

## Colture cellulari

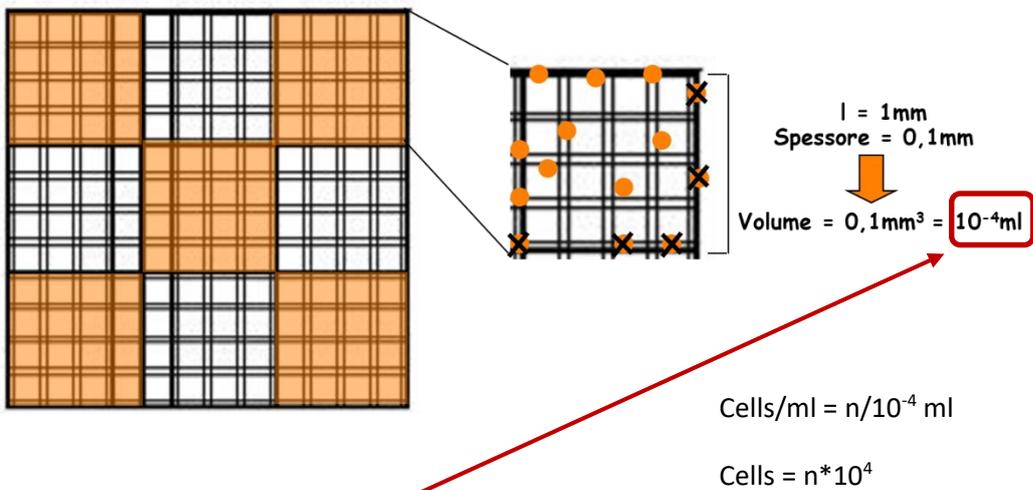
### Protocollo passaggio cellule (HMEC-1)

1. Rimuovere il terreno
2. Effettuare 1 lavaggio in **PBS w/o Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>** (3 mL)
3. Aggiungere 1 ml di **tripsina 1X** alla piastra e mettere in incubatore per 5 minuti; verificare al microscopio che le cellule si siano staccate dalla piastra: se ancora adese alla piastra, staccarle meccanicamente con l'aiuto della pipetta.
4. Nel frattempo in una provetta da 14 ml aggiungere 2 ml **terreno di coltura (MCDB131 10% FBS)**
5. Recuperare la sospensione cellulare dalla piastra e trasferirla in un tubo da 14 ml risospesando più volte.
6. Aggiungere 1 ml di terreno fresco alla piastra e per recuperare eventuali cellule residue e aggiungerlo ai 3 ml già presenti nella provetta da 14 ml (punto 5). Risospesare.
7. Caricare la camera di Burker prelevando dalla provetta in cui sono risospese le cellule (10 µl per ogni cameretta) e contare le cellule di 5 campi.
8. Nel frattempo centrifugare le cellule per 5 minuti a 1000 RPM
9. Aspirare il surnatante e risospesare il pellet in 1 ml di terreno (**MCDB131 10% FBS**)
10. Calcolare quanti µl di sospensione cellulare prelevare per avere **7\*10<sup>4</sup> cells o 5\*10<sup>4</sup> cells** (a seconda che l'esperimento di imaging sia programmato rispettivamente per il giorno seguente o dopo un paio di giorni) da piastrare in piastrellini p10.
11. Preparare 2 piastrellini p10 per cappa mettendo in ognuno 1 ml di terreno MCDB131 10% FBS, quindi aggiungere la sospensione cellulare calcolata al punto precedente.

## Conta cellulare mediante Camera di Burker



Ciascuna delle due camerette di Burker è così composta:



$n^\circ \text{ cells/quadrate} = n*10^4 \text{ cells / ml}$

1. Contare le cellule presenti nei 5 quadrati della cameretta evidenziati in arancione
2. Calcolarne la media ( $n^\circ \text{ cells/quadrate}$ )
3. Sulla base della corrispondenza riportata sopra in grassetto impostare l'equazione necessaria a calcolare quanti  $\mu\text{l}$  della sospensione cellulare corrispondono a  $5*10^4$  cells e quanti a  $15*10^4$  cells