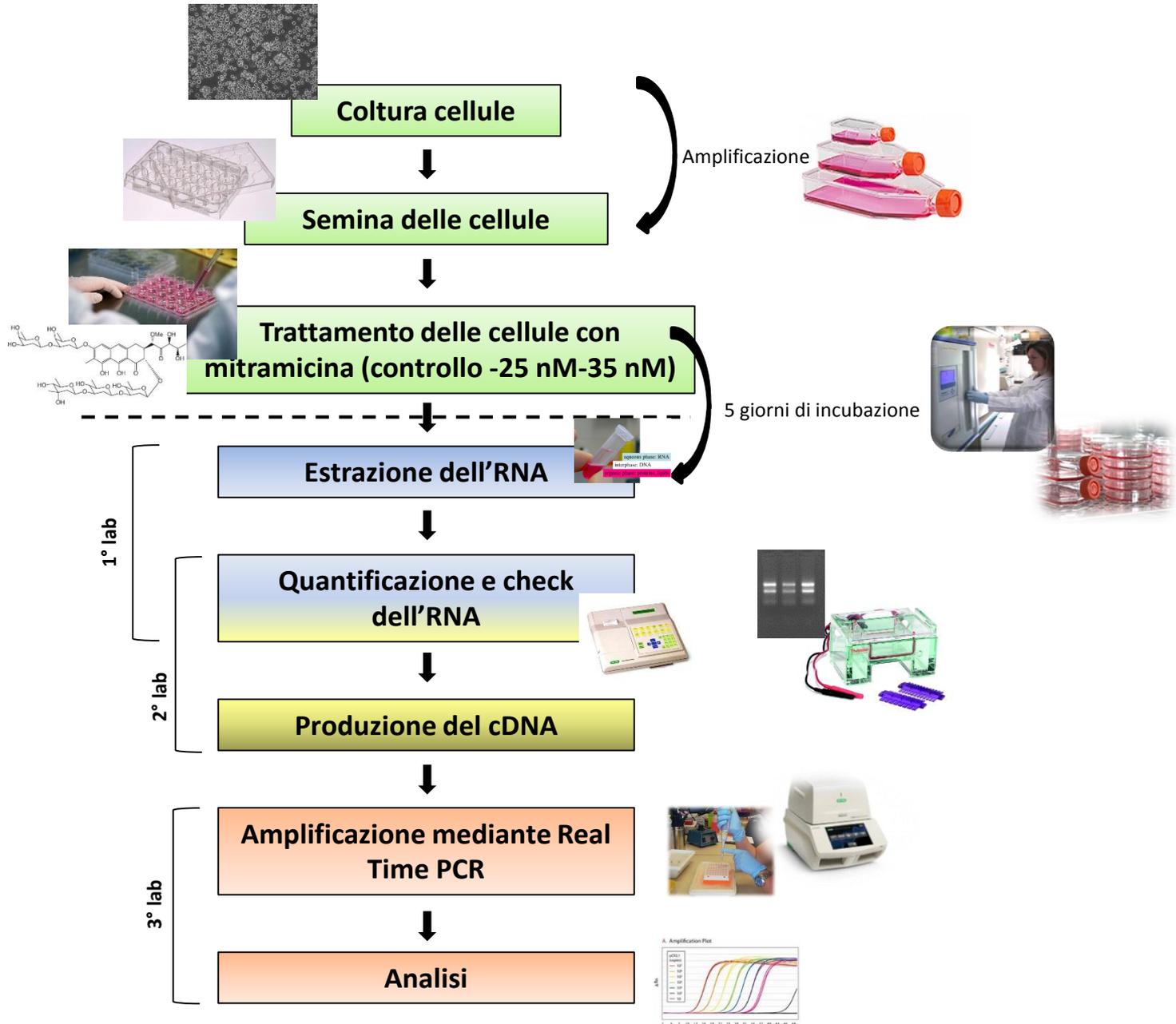


# Trattamento cellule K562 eritroleucemiche con mitramicina (induttore di emoglobina fetale) ed analisi dell'espressione genica della gamma globina.



## T 25 (V 10 ml)



## Diluizione 1:10

Per 30 ml di volume finale si metteranno 27 ml di terreno di coltura (composto da RPMI+ FBS al 10%) + 3 ml di cellule.

Circa 900.000 cells/ml



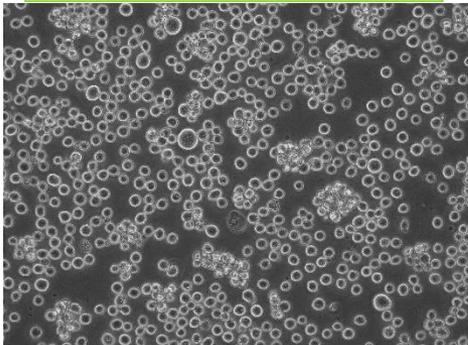
## T 75 (V 30 ml)



## Amplificazione



K562 cells:  
human chronic  
myelogenous leukemia  
(CML)



## Conta cellule

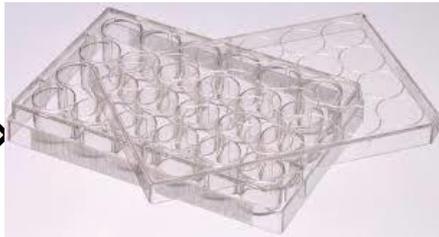


Si prelevano 50  $\mu$ l di cellule e si diluiscono in 10 ml di fisiologica. Il valore letto si moltiplica per 400.

$$1798 \times 400 = 719.200 \text{ cells/ml}$$

+

## piastratura



Le cellule vengono piastrate nel seguente modo:

- non trattato: 30.000 cells/ml
- trattati 100.000 cells/ml

Si preparano:

- 150 ml di coltura per **NT**, quindi saranno necessarie 4.500.000 di cellule
- 120 ml di coltura per ognuno dei **trattati** per cui saranno necessari 12.000.000 di cellule per ogni tipologia di trattamento

Si calcola il volume di coltura da prelevare utilizzando la seguente proporzione:

$$\text{N}^\circ \text{ cellule contate per ml} : 1 \text{ ml} = \text{n}^\circ \text{ cellule che devo usare} : x \text{ ml}$$

In questo caso:

$$494.400 \text{ cells} : 1 \text{ ml} = 4.500.000 \text{ cellule} : x \text{ ml}$$

$$X \text{ ml} = 4.500.000 \text{ cells} \times 1 \text{ ml} / 494.400 \text{ cellule} = 9.10 \text{ ml}$$

ovvero il volume di coltura che si preleverà e si diluirà (in terreno composto da RPMI+FBS al 10%) fino a volume finale di 150 ml per avere la concentrazione finale di 30.000 cells/ml

Si esegue lo stesso calcolo anche per il trattato in questo caso si dovranno prelevare 24, 270 ml per ognuno dei due trattati (MTH 25 nM e MTH 35 nM).

Poiché i volumi finali (150 e 120 ml) sono troppo elevati per una sola fiasca, si divide il volume in diverse T75, ognuna contenente un volume di 30 ml.

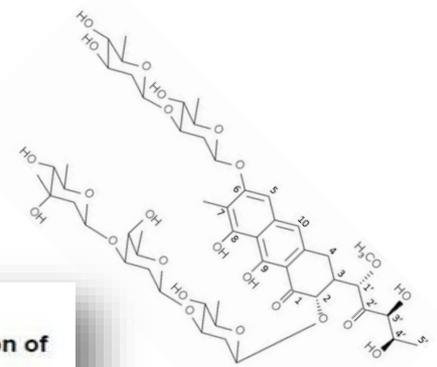
## Trattamento con mitramicina (MTH)

La **mitramicina** è una sostanza prodotta da un batterio della specie streptomyces . Studi hanno dimostrato che questa sostanza è in grado di legare il promotore del gene che codifica per la gamma globina, inducendo la produzione di quest'ultima.

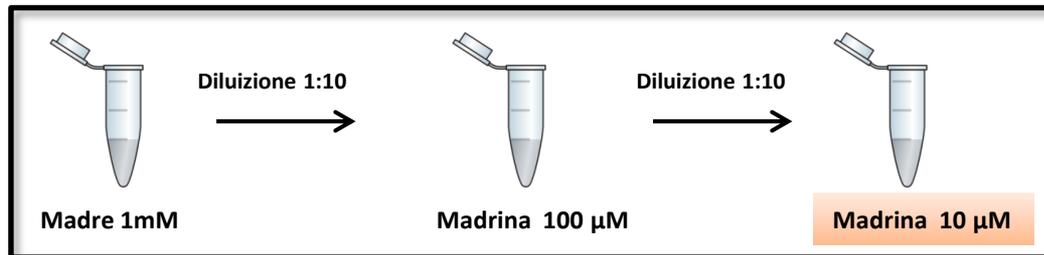
Br J Haematol. 1999 Feb;104(2):258-65.

**The DNA-binding drugs mithramycin and chromomycin are powerful inducers of erythroid differentiation of human K562 cells.**

Bianchi N<sup>1</sup>, Osti F, Rutigliano C, Corradini FG, Borsetti E, Tomassetti M, Mischiati C, Ferioto G, Gambari R.



La polvere di mitramicina viene solubilizzata in una soluzione di acqua ed etanolo 1: 1, in modo da ottenere una soluzione concentrata **1 mM** che viene normalmente conservata a -20°C e protetta dalla luce poiché è fotosensibile. Al momento del trattamento, dalla madre 1 mM si eseguono delle diluizioni successive in acqua, fino ad ottenere una diluizione concentrata **10 µM**. Si tratta di una diluizione che consente di prelevare un volume sufficiente.



Si calcola quindi il volume di MTH necessario per trattare ogni fiasca da 30 ml utilizzando il seguente rapporto:

**Volume da prelevare dalla madrina x concentrazione madrina = volume da trattare x concentrazione finale che voglio ottenere nella fiasca**

Per cui nel caso del **trattamento MTH 25 nM**:

$$V \times 10.000 \text{ nM } (=10 \mu\text{M}) = 30 \text{ ml} \times 25 \text{ nM}$$

$$V = 0.075 \text{ ml} = \mathbf{75 \mu\text{l}}$$

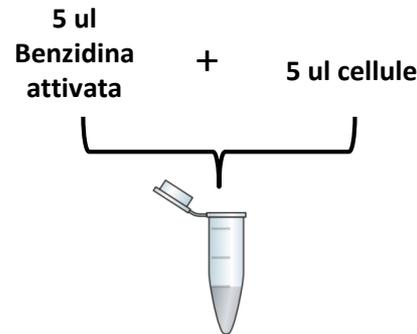
Nel caso del **trattamento MTH 35 nM**

$$V = \mathbf{105 \mu\text{l}}$$

## Saggio della benzidina

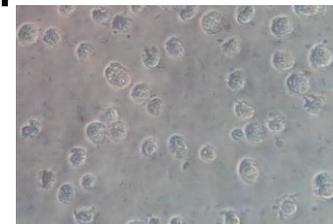
5 giorni in  
incubatore a  
37°C e 5% CO<sub>2</sub>

Il **saggio della benzidina** è un saggio colorimetrico rapido che consente di verificare se nelle cellule è viene prodotta emoglobina. Si esegue utilizzando una soluzione di benzidina attivata prima dell'uso con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in quantità pari al 10% del volume totale di benzidina. Sono sufficienti 5 ul di cellule, addizionate allo stesso volume di benzidina attivata. Si prelevano quindi 5 ul di mix e si pongono in un vetrino da microscopio procedendo alla conta delle cellule blu (in cui è stata indotta la produzione di emoglobina) rispetto al totale. Il valore ottenuto si esprime in percentuale.

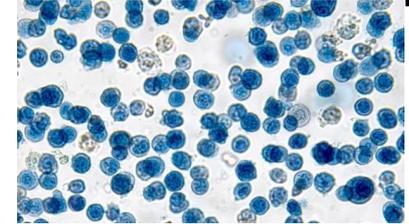


**Nel nostro caso:**

- Non Trattato=0%
- MTH 25 nM =52%
- MTH 35 nM =50%



Non trattato

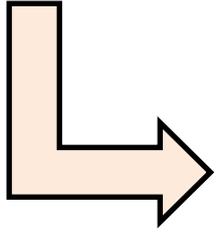


Trattato MTH

## Conta cellule

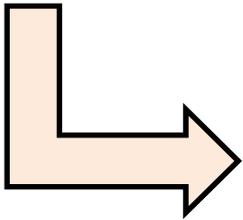
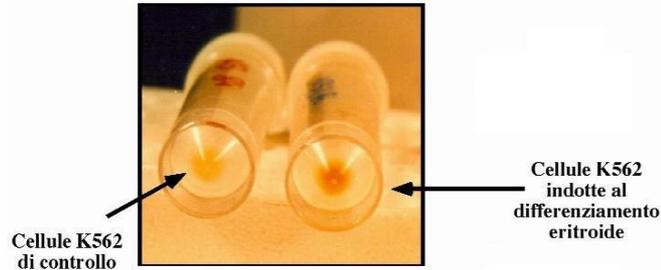
Si procede come in precedenza. Dalla conta risultata che:

- NT sono 1.138.400 cells/ml -> 170.760.000 cells totali
- MTH 25 nM sono 763.200 cells/ml -> 91.584.000 cells totali
- MTH 35 nM sono 871.600 cells/ml -> 104.592.000 cells totali



## Lavaggio del pellet

Le cellule vengono centrifugate a 1200 rpm per 8 minuti a temperatura ambiente, in questo modo le cellule si depositano sul fondo della falcon. Si elimina il surnatante e si procede al lavaggio del pellet con PRS 1x.

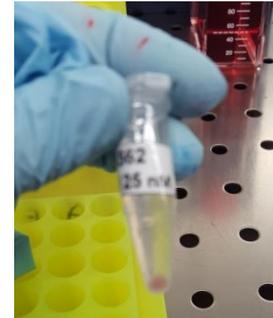


## Preparazione del pellet

Le cellule vengono quindi suddivise in eppendorf da 2 ml in modo tale da avere circa **4.000.000** cellule per eppendorf e centrifugate a 1200 rpm per 8 minuti a temperatura ambiente. Si elimina il surnatante, mantenendo il pellet adeso sul fondo dell'eppendorf.



Pellet NT



Pellet trattato con  
MTH

**Si procede con l'estrazione dell'RNA totale.**