

## Utilizzo delle colture cellulari umane in analisi molecolari e morfologiche

### Vi serviranno:

- 3/4 pasteur in plastica monouso
- 1 cell scraper
- 1 falcon vuota da utilizzare come scarto.
- un'aliquota di cristallvioletto in eppendorf da 1,5 ml – questo reagente è nocivo sulla pelle!
- un'aliquota di RNAlater in eppendorf da 1,5 ml, marchiata con RL sul tappo
- 2 eppendorf da 2 ml vuote; marchiatele con un identificativo comprensibile del vostro gruppo - vi serviranno nelle lezioni successive, una per l'RNA, l'altra per le proteine; quindi scegliete una dicitura che distingua i due campioni
- 5ml di PBS 10X in falcon da 50ml che diluirete con ddH<sub>2</sub>O
  - ✓ 5 ml PBS 10X + 45 ml ddH<sub>2</sub>O, direttamente in falcon da 50 ml

### 1. Raccolta cellule per analisi proteica

- 1.1. Aspirare tutto il terreno di coltura con la pasteur
- 1.2. Aggiungere 1 ml di PBS con la pasteur; riaspirarlo con quest'ultima e scartarlo
- 1.3. Ripetere la procedura col PBS
- 1.4. Aggiungere 1,5 ml di PBS
- 1.5. Staccare le cellule col cell scraper – conservate lo scraper nel suo fodero
- 1.6. Aspirare gli 1,5 ml di PBS con le cellule in sospensione e portarlo su eppendorf da 2 ml
- 1.7. Centrifugare per 10 minuti a 10000g
- 1.8. Aspirare tutto il PBS sopranatante facendo attenzione a non staccare il pellet di cellule sul fondo della eppendorf; conservare a -20°C per la successiva estrazione delle proteine

CAPOVOLGERE

### 2. Raccolta cellule per raccolta RNA

- 2.1. Aspirare tutto il terreno di coltura con la pasteur
- 2.2. Aggiungere 1 ml di PBS con la pasteur; riaspirarlo con quest'ultima e scartarlo
- 2.3. Ripetere la procedura col PBS
- 2.4. Aggiungere 1 ml di RNAlater PBS
- 2.5. Staccare le cellule col cell scraper
- 2.6. Aspirare tutto l'RNAlater con le cellule in sospensione e portarlo su eppendorf da 2 ml
- 2.7. Centrifugare per 10 minuti a 10000g
- 2.8. Aspirare tutto il liquido sopranatante facendo attenzione a non staccare il pellet di cellule sul fondo della eppendorf; conservare a -20°C per la successiva estrazione degli acidi nucleici

### 3. Colorazione del tappeto cellulare

- 3.1. Aggiungere, sotto cappa chimica, 1 ml di formalina al pozzetto di cellule da colorare; lasciare agire per 20' - 30'
- 3.2. Aspirare tutto il liquido con la pasteur e scartarlo; spostarsi sul bancone
- 3.3. Aggiungere 1 ml di PBS con la pasteur; riaspirarlo con quest'ultima e scartarlo
- 3.4. Ripetere la procedura col PBS
- 3.5. Aggiungere con la pasteur tutto il cristallvioletto (1 ml) contenuto nell'aliquota fornita
- 3.6. Lasciare il colorante in posa per 30'; dopodiché aspirare e scartare il colorante
- 3.7. Aggiungere 1 ml di PBS con la pasteur; riaspirarlo con quest'ultima e scartarlo
- 3.8. Ripetere la procedura col PBS altre tre/quattro volte
- 3.9. Aggiungere 1 ml di PBS nel pozzetto colorato; ora si possono osservare al microscopio le cellule colorate