

# Colture Cellulari Primarie

## Materiale:

- Petri 60 mm X 1,5 mm.
- Flask da 75 cm<sup>2</sup>.
- Vaschette con coperchietto e Falcon da 50 ml.
- Strumenti pre disinfettati per asportazione articolazioni: forbice + pinza.
- Strumenti pre-sterilizzati: forbice piccola + bisturi
- Lame sterili monouso per bisturi (lama 10).
- D-PBS sterile + Gentamicina 50 µg/ml.
- D-MEM (senza siero) + Gentamicina 50 µg/ml.
- Ialuronidasi (polvere) + Collagenasi (polvere) + Tripsina (liquida sol. 2,5%)

## Metodo:

Preparare il materiale sterile e la morsa.

Preparare le soluzioni dei tre enzimi in D-MEM + gentamicina nelle tre rispettive vaschette con coperchio e preriscaldarle a 37°C:

Ialuronidasi (4 mg/20 ml)	0,05% in D-MEM + gentamicina 50 µg/ml
Tripsina (50 mg/20 ml) o (1:10 sol. 2,5%)	0,25% in D-MEM + gentamicina 50 µg/ml
Collagenasi (40 mg/20 ml)	0,20% in D-MEM + gentamicina 50 µg/ml

Preparare sotto cappa una falcon da 50 ml con 20 ml di D-PBS sterile + Gentamicina 50 µg/ml per inserire poi il bisturi e la pinzetta, e una falcon da 50 ml vuota.

I frammenti di tessuto asportato vengono posti in petri da 60 mm contenente 10 ml di D-PBS sterile e gentamicina 50 µg/ml.

Dopo aver fatto due lavaggi con D-PBS sterile e aspirato il tampone, i frammenti vengono sminuzzati con il bisturi e trasferiti in una flask da 75 cm<sup>2</sup> (posizione orizzontale) dove vengono sequenzialmente digeriti a 37°C ( in incubatore aria + CO<sub>2</sub> 7%) da soluzioni di ialuronidasi, tripsina e collagenasi precedentemente sterilizzate per filtrazione su filtri per siringa CA 0,22µm sterili.

La digestione procede nel seguente modo :

- 1) risospensione dei frammenti in una soluzione sterile di IALURONIDASI 0,05% (4 mg/20 ml) in terreno DMEM + glutaMAX contenente gentamicina 50 µg/ml per 15'. Al termine dell'incubazione centrifugare e si aspira il surnatante.
- 2) risospensione il pellet in una soluzione sterile di TRIPSINA 0.25% (50 mg/20ml) in DMEM glutaMAX per 30'. A metà circa dell'incubazione si agita la sospensione. Al termine centrifugare e si aspira il surnatante.
- 3) risospensione ancora il pellet in una soluzione sterile di COLLAGENASI 0.20% (40 mg/20 ml) in DMEM glutaMAX per 90'. Durante l'incubazione si agita la sospensione ogni 20'.

Al termine la sospensione viene agitata vigorosamente e risospesa più volte con l'ausilio di una pipetta. L'osservazione al microscopio rivela una quasi totale digestione della matrice e poi trasferita in falcon per essere centrifugata .

Centrifugare a 600 x g per 10', lavare con D-PBS sterile contenente gentamicina 50µg/ml (20 ml), ricentrifugare e risospingere in 10 ml di DMEM glutaMAX + FCS 10% + gentamicina 50µg/ml.

Effettuare un conteggio e valutare la vitalità con il colorante trypan blu (soluz. 0,4% in fisiologica).

45 µl di sospensione cellulare + 5 µl di trypan

Diluire la sospensione con DMEM glutaMAX + FCS 10% + gentamicina 50µg/ml fino ad ottenere la concentrazione cellulare desiderata ( $1 \cdot 10^5$  cell/well).

Le cellule vengono mantenute in queste condizioni fino al raggiungimento della confluenza (circa 15 giorni), cambiando il medium ogni 2-3 giorni.

Referenza: Berenbaum, F., Thomas, G.,Poiraudau, S., Béréziat,G., Corvol, M.T., Masliah, J. (1994) FEBS Letters 340, 51-55