

## Ćwiczenie 7

### Przygotowanie i sterylizacja materiału

#### Pasaż komórek

#### Przygotowanie płytek testowych

#### Przygotowanie i sterylizacja próbek polimeru:

Sprzęt i materiały:

- próbki mat włóknistych w kształcie koła o zadanej średnicy
- sterylna płytka 48-dołkowa
- sterylne pęsety i inserty (obcięte końcówki do pipet)
- falkon 15ml

Roztwory i odczynniki

- roztwór penicyliny i streptomycyny
- roztwór amfoterycyny
- roztwór PBS
- roztwór etanolu
- suplementowane medium hodowlane DMEM

#### Wykonanie:

1. Wycięte próbki materiałów umieścić w dołkach płytki 48-dołkowej
2. Materiały zalać roztworem etanolu (200ul/dołek, 20 minut), umieścić na wytrząsarce
3. Obliczyć objętość reagentów potrzebną do zalania wszystkich materiałów (200ul/dołek) roztworem AMS (AMS – ang. *antimicrobial solution*) zawierającym 0,25 ug/ml amfoterycyny, 100U/ml pen, 100ug/ml strep /PBS, przygotować roztwór
4. Usunąć roztwór etanolu, materiały przepłukać roztworem PBS, (200ul/dołek), 5x, 5 minut, wytrząsarka (UWAGA – unikać wysychania materiałów – możliwie jak najszybciej zalewać kolejnym roztworem)
5. Po ostatnim płukaniu usunąć roztwór PBS, materiały zalać roztworem AMS, umieścić w lodówce na 2h
6. Po czasie inkubacji materiały przepłukać sterylnym PBS, 3x 5 min., wytrząsarka
7. Materiały zalać 300ul PBS, płytkę owinąć parafilmem i umieścić w lodówce

### **Pasaż komórek adherentnych**

#### **Sprzęt:**

- butelka 75cm<sup>2</sup> z rosnącymi komórkami

#### **Roztwory:**

- suplementowane medium hodowlane

- PBS bez jonów Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup>

- roztwór trypsyny (0,25%)

#### **Wykonanie ćwiczenia:**

1. Ogrzać wykorzystywane roztwory do temperatury 37°C
2. Ocenić stan hodowanych komórek (obserwacja mikroskopowa)
3. W komorze laminarnej usunąć medium hodowlane
4. Przepłukać komórki 2x PBSem bez jonów Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup>
5. Do naczynia hodowlanego dodać 1 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 (2ml), komórki zawiesić i przenieść do falkonów
8. Komórki zwirować, usunąć supernatant, dodać świeże medium (2ml), komórki zawiesić
- 9. Przenieść 1 ml zawiesiny komórek do nowego sterylnego naczynia hodowlanego (butelka 75cm<sup>2</sup>), dopełnić medium do objętości 15ml**
10. Obejrzeć komórki pod mikroskopem.
11. Umieścić naczynie hodowlane w inkubatorze.
12. Pozostała zawiesina posłuży do wysiewu komórek do płytek testowych

### Określanie żywotności komórek

#### Sprzęt:

- hemocytometr
- pipeta automatyczna o pojemności 10-100 µl (wraz z jednorazowymi tipsami)
- licznik

#### Odczynniki:

- roztwór błękitu trypanu (0,4%)
- zawiesina komórek
- medium hodowlane

#### Wykonanie ćwiczenia:

1. Pipetą automatyczną pobrać po 20 µl zawiesiny komórek i 20 µl roztworu trypanu i umieścić w probówce eppendorfa. Roztwory zmieszać przez kilkukrotne przepipetowanie całości
2. Zawiesinę wybarwianych komórek inkubować (w temperaturze pokojowej) przez 3 minuty. Oczyszczyć komorę hemocytometru za pomocą roztworu etanolu i papierowego ręcznika
3. Po upływie dokładnie 3 minut inkubacji, pipetą automatyczną pobrać 10 µl wybarwionej zawiesiny komórek a następnie wykorzystując zjawisko podciągania kapilarnego umieścić odpowiednią objętość zawiesiny na każdej z siatek hemocytometru (nie przeładować komory przez wymuszone mechanicznie pipetowanie zawiesiny)
4. Ustawić ostrość mikroskopu (obiektyw 20x) na siatkę hemocytometru, policzyć oddzielnie komórki żywe (niezabarwione) i martwe (zabarwione) w 5 kwadratach 1mm<sup>2</sup> (4 narożne oraz 1 centralny, patrz rys.1).

UWAGA: należy policzyć komórki znajdujące się na górnej i lewej linii granicznej kwadratu, nie należy liczyć komórek leżących na linii dolnej i prawej

5. Powtórzyć procedurę zliczania dla drugiej komory hemocytometru
6. 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.

7. Obliczyć objętość roztworu, którą należy dodać do zawiesiny aby uzyskać gęstość komórek = 1x10<sup>3</sup> kom/ml

zgodnie ze wzorem:

$$C \cdot V_x = C_k \cdot V_k$$

Gdzie:

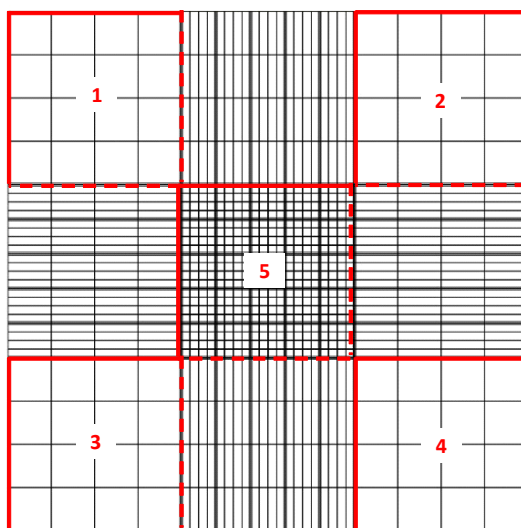
Ćwiczenie 7

$C$  – gęstość komórek policzona za pomocą hemocytometru

$V_k$  – objętość końcowa zawiesiny komórek (potrzebna do wysiania komórek na wszystkie dołki płytki)

$C_k$  – gęstość końcowa (założona gęstość wysiewu)

8. Rozcieńczyć zawiesinę komórek do odpowiedniej objętości



**Rys. 1: Układ siatek hemocytometru – należy policzyć komórki wewnątrz pól zaznaczonych na czerwono oraz komórki leżące na liniach ciągłych (pomijamy komórki na liniach przerywanych).**

### **Wysiew komórek do płytek testowych**

#### **Materiały:**

- płytka 96-dołkowa
- zawiesina komórek o zadanej gęstości
- medium hodowlane

#### **Wykonanie ćwiczenia:**

1. Pipetą automatyczną pobrać po 200  $\mu$ l zawiesiny komórek i przenieść do dołka.
2. Czynność powtarzać dla wszystkich dołków testowych
3. Obejrzeć komórki pod mikroskopem – oznaczyć markerem dołki, w których liczba komórek wyraźnie mniejsza/większa (jeśli takie wystąpią)

Uwaga!

Każdorazowo przed wysiewem komórek do dołka zamieszać zawiesinę w falkonie