

Ćwiczenie 9: „Podstawy hodowli pierwotnych komórek zwierzęcych”

Prowadzący:

dr hab. Małgorzata Duda, mgr Kamil Wartalski

Zakład Endokrynologii, maja.duda@uj.edu.pl

1. Wstęp:

Celem ćwiczenia 8, realizowanego w ramach kursu Fizjologiczne Techniki badań WBNZ-126, jest zapoznanie studentów z techniką zakładania hodowli komórkowych wyprowadzonych z zawiesiny komórek otrzymanych w wyniku izolacji enzymatycznej z tkanek zwierzęcych. Równocześnie student zapozna się z zasadami pracy w warunkach jałowych.

2. Założenie hodowli pierwotnej fibroblastów (1 stanowisko)

Narządem najczęściej stosowanym do zakładania hodowli pierwotnej fibroblastów są nerki. Jedną z najważniejszych cech komórek pochodzących z tego narządu jest fakt, że zachowują one prawidłowy wygląd, dobrze rosną i proliferują. Szybko jednak tracą większość ze swoich swoisto- narządowych funkcji (w czasie krótszym niż 1 generacja). Zjawisko to zachodzi nawet wtedy, gdy komórki te w hodowli układają się w grupy przypominające kanaliki nerkowe. Fibroblasty są komórkami o kształcie wrzecionowatym bądź gwiaździstym, tworzą długie i cienkie wypustki cytoplazmatyczne. Powstają z komórek tkanki mezenchymatycznej. Formy spoczynkowe fibroblastów charakteryzują się zmniejszoną ilością cytoplazmy i nazwane są fibrocytami.

Sprzęt	Materiały i odczynniki
- wirówka z chłodzeniem; - mieszadło z grzaniem; - komora z laminarnym przepływem powietrza; - inkubator z dopływem CO₂; - pipety; - plastiki hodowlane 4-dółkowe (Nunc)	- Enzymy: roztwór trypsyny – gotowy do użycia po rozmrożeniu (Invitrogen), DNA-za (ROCHE). - Bufor fosforanowy (BioWest)) z jonami wapnia i magnezu: - 12 ml buforu fosforanowego - 0,30 ml roztworu antybiotyków (AAS, Immuniq) - Bufor fosforanowy (BioWest) bez jonów wapnia i magnezu: - 8 ml buforu fosforanowego - 0,2 ml roztworu antybiotyków (AAS, Immuniq) - Płyn hodowlany: - 50 ml RPMI (Sigma) - 5 ml surowicy płodowej (FBS, Invitrogen) - 0,2 ml roztworu antybiotyków (AAS, Immuniq) - Płyn jałowiący: - 8 ml buforu fosforanowego (BioWest) bez jonów wapnia i magnezu - 0,8 ml surowicy płodowej (FBS, Invitrogen) - 0,2 ml roztworu antybiotyków (AAS, Immuniq)

2a. Wykonanie ćwiczenia

Przed przystąpieniem do wykonywania ćwiczeń z komórkami:

1. Załóż fartuch laboratoryjny;
2. Przygotuj miejsce do pracy - oczyść powierzchnię 70% alkoholem lub Aerodesinem;
3. Umyj ręce mydłem i płynem odkażającym;
4. W czasie pracy w komorze laminarnej zakładaj rękawiczki lateksowe;

Przygotowanie komórek:

1. Przeplukać wypreparowane nerki buforem fosforanowym bez jonów wapnia i magnezu (roztwór 3).
2. Wypłukane tkanki przenieść do kolby i zanurzyć w płynie jałowiącym na 10 minut.
3. Rozdrobnić wypreparowane nerki nożyczkami na szalce na drobne kawałki.
4. Ponownie przeplukać buforem fosforanowym bez jonów (roztwór 3).
5. Tkanek przenieść do kolby trypsynizacyjnej, zalać 8 ml ogrzanej (37°C) na mieszadle magnetycznym trypsyny.
5. Całość umieścić na mieszadle magnetycznym ustawionym na 37°C (10 min.).
6. Po 10 minutach pierwszą porcję zawiesiny komórek odlać przy użyciu sterylnych pipet

(kolba wirownicza, na lodzie)

7. Tkanę ponownie zalać 8 ml trypsyny i po 10 minutach trawienia zlać zawiesinę do sterylnych probówek wirownicznych.
8. Czynność z punktu 7 powtórzyć.
10. Dopełnić do 15 ml buforem fosforanowym z jonami (roztwór 2).
11. Wirować przez 10 minut przy obrotach 700-900/min.
12. Odciągnąć supernatant jałowymi pipetami. Do osadu komórkowego ponownie dodać 5 ml buforu (roztwór 2).
13. Przenieść zawartość probówek na filtry nylonowe (Nitex) i przesączyć do probówki, dopełnić płyn do 15 ml buforem z jonami.
14. Wirować przez 10 minut przy obrotach 700-900/ min.
15. Po ostatnim usunięciu supernatantu, wlać do probówek wirownicznych 5 ml płynu hodowlanego (roztwór 4) i rozbić osad komórkowy jałową pipetką.
16. Policzyc liczbę komórek w 1 ml zawiesiny w komorze Burkera (wzór: $c = n \times 250 \times 1\,000$)
 n = średnia ilość komórek (5 dużych kwadratów w obu siatkach)
Optymalne inokulum - $3-5 \times 10^5$ kom/ml
17. Wstawić hodowlę do inkubatora (37°C, 5% CO₂).

3. Założenie hodowli pierwotnej komórek szyszynki (1 stanowisko)

Hodowle pierwotne komórek szyszynki znajdują zastosowanie w badaniach procesów rozwojowych szyszynki i różnicowania się komórek. Hodowle pinealocytów wykorzystywane są w badaniach cytofizjologicznych dotyczących adrenergicznej i peptyderygicznej regulacji sekrecji melatoniny.

Przygotowanie komórek:

1. Bezpośrednio po ustaniu akcji serca i zaniku odruchów mięśniowych usunąć skórę z głowy, za pomocą narzędzi otworzyć czaszkę i wyizolować szyszynkę. Jedna szyszynka szczura jest źródłem ok. 5×10^5 komórek.
2. Dwie szyszynki, po rozdrobnieniu, przenieść do naczynia z roztworem trypsyny (0,25%) i DN-azy (2 mg/ml). Całość umieścić na mieszadle magnetycznym ustawionym na 37°C (30 min.)
3. Zebrać zawiesinę z nad fragmentów szyszynek (sterylna pipetka) do probówki wirownicznej, pozostałą tkankę przepłukać Buforem fosforanowym bez jonów. Płyn po płukaniu dodać do zebranej wcześniej zawiesiny.
3. Odwirować zawiesinę (1000 obrotów/ 5 minut).
4. Odwirowane komórki zawiesić w niewielkiej ilości medium hodowlanego (1 ml) i umieścić w inkubatorze.
5. Pozostałe fragmenty gruczołów ponownie zalać roztworem trypsyny (2.5 mg/ml) i DNA-zy i ponownie umieścić na mieszadle magnetycznym ustawionym na 37°C (15 min.).
6. Tkanę przetrzeć (bagietka szklana) przez sitko nylonowe (średnica oczek 70-200µm).
7. Uzyskaną zawiesinę odwirować (1000 obrotów/ 5 minut).
8. Supernatant zlać, komórki zawiesić w medium hodowlanym.
9. Połączyć zawiesiny uzyskane podczas pierwszego i drugiego trawienia enzymatycznego, odwirować i zawiesić w 4 ml medium hodowlanego.
10. Policzyc liczbę komórek w 1 ml zawiesiny w komorze Burkera (wzór: $c = n \times 250 \times 1\,000$)
 n = średnia ilość komórek (5 dużych kwadratów w obu siatkach)
Optymalne inokulum - $0.5-3.0 \times 10^5$ kom/ml
11. Wstawić hodowlę do inkubatora (37°C, 5% CO₂).

4. Wymagania:

Student powinien znać najważniejsze zasady techniki hodowli komórek i tkanek, znać jej zastosowanie zarówno w badaniach naukowych, jak i praktyce klinicznej. Student powinien umieć zdefiniować podstawowe typy kultur *in vitro* i opisać uwarunkowania podstawowych procesów morfogenetycznych i fizjologicznych zachodzących w tych kulturach. Student

powinien umieć wykonać zadania laboratoryjne w zakresie zakładania i prowadzenia pierwotnych zwierzęcych kultur *in vitro*.

5. Literatura dodatkowa

- S. Stokłosowa; Hodowla komórek i tkanek, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2006
- RI Freshney Culture of Animal Cells- A manual of Basic Technique- Wiley-Liss Inc, New York, 1994.