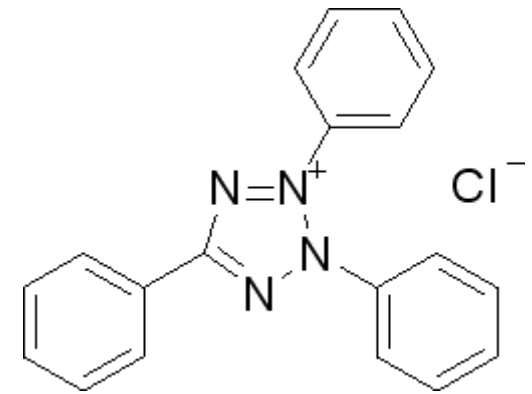


Test di vitalità cellulare servono a discriminare le cellule vive da quelle morte la percentuale di vitalità viene determinata con la formula

$$\frac{\text{numero cellule vive}}{\text{numero cellule morte}} \times 100$$

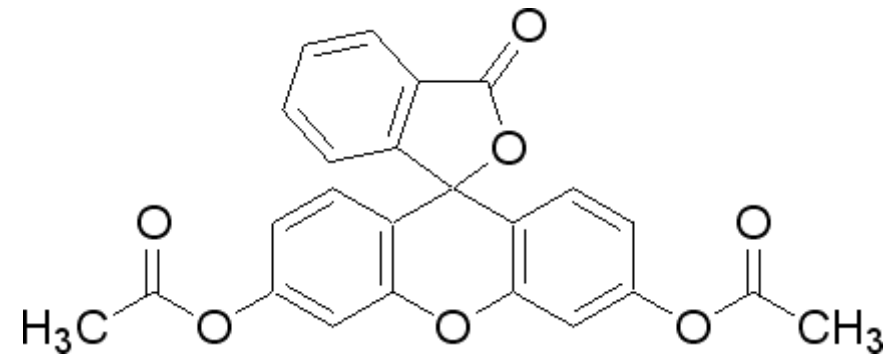
Per valutare, nell'ambito di una popolazione cellulare, la percentuale di cellule vitali si possono effettuare diversi test, ad es.:

## 1. Cloruro di Trifeniltetrazolio (TTC)



Formula di struttura del TTC

## 2. Fluoresceina diacetato (FDA)

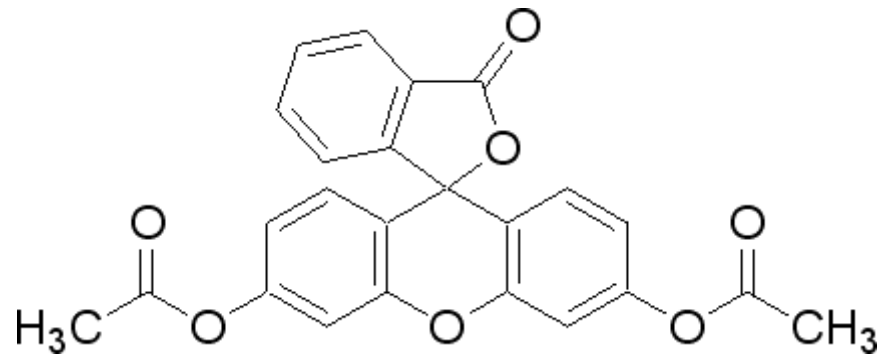


Formula di struttura della FDA

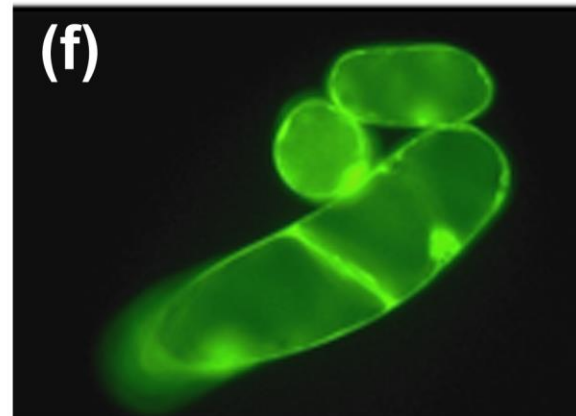
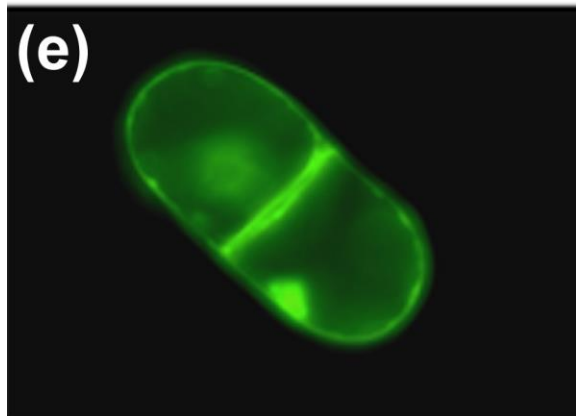
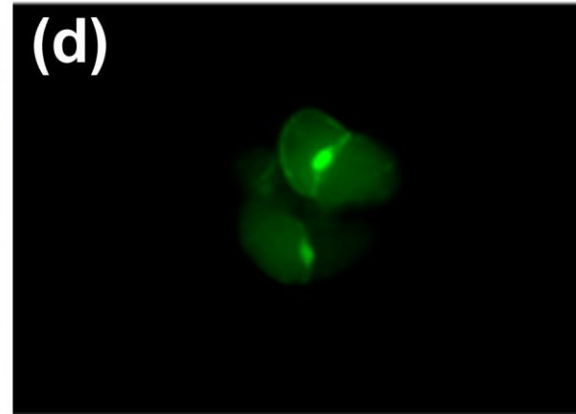
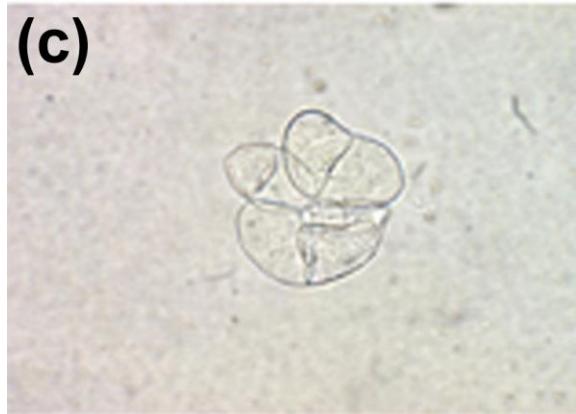
FDA è un composto non fluorescente che grazie alla sua ridotta polarità attraversa facilmente la membrana cellulare. Penetra sia nelle cellule vive che morte.

Nelle cellule vive le esterasi citoplasmatiche idrolizzano i gruppi acetilici con formazione di fluoresceina, composto con elevata polarità quindi non riattraversa la membrana e si accumula nel citoplasma. Le cellule vitali risultano autofluorescenti, emettendo luce verde quando esposti a luce blu. Le cellule non vitali non emettono fluorescenza

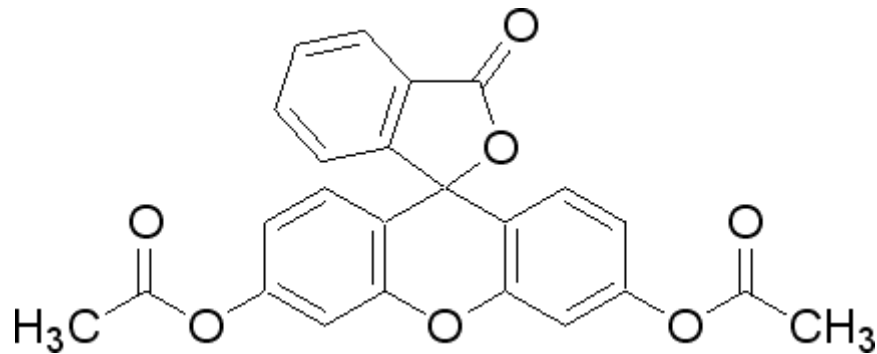
La FDA è una molecola costituita da anelli aromatici e non, condensati fra loro: un anello benzenico è unito ad un anello pentatomico, saturo, che presenta un eteroatomo di ossigeno ed un carbonio carbonilico; quest'ultimo anello è legato ad un altro composto saturo, ciclico, esatomico, con un eteroatomo di ossigeno ed infine tale anello è affiancato da due esteri aromatici di benzoato di metile.



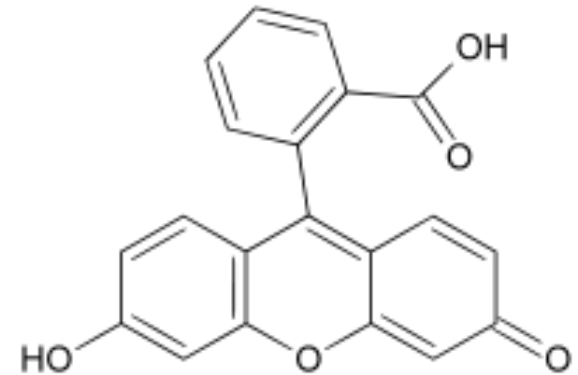
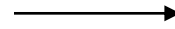
Formula di struttura della FDA



Le esterasi idrolizzano l'FDA (non fluorescente) nella fluoresceina, composto fluorescente.



FLUORESCEINA DIACETATO (FDA)  
Non fluorescente

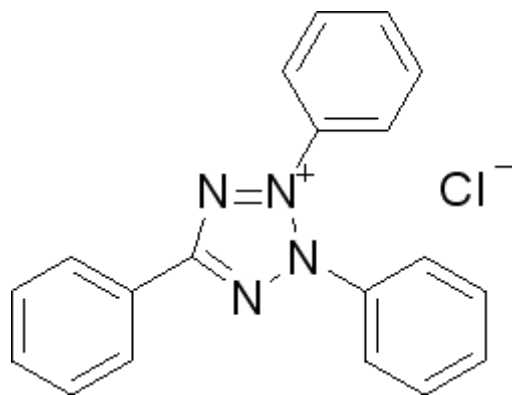


FLUORESCEINA  
Fluorescente

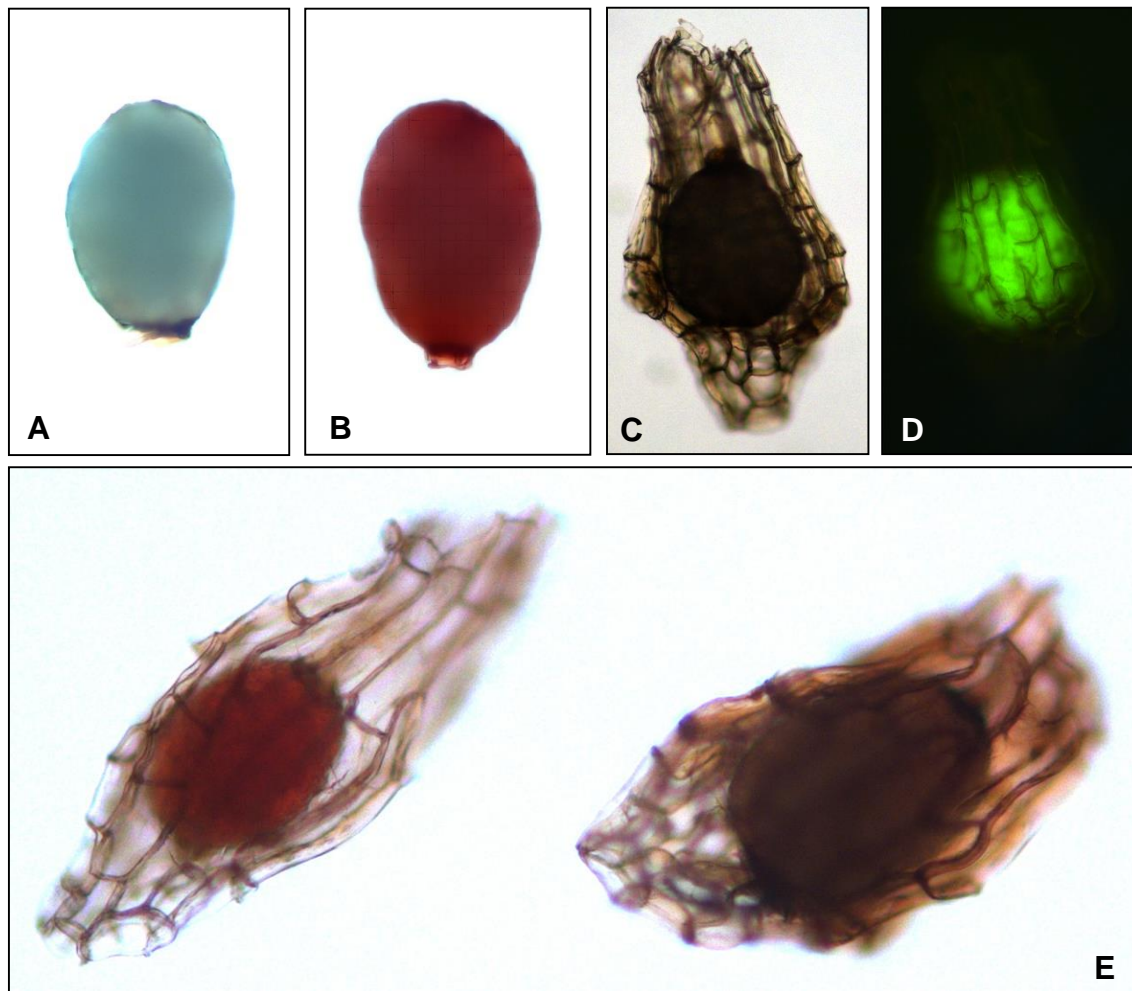
# Cloruro di trifeniltetrazolio (TTC)

In presenza di deidrogenasi avviene la riduzione del TTC da parte delle cellule, si forma un composto rosso insolubile il trifenilformazano (TF). La reazione è direttamente legata all'attività della catena respiratoria mitocondriale. Le cellule vitali assumono una colorazione dal rosa al rosso intenso.

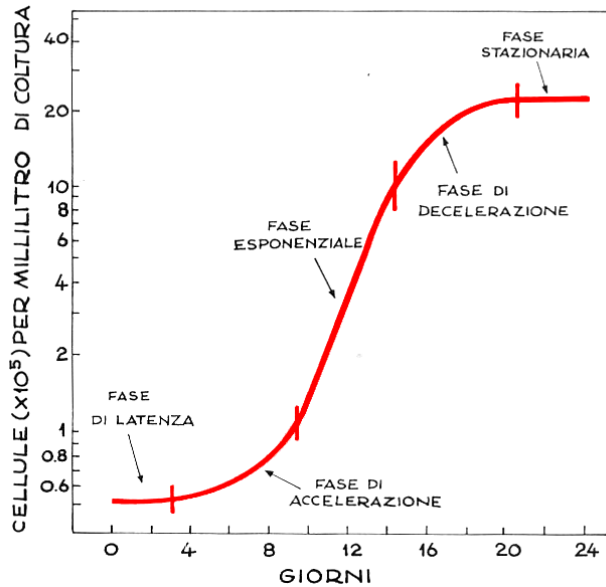
Il TTC è un sale che presenta un anello aromatico pentatomico eterociclico con quattro atomi di azoto, legato a tre anelli benzenici in posizione 2, occupata da un azoto cationico, in posizione 3, ove è presente un secondo azoto non carico ed in posizione 5, ove è presente un carbonio. La carica positiva dell'azoto 2 è bilanciata dalla presenza di uno ione cloruro.



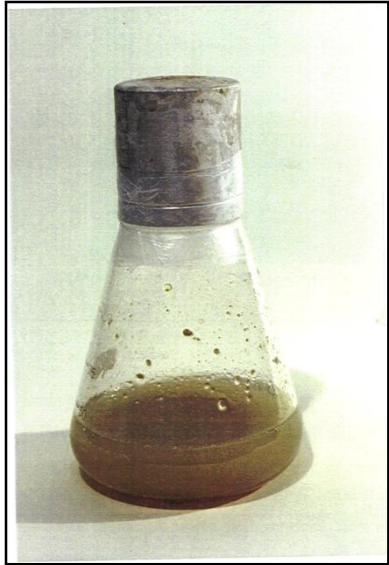
Formula di struttura del TTC



Test di vitalità con TTC (A, B, E) e con FDA (C, D), eseguiti su semi della specie *Orchis provincialis*. (A) embrione non vitale, trattato con TTC; (B) embrione vitale, trattato con TTC; (C) seme con embrione vitale, trattato con FDA ed osservato in campo chiaro; (D) stesso seme di C, osservato sotto luce blu; (E) semi con embrione vitale (a sinistra) e con embrione non vitale (a destra), entrambi trattati con TTC.



## PARAMETRI DI CRESCITA



### VITALITÀ CELLULARE

- FDA
- TTC

### CURVA DI CRESCITA

Valutazione peso fresco e peso secco

### PACKAGE CELL VOLUME (PCV)

Crescita percentuale su liquido



# Procedure di quantificazione della crescita cellulare

- La crescita di una coltura cellulare nel tempo, sia per un callo che per una crescita in sospensione è caratterizzata da un incremento in numero di cellule, o un incremento in volume o in massa:

Diversi parametri possono essere valutati per misurare la crescita:

- Peso fresco
- Peso secco
- Conta cellulare
- Volume delle cellule impaccate

# Determinazione del peso fresco

per colture cresciute in mezzo agarizzato

- Inoculare in 10 piastre petri circa 2 g di callo
- Dopo 25 giorni pesare le piastre con il callo cresciuto
- Trasferire il callo in 10 piastre con terreno rinnovato
- Pesare le piastre vuote e per differenza con le piene valutare la crescita del callo
- Ripetere dopo 25 giorni (subculture)

**In questo modo si possono confrontare terreni diversi**

# Determinazione del peso secco

Il campione verrà sacrificato

- Preparare 20 piastre petri con 2g di callo ciascuna
- Prelevare il callo da 3 piastre, seccare a 60°C per 48-72 h e pesare (peso secco iniziale)
- Il campione viene considerato secco quando il suo peso non varia più
- Dopo 25 giorni prelevare il callo da 3 piastre, seccare e pesare (peso secco finale)
- L'accrescimento in peso sarà dato dalla differenza tra il peso finale e quello iniziale

La biomassa cellulare essiccata potrebbe essere utilizzata per l'analisi dei metaboliti prodotti

# Determinazione della densità cellulare tramite conta al microscopio ottico

DENSITÀ = numero di cellule per unità di volume

- preparare una sospensione cellulare consistente di singole cellule o piccoli *clumps* in attiva divisione
- Dopo un certo intervallo di tempo, prelevare un'aliquota e separare le cellule mediante trattamento chimico (tetrossido di cromo) o enzimatico (pectinasi)
- Procedere alla conta, mediante vetrini contacellule (camera di Thoma, camera di Burker)

## CONTEGGIO DELLE CELLULE CON LA CAMERA DI BURKER

Per contare le cellule con la camera di Burkler, si agita bene la sospensione cellulare usando una pipetta di plastica sterile da 2 o 5 mL, evitando la formazione di bolle e schiuma. Quindi si prelevano circa 0.2 ml di sospensione che vengono messi in una provetta Eppendorf non sterile. A questo punto la provetta Eppendorf viene portata fuori dalla cappa sterile e le cellule vengono contate.

Per valutare la mortalità cellulare, le cellule sono colorate diluendo il campione 1:1 con una soluzione di Trypan blue allo 0.5% (p/v) in PBS. Il colorante diffonde solo nelle cellule la cui permeabilità di membrana è fortemente danneggiata, il che implica che le cellule che appariranno colorate in blue sono le cellule da considerare morte.

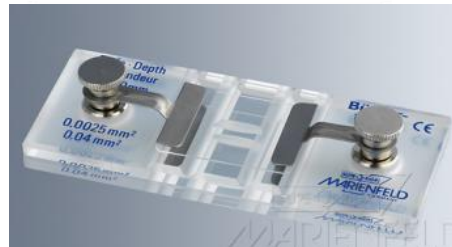
Il Trypan Blue ha un effetto tossico, quindi il colorante va aggiunto solo poco prima di effettuare la conta con il microscopio ottico.

Si deve preparare la diluizione con il Trypan Blue con precisione perché è necessario conoscere esattamente il fattore di diluizione per risalire poi alla concentrazione di cellule presente nel campione analizzato.

### PROCEDIMENTO

- Controllare che la Burkler sia pulita e montata correttamente, cercando di osservare gli anelli di Newton.
- Prelevare una piccola quantità del campione da contare e appoggiare la punta della pipetta contro il bordo del vetrino coprioggetto. Lasciare fuoriuscire una goccia del campione che per capillarità si diffonderà nella camera di Burkler.
- Contare le cellule contenute nei quadrati disposti sulle diagonali della camera e calcolare il numero medio di cellule per quadratino. La camera di Burkler ha due settori, uno in alto e uno in basso; ciascun settore è costituito da  $12 \times 12 = 144$  quadratini da  $1/250 \mu\text{L}$ . Se si contano le cellule contenute nei quadratini lungo le diagonali della camera di Burkler si contano 48 quadratini, ovvero 24 quadratini per ciascun settore.

1													13
	2												14
		3										15	
			4								16		
				5						17			
					6	18							
					19	7							
				20			8						
					21					9			
					22						10		
						23						11	
24													12



Schema di un settore della camera di Burkler

- Sapendo che ogni quadratino corrisponde ad  $1/250$  di  $\mu\text{L}$  e che si sono diluite le cellule 2 volte con il Trypan Blue, il n. medio di cellule per quadrato (N) va moltiplicato per 250 (in modo da avere le cellule in  $1 \mu\text{L}$  nella sospensione diluita con il colorante), per due (per avere le cellule per  $\mu\text{L}$  della sospensione originale) ed infine per mille in modo da ottenere le cellule in  $1 \text{ mL}$  della sospensione originale.

$$\text{Numero di cellule in 1 mL} = N/48 \times 250 \times 2 \times 1000$$

dove:

N è il numero di cellule che si contano all'interno dei quadrati lungo le 4 diagonali della camera di Burkler

48 sono i quadrati che costituiscono le 4 diagonali della camera di Burkler

250 è il fattore che considera il volume di ciascun quadratino della camera di Burkler

2 è il fattore di diluizione (dipende dal volume di Trypan Blue aggiunto)

1000 è il fattore di conversione da  $\mu\text{L}$  a mL.

Se si vuole calcolare il numero di cellule totali contenute nella fiasca si moltiplica il numero di cellule in  $1 \text{ mL}$  per il volume totale della sospensione cellulare in mL.

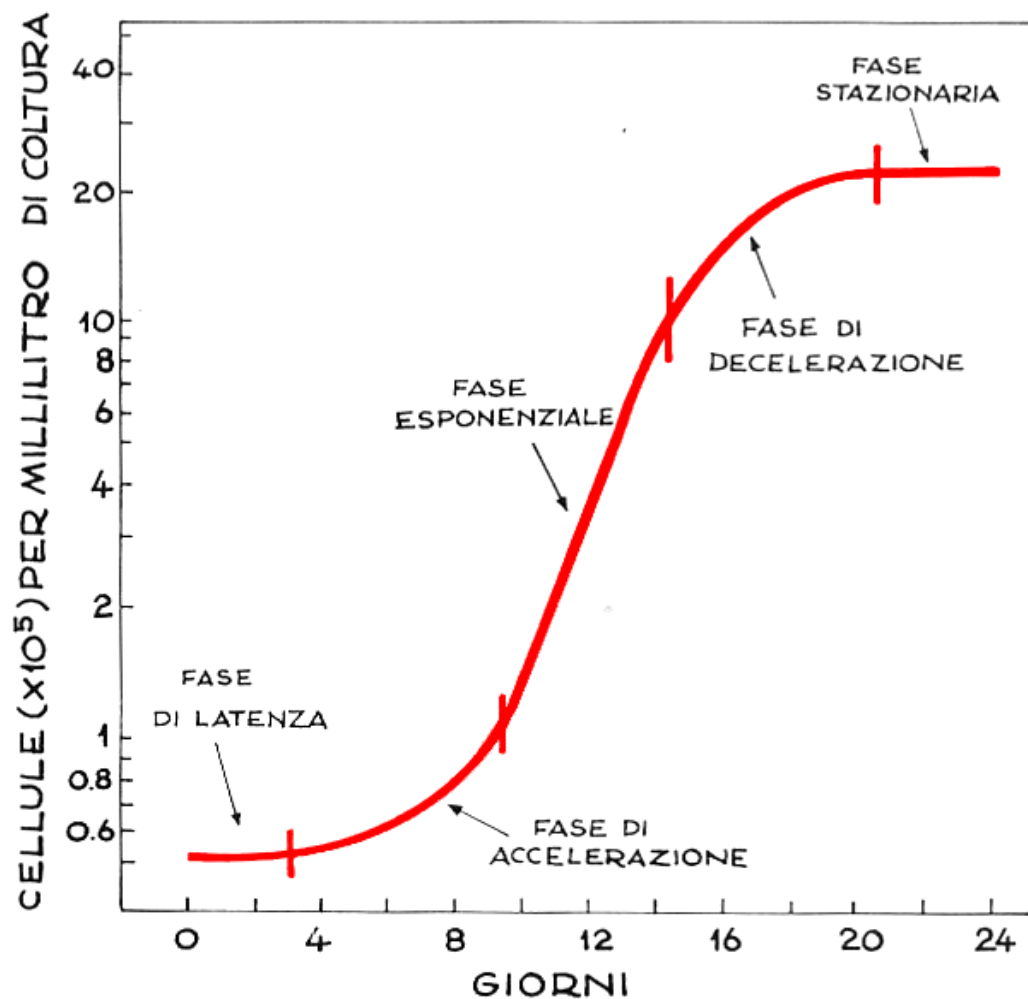
# Determinazione della crescita mediante misura dell'impaccato cellulare (PCV) su un volume noto

Per colture cellulari in sospensione

- Prima di rilevare il peso è necessario separare le cellule dal mezzo colturale
- Trasferire un volume noto di una sospensione cellulare in un tubo conico da centrifuga
- Centrifugare a 1.000 rpm per 3-5 min
- Leggere il volume occupato dalle cellule impaccate sul volume totale
- Fare più repliche



# Colture cellulari



Per valutare la crescita della popolazione cellulare nel tempo (incremento di **biomassa**) si costruisce una curva di crescita