

ĆWICZENIE 1: Podstawowe techniki pracy w laboratorium hodowli komórkowych

Zakres:

Zapoznanie ze sprzętem używanym w pomieszczeniu czystym

Suplementacja medium hodowlanego

Założenie hodowli

Obserwacje mikroskopowe

Przygotowanie biomateriału do testów cytotoksyczności

Sterylizacja biomateriału

Wprowadzenie

1. Wyposażenie laboratorium hodowli komórkowych

1.1. Sprzęt

Poniżej przedstawiono podstawowy sprzęt obecny w laboratorium hodowli komórkowych:

- **komora laminarna** – przestrzeń przeznaczona do pracy w warunkach sterylnych, wykonywane są tu wszystkie operacje na rosnących komórkach, dzięki zamontowanym wewnątrz komory filtrom powietrze dostarczane do wnętrza komory jest sterylne, należy pamiętać o spryskiwaniu roztworem etanolu wszelkich pojemników umieszczonych w komorze oraz o odpowiednim zasadach pracy (więcej w sekcji „Praca w warunkach jałowych”)



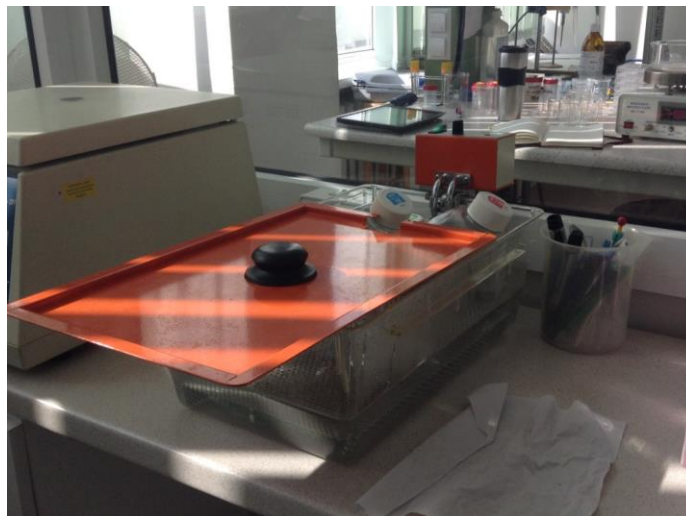
- **inkubator** – jego funkcją jest zapewnienia odpowiednich warunków wzrostu dla umieszczonych w nim komórek (wilgotność, pH, temperatura)



- **mikroskop odwróconego pola** – umożliwia obserwacje mikroskopowe komórek rosnących wewnątrz naczyń hodowlanych



- **łaźnia wodna** – umożliwia podgrzewanie roztworów używanych w trakcie hodowli (bufory, media) do temperatury 37°C



- **wirówka** – wirowanie komórek prowadzi do ich oddzielenia od medium hodowlanego, co jest wykorzystywane np. podczas pasażu
- **zamrażarka** – przechowywanie komórek w temperaturze -70°C
- **pojemniki z ciekłym azotem (dewary)** – długotrwałe przechowywanie komórek w temperaturze ok. -180°C
- **autoklaw** – służy do sterylizacji sprzętu, roztworów, odpadów

1.2. Plastik laboratoryjny

W trakcie prowadzenia hodowli komórkowych, oprócz przedstawionego powyżej sprzętu laboratoryjnego, konieczne jest stosowanie naczyń hodowlanych. Są to sterylne naczynia, najczęściej polistyrenowe, o odpowiednio zmodyfikowanej powierzchni, umożliwiającej adhezję i wzrost komórek.

Najpopularniejszymi naczyniami hodowlanymi są:

- Butelki i szalki hodowlane – charakteryzują się dużą powierzchnią wzrostu, stosowane do namnażania komórek

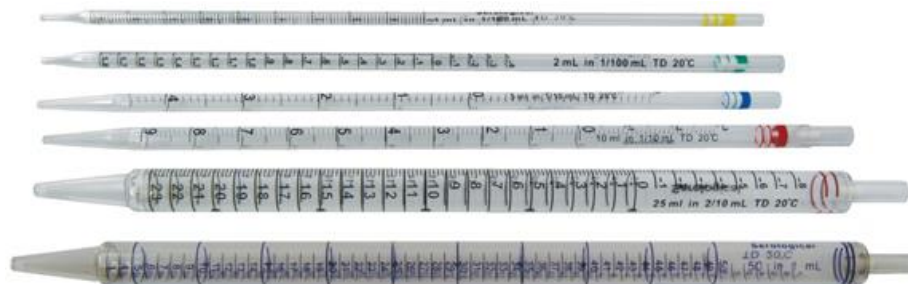


- Płytki wielodołkowe – dostępne w różnych wariantach, najczęściej 6-, 12-, 24-, 48-, 96-dółkowe, na ogół służą do przeprowadzania konkretnych eksperymentów, rzadziej do namnażania komórek, umożliwiają przeprowadzenie wielu eksperymentów jednocześnie, przy wykorzystaniu małej powierzchni (w każdym dołku inny eksperyment)



W odróżnieniu od pracy w tradycyjnym laboratorium, w trakcie pracy w warunkach sterylnych płyny nie są przelewane bezpośrednio z pojemników, ale są przenoszone w sposób jałowy, przy użyciu:

- sterylnych pipet serologicznych



Kultury komórkowe i tkankowe roślin i zwierząt - LABORATORIUM
Opracowanie: dr inż. Beata Butruk-Raszeja
Ćwiczenie 1

- Pipetora



- Pipet automatycznych jedno- i wielokanałowych



2. Media hodowlane

W trakcie trwania hodowli i wykonywania wszelkich czynności hodowane komórki przetrzymywane są w płynach zapewniających odpowiednie środowisko. Dwa podstawowe roztwory stosowane w trakcie hodowli komórkowych to:

- **bufory** – najczęściej bufor fosforanowy (PBS), zapewnia podstawowe środowisko, służy do przepłukiwania komórek i ich krótkotrwałego przechowywania, zawiera jony wapnia, magnezu, potasu, sodu
- **media hodowlane**

Funkcje medium hodowlanego:

- zapewnia wszelkie substancje odżywcze i regulatorowe konieczne do prawidłowego rozwoju komórek w trakcie trwania hodowli
- utrzymuje stałe pH
- zapewnia odpowiednie ciśnienie osmotyczne

Podstawowy skład medium hodowlanego:

- **aminokwasy** – źródło węgla i azotu, na ogół są obecne w medium, wyjątek stanowi glutamina – ze względu na niską stabilność w środowisku wodnym najczęściej jest dodawane do medium tuż przed rozpoczęciem eksperymentów
- **glukoza** – źródło energii
- **witaminy, hormony**
- **sole mineralne** – buforowanie środowiska
- **surowica** – najczęściej bydlęca (FBS – ang. *fetal bovine serum*), źródło czynników wzrostu, hormonów, czynników adhezyjnych, czynników regulujących przepuszczalność błony komórkowej
- **antybiotyki** – ograniczają ryzyko zakażeń biologicznych
- **czerwień fenolowa** – wskaźnik pH

Odpowiednie pH jest bardzo ważnym parametrem podlegającym kontroli. Jak wspomniano wcześniej, większość komórek ssaczy wykazuje optimum wzrostu przy pH neutralnym (7,4). Utrzymanie pH na tym poziomie możliwe jest dzięki odpowiedniemu balansowi pomiędzy stężeniem CO₂ rozpuszczonym w medium hodowlanym a stężeniem jonów wodorowęglanowych. Dlatego konieczne jest dokładne zapoznanie się ze składem stosowanego medium – niektóre media zawierają zwiększone stężenie jonów HCO₃⁻, wówczas należy prowadzić hodowle przy wyższym stężeniu CO₂ w inkubatorze.

Kontrola pH w trakcie trwania hodowli możliwa jest dzięki obecności w medium hodowlanym wskaźnika pH. Najczęściej jest to czerwień fenolowa –

barwnik ten zmienia swój kolor w zależności od pH roztworu, przyjmując barwę żółtą w pH kwaśnym, czerwoną w pH neutralnym i fioletową w pH zasadowym.

3. Zakażenia biologiczne

Największym problemem w trakcie prowadzenia hodowli komórkowych jest ryzyko zakażeń biologicznych. Zakażenia są związane z rozwojem drobnoustrojów (najczęściej bakterii) w medium hodowlanym. Aby zminimalizować ryzyko rozwoju bakterii media suplementuje się **antybiotykami**, konieczne jest również zachowanie wszelkich **zasad pracy obowiązujących w laboratorium czystym**.

Każdorazowo po wyjęciu hodowli z inkubatora i przed przystąpieniem do jakichkolwiek czynności należy **sprawdzić** czy nie doszło do zakażenia poprzez obserwacje makro- (sprawdzenie przejrzystości medium, w przypadku gdy dochodzi do zakażenia medium pokrywa się widocznym gołym okiem biofilmem, dochodzi też do zmętnienia pożywki) i mikroskopowe (bakterie są widoczne pod mikroskopem, należy jednak pamiętać że są znacznie mniejszych rozmiarów niż komórki zwierzęce).

Każdorazowo w przypadku stwierdzenia wystąpienia zakażenia należy zaprzestać dalszej hodowli i usunąć zakażoną hodowlę.

Kontaminacje nie mogą być całkowicie wyeliminowane z hodowli, ale właściwe zachowania mogą zredukować ich negatywne skutki!

Wyróżnia się kontaminacje:

- ✓ chemiczne
- ✓ biologiczne

Najważniejsze skutki kontaminacji:

- ✓ Strata czasu, wysiłku, pieniędzy
- ✓ Niewłaściwe wyniki eksperymentów
- ✓ Utrata/Zanieczyszczenie produktu

Kontaminant chemiczny – każdy **związek nieożywiony**, który wykazuje **negatywne działanie** na hodowlę, przykłady kontaminantów chemicznych:

Media:

- ✓ Odpowiednie przechowywanie (czas, temperatura, UV)
- ✓ Dokładne odważanie reagentów
- ✓ Wysoka czystość wody
- ✓ Odpowiednia czystość butelek

Surowica:

Kultury komórkowe i tkankowe roślin i zwierząt - LABORATORIUM

Opracowanie: dr inż. Beata Butruk-Raszeja

Ćwiczenie 1

- ✓ Duże zróżnicowanie składników obecnych w surowicy (hormony, czynniki wzrostu)
- ✓ wybór jednego dostawcy lub stosowanie *serum-free media*

Woda

- ✓ Utraczysta woda (UPW) do buforów, pożywek
- ✓ Woda destylowana nie jest wystarczająca (!)
- ✓ systemy do otrzymywania UPW, wymiana filtrów
- ✓ Odpowiednie przechowywanie
- ✓ Woda w autoklawie odpowiedniej czystości

Naczynia

- ✓ Toksyczne pozostałości po roztworach
- ✓ Do hodowli używać odrębną grupę naczyń (!)

Światło

- ✓ degradacja
- ✓ wolne rodniki
- ✓ bufory HEPES – wrażliwe na światło
- ✓ przechowywanie w ciemnych szafkach

Endotoksyny

- ✓ lipopolisacharydowe związki obecne w błonie bakterii Gram-
- ✓ uwalniane podczas wzrostu i śmierci
- ✓ powszechne w wodzie i surowicy
- ✓ hydrofobowe

Zakażenia biologiczne:

- ✓ Łatwe do wykrycia:
 - ✓ Bakterie
 - ✓ Pleśnie
 - ✓ Drożdże
- ✓ Trudne do wykrycia
 - ✓ Wirusy
 - ✓ Mykoplazma
 - ✓ Inne linie komórkowe
- ✓ Efekty zakażeń
 - ✓ Wykorzystanie składników odżywczych
 - ✓ Wydzielanie metabolitów – zmiana pH
 - ✓ Wydzielanie H₂O₂

Źródła zakażeń biologicznych:

- ✓ Niesterylne media, bufory, reagenty
- ✓ Aerozole

Kultury komórkowe i tkankowe roślin i zwierząt - LABORATORIUM

Opracowanie: dr inż. Beata Butruk-Raszeja

Ćwiczenie 1

- ✓ Ludzie
- ✓ Błędy i wypadki
- ✓ Powierzchnie naczyń hodowlanych

Bakterie (rys1):

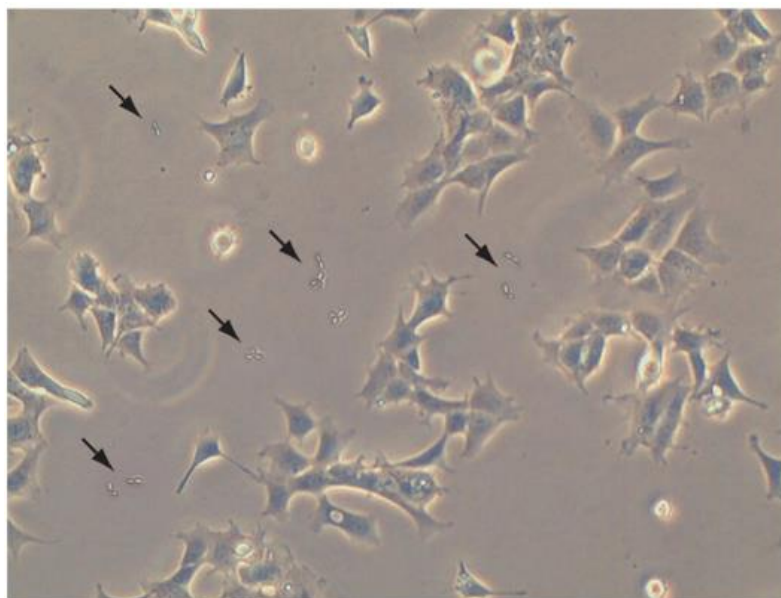
- ✓ Stosunkowy duży rozmiar i bardzo szybki wzrost – łatwe do wykrycia

Wykrycie zakażenia:

- ✓ zmiana morfologii komórek
- ✓ zmętnienie pożywki
- ✓ zmiana koloru pożywki (zakwaszenie)
- ✓ ruch pożywki

Antybiotyki

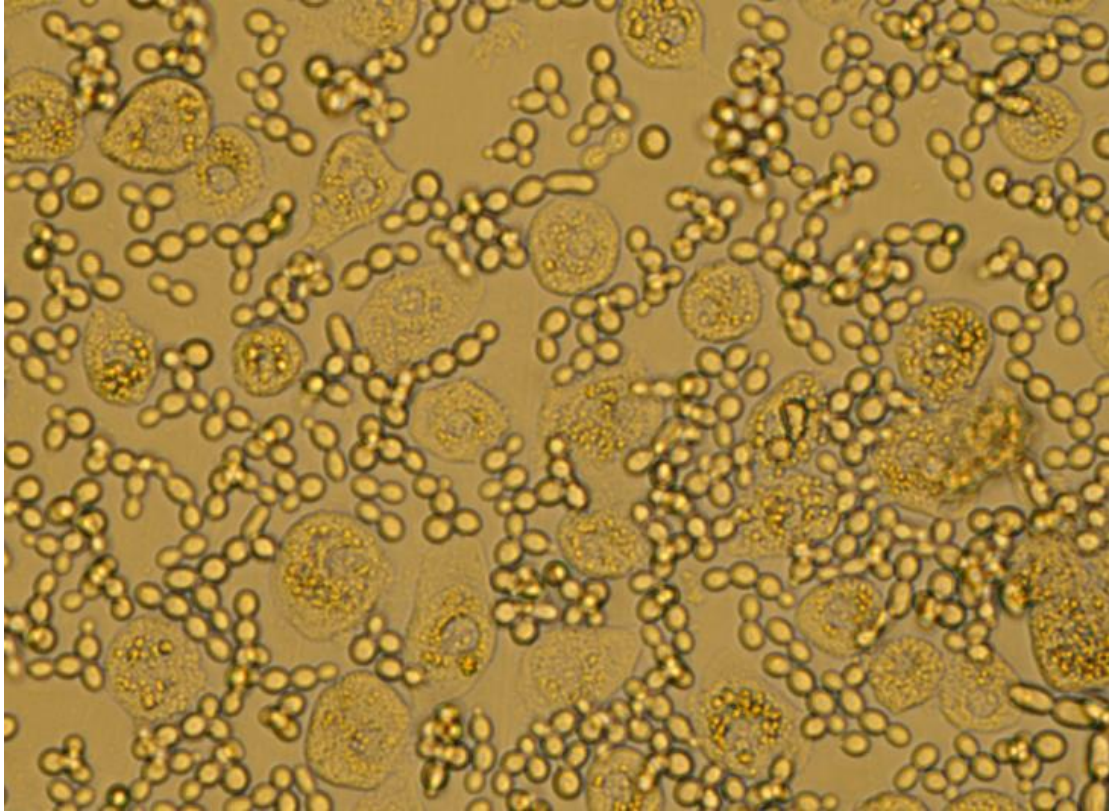
- ✓ penicilina/streptomycyna
- ✓ gentamycyna



Rys. 1: Hodowla, w której doszło do zakażenia bakteryjnego; strzałami zaznaczono bakterie.

Drożdże (rys.2):

- ✓ Stosunkowy duży rozmiar – łatwe do wykrycia
- ✓ Wykrycie zakażenia:
 - ✓ Obserwacje mikroskopowe
 - ✓ Zmętnienie pożywki
 - ✓ Charakterystyczny zapach
 - ✓ Nieznaczna zmiana pH
 - ✓ Antybiotyki nie są skuteczne
 - ✓ Antymikotyki: amfoterycyna, mykostatyna



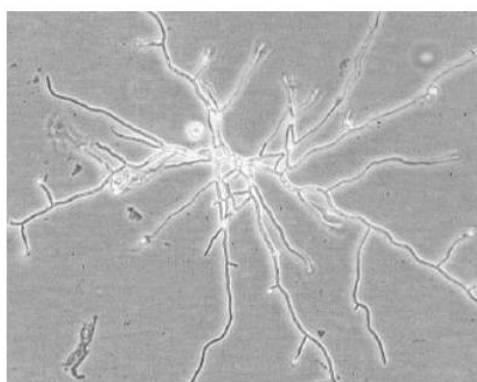
Rys. 2: Hodowla, w której doszło do zakażenia drożdżami.

Pleśnie (rys.3)

- ✓ Stosunkowo duży rozmiar – łatwe do wykrycia

Wykrycie zakażenia:

- ✓ Obserwacje mikroskopowe
- ✓ Nieznaczna zmiana pH
- ✓ Antybiotyki nie są skuteczne
- ✓ Antymikotyki: amfoterycyna, mykostatyna



Rys. 3: Hodowla, w której doszło do zakażenia pleśnią.

4. Praca w warunkach jałowych

Podczas pracy w warunkach sterylnych należy zawsze być świadomym potencjalnych źródeł zakażeń - kurz, włosy, ręce, ubranie. Dlatego należy mieć zawsze umyte ręce, związane włosy oraz założony fartuch. Wszelkie skaleczenia, zadrapania, zranienia na dłoniach i przedramionach należy zabezpieczyć plastrem. Przedstawione poniżej zasady obowiązują w każdym laboratorium hodowli komórkowych i mają na celu zminimalizowanie ryzyka zakażeń biologicznych prowadzonych hodowli.

Przykładowa organizacja pracy w komorze laminarnej obejmuje (patrz zdjęcie poniżej):

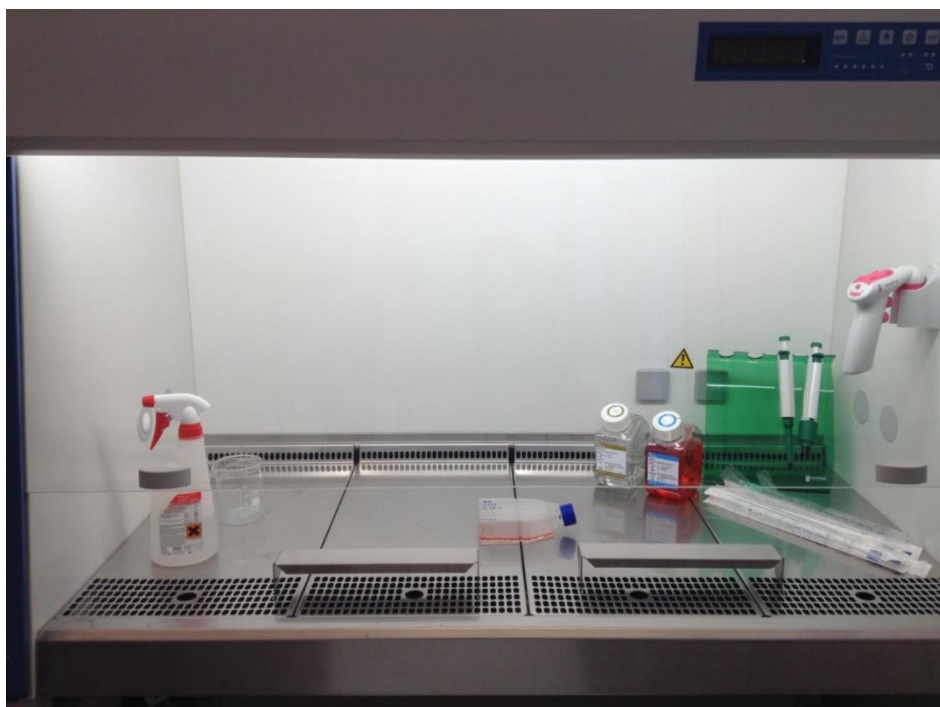
- dużą przestrzeń w centralnej części komory laminarnej przeznaczoną do pracy z komórkami,

Kultury komórkowe i tkankowe roślin i zwierząt - LABORATORIUM

Opracowanie: dr inż. Beata Butruk-Raszeja

Ćwiczenie 1

- części ze sterylnymi odczynnikami i sprzętem po prawej stronie; znajduje się tam automatyczny pipetor z brzegu, sterylne pipety, butelki z reagentami i medium hodowlanym w głębi po prawej stronie,
- stojak na próbówki może zostać umieszczony na środku w głębi (nie dla komórek z poziomy przepływem powietrza),
- część ze zużytymi roztworami, opakowaniami, pipetami po lewej (zlewka na zużyte płyny w głębi po lewej, zużyte pipety, opakowania z przodu (zanim zostaną usunięte z komory laminarnej)
- pojemnik z 70% roztworem alkoholu po lewej stronie na brzegu



Podczas sterylnej pracy należy:

- nosić odzież ochronną,
- odkazić ręce/rękawiczki 70% roztworem alkoholu, po czym pozwolić mu odparować, czynność tę powtórzyć każdorazowo po wyjęciu rąk z komory laminarnej,
- wszystkie przedmioty umieszczane w komorze laminarnej wcześniej spryskać 70% EtOH
- pojemniki hodowlane umieszczać w komorze laminarnej jako ostatnie,
- wszystkie butelki, pojemniki hodowlane odpowiednio podpisać i oznaczyć,
- otwierać sterylne pipety, roztwory bezpośrednio przed użyciem,
- wszystkie czynności wykonywać w centralnej części komory laminarnej,
- wykonywać płynne i spokojne ruchy,
- wszystkie czynności wykonywać na wyprostnych ramionach,

Kultury komórkowe i tkankowe roślin i zwierząt - LABORATORIUM

Opracowanie: dr inż. Beata Butruk-Raszeja

Ćwiczenie 1

- ograniczyć czas pracy do koniecznego minimum,
- często usuwać wszystkie zużyte opakowania,
- każdy rozlany płyn od razu wytrzeć i spryskać to miejsce 70% roztworem alkoholu,
- unikać prowadzenia rozmów,
- sprawdzić czy wszystkie butelki są odpowiednio zamknięte przed wyjęciem ich z komory laminarnej
- pracować z jedną linią komórkową

Podczas sterylnej pracy nie wolno:

- dotykać powierzchni znajdujących się poza komorą
- kichać, kasłać w pobliżu komory laminarnej,
- przenosić pojemników i butelek za szyjki lub nakrętki,
- pracować nad odkrytymi butelkami i płytkami,
- pozostawiać odkryte butelki ze sterylną zawartością,
- przelewać płynów bez użycia sterylnej pipety,
- dotknąć końcem pipety lub tipsów niesterylnych powierzchni (szyjki butelki, zewnętrzne powierzchnie butelek)
- pobierać roztwory z różnych butelek tą samą pipetą,
- napełniać butelek, płytek hodowlanych i probówek wirówkowych po brzegi,
- tworzyć pęcherzy powietrza w medium hodowlanym i pipetach.

Przed przystąpieniem do pracy w komorze laminarnej należy:

- sprawdzić czy wszystkie urządzenia działają poprawnie i czy ich parametry są właściwe,
- sprawdzić czy wszystkie drzwi i okna są zamknięte,
- przygotować wszystkie niezbędne odczynniki i pojemniki, które będą potrzebne podczas pracy

Przed wykonaniem jakichkolwiek czynności na hodowli komórkowej należy dokonać obserwacji makro- i mikroskopowych:

- pH medium hodowlanego (kolor medium)
- ilość komórek pływających w medium hodowlanym, stopień konfluencji
- kształt komórek,
- przejrzystość medium hodowlanego

Przygotowanie medium hodowlanego - dodatek suplementów

Sprzęt:

- pipetor automatyczny
- sterylne pipety serologiczne
- sterylna moczówka 100 ml (x2)

Odczynniki:

- DMEM (ang. *Dulbecco's modified Eagle's medium*) – medium hodowlane
- FBS (ang. *fetal bovine serum*) - płodowa surowica bydlęca
- roztwór glutaminy
- mieszanina antybiotyków penicylina – streptomycyna (Pen-Strep)
- PBS z jonami magnezu i wapnia
- PBS bez jonów magnezu i wapnia

Wykonanie ćwiczenia:

1. Ogrzać wykorzystywane roztwory do temperatury 37°C
2. Przenieść roztwory do komory laminarnej (wcześniej spryskać roztworem alkoholu)
3. Do sterylnej moczówki o objętości 120 ml dodać odpowiednią objętość roztworu FBS (aby uzyskać stężenie 10% v/v)
4. Dodać odpowiednią objętość roztworu glutaminy (aby uzyskać stężenie 1%v/v)
5. Dodać odpowiednią objętość roztworu penicylina-streptomycyna (aby uzyskać stężenie 1%v/v)
6. Uzupełnić medium hodowlanym DMEM do objętości 100ml
7. Wymieszać roztwór
8. Przygotować 100ml PBS (z jonami) w sterylnej moczówce
9. Wszystkie pojemniki z roztworami podpisać (data, nazwisko, rodzaj roztworu)
10. Po skończonej pracy roztwory dokładnie zamknąć i umieścić w lodówce.

Rozmrażanie komórek i wysiew do naczynia hodowlanego

Sprzęt:

- pipetor automatyczny
- sterylne pipety serologiczne (tzw. "pasterówki")
- sterylne naczynie hodowlane
- sterylny falkon o objętości 15 ml
- kriotuba z zamrożonymi komórkami

Odczynniki:

- suplementowane medium hodowlane

Wykonanie ćwiczenia:

1. Ogrzać medium hodowlane do temperatury 37°C

Kultury komórkowe i tkankowe roślin i zwierząt - LABORATORIUM

Opracowanie: dr inż. Beata Butruk-Raszeja

Ćwiczenie 1

2. Przygotować naczynie hodowlaną – napęlić medium w objętości 2ml i umieścić w inkubatorze
3. Rozmrozić komórki przy użyciu łaźni wodnej lub inkubatora (w przypadku użycia łaźni wodnej należy uważać, aby woda nie dostała się do wnętrza kriotuby) - rozmrażanie powinno trwać jak najkrócej (do 2 minut)
4. Przenieść kriotubę z komórkami do komory laminarnej i spryskać roztworem alkoholu
5. Przenieść komórki z kriotuby do falkonu
6. Do falkonu z komórkami dodać 5 ml medium hodowlanego (dodawać kroplami)
7. Zwirować komórki (dla fibroblastów: czas wirowania 10 minut, szybkość obrotów 192 RCF)
8. Odpipetować supernatant ze zwirowanych komórek
9. Zawiesić komórki w 2 ml świeżego medium hodowlanego
10. Roztwór komórek przenieść do naczynia hodowlanego, dopełnić medium do objętości 5ml
11. Obejrzyć komórki pod mikroskopem
12. Umieścić naczynie w inkubatorze

Przygotowanie i sterylizacja biomateriału

Sprzęt:

- pipetor automatyczny
- sterylne pipety serologiczne
- sterylna szalka Petriego

Odczynniki:

- roztwór sterylizujący
- PBS

Wykonanie ćwiczenia:

1. Materiał wyciąć do wielkości podanej przez prowadzącego
2. Materiał umieścić na szalce
3. Przygotować roztwór sterylizujący: 70% etanol/woda, w objętości 5 ml
4. Zalać materiał roztworem sterylizującym na 20min
5. Usunąć roztwór sterylizujący, materiał przepłukać PBS, 5 min, 5x
6. Materiał zalać roztworem PBS i umieścić w lodówce
7. Przygotować pęsety do sterylizacji – umieścić je w torebce do sterylizacji