

Ćwiczenie 8:

Włókniny - cytotoksyczność

Wysiew komórek na materiał

Cytotoksyczność ekstraktów cz.1

Cytotoksyczność ekstraktów cz.1

Materiały:

- Płytki 96-dołkowa z wysianymi komórkami
- Sterylne materiały polimerowe
- Medium hodowlane
- Triton X

Wykonanie:

1. Obliczyć objętość medium jaką należy dodać tak, aby stosunek objętości medium do powierzchni próbki wynosił ok. $6\text{cm}^2:1\text{ml}$
2. Materiały po ostatnim płukaniu PBS, przełożyć do **nowej sterylnej** płytki (2 próbki na jeden wariant materiałowy)
3. Materiały zalać medium (obliczona objętość), przycisnąć insertami – ważne, żeby materiały były całe zanurzone.
4. Materiały umieścić w inkubatorze na okres 1h
5. W tym czasie przygotować kontrolę pozytywną do testów ekstraktów: 1% roztwór Triton X w medium hodowlanym (objętość końcowa roztworu: 1ml)
6. Wyjąć z inkubatora płytki testowe z wysianymi na poprzednich zajęciach komórkami i obejrzeć je pod mikroskopem
7. Oznaczyć ewentualne nieprawidłowości w morfologii komórek
8. Usunąć medium z dołków, komórki 2x przepłukać roztworem PBS.
9. Po zadanym czasie ekstrakcji ekstrakty odciągnąć z dołków i przenieść do falkonu 15ml
10. Dołki zalać odpowiednim roztworem ekstraktu/medium/roztworu z dodatkiem czynnika cytotoksycznego
11. Płytkę umieścić w inkubatorze na okres 72h

Pasaż komórek adherentnych

Materiały:

- butelka 75cm² z rosnącymi komórkami
- medium hodowlane
- PBS bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺
- 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 Ca²⁺ i Mg²⁺
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. Policzyc gęstość żywych komórek w hodowli oraz żywotność komórek w hodowli
10. Obliczyć objętość roztworu, którą należy dodać do zawiesiny aby uzyskać gęstość komórek = 1×10^5 kom/ml
11. Rozcieńczyć zawiesinę komórek do odpowiedniej objętości

Wysiew komórek na materiały

Materiały:

- sterylne materiały
- zawiesina komórek o zadanej gęstości
- suplementowane medium hodowlane

Wykonanie:

1. Sterylne materiały umieścić w płytce 24-dołkowej
2. Materiały zalać medium hodowlanym i inkubować w inkubatorze przez okres 15 minut
3. Po czasie inkubacji odciągnąć medium hodowlane i od razu dodać odpowiednią objętość zawiesiny komórkowej
4. Materiały umieścić w inkubatorze na okres 72h

Uwaga: nie dopuścić do wysuszenia materiałów.

Każdorazowo przed wysiewem komórek do dołka zamieszać zawiesinę w falkonie.

Wysiew komórek do płytek testowych

Materiały:

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

Wykonanie:

1. Pipetą automatyczną pobrać po 200 μ 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