

RELAZIONE

di Giada Ciandella

LABORATORIO DI COLTURE CELLULARI

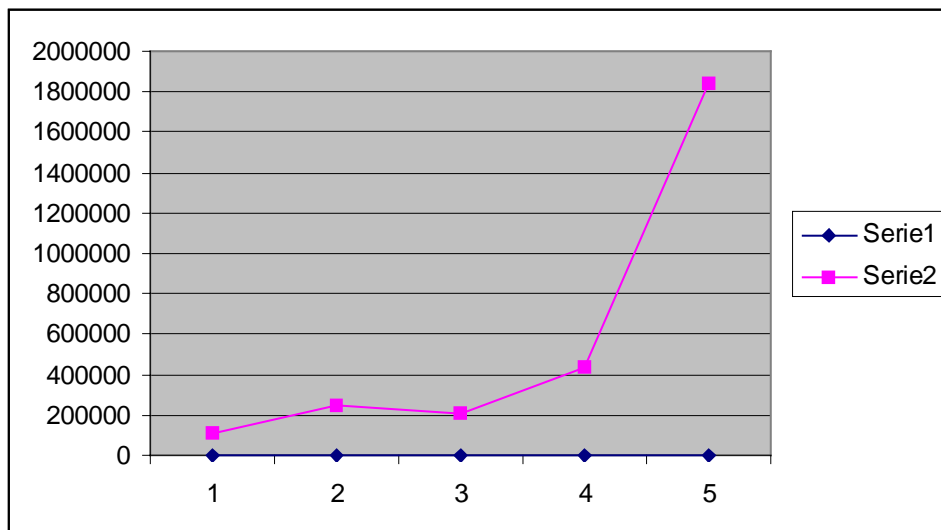
CURVA DI CRESCITA DELLE CELLULE HL60

Nell'attività di laboratorio abbiamo seguito la crescita delle HL60, cellule in sospensione appartenenti ad una linea leucemica umana. Essendo in sospensione è stato possibile contare le cellule con la *Camera di Bunker* e con il *Contatore Automatico*. Questi sono i dati

| Data | Tempo in h | N° di cellule/ml |
|------------|------------|------------------|
| 27/11/2006 | 0 | 106.000 |
| 28/11/2006 | 23 | 248.670 |
| 29/11/2006 | 44 | 204.610 |
| 30/11/2006 | 65 | 434.620 |
| 04/12/2006 | 89 | 1.837.800 |

Come si può notare dai dati, le cellule contate il 29/11/2006 corrispondono ad un valore anomalo. Ciò è dovuto ad un mio errore poiché non ho sospeso bene le cellule prima della conta, prelevando un campione troppo povero di cellule, facendo quindi una sottostima, in quanto le cellule dovrebbero essere cresciute rispetto al 28/11/2006.

Ecco la curva di crescita:

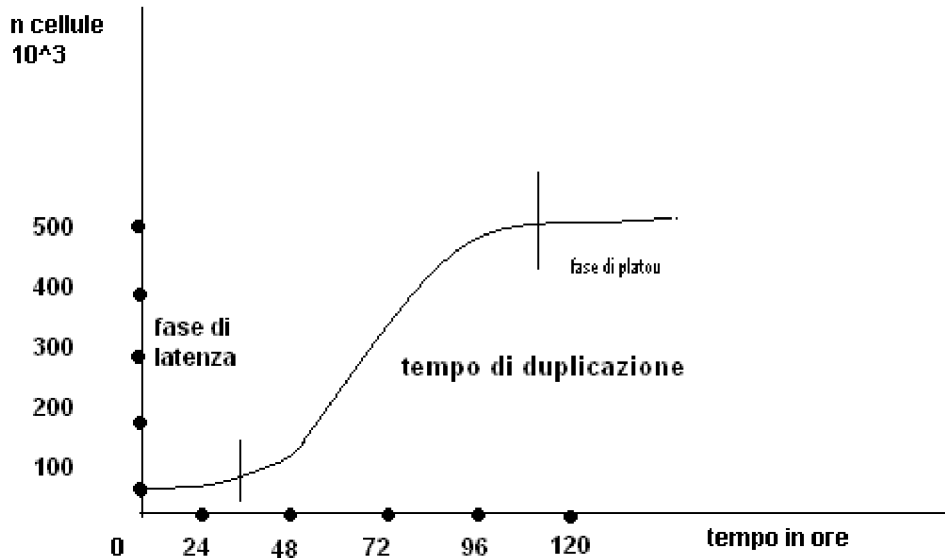


Io avevo la fiasca B contenente 2 ml con 800.000 cellule/ml che ho poi messo in 15 ml di terreno dividendole poi in due fiasche una da 5 ml e una da 10 ml, quindi

ottengo: $\frac{800.000 * 2}{15} = 106.000$ cell/ml, e per la conta ho usato sempre la seconda fiasca

(da 10 ml) e ciò non è completamente corretto poiché perturbiamo le cellule, ma per comodità abbiamo fatto così.

Anche l'aprire e il chiudere l'incubatore può influire su una curva di crescita imperfetta; infatti la curva di crescita ipotizzata dovrebbe essere così:

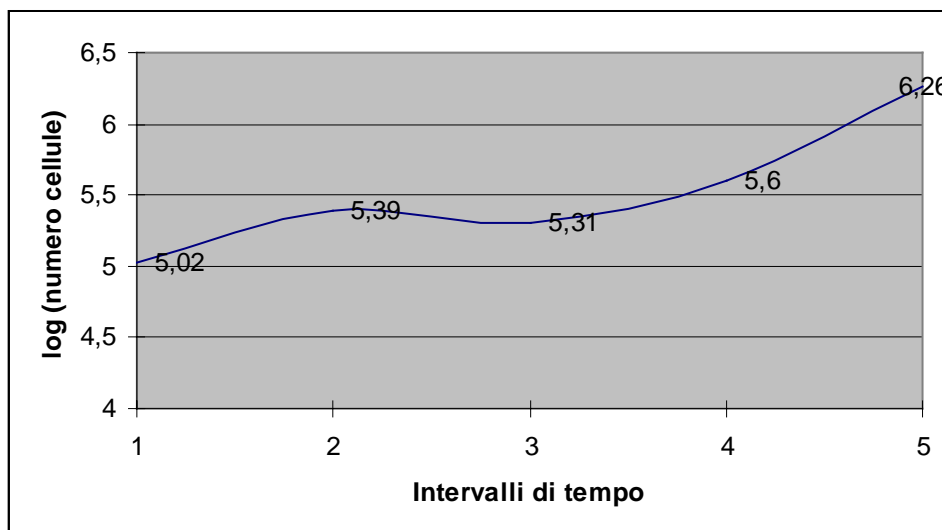


Questo è ciò che ci si aspetta: le HL60 dovrebbero avere una fase di latenza molto piccola (in quanto cellule tumorali) seguita da una funzione esponenziale. Il tempo medio di duplicazione dovrebbe essere di $\cong 23$ h

Posso comunque linearizzare la mia curva passando alla scala logaritmica

| | TEMPO IN ORE | | | | |
|---------------|--------------|--------|--------|--------|---------|
| | 0 | 23 | 44 | 65 | 89 |
| n. cellule/mL | 106000 | 248670 | 204610 | 434620 | 1837800 |
| Log n.cellule | 5,02 | 5,39 | 5,31 | 5,60 | 6,26 |

Grafico corrispondente:



CALCOLO TEMPO DUPLICAZIONE

Il tempo medio di duplicazione dovrebbe essere di circa 23h

Se si inoculano N cellule al tempo T dopo Z generazioni abbiamo che:

$$\log N = \log N_0 + Z \log 2$$

$$Z = \text{tempo trascorso tra due conte} \frac{T}{T_{\alpha}} \quad t_{\alpha} = \frac{t}{z}$$

| Giorni | Z | T | T α |
|------------|------|----|------------|
| 28/11/2006 | 1,79 | 23 | 12 |
| 29/11/2006 | 1,77 | 21 | 12 |
| 30/11/2006 | 1,80 | 21 | 11 |
| 04/12/2006 | 2,08 | 24 | 11 |

CITOSPIN E CICLO CELLULARE

Le HL60 sono state utilizzate anche per la determinazione del ciclo cellulare attraverso la colorazione di campioni da analizzare al *Citofluorimetro a flusso* facendoci vedere le diverse fasi del ciclo cellulare in cui si trovano le cellule; questi sono i dati relativi alle mie cellule:

fase G₀/G₁ = 25%

fase S = 34,7%

fase G₂/M = 16,7%

Ciò dimostra che le cellule sono disomogenee

SaOS

Tripsinizzazione: La linea SaOS è costituita da cellule di osteosarcoma umano e sono cellule adese ovvero attaccate alla superficie del recipiente di coltura; dunque per poterle analizzare è necessario staccarle da esso. Ciò è stato fatto attraverso la *tripsinizzazione* con tripsina addizionata di EDTA, enzima proteolitico che distrugge le proteine che permettono l'adesione delle cellule (digerisce la matrice extracellulare). Una volta staccate le cellule è necessario inibire l'effetto della *tripsina* che a contatto prolungato con le cellule ne provoca la morte. Tutto ciò è servito per permetterci di contare le SaOS.

Con le SaOS abbiamo preparato dei lisati enzimatici per la determinazione dell'attività enzimatica della fosfatasi alcalina che idrolizza in ambiente alcalino i legami fosfato. Abbiamo quindi lisato le cellule e congelate a -80° in azoto liquido. Questo ci sarà utile nei prossimi anni durante il corso di Laboratorio di Biochimica dove potremo dosare l'enzima presente nel lisato cellulare.

Colorazione: Abbiamo preparato dei vetrini contenenti le SaOS per essere colorati mediante Sudan Black B. Questa operazione si basa sulla proprietà che ha il *formolo* addizionato di *cloruro di calcio* di rendere insolubili e di evidenziare molti lipidi complessi in solventi apolari. I lipidi risultano quindi colorati in blu-nero. Così possono essere evidenziati anche organelli intracellulari come i mitocondri.