

Divisione della coltura

Le cellule devono essere divise e ripiastrate ad intervalli regolari per permettere loro di crescere. Le cellule **normali** si bloccano a *confluenza (inibizione da contatto)*, le cellule tumorali meno, ma se crescono impilate le cellule sottostanti avranno problemi di cibo e scambi gassosi.

Le cellule non possono neppure essere seminate troppo diluite, perché non crescono.

- Ogni cellula ha le sue caratteristiche specifiche, riportate anche dalle schede delle banche cellulari

HL-60	<i>leukemia, promyelocytic</i>
Race: Caucasian female 36 years old Tumorigenic in nude mice Grown as suspension, lymphoblast-like morphology Karyology: 2n = 46; pseudodiploid Susceptibility to viruses: HIV-1 * HTLV-1 Function, products, applications: phagocytosis * pharmacodynamics * differentiation * cloning * antitumour testing Bibliography: Blood 1979, 54:713-733 Nature 1977, 270:347-349 Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 1978, 75:2458-2462	
Availability:	
- ATCC (CCL 240)	
- DSM (ACC 3) C: RP01 F: CM06 mycoplasma negative, DAPI and broth-agar Validated by immunological analysis (CD3- CD13+ CD14- CD15+ CD19- CD33+ HLA-DR-) * DNA fingerprinting (unique Hinf I- (gtg)5 DNA profile) * cytogenetics (hypotetraploid: 78 (40-88)) * reverse transcriptase (not detected (RDDP assay)) Maintain at 1-5 x 10 ⁵ cells/ml, grows to 1-2 x 10 ⁶ cell/ml; freeze at 5 x 10 ⁶ cells/ampoule. Responsive to DMSO and TPA and other reagents; cells carry amplified c-myc gene.	
- ECACC (88112501) C: RP30 F: AM07 mycoplasma negative, HOECHST and culture Validated by isoenzymes (species confirmation) Maintain between 1-5 x 10 ⁵ cells/ml. Maintain at a low density or they may differentiate.	
- IZSBS (BS TCL25) C: RP08 8% CO ₂ F: CM01 mycoplasma negative, culture	
- ANIR	
- BOHIC C: RP08 Split 1:6 F: CM01 mycoplasma negative, DAPI and HOECHST Validated by B cell markers Split every 3-4 days	
- PDUON C: RP05 Split 1:5 F: RP01	
- PNIOS C: RP01 F: RP01 Passage 510	

Saos-2

Designations: Saos-2 **Depositors:** J Fogh, G Trempe

Biosafety Level: 1

Properties: adherent

Organism: *Homo sapiens* (human) **Morphology:** epithelial

Source: **Organ:** bone **Disease:** osteosarcoma

Age: 11 years **Gender:** female

Ethnicity: Caucasian

Comments: This is one of an extensive series of human tumor lines isolated and characterized by J. Fogh and G. Trempe.

Applications: transfection host (technology from amaxa Roche FuGENE® Transfection Reagents)

Receptors: epidermal growth factor (EGF); transforming growth factor beta (type1 and type 2)

Cytogenetic

Analysis:

The stemline chromosome number is hypotriploid with the modal number of 56 chromosomes per cell and the 2S component occurring at 13.2%. Over two-thirds of the chromosome complement consisted of structurally rearranged chromosomes., Most marker chromosomes had complex rearrangements. The origin of the segments composing these markers could not be identified. Of the identifiable markers, 6p+/q+, 7p+, 11p+, and 12p+ occasionally were present at 2 copies per cell., The Y chromosome was not detected in the QM stained preparation.

Propagation:

ATCC complete growth medium: The base medium for this cell line is ATCC-formulated McCoy's 5a Medium Modified, Catalog No. 30-2007.

To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: fetal bovine serum to a final concentration of 15%.

Atmosphere: air, 95%; carbon dioxide (CO₂), 5%

Temperature: 37.0°C

Subculturing:

Subcultivation Ratio: A subcultivation ratio of 1:2 to 1:4 is recommended

Remove medium, and rinse with 0.25% trypsin, 0.03% EDTA solution.

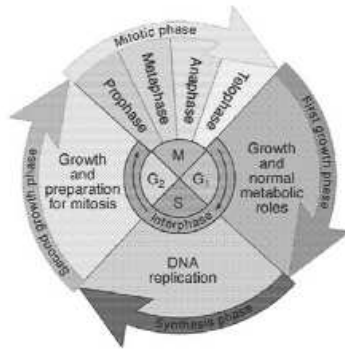
Remove the solution and add an additional 1 to 2 ml of trypsin-EDTA solution. Allow the flask to sit at room temperature (or at 37C) until the cells detach. Add fresh culture medium, aspirate and dispense into new culture flasks.

Medium Renewal: 1 to 2 times per week

Preservation: Culture medium, 95%; DMSO, 5%

Proliferazione cellulare

CICLO CELLULARE



Il ciclo cellulare è un 'ordinata serie di eventi che determinano la crescita della cellula e la sua divisione in due cellule figlie.

Le fasi sono:

- G₁
- S
- G₂
- M.

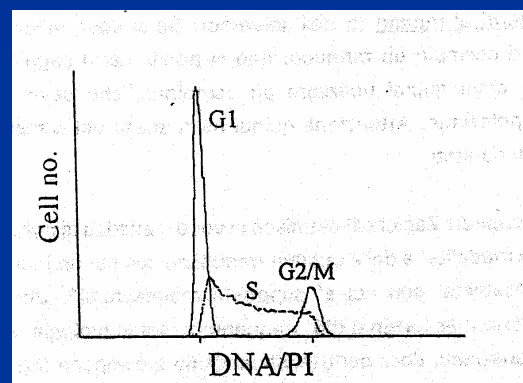
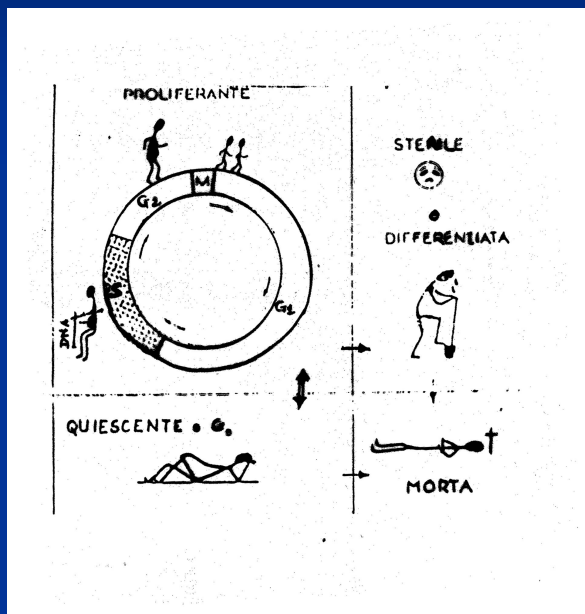
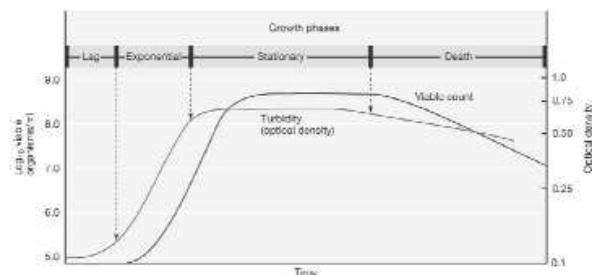


Tabella 22.2 Durata delle fasi del ciclo cellulare

Tipo di cellula	Tempo in ore			
	Ciclo totale	G1	S	G2 + Mitosi
<i>Cellule in coltura</i>				
Cellule di polmone di criceto cinese	10	1,5	6,0	2,5
Cellule di ovaio di criceto cinese	14	5,5	4,5	4,0
Fibroblasti di topo	18	8,0	6,0	4,0
Fibroblasti diploidi umani	18	6,5	7,5	4,0
Cellule amniotiche umane	19,5	9,5	7,0	3,0
<i>Cellule somatiche umane</i>				
Cellule del midollo osseo	18	2	12	4
Cellule dell'epitelio gastrico	24	9	12	3
Cellule epiteliali del colon	25	9	14	2
Cellule epiteliali del retto	48	33	10	5
<i>Cellule somatiche di topo</i>				
Cellule della cripta dell'ileo	10,1	1,8	6,9	1,4
Epitelio duodenale	10,3	1,3	7,5	1,5
Follicoli piliferi in crescita	12	3	7	2
Epitelio del colon	19	9	8	2
Ghiandola mammaria, alveoli	71	45	22	4
Le stesse, dopo stimolo ormonale	13	1,3	9,2	2,5

CINETICA DI CRESCITA



- Fase di latenza:** le cellule si riprendono dalla shock della subcoltura. Aumento dell'attività cellulare, ma, assenza di crescita.
- Fase esponenziale:** aumento esponenziale del numero di cellule ed elevata attività metabolica
- Fase stazionaria:** nessun incremento della crescita per accumulo di prodotti tossici, mancanza di sostanze nutritive, limitazione dello spazio di crescita.
- Fase di declino:** decadimento e morte (se non si procede ad una subcoltura)

Per le colture secondarie le fasi esponenziale e stazionaria sono più lunghe rispetto alle primarie.

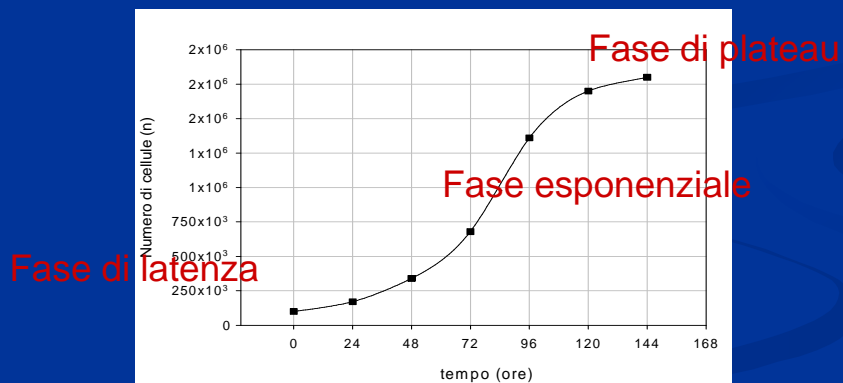
Curva di crescita

Per conoscere le caratteristiche ottimali di crescita di una certa linea e per valutare gli effetti di farmaci, inquinanti ecc.ecc. il test più importante è la curva di crescita delle nostre cellule: si contano accuratamente e si seminano almeno 3 fiasche per ogni giorno in cui si conteranno (di solito da 5 giorni – se si e' fortunati) a 8 o più.

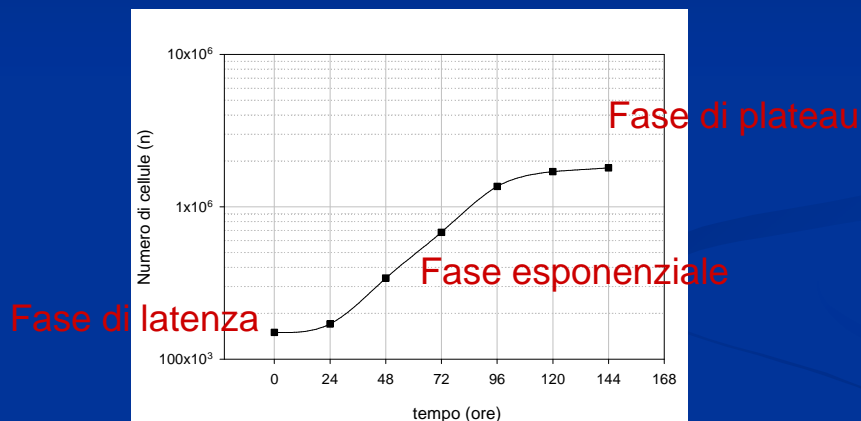
Tutti i giorni si prelevano le cellule e si contano. E' **obbligatorio riportare l'ora del prelievo e del conteggio**, perché verranno poi messi in grafico il numero di cellule totali o per mL o per cm^2 a seconda di quello che ci interessa, in funzione del tempo.

	Tempo in ore						
	0	24	48	72	96	120	144
n. cellule	150×10^3	170×10^3	340×10^3	680×10^3	136×10^4	190×10^4	210×10^4
Log n.cellule	5,18	5,23	5,53	5,83	6,13	6,28	6,32

Se riportiamo i dati in grafico otteniamo la seguente curva:



Che si rettifica se riportata in scala logaritmica:



Calcolo del tempo di duplicazione

E' caratteristico della linea e delle condizioni di coltura. Va calcolato nella fase esponenziale. Puo' essere ricavato graficamente dai grafici in scala logaritmica, ma e' piu' preciso calcolato matematicamente.

Al tempo t_0 avremo N_0 cellule. Ogni volta che le contiamo, segniamo l'ora e possiamo così calcolare l'intervallo di tempo intercorso tra le conte. Una popolazione cellulare si duplica ogni tot ore, cioè cresce secondo la legge:

$$N = N_0 2^z$$

$$N = N_0 2^z$$

ovvero

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

Cioè

$$z = (\log N - \log N_0) / \log 2$$

z è il numero di generazioni.

Se T è il **tempo medio di generazione** e t il tempo che la popolazione impiega per crescere esponenzialmente da n_0 a n , allora:

$$z = t/T$$

e quindi sostituendo nella equazione precedente:

■

$$t/T = (\log N - \log N_0) / \log 2$$

da cui

$$T/t = \log 2 / (\log N - \log N_0)$$

e

$$T = t \log 2 / (\log N - \log N_0)$$

Anche la durata della fase di latenza e la densita' a cui si arriva alla fase di plateu sono fortemente influenzate da cambiamenti ambientali, o dai trattamenti.