

**Ćwiczenie 9:**

**Cytotoksyczność ekstraktów cz.2 – analiza XTT**

**Cytotoksyczność materiałów cz.2 - barwienie do obserwacji CLSM**

**Cytotoksyczność nanocząstek cz.1**

**Cytotoksyczność ekstraktów cz.2 – test XTT**

**Materiały:**

- XTT working solution
- PBS
- Płytki 96-dołkowe inkubowane z ekstraktami

**Wykonanie:**

1. Wyjąć płytki z komórkami inkubowanymi z ekstraktami, obejrzeć komórki pod mikroskopem, oznaczyć ewentualne nieprawidłowości w morfologii
2. Usunąć ekstrakty z dołków, komórki przepłukać PBS (1x)
1. Wykonać test XTT – zalać dołki roztworem XTT, inkubować w ciemności w 37st.C przez okres 3h
2. Odczytać absorbancję przy dł. fali 470nm i 650nm
3. Zapisać wyniki

### **Cytotoksyczność materiałów cz.2 - barwienie do obserwacji CLSM**

#### **Materiały:**

- Płytki 48-dołkowa z komórkami rosnącymi na powierzchni materiałów
- Roztwór paraformaldehydu
- Roztwór DAPI
- Roztwór Alexa
- Roztwór Triton
- PBS

#### **Wykonanie:**

1. Materiały polimerowe wraz z rosnącymi na ich powierzchni komórkami wyjąć z inkubatora
2. Wyjąć inserty, usunąć medium hodowlane, materiały delikatnie (!) przepłukać PBS (2x)

UWAGA: przy płukaniu postępować delikatnie, uważać, żeby materiały nie przekręciły się na drugą stronę (komórki rosną na górnej powierzchni materiału)

3. Materiały zalać roztworem PFA
4. Płytkę owinać parafilmem i inkubować w temperaturze pokojowej 15 minut
5. Płukanie PBS 4x5 min, RT, wytrząsarka
6. Permeabilizacja w 0,2% Triton X-100, 8 min, RT
7. Płukanie PBS 4x5min, wytrząsarka
8. Materiały zalać 100 ul roztworu Alexa, 1h, RT, **w ciemności**
9. Płukanie PBS 4x5min, RT, wytrząsarka, **w ciemności**
10. Materiały zalać 100 ul roztworu DAPI, 6 minut, RT, **w ciemności**
11. Płukanie PBS 4x5min, RT, wytrząsarka, **w ciemności**
12. Na szkiełko nakrywkowe (cienkie) nałożyć kroplę kleju utrwalającego z DAPI, na kropli umieścić materiały stroną z komórkami do kropli, przykryć drugim szkiełkiem nakrywkowym, zabezpieczyć lakierem do paznokci. Zawinąć w folię, trzymać w ciemności.

### **Cytotoksyczność nanocząstek cz.1**

#### **Materiały:**

Płytki 96-dołkowa z rosnącymi komórkami

Nanocząstki

#### **Wykonanie:**

1. Przygotować zawiesiny nanocząstek w medium hodowlanym w stężeniu :
1. Przygotować kontrolę pozytywną do testu cytotoksyczności: 1% roztwór Triton X w medium hodowlanym (objętość końcowa roztworu: 1ml)
2. Wyjąć z inkubatora płytki testowe z wysianymi na poprzednich zajęciach komórkami i obejrzyć je pod mikroskopem
3. Oznaczyć ewentualne nieprawidłowości w morfologii komórek
4. Usunąć medium z dołków, komórki 1x przepłukać roztworem PBS.
5. Dołki zalać odpowiednio: zawiesiną nanocząstek/medium/roztworem z dodatkiem czynnika cytotoksycznego
6. Płytkę umieścić w inkubatorze na okres 72h