

ĆWICZENIE 2

Pasaż i określanie żywotności hodowli

Wprowadzenie

1. Pasaż komórek

Standardowe operacje wykonywane podczas hodowli komórkowych obejmują: rozmrażanie komórek, wymianę medium hodowlanego, pasaż komórek oraz ich zamrażanie.

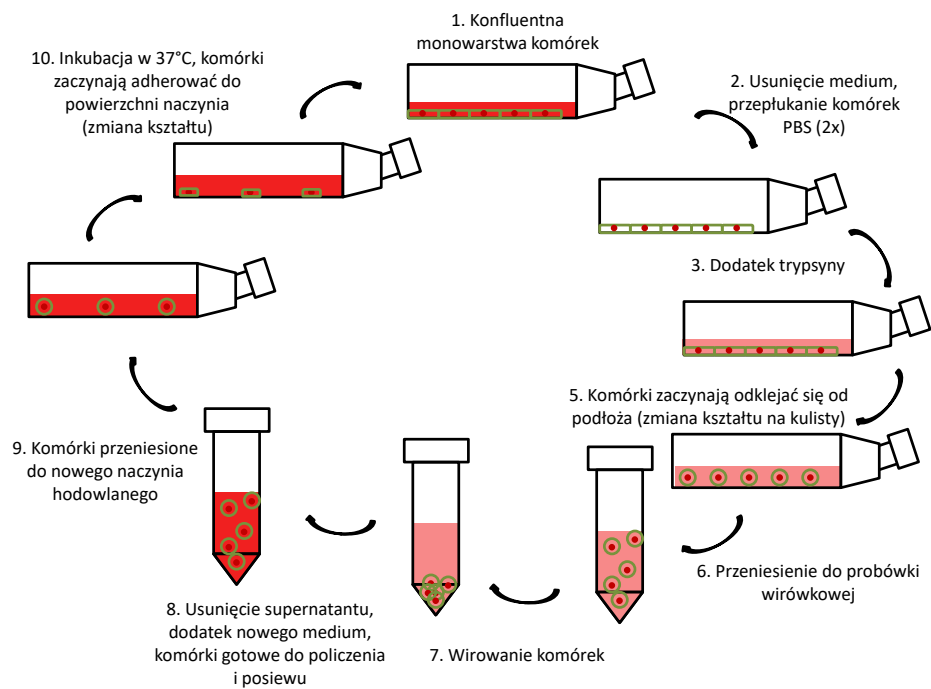
Pasaż komórek jest czynnością polegającą na usunięciu starego medium, dodatku nowego medium i przeniesieniu komórek do nowych naczyń hodowlanych. Komórki należy pasażować w fazie wzrostu logarytmicznego, przed osiągnięciem stanu pełnej konfluencji (najczęściej czynność tę wykonuje się, gdy konfluencja osiągnie wartość ok. 80%).

Pasażowanie komórek ma na celu:

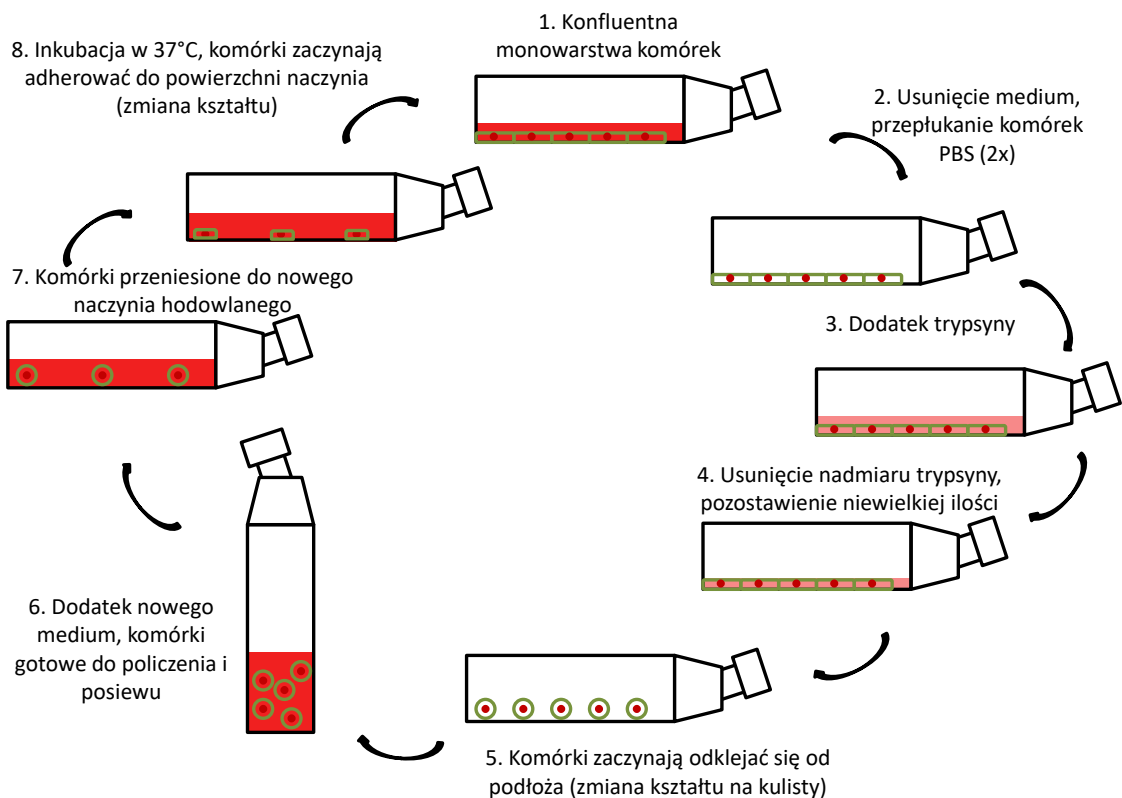
- uniknięcie zahamowania wzrostu wskutek inhibicji kontaktowej
- dostarczenie nowej powierzchni do dalszego wzrostu komórek

W przypadku komórek adherentnych należy przeprowadzić zabieg odklejenia komórek od podłoża – zabieg ten wykonuje się metodą enzymatyczną, z zastosowaniem trypsyny. Enzym ten rozcina wiązania peptydowe w białkach adhezyjnych pośredniczących w związaniu komórek z podłożem hodowlanym. Na etapie trypsynizacji należy zwrócić szczególną uwagę na odpowiednio dobrany czas zabiegu. Trypsynizacja powinna trwać do momentu odklejenia większości komórek z podłoża (obserwacja pod mikroskopem, następuje charakterystyczna zmiana kształtu komórek – z rozpląszonego na kulisty, aby sprawdzić, czy komórki są już całkowicie „odklejone” należy poruszyć naczyniem), proces można przyspieszyć delikatnie stukając palcem w dno naczynia hodowlanego. Proces trypsynizacji prowadzimy w temperaturze 37°C – jest to temperatura optymalna dla działania trypsyny. **Należy pamiętać, aby proces trypsynizacji nie trwał zbyt długo – dochodzi wówczas do uszkodzenia struktury błon komórkowych. Dlatego też ważne jest monitorowanie procesu pod mikroskopem.**

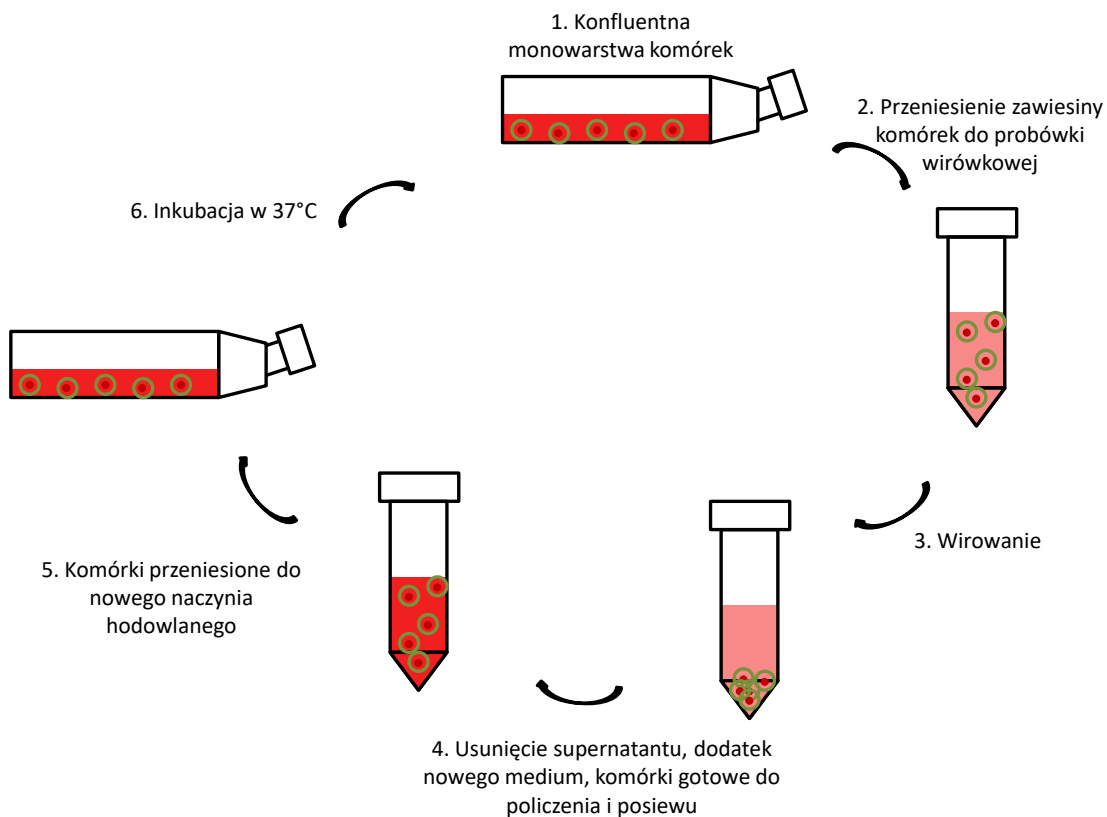
Standardowy protokół pasażu różni się w zależności od typu hodowanych komórek. Najczęściej przebiega on według następującego schematu: z hodowli usuwane jest stare medium, komórki przepłukiwane są dwukrotnie **roztworem PBS bez jonów wapnia i magnezu** (jony te są inhibitorami trypsyny, dlatego też należy pamiętać o zastosowaniu buforu PBS Ca^{2+} (-), Mg^{2+} (-) przed procesem trypsynizacji), następnie dodawany jest roztwór trypsyny. Po zakończeniu trypsynizacji do naczynia dodawane jest medium hodowlane, którego składniki hamują działanie enzymu. Następnie, w celu pozbycia się trypsyny, komórki są wirowane, supernatant zawierający trypsynę jest usuwany, komórki są zawieszane są w nowym medium hodowlanym, liczone, i w odpowiednim rozcieńczeniu przenoszone do nowych naczyń hodowlanych (rys.1). Dla komórek szczególnie wrażliwych na uszkodzenia mechaniczne proces trypsynizacji przeprowadzany jest z pominięciem etapu wirowania – do naczynia wlewa się określoną ilość trypsyny, po chwili usuwa się większość roztworu pozostawiając tylko cienką warstewkę (rys.2). Trypsynizacja prowadzona w taki sposób trwa dłużej, jednak zastosowana ilość trypsyny jest na tyle niewielka, że nie ma potrzeby usuwania jest z hodowli w procesie wirowania. W przypadku komórek rosnących w zawieszynie (nieadherentnych) proces pasażu przeprowadzany jest oczywiście z pominięciem trypsynizacji (nie ma potrzeby „odklejania” komórek od podłoża, rys.3).



Rys. 1: Standardowa procedura pasażu komórek adherentnych.



Rys. 2: Procedura pasażu komórek adherentnych wrażliwych na wirowanie.



Rys. 3: Procedura pasażu komórek nieadherentnych.

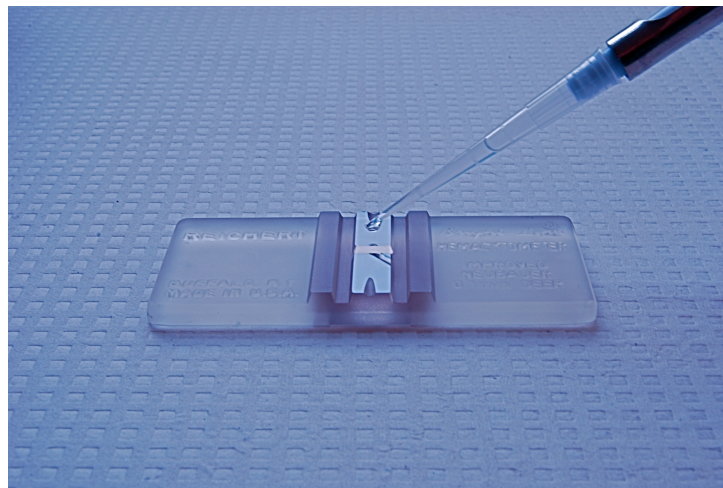
2. Bankowanie komórek

Zamrażanie komórek pozwala na długotrwałe ich przechowywanie. Zamrożone komórki w -80°C mogą być przechowywane kilka dni a w ciekłym azocie nawet przez kilka lat. Pozwala to na przerwanie pracy z daną linią komórkową na dowolny okres czasu, bez konieczności ciągłej hodowli. Zamrażanie powinno zachodzić wolno, aby uniknąć wytworzenia kryształków lodu wewnątrz komórek, które niszczą struktury komórkowe. Optymalny spadek temperatury zapewniają zamrażarki programowane lub użycie specjalnego pojemnika do zamrażania materiału biologicznego, wypełnionego alkoholem izopropylowym. Zamrażane komórki powinny znajdować się w fazie logarytmicznego wzrostu. Stosując odpowiednie krioprotektanty, np. DMSO, podczas mrożenia komórek, można uniknąć ich uszkodzeń. Jednym z takich preparatów jak BambankerTM. Jest to medium, które może być wykorzystywane z każdym typem komórek hodowanych in vitro. Jego szczególną cechą jest brak konieczności dodawania suplementów oraz możliwość pominięcia wstępnego

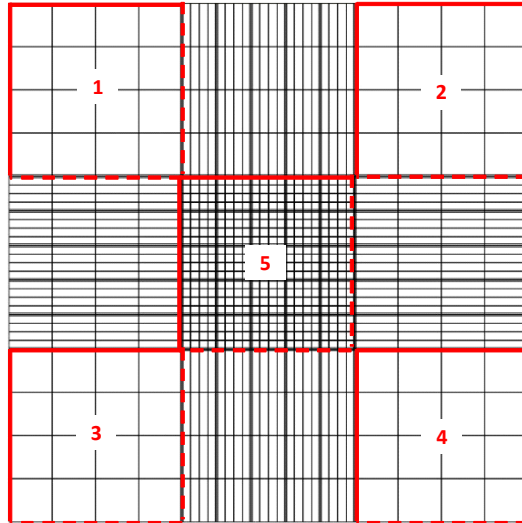
mrożenia w -80°C . Dodatkowo fakt, że jest wolny od surowicy niweluje ryzyko kontaminacji oraz interakcji białek surowicy z komórkami.

3. Określanie żywotności komórek

W trakcie prowadzenia hodowli konieczne jest określanie liczby komórek oraz ich żywotności. Przyrządem służącym do tego celu jest hemocytometr (rys.4). Hemocytometr składa się ze szkiełka podstawowego z dwiema komorami pomiarowymi z naniesionym układem siatek ułatwiających liczenie komórek. Do każdej komory pomiarowej wprowadza się zawiesinę komórek o objętości ok. 10 μl . Układ siatek przedstawiony jest na rys.5. Aby określić liczebność komórek należy policzyć komórki znajdujące się w pięciu dużych kwadratach (czterech narożnych i jednym centralnym). Powierzchnia jednego kwadratu wynosi 1mm^2 , wysokość komory jest równa $0,1\text{mm}$, objętość przestrzeni nad dużym kwadratem równa więc jest $0,1\text{mm}^3$. Aby otrzymać gęstość komórek w 1ml zawiesiny, liczbę komórek obecnych w jednym kwadracie ($0,1\text{mm}^3 \approx 10^{-4}\text{ml}$) należy więc pomnożyć przez 10^4 . Podczas liczenia należy pamiętać, że w przypadku komórek leżących na liniach granicznych zliczamy komórki leżące na liniach górnej i lewej (rys.5 linia ciągła), natomiast pomijamy komórki leżące na liniach dolnej i prawej (rys. 5 linia przerywana).



Rys.4: Hemocytometr.



Rys. 5: Układ siatek hemocytometru – należy policzyć komórki wewnątrz pól zaznaczonych na czerwono oraz komórki leżące na liniach ciągłych (pomijamy komórki na liniach przerywanych).

Istnieje wiele metod określania żywotności komórek. Jedną z prostszych jest barwienie przy użyciu błękitu trypanu. Błękit trypanu ($C_{34}H_{24}N_6O_{14}S_4Na_4$) (ang. *trypan blue*) to barwnik wykorzystywany w hodowlach komórkowych do selektywnego rozróżniania żywych i martwych komórek w testach cytotoksyczności oraz podczas rutynowego oznaczania żywotności. Błona komórkowa jest nieprzepuszczalna dla barwnika, w związku z czym barwi on tylko komórki o uszkodzonej strukturze błony – komórki martwe. Komórki żywe pozostają niewybarwione. W wyniku barwienia zawiesiny komórek zwierzęcych roztworem błękitu trypanu martwe komórki stają się ciemnoniebieskie, podczas gdy komórki żywe pozostają przezroczyste (niezabarwione). Na potrzeby oznaczania żywotności komórek w hodowli stosuje się 0,4 % roztwór błękitu trypanu w 0,81 % NaCl i 0,06 % K_2HPO_4 .

Ćwiczenie 2

2.1. Pasaż hodowli

2.2. Określenie gęstości i żywotności

2.3. Wysiew komórek

3.4. Bankowanie hodowli

2.1. Pasaż hodowli

Materiały:

- naczynie hodowlane z rosnącymi komórkami
- pipety serologiczne, pipetory
- mała szalka Petriego

Roztwory:

- suplementowane medium hodowlane
- PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+}
- roztwór trypsyny

Wykonanie ćwiczenia:

1. Ogrzać wykorzystywane roztwory do temperatury 37°C
2. Oceń stan hodowanych komórek (obserwacja mikroskopowa)
3. W komorze laminarnej usunąć medium hodowlane
4. Przepłukać komórki 2x PBSem bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+}
5. Do naczynia hodowlanego dodać 5 ml roztworu trypsyny.
6. Komórki poddać procesowi trypsynizacji inkubując naczynie hodowlane w cieplarni, w temperaturze 37°C . Inkubację należy prowadzić do czasu odklejenia się komórek od dna naczynia hodowlanego, monitorując przebieg procesu trypsynizacji pod mikroskopem.
7. Dodać świeże medium hodowlane (5 ml), zamieszać, przenieść zawiesinę komórek do falkonu, uzupełnić medium do 14 ml
8. Komórki zwirować, usunąć supernatant, dodać świeże medium do objętości 2ml, komórki zawiesić
9. Obliczyć gęstość komórek w zawieszynie za pomocą hemocytometru oraz licznika komórkowego, rozcieńczyć zawiesinę tak, aby uzyskać gęstość 1×10^4 kom/ml
10. Wysiać zawiesinę komórek do dołków płytki 48-dołkowej (2 x 500 ul) oraz 96-dołkowej (9 x 100 ul) – patrz punkt 2.3.
11. Pozostałą część zawiesziny komórek przenieść do nowego sterylonego naczynia hodowlanego (mała szalka Petriego) dopełnić medium do objętości 10 ml
12. Obejrzyć komórki pod mikroskopem.
13. Umieścić naczynie hodowlane w inkubatorze.
14. Pozostała zawieszina posłuży do wysiewu komórek do płytek testowych

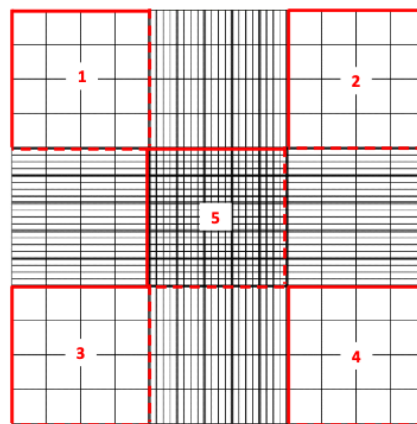
2.2. Określanie gęstości i żywotności

Materiały:

- hemocytometr
- licznik komórkowy
- eppendorf

Roztwory:

- roztwór błękitu trypanu (0,4%)
- zawiesina komórek (do licznika minimum 100 ul)
- medium hodowlane



Rys. 1: Układ siatek hemocytometru

Wykonanie ćwiczenia:

1. Pipetą automatyczną pobrać po 10 µl zawiesiny komórek i 10 µl roztworu trypanu i umieścić w probówce eppendorfa. Roztwory zmieszać przez kilkukrotne przepipetowanie całości, zawiesinę wybarwiać przez 3 minuty
2. Po upływie 3 minut inkubacji, pobrać 10 µl wybarwionej zawiesiny komórek i umieścić jednej komorze pomiarowej hemocytometru
3. Ustawić ostrość mikroskopu (obiektyw 10x) na siatkę hemocytometru, policzyć oddzielnie komórki żywe (niezabarwione) i martwe (zabarwione) w 5 kwadratach 1mm² (4 narożne oraz 1 centralny, patrz rys.1 – kwadraty zaznaczone na czerwono). UWAGA: należy policzyć komórki znajdującej się na górnej i lewej linii granicznej kwadratu, nie należy liczyć komórek leżących na linii dolnej i prawej
4. Powtórzyć procedurę zliczania dla drugiej komory hemocytometru
5. Policzyć gęstość żywych komórek w hodowli (wzór 1) oraz żywotność komórek w hodowli (wzór 2):

$$C = x \cdot \frac{z}{a} \cdot 10^4 \text{ [żywych komórek / ml]} \quad (1)$$

$$Z = \frac{z}{z + m} \cdot 100\% \quad (2)$$

gdzie: C – gęstość żywych komórek, Z – żywotność komórek w hodowli, x – rozcieńczenie, z – liczba komórek żywych, m – liczba komórek martwych, a – liczba pól, dla których dokonano liczenia komórek.

6. Obliczyć objętość roztworu, którą należy dodać do zawiesiny tak, aby uzyskać gęstość komórek = 1×10^5 kom/ml

zgodnie ze wzorem:

$$C_1 \cdot V_1 = C_k \cdot V_k$$

Gdzie:

C₁ – gęstość komórek policzona za pomocą hemocytometru/licznika

V₁ – objętość początkowa zawiesiny (v = 2 ml – 0.1 ml pobrany do pomiarów)

C_k – gęstość końcowa (1 x 10⁵ kom/ml)

V_k – objętość końcowa zawiesiny (do takiej v należy rozcieńczyć zawiesinę)

2.3. Wysiew komórek

Materiały:

- płytka 48-dołkowa zawierająca sterylny materiał
- płytka 96-dołkowa
- sterylne inserty/pęsety
- pipety, pipetory

Roztwory:

- zawiesina komórek o zadanej gęstości (1×10^5 kom/ml)
- medium hodowlane

Wykonanie ćwiczenia:

1. Wyjąć z lodówki materiały zalane AMS
2. Usunąć roztwór AMS, materiały przepłukać PBS (500ul/dołek, 2 x 5 min, wytrząsarka)
3. **Wysiew na materiał:** z materiałów odciągnąć PBS, pipetą automatyczną pobrać po 500 μ l zawiesiny komórek i wysiać na materiał na płytce 48-dołkowej, materiał przycisnąć insertem
4. **Wysiew do dołków:** pobrać po 100 μ l zawiesiny komórek i wysiać do 6 x 4 dołków na płytce **96-dołkowej** (w 6 kolumnach)
5. Obejrzeć komórki pod mikroskopem – oznaczyć markerem dołki, w których liczba komórek jest wyraźnie mniejsza/większa (jeśli takie wystąpią)

Uwaga!

Każdorazowo przed wysiewem komórek do dołka zamieszać zawiesinę w falkonie

Wszystkie materiały powinny być umieszczone pod insertami

2.4. Bankowanie komórek

Materiały:

- próbówki do mrożenia (mrożaki)
- pudełko z izopropanolem

Odczynniki:

- medium krioprotetyczne

Wykonanie ćwiczenia:

1. 1 ml zawiesiny komórek przenieść do mrożaka
2. Dodać 1 ml krioprotetycznego medium
3. Probówki umieścić w pudełku z izopropanolem i następnie umieścić w zamrażalce w -80°C