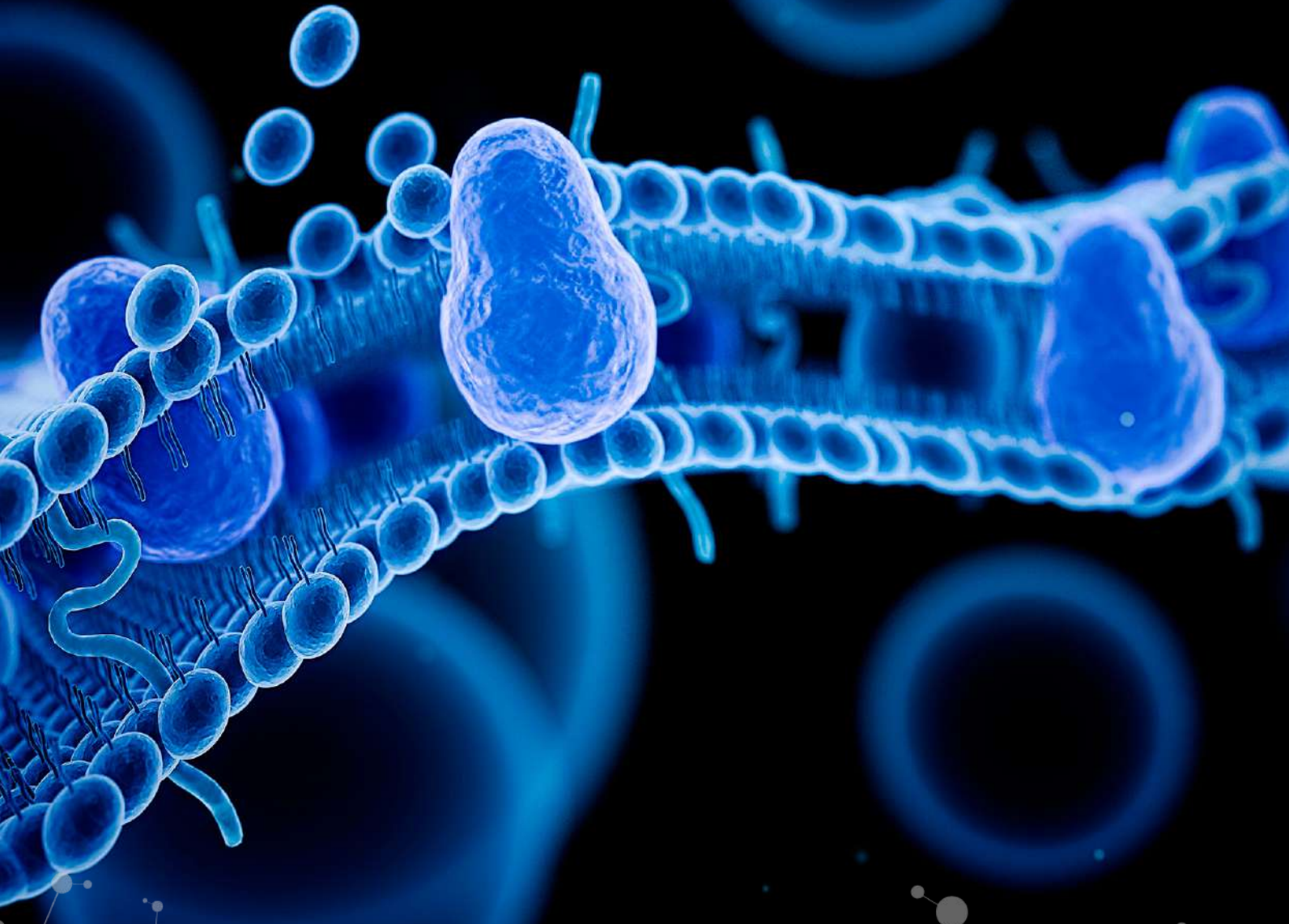


WORKFLOW

CELLULARE



SOLUZIONI PER IL LABORATORIO
DALLA PREPARAZIONE ALLO STOCCAGGIO

WORKFLOW CELLULARE

SOLUZIONI DALLA PREPARAZIONE ALLA CONSERVAZIONE

Le colture cellulari vengono utilizzate nella ricerca come modello sperimentale in innumerevoli tipi di esperimenti. Svolgono un ruolo fondamentale in diverse applicazioni:



- analisi dell'effetto dei farmaci
- verifica della mutagenicità e cancerogenicità delle sostanze
- studio dell'espressione genica
- produzione di OGM, organismi geneticamente modificati
- produzione di anticorpi monoclonali
- produzione proteine ricombinanti
- produzione vaccini
- studio della risposta immunitaria
- studio dei processi di base delle cellule (replicazione, morte cellulare programmata, necrosi, produzione di energia, duplicazione del DNA)

IL WORKFLOW IN LABORATORIO

L'obiettivo è avere una coltura cellulare che sia adeguata per il numero di cellule e per la qualità delle cellule stesse. È necessario effettuare tutti i passaggi di coltura, preparazione e conservazione, in un ambiente che rispetti determinate condizioni di crescita, in modo da poter effettuare le successive analisi del campione senza avere incognite riguardo alla qualità del campione analizzato.

1. PREPARAZIONE



2. COLTURA E CRESCITA



3. SEPARAZIONE E RACCOLTA



5. CONSERVAZIONE



4. ANALISI



FASE 1: PREPARAZIONE

EVITA LE CONTAMINAZIONI



Preparare una coltura cellulare significa partire da una criovials, che contiene le cellule di interesse da coltivare, da un organismo o da un organo e mettere in atto una serie di lavorazioni per espandere e crescere nel miglior modo possibile le cellule. *Perché è importante la preparazione cellulare?*

L'obiettivo della separazione delle cellule è isolare il maggior numero possibile di cellule vitali e desiderate da una miscela eterogenea; un campione di partenza pulito fornirà risultati più accurati su tutta la linea.

Eventuali contaminazioni del campione possono distorcere i risultati sperimentali e talvolta annullare l'intera procedura. E' quindi fondamentale eseguire le fasi di preparazione del campione nel modo migliore possibile.

STRUMENTAZIONE E ACCESSORI

COSA SERVE PER UN RISULTATO OTTIMALE



1



2



3



4



5



6



7



8

CAPPE A FLUSSO LAMINARE

1

- manipolazione sterile delle cellule coltivate in vitro
- ambiente di lavoro pulito per le cellule
- operatore protetto dagli aerosol
- provviste di filtri HEPA

AGITATORI MAGNETICI E VORTEX

2

- sospensione delle cellule
- miscela dei reagenti di un test
- miscela di un campione sperimentale e un diluente

3 SHAKER ORBITALI

- agitazione e miscelazione

4 BAGNI RISCALDANTI AD ACQUA

- scongelamento delle criovials contenenti le cellule di interesse

5 CENTRIFUGHE

- raccolta del campione

6 AUTOCLAVI

- sterilizzazione di soluzioni, brodi di coltura per batteri, puntali etc

7 SISTEMI PER LA PRODUZIONE DELL'ACQUA

- produzione di acqua di tipo 1 e 2 per le soluzioni necessarie in laboratorio

8 PIPETTE E PIPETTATORI

- sterili e monouso
- manipolazione, aliquotazione e trasferimento dei diversi volumi di campione da un supporto a un altro

FASE 2: COLTURA E CRESCITA

ASSICURA LE CONDIZIONI DI CRESCITA OTTIMALI



Per colture cellulari si intende la crescita e la proliferazione di cellule, eucariotiche o procariotiche, in ambienti controllati, con appositi nutrienti. Si parla quindi di colture di cellule vegetali, animali, o, ad esempio, di cellule staminali. Tali cellule, però, non sono adatte a una vita autonoma e la loro sopravvivenza dipende dalla disponibilità di un numero elevato di sostanze (zuccheri, aminoacidi, lipidi, vitamine, ecc.) che non sono in grado di procurarsi da sole. Inoltre, le cellule sono molto sensibili a parametri chimico-fisici dell'ambiente in cui si trovano: pH, concentrazione di anidride carbonica, temperatura, concentrazione di ossigeno e, in molti casi, la presenza di un substrato adeguato. Le tipiche condizioni di coltura sono ottenute mantenendo le cellule in contenitori di plastica opportunamente trattata (es. *flask* e piastre da coltura), immerse in appropriati terreni di coltura - liquidi che contengono disciolte le quantità appropriate delle sostanze necessarie - all'interno di incubatori che sono in grado di mantenere controllata la temperatura, la CO_2 , l' O_2 e % umidità.

STRUMENTAZIONE E ACCESSORI COSA SERVE PER UN RISULTATO OTTIMALE



1 CAPPE A FLUSSO LAMINARE

2 BAGNI RISCALDANTI AD ACQUA

- riscaldamento terreni di coltura

3 CENTRIFUGHE

- raccolta del campione

4 INCUBATORI A CO_2

- coltivazione delle cellule di mammifero

5 INCUBATORI MICROBIOLOGICI

- coltivazione delle cellule batteriche statiche
- dotazione opzionale di sistema di refrigerazione

6 PIPETTE E PIPETTATORI

7 INCUBATORI CON AGITAZIONE

- coltivazione colture batteriche o di cellule di insetto

8 ISOLATORI

- manipolazione campioni di ricerca in ambiente sterile

FASE 3: SEPARAZIONE E RACCOLTA

ISOLA LE SINGOLE CELLULE



Il processo di coltura delle cellule prevede l'introduzione di una popolazione ospite in un mezzo di crescita, consentendo alla popolazione di riprodursi rapidamente in un ambiente ricco di nutrienti. Dopo che un numero sufficiente di cellule si è generato per soddisfare i requisiti necessari, quelle stesse cellule devono essere rimosse dal mezzo di coltura cellulare.

Le cellule necessitano quindi di essere **separate** mediante filtrazione, o meglio, centrifugazione. Questo processo di isolamento delle cellule da un mezzo di crescita è chiamato **raccolta cellulare**.

STRUMENTAZIONE E ACCESSORI

COSA SERVE PER UN RISULTATO OTTIMALE

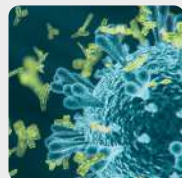
Le centrifughe sono utilizzate nel cosiddetto procedimento "downstream" del workflow cellulare, ovvero quella parte del processo che contempla il **processamento delle cellule** ottenute così da garantire la **purezza e la qualità** necessarie. Tipicamente si suddivide in più parti: *separazione e raccolta della biomassa*, *separazione/purificazione delle cellule dai "detriti"* e *rifinitura*. Esistono diverse applicazioni:



Vaccini a base di mRNA



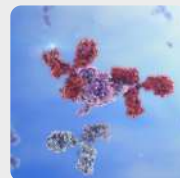
Terapie cellulari



Anticorpi monoclonali



Vaccini virali da uova



Espressione proteica



Terapie geniche



1



2



3



4



5



6

1 CAPPE A FLUSSO LAMINARE

CENTRIFUGHE DA BANCO

- preparazione di campioni in coltura cellulare, per protocolli di chimica clinica e per la centrifugazione di micropiastre

3 SUPERCENTRIFUGHE

- centrifughe da pavimento ad alta capacità, in grado di processare fino a 4 o 6 litri

CENTRIFUGHE DA BIOPROCESSO

- sviluppo e implementazione di metodi di bioprocesso di raccolta, separazione e purificazione ad alta qualità che richiedono riproducibilità e tracciabilità corsa dopo corsa

5 ULTRACENTRIFUGHE

- raggiungimento di elevatissimi valori di accelerazione di gravità
- separazione, preparazione e purificazione dei campioni

6 PIPETTE E PIPETTATORI

FASE 4: ANALISI

SU CELLULE VIVE E IN TEMPO REALE

In questa fase, sono compresi strumenti utilizzati per ottenere dati sulla conta cellulare, sulla vitalità per la caratterizzazione della salute cellulare e quelli che eseguono analisi e schermate cellulari specifiche con imaging cellulare avanzato e raccolta di dati in tempo reale. Numerosi possono essere i processi cellulari oggetto di studio e analisi, tra cui l'attivazione cellulare, la proliferazione, la differenziazione, la morte cellulare e la progressione di una malattia.

I sistemi di analisi, in linea generale, consentono la misurazione di numerosi parametri e funzioni metaboliche utilizzando cellule vive e in tempo reale, consentendo ai ricercatori di valutare, ad esempio, il dispendio energetico, l'utilizzo del substrato e la funzione mitocondriale. Le linee cellulari tipicamente oggetto di studio possono essere cellule primarie, linee cellulari aderenti e in sospensione, mitocondri isolati, colture 3D, embrioni di Zebrafish, C. elegans, lieviti e molti altri materiali biologici. Le classiche aree di ricerca possono essere: tumori, obesità, diabete, disturbi metabolici, immunologia, cardiovascolare, neurobiologia, virologia e molto altro ancora.

STRUMENTAZIONE E ACCESSORI

COSA SERVE PER UN RISULTATO OTTIMALE

Le colture cellulari che risultano essere idonee possono essere utilizzate per esperimenti, effettuati utilizzando diverse tecniche, quali Test ELISA, Western Blot, Immunoprecipitazione, Immunofluorescenza, Analisi Citofluorimetriche, analisi di Biologia Molecolare, etc.



1 LAVATORI DI MICROPIASTRE

- automazione e ottimizzazione della riproducibilità delle diverse fasi di lavaggio
- a strip o a piastra completa

2 LETTORI MULTI-MODE

- Gestione delle letture in
- assorbanza
 - fluorescenza
 - luminescenza

3 ANALIZZATORI DEL METABOLISMO CELLULARE

- analisi in tempo reale del processo metabolico delle cellule in vivo
- misurazione consumo di ossigeno
- misurazione acidificazione cellulare

4 DISPENSATORI DI MICROPIASTRE

- dispensazione di campioni/reattivi

5 SISTEMI DI IMAGING

- ottenimento di immagini delle cellule in tempo reale

6 LETTORI SINGLE MODE

- coltivazione delle cellule batteriche statiche

7 CITOFUORIMETRI

- rilevazione, identificazione e conteggio di specifiche cellule/particelle all'interno di una popolazione cellulare/sospensione di materiale biologico
- identificazione strutture intracellulari
- studio dei processi biologici, sia fisiologici che patologici

FASE 5: CONSERVAZIONE

CRIOCONSERVAZIONE E CONGELAMENTO



Lo scopo della crioconservazione o congelamento cellulare è quello di consentire la **conservazione di scorte di cellule** per evitare la necessità di avere tutte le linee cellulari in coltura in ogni momento. È un passaggio di **inestimabile valore**, soprattutto quando si tratta di cellule di durata limitata.

Gli altri principali vantaggi della crioconservazione sono il ridotto rischio di **contaminazione microbica**, di contaminazione incrociata con altre linee cellulari, di deriva genetica e cambiamenti morfologici e altri ancora. Sebbene i requisiti possano variare tra le linee cellulari, come guida generale le cellule dovrebbero essere raffreddate a una **velocità compresa tra $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ al minuto** e scongelate rapidamente mediante incubazione in un bagnomaria a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 3-5 minuti. Se vengono seguiti questi punti, con la giusta tecnologia a supporto, la maggior parte delle linee cellulari dovrebbe essere crioconservata con successo.

STRUMENTAZIONE E ACCESSORI

COSA SERVE PER UN RISULTATO OTTIMALE



1



2



3



4



5



6

FRIGORIFERI $+4^{\circ}\text{C}$

CONGELATORI -20°C , -30°C , -35°C , -40°C

FRIGOCONGELATORI $+4^{\circ}\text{C}$, -20°C

- conservazione di reagenti, terreni di coltura, DNA, vaccini, farmaci, etc.

ULTRACONGELATORI $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

- conservazione a lungo termine di DNA, RNA, ceppi batterici, vaccini, etc.

CONGELATORI MECCANICI -150°C

- stoccaggio a bassissime temperature, in alternativa allo stoccaggio in azoto liquido, di linee cellulari e materiale sensibile

CONGELATORI A DISCESA PROGRAMMATA

- preparazione dei campioni cellulari prima della conservazione criogenica, garantisce la massima vitalità delle cellule, secondo procedure standardizzate e ripetibili

CONTENITORI DI AZOTO

- sistemi di stoccaggio in vapori d'azoto per conservazione a lungo termine delle cellule.
- disponibili in diverse capacità, a riempimento manuale o automatico

SISTEMI DI MONITORAGGIO SP4LOG

- monitoraggio 24/7 di temperatura e altre grandezze chimico-fisiche
- tecnologia LoRaWAN



AHSI SpA

Viale delle Industrie, 33
20881 Bernareggio (MB)

Tel: +39 039 68 27 1 - info@ahsi.it - ahsi@pec.it -

www.ahsi.it



SOLUZIONI PER IL **WORKFLOW CELLULARE**
DALLA PREPARAZIONE ALLA CONSERVAZIONE

