

CORSO DI TECNICHE DI MICROSCOPIA E COLTURE CELLULARI

Il corso di "Tecniche di microscopia e colture cellulari" (curriculum Biologia Molecolare e cellulare) è costituito da 3 CFU di lezioni frontali comprensive di esercitazioni in aula e ricapitolazioni e 1 CFU di esercitazioni di laboratorio.

CONOSCENZE:

Conoscenze teorico-pratiche relative alle tecniche di microscopia, al rilevamento e all'elaborazione delle immagini microscopiche. Metodiche di colture cellulari.

CAPACITA'

Utilizzo delle varie modalità di osservazione in microscopia e relativo allestimento di preparati biologici. Allestimento di colture di cellule aderenti o in sospensione. Linee cellulari. Separazione di cellule, criopreservazione.

Analisi biologiche e biomediche

COMPORAMENTI

Valutazione, interpretazione di dati sperimentali di laboratorio, sicurezza in laboratorio, valutazione della didattica; principi di deontologia professionale e approccio scientifico alle problematiche bioetiche.

PROPEDEUTICITA'

Si consiglia sia preceduto da Citologia ed Istologia e Laboratorio

PROGRAMMA

NOTIZIE STORICHE

Microscopia ottica

Microscopia Ottica

Principi di Funzionamento del Microscopio Ottico

Microscopia in campo chiaro: Il microscopio ottico per luce trasmessa - L'ottica del microscopio -Potere di risoluzione -Apertura numerica -Le aberrazioni -Gli obiettivi all'infinito - L'illuminazione secondo Köhler

Microscopia di cellule in vivo: campo scuro -contrasto di fase -contrasto interferenziale

Microscopia in fluorescenza: Epifluorescenza – Fluorocromi - Microscopia confocale a scansione laser.

Allestimento di preparati in fluorescenza: Anticorpi policlonali e monoclonali; Immunofluorescenza diretta e indiretta; Lectine fluorescenti e glicobiologia; Marcatura in fluorescenza di cellule in vivo; Concetti di specificità e aspecificità della marcatura; Metodi di bloccaggio della marcatura aspecifica; Decadimento dei fluorocromi; Indicatori fluorescenti per lo studio dinamico di fenomeni cellulari in vivo mediante microscopia a intervalli di tempo (time lapse). Separazione di tipi cellulari marcati con fluorocromi: FACS (fluorescence activated cell sorter).

Analisi delle Immagini

Cenni sull'analisi computerizzata delle immagini e relative applicazioni.

Tecniche di Coltura Cellulare

Colture Cellulari e Biologia delle Cellule in Coltura

Applicazioni delle colture cellulari; Tipi di colture: coltura di tessuti, organi, cellule; Vantaggi e svantaggi delle colture; Isolamento dei tessuti; Disaggregazione enzimatica; Disaggregazione meccanica. L'ambiente cellulare: adesione cellulare; molecole che intervengono nell'adesione cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare – Basi cellulari del differenziamento-Basi cellulari sul ciclo cellulare e la senescenza - Fasi iniziali delle colture cellulari -Evoluzione delle linee cellulari – Mantenimento del differenziamento delle cellule in coltura-Proliferazione e senescenza delle cellule in coltura; Colture primarie ancoraggio-dipendenti: adesione, proliferazione, raggiungimento della confluenza; allestimento di subculture per tripsinizzazione, conta cellulare e inoculo in subcultura.

Equipaggiamento e Materiali per Colture Cellulari

Requisiti dei laboratori di coltura dei tessuti: attrezzature essenziali -Cappa a flusso laminare - Incubatore a CO₂ -Purificazione dell'acqua -Attrezzature Utili -Camera di conta cellulare -Trattamento della sterilità -Cappe a flusso laminare -Procedure standard -Operare con la cappa a flusso laminare - Operare sul banco –

I contenitori per le colture e per i mezzi di coltura; Scelta dei supporti; Le superfici di crescita e trattamenti per migliorare la adesione e il differenziamento.

Mezzi di Coltura

Sviluppo dei mezzi; Proprietà chimico-fisiche; Soluzioni saline bilanciate; Mezzi semplici e mezzi complessi; Antibiotici e antimicotici; L'uso del siero nei mezzi di coltura: principali componenti e azioni del siero. Selezione dei mezzi e dei sieri: Tests di efficienza della piastratura e di citotossicità per l'immissione di nuovi lotti di mezzi e sieri nel laboratorio per colture. Mezzi senza siero e mezzi selettivi

Colture Primarie e Subcolture

Prelievo-Tipi di colture cellulari primarie: coltura di tessuti, d'organo e coltura di cellule - Colture primarie dipendenti dall'ancoraggio o in sospensione - Tripsinizzazione e subcolture - Conta delle cellule - Controllo della vitalità cellulare; Linee cellulari: finite, continue, trasformate.

Clonazione

Clonazione e isolamento dei cloni da monostrati o da cellule in sospensione -Mezzi condizionati - Monostrati cellulari nutritivi (feeder layers)

Separazione delle Cellule

Metodi che sfruttano differenze di densità tra le cellule. Metodi con anticorpi: separazione magnetica o per fluorescenza (MACS e FACS)

Criopreservazione

Necessità Della Criopreservazione - Basi Per Il Congelamento - Preservazione.

Tecniche di Coltura Speciali

Cellule staminali embrionali o da tessuti adulti: Tipi ed origine -Potenzialità e limiti -Isolamento e coltura-Differenziamento in vitro; Applicazioni terapeutiche

MATERIALE DIDATTICO UTILIZZATO E CONSIGLIATO

-Scala C, Pasquinelli G, Cenacchi G -**Microscopie in biologia e medicina**- CLUEB 1995

-R I Freshney- Culture of animal cells: **A manual of basic techniques**-Wiley-Liss 2000

-Roberto Gualtieri: Presentazioni powerpoint delle lezioni del corso. (vanno corredate con il testo derivante dalle registrazioni effettuate dagli studenti)

MODALITA' VERIFICA E VALUTAZIONE DELL'APPRENDIMENTO

Prova scritta preliminare all'esame orale.

La commissione d'esame, nominata dal CCS accerterà e valuterà collegialmente la preparazione dello studente attribuendo il voto finale sulla base di un adeguato numero di prove e di verifiche. La frequenza assidua e la partecipazione alle attività in aula e laboratorio sono considerati elementi positivi di valutazione.

COMPOSIZIONE DELLA COMMISSIONE PER LA VERIFICA DELL'APPRENDIMENTO

1° gruppo: Roberto Gualtieri (Presidente), Riccardo Talevi, Francesco Angelini, Gaetano Odierna, Fabio Maria Guarino.

2° gruppo: Fabio Maria Guarino (Presidente), Francesco Angelini, Gaetano Odierna, Orfeo Picariello, Gualtieri Roberto.