



2004-2006 m. Bendrojo programavimo dokumento 2 prioriteto „Žmogiškųjų išteklių plėtra“ 4 priemonė „Mokymosi visą gyvenimą sąlygų plėtra“

Projekto sutarties numeris: **ESF/2004/2.4.0-K01-160/SUT-261**

Projekto pavadinimas: **Inovatyvūs mokymosi metodai ir naujausios technologijos gamtos mokslų bakalauro rengimui**

BIO 314. BIOLOGINIŲ TYRIMŲ METODOLOGIJA

Laboratorinis darbas

DARBO LAŠTELIŲ KULTŪRŲ LABORATORIJOJE PAGRINDAI

DARBO TIKSLAS:

Susipažinti su darbo ląstelių kultūrų laboratorijoje pagrindais. Išmokti pakelti ląsteles ir pasidaryti norimos koncentracijos ląstelių suspensiją.

DARBO UŽDUOTYS:

1. Susipažinti su darbo ląstelių kultūrų laboratorijoje aseptinėmis sąlygomis taisyklėmis.
2. Išmokti pakelti ant flakono dugno prisitvirtinusias augančias ląsteles.
3. Pasidaryti norimos koncentracijos ląstelių suspensiją.

TEORIJA:

MH-22A ląstelės yra pelių kepenų karcinomos ląstelių linija. Ji gauta iš pelių standžiosios hepatomos 22A formos. Šios linijos ląsteles išskiepėjus į C3HA linijos peles susiformuoja transplantuojami augliai. MH-22A ląstelių kultūrą galima palaikyti tiek kultivuojant *in vitro* sąlygomis, tiek jas išskiepįjant pelėms *in vivo* sąlygomis. MH-22A ląstelės skirtos eksperimentinei auglių terapijai *in vitro* ir *in vivo*. Šių ląstelių kultūra yra palaikoma VDU Biologijos katedros biofizikinių tyrimų laboratorijoje *in vitro*.

Pelių hepatomos ląstelių linija MH-22A auginama monosluoksniu augimo terpėje steriliuose flakonėliuose. Flakonėliai su ląstelių kultūra laikomi inkubatoriuje, kurio pagalba sudaroma 37 °C drėgna, 5% CO₂ prisotinta aplinka. Flakonėlio dangtelis paliekamas prasuktas tam, kad į flakonėlio vidų galėtų patekti CO₂ reikalingas augimo terpės pH pusiausvyros palaikymui.

Prieš persėjimą ar eksperimentą įvertinamas sėjimui skirtas ląstelių monosluoksnius, terpės spalva ir drumstumas. Augant ląstelių kultūrai stebimas terpės spalvos pasikeitimas iš rausvos į geltoną, nes reaguoja terpėje esantis indikatorius – fenolio raudonasis, kuris parodo terpės parūgštėjimą. Galimas terpės padrumstėjimas, kurį sukelia nuo substrato nuslenkančios ląstelės arba infekcija. Ląstelių monosluoksnius esantis flakonėlyje apžiūrimas invertuotu mikroskopu Eclipse TS 100.

Siekiant apsaugoti auginamą ląstelių kultūrą nuo infekcijos dirbama steriliomis sąlygomis vertikalaus srauto laminare ir naudojamos sterilios priemonės.

Šių laboratorinių darbų metu išmoksime manipuluoti MH-22A ląstelių kultūra steriliomis *in vitro* sąlygomis.

DARBO PRIEMONĖS:

1. Vertikalaus srauto laminaras (BIOAIR instruments, aura vertical S.D.4, Italija)
2. Inkubatorius su vandens marškinėliais IR AutoFlow Water-Jacketed Incubator NU-2500E (NuAire, Inc., Plymouth, JAV)
3. Neubauerio hemocitometras (Neubauer improved, Heinz Herenz Medizinalbedarf, Hamburgas, Vokietija)
3. Mikroskopas Eclipse TS 100 (Nikon, Tokijus, Japonija)
4. Centrifuga (OPN-3YXL4, Rusija)
5. Automatinės pipetės Eppendorf, 10 µl, 200 µl, 1 ml.

6. Sterilios vienkartinės priemonės: 25 cm² ploto (60-75 ml tūrio) flakonai (Greiner Bio-One, GmbH, Frickenhausen, Vokietija), centrifuginiai mėgintuvėliai (15 ml ir Eppendorf 1,5 ml) ir antgaliai automatinėms pipetėms.

MEDŽIAGOS, REAGENTAI, TIRPALAI:

1. Pelių hepatomos MH-22A ląstelės

2. Ląstelių augimo terpė (paruošta iš: Dulbecco's modifikuotos Eagle's terpės - DMEM (Produktas Nr. D5546, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Vokietija), 10% embrioninio jaučio serumo - FBS (F7524, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Vokietija), 1% L – Glutamino tirpalo (G7513, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Vokietija), 100 U/ml penicilino ir 100 µl streptomicino antibiotikų (P0781, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Vokietija).

3. Minimum essential medium Eagle (M8167, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Vokietija)

4. 0,25% tripsino-0,02% EDTA tirpalas (Produktas Nr. T4049, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Vokietija)

5. Tripano mėlio dažų tirpalas 0,4% (T-8154, Sigma-Aldrich co Ltd., Irvine, UK)

6. Etanolis 70% (AB Stumbras, Kaunas, Lietuva).

PASIRUOŠIMAS DARBUI IR SVARBIOS PASTABOS DIRBANT ASEPTINĖMIS SĄLYGOMIS

Būtina kruopščiai nusiplauti rankas. Dirbama su steriliomis pirštinėmis. Plaukai turi būti susegti už nugaros. Darbui su ląstelėmis naudojamo chalato negalima naudoti už laboratorijos ribų.

Prieš dedant butelius su terpėmis ar kitus nesterilius daiktus į inkubatorių ar laminarą reikia juos nuvalyti 70% etanoliu.

Jei flakono dangtelis yra be filtro, inkubatoriuje jis paliekamas prasuktas tam, kad į flakono vidų galėtų patekti CO₂, reikalingas augimo terpės pH pusiausvyros palaikymui. Prieš išimant flakoną, kurio dangtelis yra be filtro, iš inkubatoriaus, dangtelis sandariai užsukamas!

Ląstelių pakėlimas atliekamas vertikalaus srauto laminare (1 pav). Prieš tai jis 10 min sterilizuojamas UV spinduliuote. Būtinai prieš pakeliant laminaro apsauginį stiklą įjungiamas oro srautas.

Tirpalai prieš naudojant sušildomi (inkubatoriuje 20-30 min). Iš inkubatoriaus išimami indai turi būti nuvalomi spiritu. Sterilių indų (buteliukų su terpėmis, petri lėkštelių, ependorfinių ar centrifuginių mėgintuvėlių) dangtelių negalima nei atidaryti nei nešti jau atidarytų už laminaro ribų.

Sterilių indų (buteliukų su terpėmis, petri lėkštelių, ependorfinių mėgintuvėlių) viršutinių dangtelių negalima padėti ant kokio nors paviršiaus, tame tarpe ir laminaro darbinio paviršiaus, krašteliais į apačią. Visus dangtelius galima dėti tik krašteliais į viršų (,žemyn galva/aukštyn kojom‘).

Negalima už laminaro ribų išnešti automatinę pipetę sterilaus antgalio. Dirbant, automatinę pipetę reikia laikyti vertikaliai. Negalima pipetmano su antgaliu paversti antgaliu į viršų, kad neužteršti pačios automatinės pipetės.



1 pav. Vertikalaus srauto laminaras paruoštas darbui. Viduje matomos visos reikalingos priemonės reikalingos šiam laboratoriniam darbui atlikti.

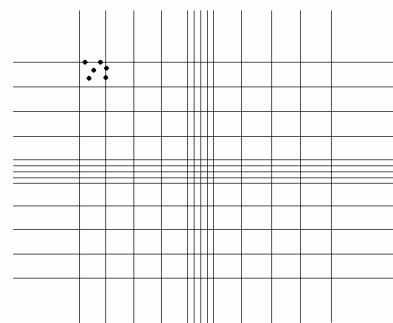
DARBO EIGA:

Ląstelių pakėlimas

Nupilama augimo terpė. Ląstelių sluoksnis užpilamas 1 ml tripsino/EDTA tirpalo (Sigma), kad nuplauti seną terpę ir žuvusias ląsteles. Jis iškart išpilamas. Tuomet ląstelių sluoksnis užpilamas 2 ml tripsino/EDTA tirpalu ir paliekamas inkubatoriuje 2 – 10 min kol ląstelių monosluoksnis pilnai atsiskiria nuo flakonėlio sienelės. Po to ląstelių suspensija papildoma 2 ml augimo terpės (tiek kiek dėta tripsino) tam, kad sustabdytų tripsino veiklą. Viskas perpilama į sterilų 15 ml talpos mėgintuvėlį ir centrifuguojama 5 min 1000 aps/min greičiu centrifugoje (Rusija). Supernatantas nupilamas, o nusėdusios ląstelės suspenduojamos 1 ml Minimum essential medium Eagle. Tokiu būdu paruošiama ląstelių suspensija, kurios tankis - X ląstelių/ml. Ląstelių tankis X apskaičiuojamas Neubauer hemocitometro pagalba.

Ląstelių skaičiavimas Neubauer hemocitometro kameroje

Į mėgintuvėlį dedama 10 μ l terpės su ląstelėmis bei 90 μ l tripsino mėlio dažų (dažą reikia imti nuo viršaus, kad būtų mažiau šiukšlių) ir gerai sumaišoma. Paruošiamas Neubauer hemocitometras: ant jo papučiamas oro ir atsargiai prispaudžiamas dengiamasis stiklelis, kol pasirodo Niutono žiedai (matomos vaivorykštės spalvų juostos). Lašas dažų su ląstelėmis paskirstomas Neubauer kameroje, kurioje per mikroskopą ląstelės suskaičiuojamos. Ląstelės skaičiuojamos visuose dideliuose kameros kvadratėliuose (jų yra 64). Smarkiai nusidažiusių mėlynai ląstelių skaičiuoti nereikia. Kvadratėlyje skaičiuojamos tik ląstelės esančios kvadratėlio viduje, bei ant viršutinės ir dešinės kraštinės (2 pav.).



2 pav. Shematinis Neubauer kameros vaizdas matomas pro mikroskopą. Vienaame kameros kvadratėlyje pavaizduotos ląstelės, kurios tame kvadratėlyje turi būti suskaičiuotos (t.y. ląstelės esančios kvadratėlio viduje, bei ant viršutinės ir dešinės kraštinės, o ląstelės esančios ant kitų kvadratėlio kraštinių neskaičiuojamos).

Koncentracijos apskaičiavimas

Gautas ląstelių skaičius dalinamas iš didelių laukelių, kurių kiekviename yra po 16 didelių kvadratėlių, skaičiaus (4) ir dauginamas iš 10^4 , bei dar dauginama iš 10, nes ląstelės skiestos 10 kartų dedant į dažus. Gautasis skaičius ir parodo ląstelių skaičių mililitre.

Pvz .: suskaičiuota 240 ląstelių.

$$240 \text{ ląstelių} / 4 \text{ laukeliai} = 60 \text{ ląstelių}$$

$$60 * 10^4 * 10 = 60 * 10^5 = 6 * 10^6 \text{ ląstelių/ml.}$$

Jeigu reikia kad būtų $2 * 10^6$ ląstelių/ml:

$$6 * 10^6 \text{ ląstelių} - X \text{ ml}$$

$$2 * 10^6 \text{ ląstelių} - 1 \text{ ml}$$

$$X = 3 \text{ ml.}$$

Tai reiškia, kad į mėgintuvėlį su ląstelėmis reikia įpilti dar 2 ml terpės (1 ml jau yra).

Darbo vietos sutvarkymas

Baigus darbą, sutvarkoma darbo vieta. Terpės padedamos į šaldytuvą. Automatinės pipetės nuvalomos spiritu ir padedamos į stovėlį laminare. Panaudoti indeliai, antgaliai ir kitos atliekos surenkamos, saugojamos ir likviduojamos bei dezinfekuojamos ir transportuojamos laikantis nustatytų reikalavimų. Laminaras sutvarkomas, kruopščiai nuvalomas distiliuotu vandeniu ir po to 70% spiritu.

Neubauer kamera nuplaunama distiliuotu vandeniu (po srove stiklelis atšoka pats) ir po to nuvaloma spiritu.

KONTROLINIAI KLAUSIMAI:

1. Darbo steriliomis sąlygomis pagrindai.
2. Įvairių ląstelių tankių suspensijose apskaičiavimas.

LITERATŪRA:

1. Freshney, I. R. (2000) Culture of animal cells: a manual of basic techniques, John Wiley & Sons, Inc., New York.