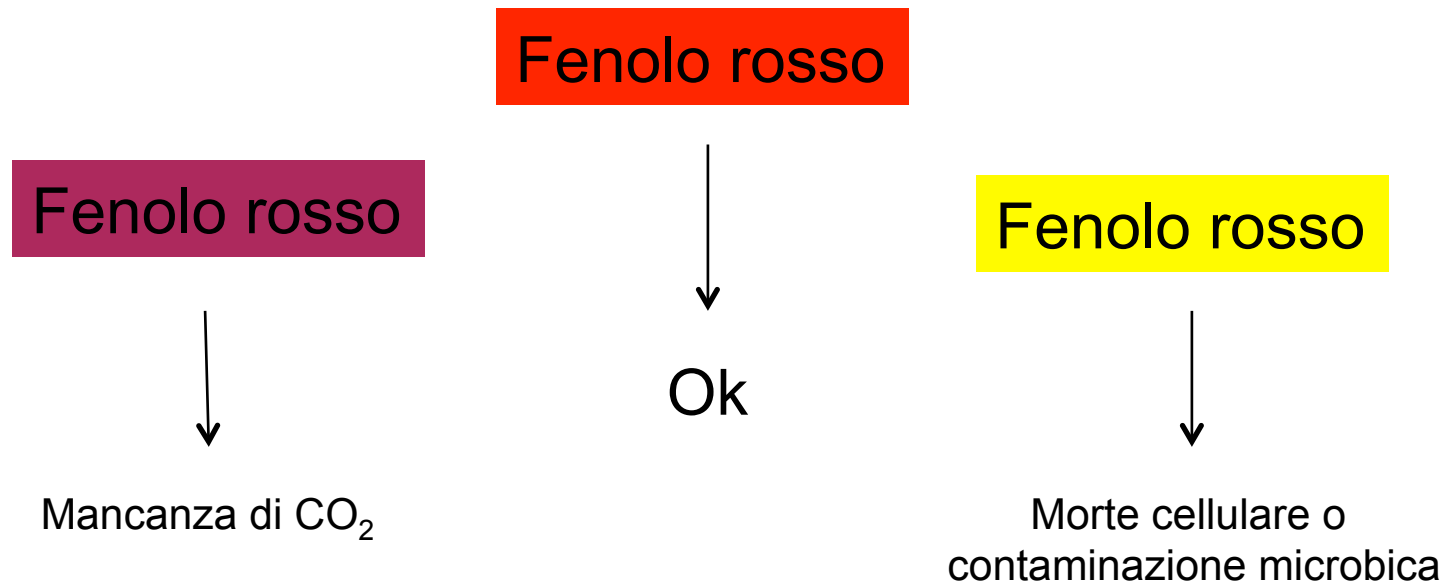
DMEM

DMEM / Ham's F-12

High glucose (4500 mg/l) oppure low glucose (1000 mg/l)



Colore rosso dovuto all'aggiunta di fenolo rosso = indicatore di PH



Attenzione: il fenolo rosso può avere effetto su alcuni tipi cellulari (effetto estrogenico su cellule mammarie)

Comuni additivi:

- L-glutamina
- Amminoacidi non essenziali
- *Penicillina-streptomicina*
- *Fungizone*



Serum



Sieri più comuni:
Siero bovino fetale
Siero bovino
Siero di cavallo

Aggiunto al 2-10%

Serum-free medium (chemically defined)

Substituti sintetici ad esempio:

SynQ: *Protein Free Serum Substitution*



Oppure mezzi di colture ottimizzati (aggiunta di cocktail di fattori di crescita) per:

- Cellule neuronali
- Ibridoma
- Cellule staminali....

Per staccare le cellule

PBS: W/O Ca^{++} e Mg^{++}
Si usa per lavaggio prima di
staccare le cellule



Tripsina EDTA
Per staccare le cellule



Sterilizzazione di pipette e strumenti per radiazione UV



Sterilizzazione di mezzi e reagenti per filtrazione



Nota: stufa poco utile per colture cellulari

Autoclave usata per eliminazione rifiuti potenzialmente pericolosi

Contaminazioni microbiche:

Visibili al microscopio e ad occhio nudo

Batteri
Lievito
Candida

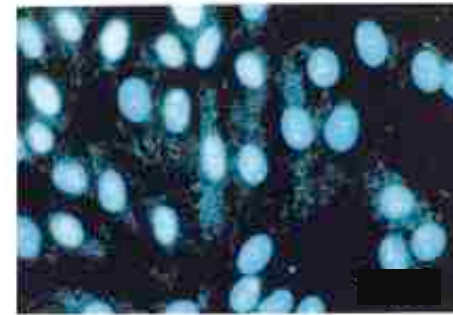


Non visibili al microscopio e ad occhio nudo

Micoplasma
(necessari kit specifici)



controllo

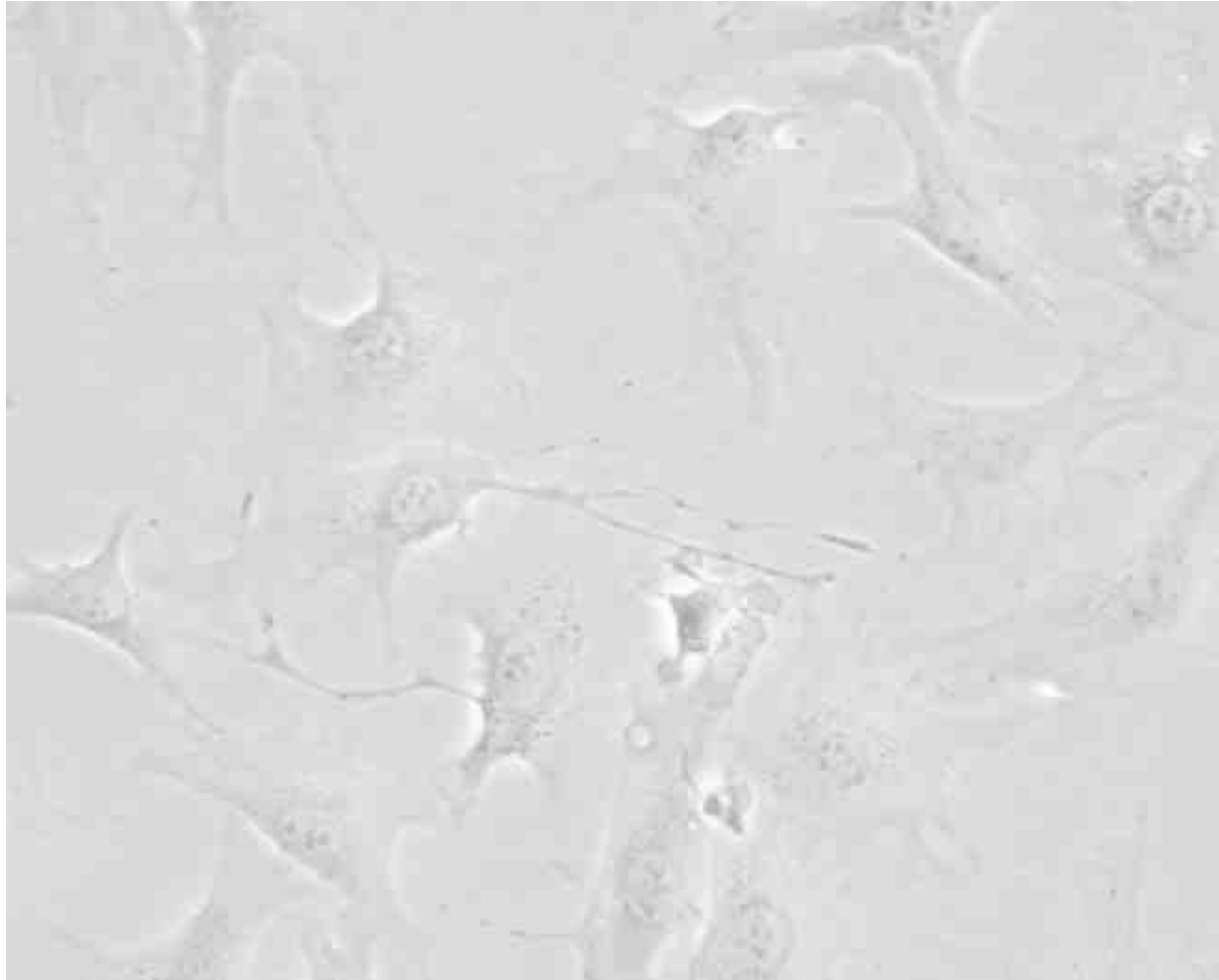


contaminazioni

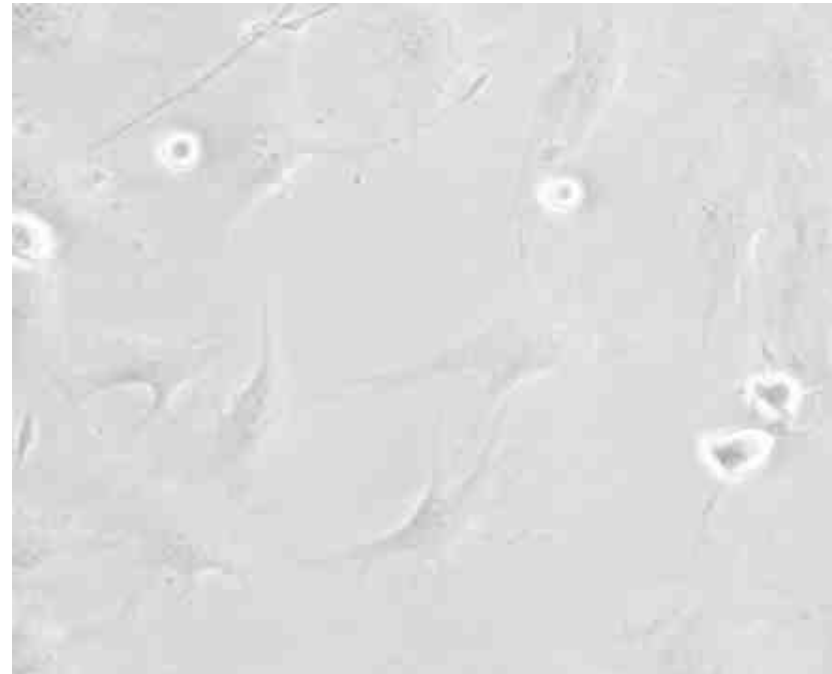
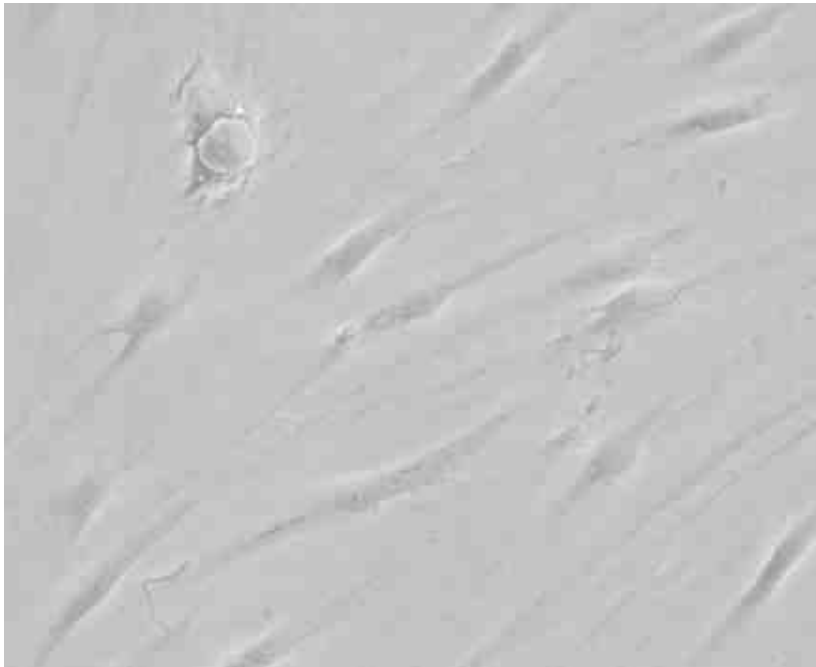
Cross-contaminazioni

Le cross contaminazioni fra linee cellulari diversi sono spesso sottovalutate.

L'aspetto del nucleo dà informazioni sullo stato della cellula. Se il nucleo è molto chiaro è indice di cromatina finemente dispersa e attiva

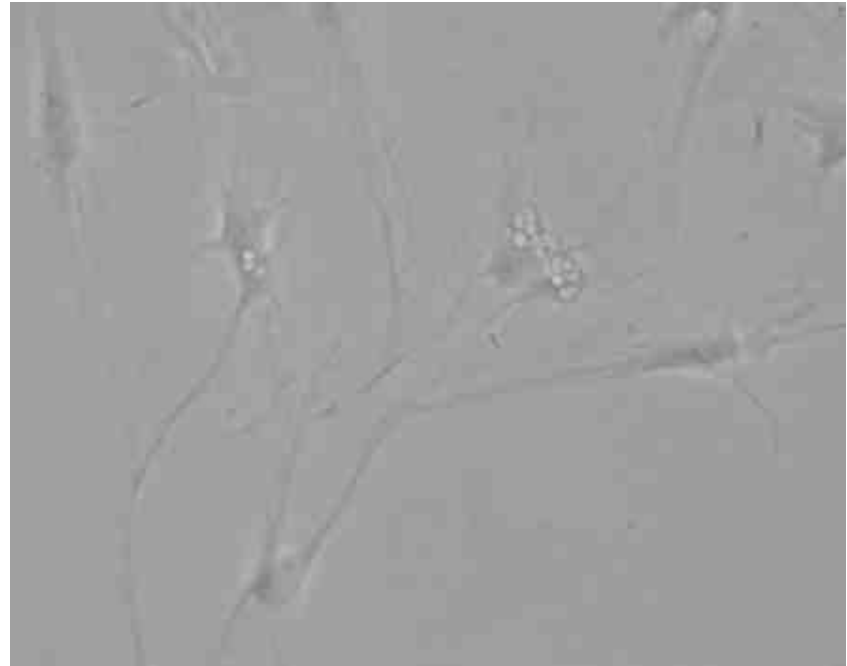


Il nucleo con la **cromatina molto addensata** (nucleo picnotico) è l'evidenza di una cromatina fortemente spiralizzata e inattiva e di morte cellulare.



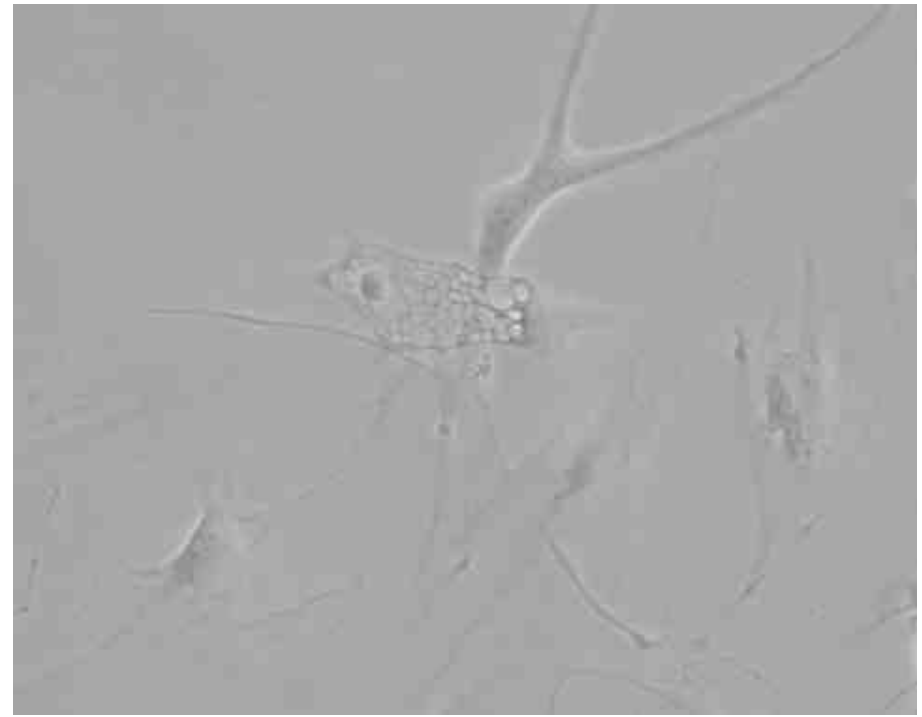
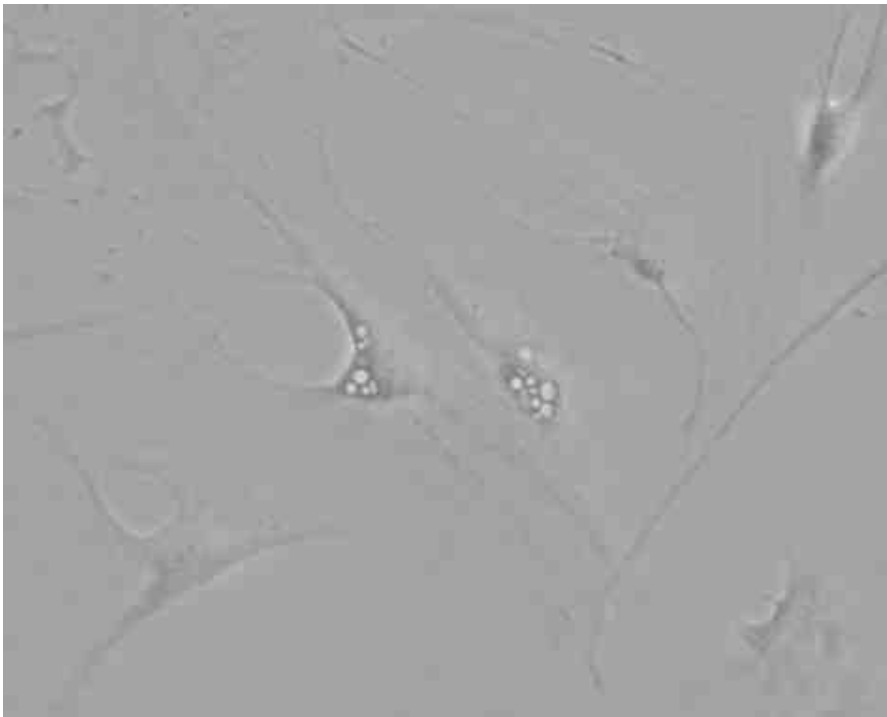
I vacuoli

La presenza di vacuoli nelle cellule animali, in coltura, sono un segno di sofferenza cellulare



I vacuoli

Con l' aumento dei **vacuoli** la cellula modifica la sua morfologia (retrazione dei prolungamenti) e si distacca dal substrato. Indice di morte cellulare



Però i **vacuoli** possono essere un segno dell' avvenuto differenziamento in senso adipocitico di cellule staminali

