Temat ćwiczenia: **Technika bankowania adherentnych linii komórkowych**

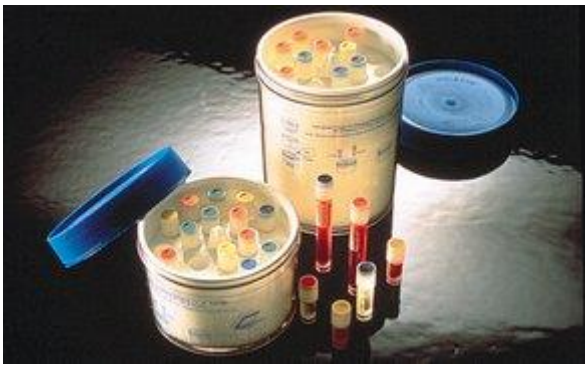
WSTĘP

Jedną z rutynowych metod laboratoryjnych stosowanych we współczesnej biologii jest długotrwałe przechowywanie żywych komórek w obniżonej temperaturze. Materiał biologiczny przechowujemy w temperaturach między (-79)°C, a (-196)°C. W zakresie tych temperatur procesy metaboliczne komórek ustają, przy jednoczesnym niewielkim uszkodzeniu samych komórek. Metoda ta jest szczególnie przydatna ponieważ:

- zapewnia stały dostęp do materiału biologicznego oraz pozwala na przerwanie pracy z danym rodzajem komórek na dowolny okres czasu (nawet na kilka lat)
- redukuje ryzyko kontaminacji krzyżowej (pomiędzy różnymi liniami komórkowymi), w przypadku posiadania w pracowni wielu różnych linii komórkowych,
- w przypadku linii komórkowych o określonej liczbie podziałów, zamrożona pula komórek o niskim pasażu, gwarantuje wykonywanie badań na komórkach o wysokiej sile proliferacyjnej i zawsze tym samym pasażu,
- zabezpiecza wyselekcjonowane linii komórkowe o często unikalnych właściwościach, przed utratą
- wpływa na obniżenie kosztów wynikających z ciągłego utrzymywania komórek w hodowli

Możliwość zamrażania komórek przyczyniła się także do stworzenie komercyjnych banków linii komórkowych. Najbardziej znanymi i największymi kolekcjami na świecie są: Europejska Kolekcja Linii Komórkowych – ECACC, (ang. European Collection of Animal Cell Culture) i Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych – ATCC (ang. American Type Culture Collection). Banki te zawierają wiele linii komórkowych pochodzących z tkanek prawidłowych oraz nowotworowych ponad 45 gatunków zwierząt oraz ludzi.

W trakcie zamrażania, komórki mogą zostać uszkodzone przez kryształki lodu, które powstają podczas obniżania temperatury. Zamrażanie musi być wystarczająco wolne aby mogła zajść dehydratacja, która zapobiega powstawaniu wewnątrzkomórkowych kryształków lodu. Z drugiej strony nie może być zbyt wolne, aby nie dopuścić do uszkodzenia komórek wynikających nadmiernej dehydratacji, mogącej spowodować wytrącanie się zagęszczonych składników cytozolu, wypadanie jonów, wysalanie białek, zmianę pH oraz wiele innych, niekorzystnych zjawisk. Optymalna prędkość obniżania temperatury w trakcie zamrażania wynosi dla większości typów komórek od 1 °C do 3°C na minutę.



Ryc. 1 Pojemniki do schładzania komórek podczas bankowania.

Warunki takie można najprościej uzyskać umieszczając ampułkę z komórkami w pudełku wypełnionym alkoholem izopropylowym w temperaturze -70°C na okres 4 godzin. Następnie, należy przenieść ampułkę do ciekłego azotu (dewary) w -196°C.

Ryc.2 Pojemniki do przechowywania komórek w ciekłym azocie.

Ponadto, w celu zminimalizowania uszkodzeń komórek w trakcie ich powolnego zamrażania niezbędne jest stosowanie substancji ochronnych, tzw. krioprotektantów. Dlatego podłoże do zamrażania komórek, oprócz medium odpowiedniego dla danej linii komórkowej, powinno zawierać krioprotektant DMSO (dimetylosulfotlenek) lub glicerol, w stężeniu końcowym wynoszącym od 5 do 10 % (v/v). Dodatkowo, w celu zwiększenia przeżywalności wrażliwych komórek w pożywce do mrożenia zwiększa się stężenie surowicy nawet do 95%.

Zamrażane komórki powinny mieć prawidłową morfologię i być wolne od zakażeń. Zamrażanie należy wykonywać przed osiągnięciem stanu konfluencji (tzw. hodowla semikonfluentna), ponieważ komórki znajdują się wtedy w logarytmicznej fazie wzrostu. Optymalna gęstość zamrażanej zawiesiny komórek powinna wynosić 10^6-10^7 komórek/ml.

Rozmrażanie powinno przebiegać możliwie jak najszybciej. Po wyjęciu z banku komórek ampułki umieszcza się w temperaturze 37°C przez z 3 – 5 minut. Zapobiega to mechanicznemu uszkodzeniu komórek związanego z zjawiskiem wtórnego rozrastania się kryształów lodu.

1. PRZEBIEG ĆWICZENIA

Przed przystąpieniem do wykonywania ćwiczeń z komórkami:

1. Załóż fartuch laboratoryjny;
2. Umyj ręce mydłem i płynem odkażającym;
3. W czasie pracy pamiętaj o rękawiczkach lateksowe;
4. Włącz komorę laminarną i przygotuj miejsce do pracy (czyszczenie powierzchni 70% alkoholem);

Przed przystąpieniem do pracy przygotuj:

1. Semikonfluentną hodowlę komórek OVCAR-3 – znajduje się w inkubatorze hodowlanym;
2. Probówki do zamrażania w ciekłym azocie;
3. Sterylne pipety;
4. Pipety automatyczne;
5. Probówki wirownicze;
6. Zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (PBS) (bez jonów wapnia i magnezu);
7. 0,25 % roztwór trypsyny z dodatkiem 0,53 mM EDTA;
8. Podłoże hodowlane RPMI1640
9. Płodową surowicę cielęca (FBS)
10. Antybiotyki (penicylina/streptomycyna)
11. Podłoże do zamrażania komórek (RPMI1640 zawierające 10% FBS);
12. Pojemnik na odpady;

Wykonanie ćwiczenia:

1. Ogrzać roztwór trypsyny, podłoże hodowlane oraz PBS do temperatury pokojowej;
2. Po obejrzeniu hodowli komórkowej pod mikroskopem świetlnym, za pomocą sterylnej pipety usunąć zużyte podłoże;
3. Hodowlę przepłukać trzykrotnie:
   i. dla hodowli w butelce 25cm^2 - 3 ml roztworu PBS bez jonów wapnia i magnezu;
   ii. dla hodowli w butelce 75cm^2 - 6 ml roztworu PBS bez jonów wapnia i magnezu;
4. Usunąć PBS, a do naczynia hodowlanego dodać 1 ml roztworu trypsyny z EDTA;
5. Hodowlę należy wstawić do cieplarki i inkubować w temperaturze 37°C do czasu odklejenia się komórek od dna naczynia (około 1-5 minuty);
6. Po odklejeniu komórki zawiesić w 5 ml pożywki hodowlanej (RPMI 1640 +10% FBS);
7. Przenieść całą objętość do probówki wirowniczej i wirować przez 5 min. przy 1000 obr./min.;
8. Usunąć supernatant;
9. Komórki zawiesić w 1ml podłoża hodowlanego (RPMI 1640 +10% FBS);

10. Policzyć gęstość zawiesiny komórkowej w komorze Burkera, określić przy pomocy błękitu trypanu % żywych komórek (w ependorfie przygotować 10 µl roztworu błękitu trypanu i 10µl zawiesiny komórek, następnie wprowadzić 10 µl wybarwionej zawiesiny komórek do komory Burkera)
11. Odwirować komórki przez 5 min. przy 1000 obr./min.;
12. Zawiesić komórki w medium do zamrażania komórek: gęstość zamrażanej zawiesiny komórek powinna wynosić 10^6 komórek/ml.
13. Całość przenieść do probówki do zamrażania w ciekłym azocie;
14. Opisać probówkę: data, nazwa linii komórkowej, numer pasażu, nazwisko wykonującego;
15. Włożyć probówki z zawiesiną komórkową do zamrażarki do (– 86°C) w pudełku z propanolem na 4 godziny;
16. Przenieść probówki do ciekłego azotu;

2. LITERATURA

Stokłosowa S., (red.), Hodowla komórek i tkanek: praca zbiorowa, PWN, Warszawa 2004.

Freshney R.I., Culture of Animal Cells, Wiley-Liss, 2005.

Fundamental techniques in cell culture. A laboratory handbook, SIGMA, 2002.

3. EFEKTY KSZTAŁCENIA

Co student powinien umieć

- powinien potrafić zaplanować przeprowadzenie badania i zaplanować potrzebny sprzęt używany w trakcie doświadczenia;
- umieć rzetelnie i starannie prowadzić zapis prac laboratoryjnych;
- zamrozić komórki o określonej gęstości;
- ocenić stan hodowli w mikroskopie;