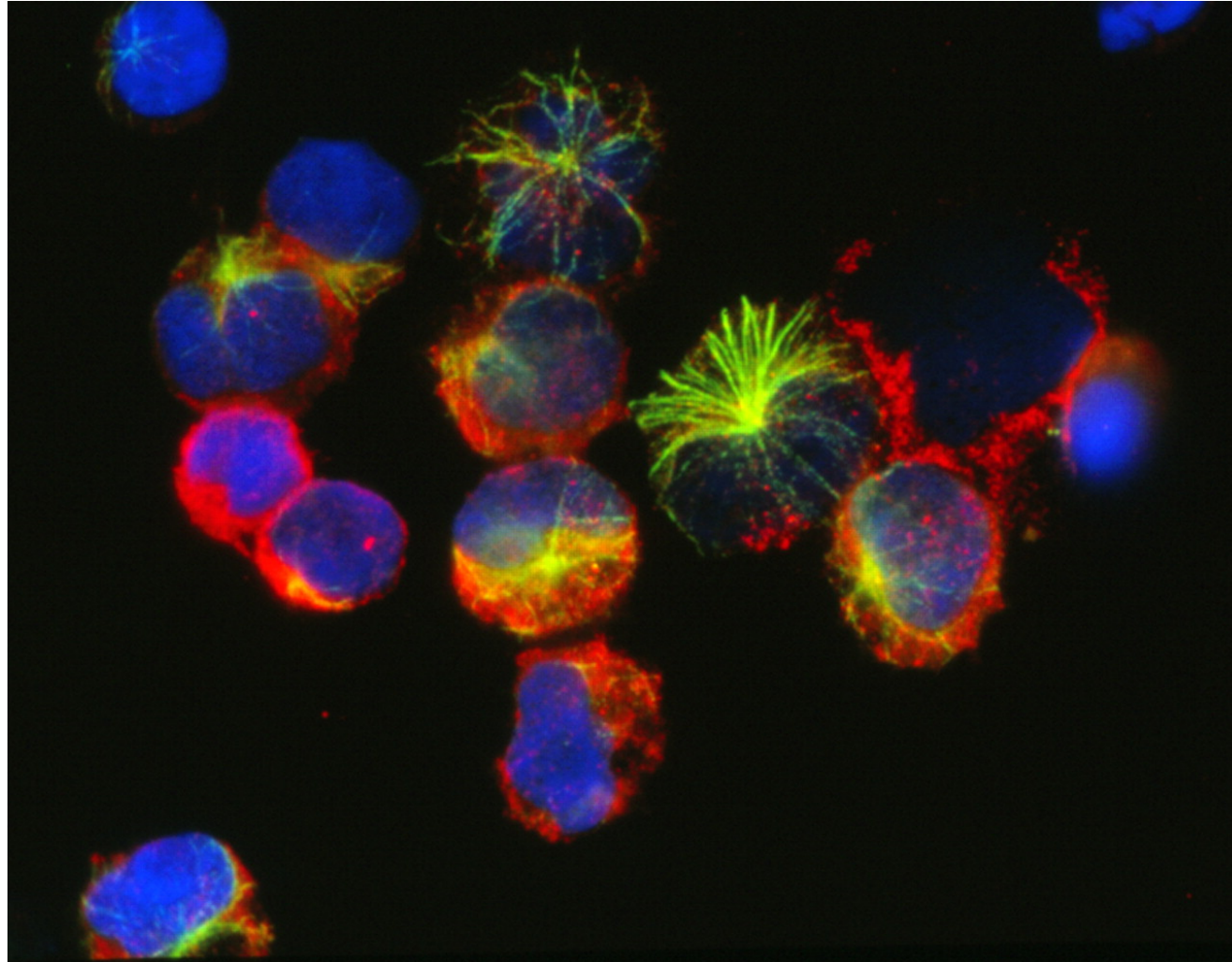


Corso di biologia della cellula e dei tessuti 2011-2012

Introduzione alle colture cellulari

Claudio Dati





Kmietowicz Z BMJ 2011;343:bmj.d6726

Perché coltivare le cellule?

1907 coltura di tessuto nervoso di rana su coagulo di linfa
si dimostra che le fibre nervose (assoni) originano da singoli
neuroni

anni '50 sviluppo dell'uso delle colture di cellule per produrre
vaccini e per studiare la proliferazione cellulare

Perché coltivare le cellule?

- studiare metabolismo, proliferazione, differenziamento, migrazione
- ridurre/studiare le interazioni tra tipi cellulari
- manipolazione controllata dell'ambiente -> effetto di ormoni, farmaci ecc.
- manipolazione genetica -> sintesi su larga scala di proteine
- produzione di tessuti per trapianti, ricerca ecc.

Culture Types



Host

Dissection



Trypsin digestion



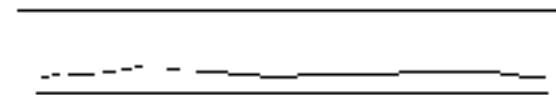
Finely chop



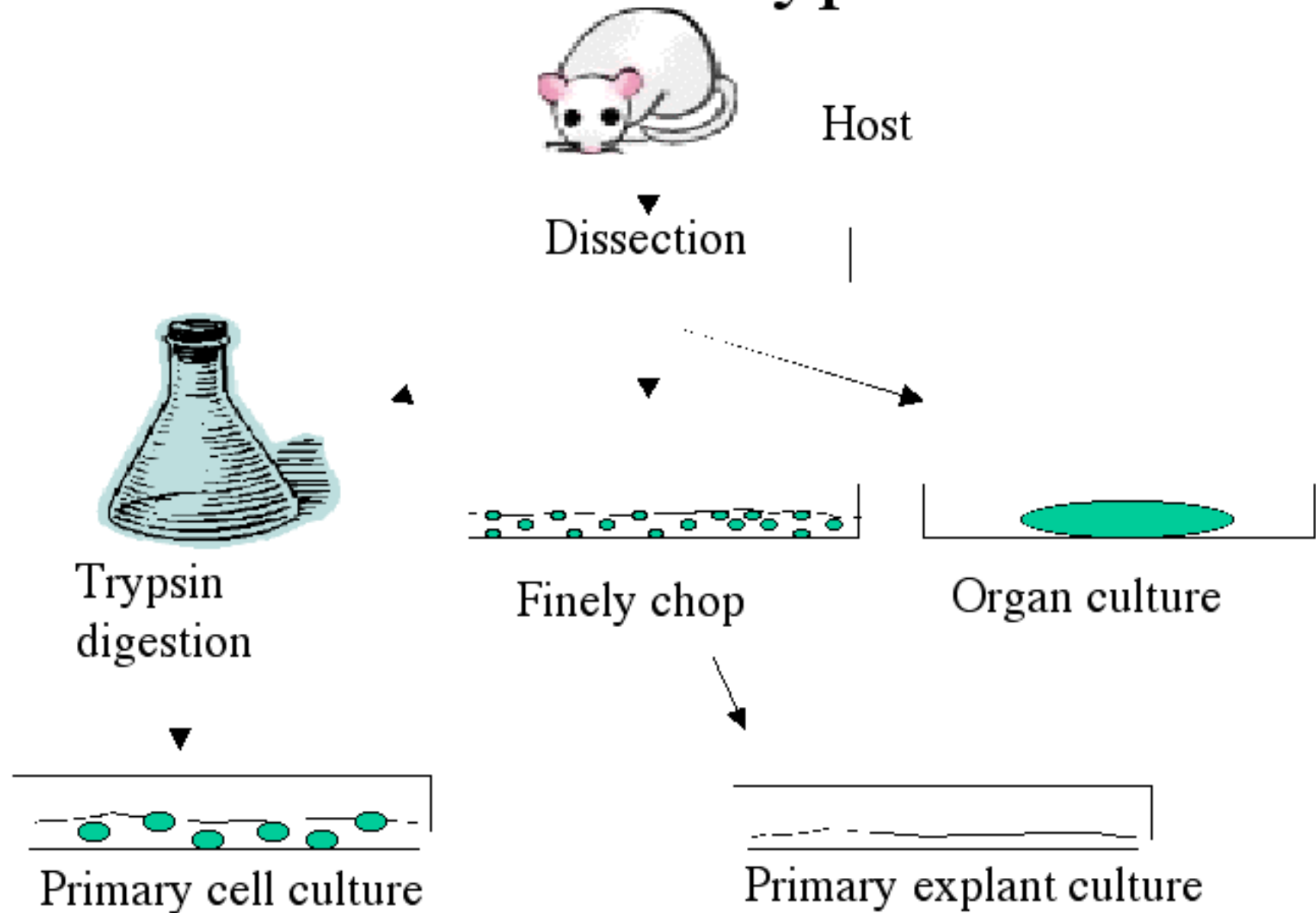
Organ culture



Primary cell culture



Primary explant culture



Colture d'organo

mantenimento dei rapporti tra le cellule

nessuna possibilità di **replica**

Colture di espanti

mantenimento dei rapporti tra le cellule

limitata possibilità di **replica**

Colture primarie

isolate direttamente dal tessuto

cellule eterogenee

possibilità di isolare singoli tipi cellulari

limitata capacità di proliferazione senescenza

Cell Lines



Primary cell culture



Trypsin
digestion



Cell line culture

1st passage, 1:3 split ratio

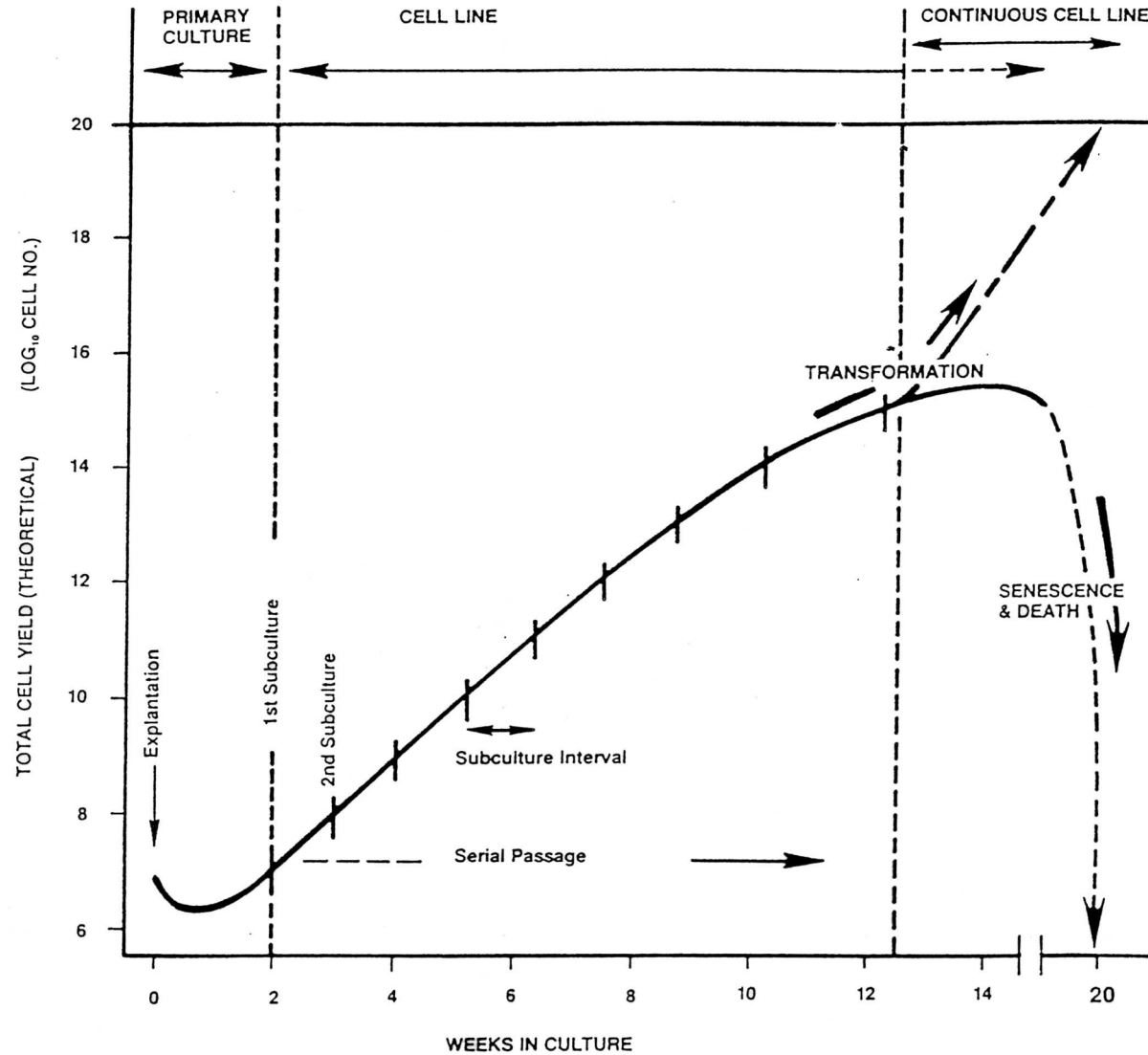


Fig. 2.1. Evolution of a cell line. The vertical axis represents total cell growth (assuming no reduction at passage) for a hypothetical cell culture. Total cell number (cell yield) is represented on the Y-axis on a log scale and time in culture, on the X-axis on a linear scale. Although a continuous cell line is depicted as arising at 12½ wk it could, with different cells, arise at any time. Likewise, senescence may occur at any time, but for human diploid fibroblasts it is most likely to occur between 30 and 60 cell doublings or 10 to 20 wk, depending on the doubling time. Terms and definitions used are as in the Glossary. Transformation is explained in more detail in Chapter 15.

Linee cellulari continue

immortalizzate (spontaneamente o no)

possibilità di ripetere gli esperimenti

possibilità di isolare singoli tipi cellulari

possibilità di conservazione indefinita in azoto liquido

perdita di rapporti diretti tra le cellule

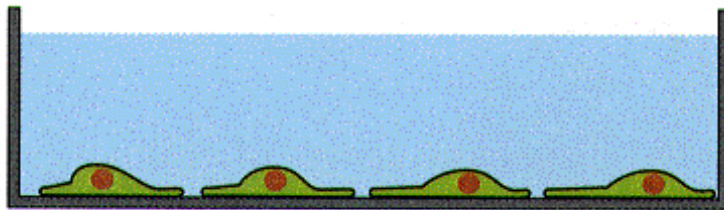
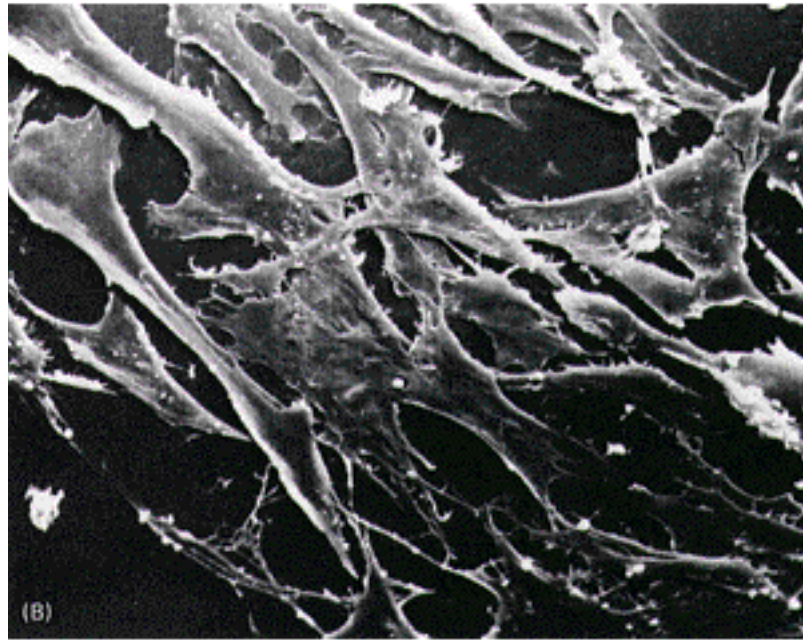
modificazione di alcune caratteristiche

dimensioni ridotte

prevalenza di glicolisi anaerobia

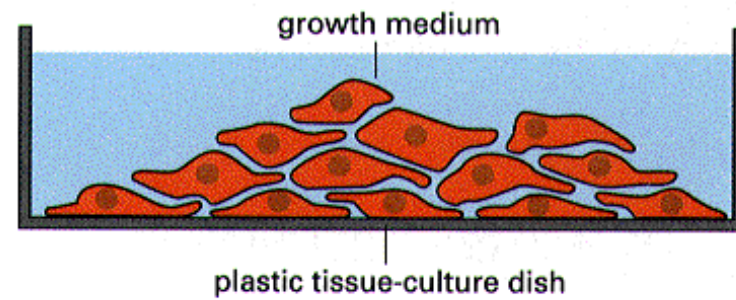
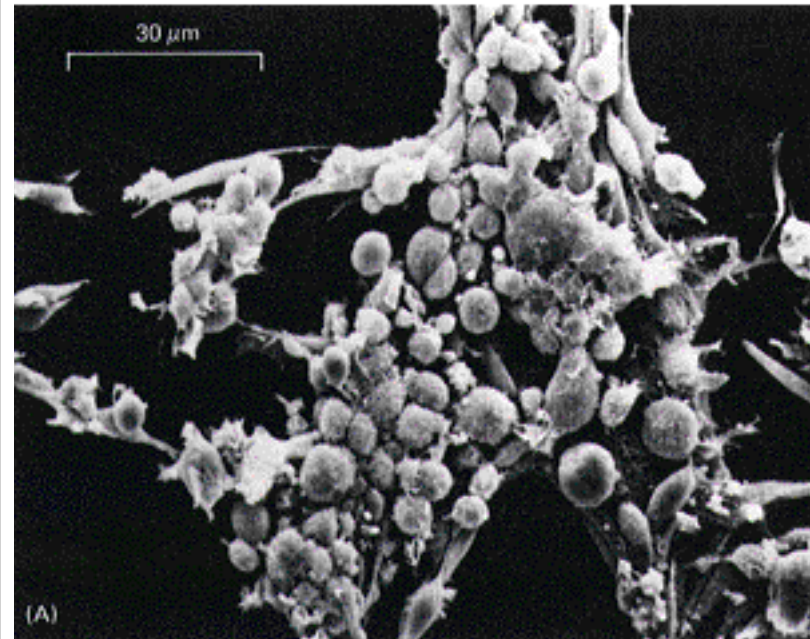
aneuploidia, eteroploidia

Normal cells



Contact inhibited
normal cells

Transformed cells



Multilayer of uninhibited
cancer cells

Come si coltivano le cellule

condizioni critiche:

Sterilità

Temperatura

Terreno di coltura

Recipienti

Sterilità

Manipolazione in ambiente sterile: cappa per colture



Sterilità

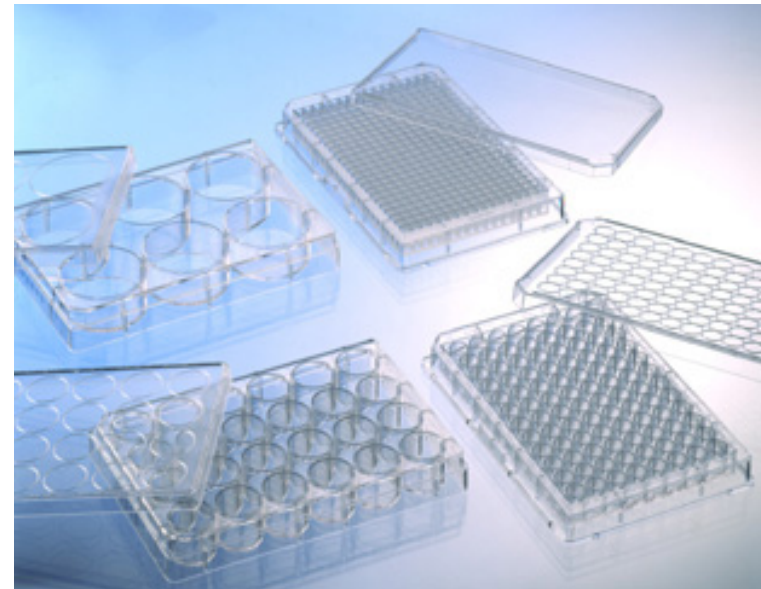
Utilizzo di strumenti e contenitori sterili



Contenitori in polistirene sterile

trasparente

biologicamente inerte / non tossico



Incubatore

mantiene temperatura (37 °C)

e atmosfera (95% aria, 5% CO₂, 98% umidità)



Terreno di coltura

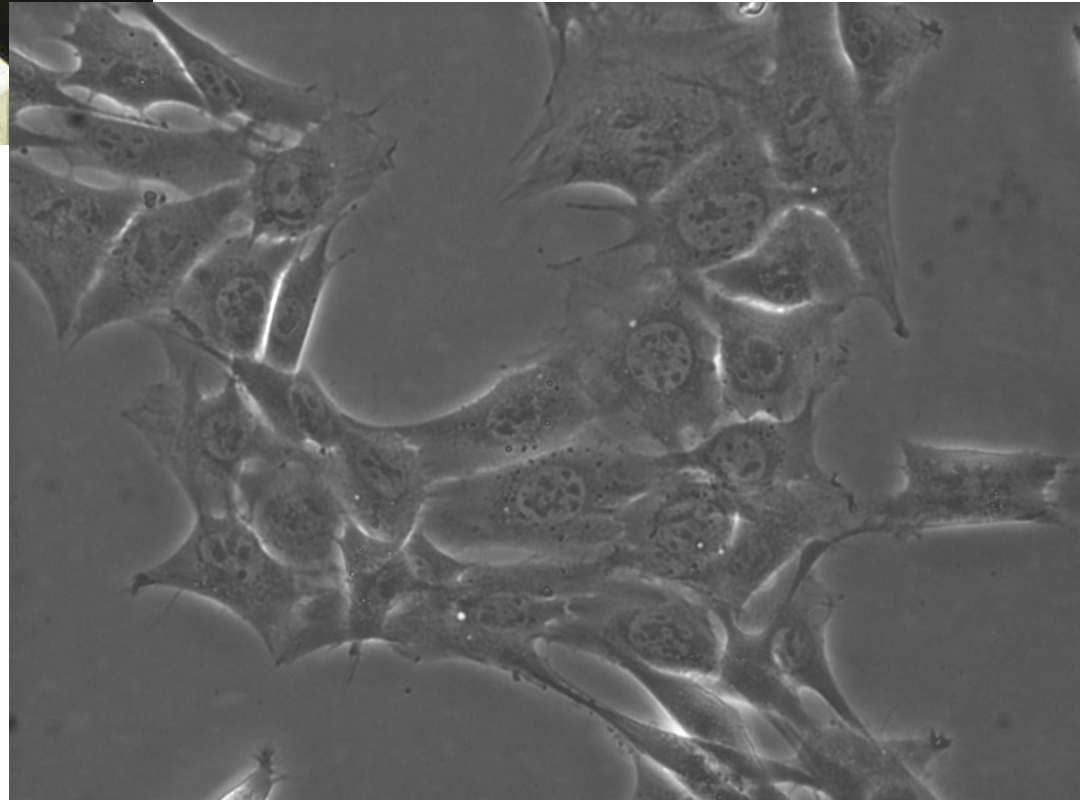
terreno base

siero (fetale bovino)

antibiotici

ecc.





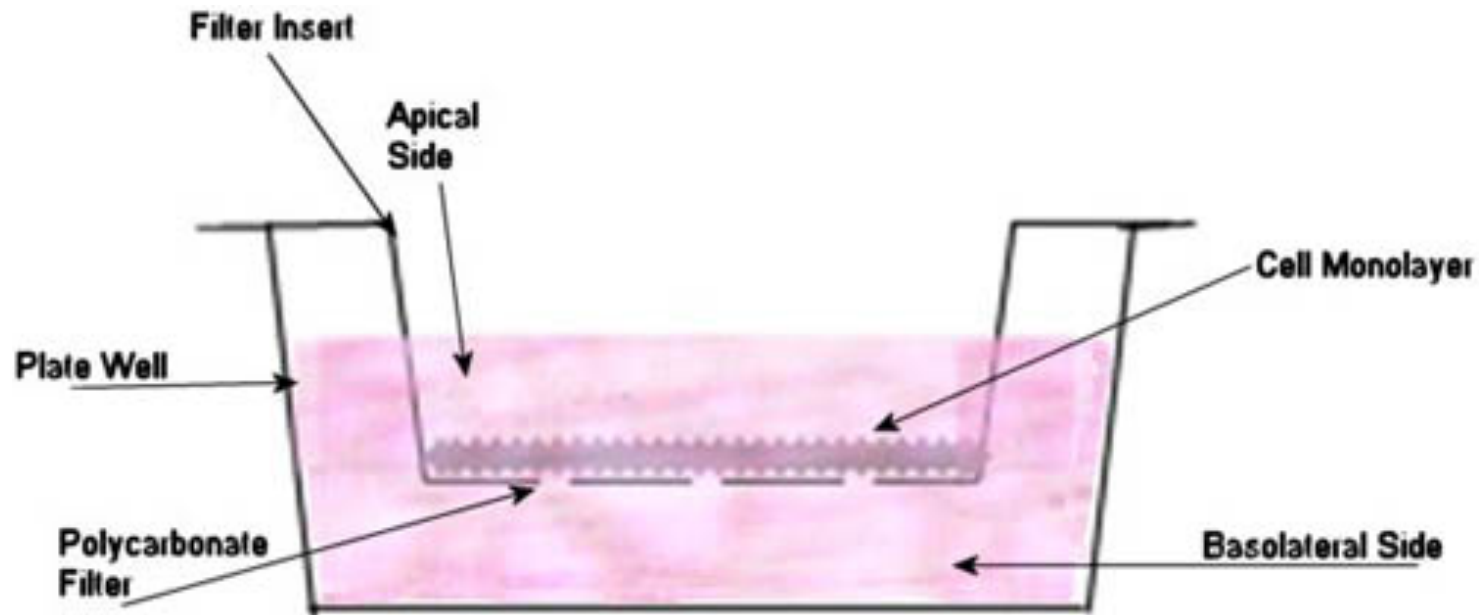
Un passo (o più) oltre

substrati alternativi (polilisina, collagene, laminina)

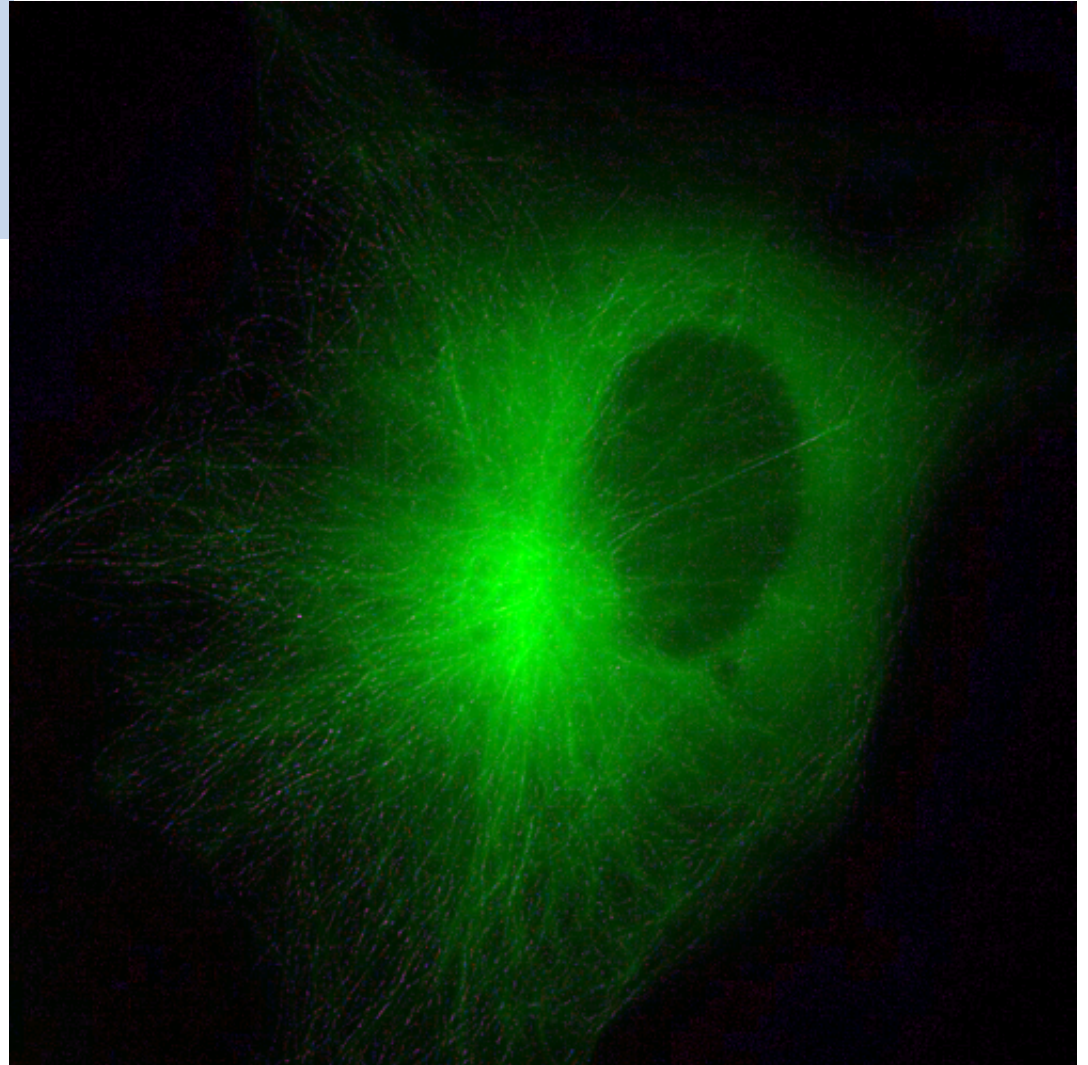
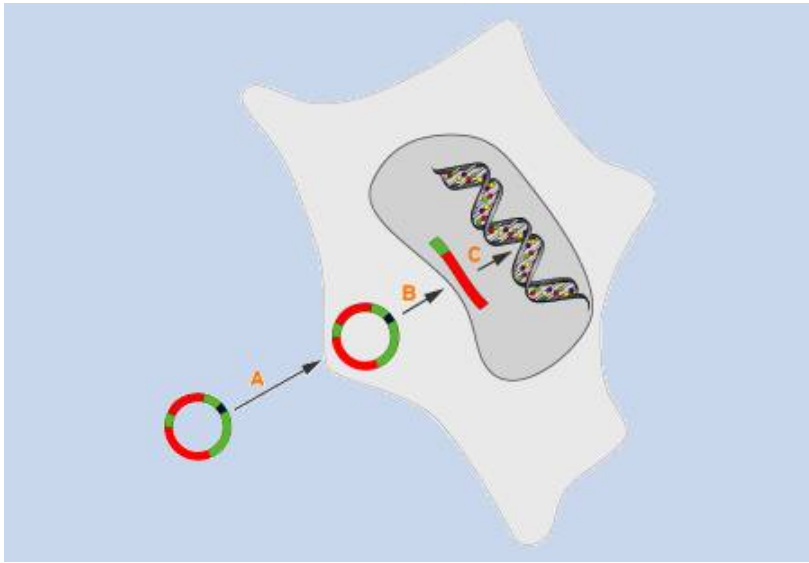
co-culture

culture in 3 dimensioni

...







<http://www.microscopyu.com/articles/livecellimaging/index.html>

<http://www.youtube.com/watch?v=4mKhULnxqcw>