

Základy kultivace buněk – cvičení (EMKB0311c)

Jméno a příjmení:		
Číslo skupiny:		
Studijní obor:		

DEN 1

Náplň cvičení:

- Seznámení se s laboratoří, BOZP, specifika práce s GMO, aseptická práce
- Pipetování přesných objemů
- Vážení za použití analytických vah
- Ředění směsí
- Základy aseptické práce v laboratoři
- Příprava medií (DMEM F12, RPMI):
 - Vážení
 - Ředění
 - Úprava pH
 - Antibiotika

Teoretická příprava

Pipetování

Pipetování pomocí automatické pipety slouží k nasátí přesných objemů kapalin a jejich vypuštění do zvolené nádoby při nezměněném objemu.

Funkce automatické pipety:

Tlačítko automatické pipety má tři polohy. V klidu (výchozí poloha) je tlačítko v nejvyšší pozici a lze jej postupně stlačit ke kalibrační záračce (2. poloha). Pro přímé pipetování při nasávání tekutin nejdříve stlačíme píst do 1. polohy a ponoříme špičku pipety do kapaliny. Uvolněním pístu do výchozí polohy vzniká podtlak, který umožňuje nasátí příslušného objemu kapaliny. Pro vypuštění kapaliny stlačíme píst do 2. polohy, dojde tak k úplnému vypuštění celého objemu nasaté kapaliny.



Výchozí poloha



1. poloha



2. poloha

Pro nastavení požadovaného objemu: Nastavíme pipetovací píst do výchozí polohy a pomocí otáčecího mechanismu navolíme požadovaný objem na číselníku. Na některých pipetách je potřeba zmáčkнуть pojistku chránící před nechtěným otočením pístu.

V rámci pipetování existují tři základní techniky:

- **Přímá technika** pipetování doporučena pro vodné roztoky jako pufrů, zředěné kyseliny nebo zásady (pipetování reagens do roztoků).

Klidová pozice	1	2	3	4
První pozice	↓	↑	↓	↑
Druhá pozice			↓	↑

- **Repetitivní technika** pipetování je doporučena pro opakované dávkování stejného objemu (přidávání do zkumavek nebo na destičky)

Klidová pozice	1	2	3	4
První pozice	↓	↑	↓	↑
Druhá pozice	↓	↑		

- **Reverzní technika** pipetování se doporučuje pro pipetování vzorků, které se nepřidávají nebo nemíchají s jinými roztoky. Tato technika předchází riziku tvorby pěny a bublin a využívá se tedy pro pipetování viskózních roztoků a roztoků s tendencí pěnit.

Klidová pozice	1	2	3	4	5
První pozice	↓	↑	↓		↑
Druhá pozice	↓	↑		↑	↑

Postup pipetování (přímá technika):

1. Nasadíte na automatickou pipetu špičku.
2. Stisknete píst do první polohy.
3. Ponoříte špičku cca 2 mm pod hladinu pipetované kapaliny.
4. Pomalů uvolníte píst až do výchozí polohy (pozor na vznik bublin ve špičce).
5. Nasátou kapalinu pipetujeme do vybrané nádoby postupným stisknutím pístu do první a následně druhé polohy.
6. Stisknutím tlačítka odstraníme špičku do odpadní nádoby (v závislosti na typu pipety speciální tlačítka, nebo další poloha hlavního tlačítka).

Vážení

Princip metody vážení na vahách

Tíha, působící na miskou vah je převedena na elektrickou veličinu (nejčastěji je měřen elektrický odpor polovodičového článku ve vahách způsobený zatížením misky vah)

Typy laboratorních vah:

- **předvážky** – váhy s větším rozsahem měřených hodnot (desítky gramů až kilogramy) a nižší přesností. Na předvážkách si měřené množství připravíme a v případě potřeby jej pak dovážíme na přesných analytických vahách
- **váhy přesné** – určitý mezistupeň mezi předvážkami a váhami analytickými
- **váhy analytické** – kvalitní váhy s velkou přesností na cca 1/10000 měřené hmotnosti

Postup vážení:

1. Proveďte se kontrola vah, tj. kontrola čistoty vah a kontrola vyvážení podle libely. Pro případné čištění se používá štětec. Vyvážení se provádí seřazení polohy vah pomocí otáčení matic na podstavci vah.
2. Zaznamenají se údaje o váze, tj. typ, váživost a přesnost.
3. Po zapojení do proudu a spuštění vah se zkontroluje správnost nulové polohy a počet desetinných míst, na které váha váží.
4. Vážení se naváží přímým způsobem za použití funkce TARA.

ÚKOL: OPAKOVANÉ PIPETOVÁNÍ PŘESNÉHO OBJEMU

Pomůcky: zkumavka (0,2 ml; 1,5 ml; 15 ml), H₂O, váhy laboratorní, váhy analytické, pipeta 0,1 ml, 1 ml a 10 ml, příslušné špičky na pipety.

Opakovaně 5× napipetuj do příslušných zkumavek **0,01 ml, 0,5 ml 7 ml** vody a zvaž.

Urči směrodatnou odchylku.

$$s = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

	Měření 1.	Měření 2.	Měření 3.	Měření 4.	Měření 5.	Průměr	Rozptyl	Směrod. Odch.
0,01 ml								
0,5 ml								
7 ml								

Pufry

Kritéria pro výběr vhodného pufru při biologickém výzkumu

V současné době je známa celá škála pufrů, které jsou vhodné pro různé biologické systémy. Nicméně povědomost o vhodnosti/nevhodnosti pufrů pro biologické experimenty není tak stará a sahá teprve do roku 1966. Tehdy prof. Norman Good z Michigan State University publikoval práci, kde představil kritéria vhodných pufrů a publikoval 20 různých pufrů, které těmto kritériím odpovídají.

Kritéria vhodnosti pufru dle Gooda:

- **pKa (disociační konstanta)** mezi 6-8. pKa pufru by mělo být mezi 6-8, protože většina biochemických experimentů vyžaduje rozsah pH 6-8.
- **Toxicita:** Pufr nesmí být v daném biologickém systému toxický.
- **Rozpustnost pufru ve vodě:** Pufr by měl být vysoce rozpustný ve vodě.
- **Omezená permeabilita biologickými membránami:** Významná prostupnost pufru biologickými membránami vede k disproporční akumulaci pufru v subcelulárních prostorech. Biologické membrány nejsou permeabilní pro obojetné pufry (tj. pufry, které nesou pozitivní a negativní náboje na různých atomech molekuly, např. MOPS a HEPES).
- **Inertnost:** Pufr nesmí ovlivňovat studované biochemické reakce a interagovat s kritickými reakčními komponentami. Příklad: citrát je chelátorem vápníku, tudíž nelze citrátové pufry využít při reakcích, kde je jednou z komponent vápník. Dalším příkladem jsou aminové skupiny v Trisu, které reagují s DEPC (diethyl pyrokarbonát) využívaným při inaktivaci RNáz. Obdobně s DEPC reaguje HEPES. Proto v pufrech Tris a HEPES nelze použít působení DEPC.
- **Minimální vliv koncentrace a teploty na disociaci:** To znamená, že při ředění zásobního pufru by nemělo docházet k výrazným změnám pH pufru.
- **Chemická stabilita:** Pufry by měly být při experimentálních podmínkách stabilní.
- **Absorbance:** Pufr by neměl výrazně absorbovat UV při vlnových délkách, které jsou využívány např. pro spektrofotometrické vyhodnocování vzorku.

Příklady pufrů: HEPES, PIPES, fosfátový pufr (PBS), směs kyseliny octové a octanu sodného.

Kultivační médium

Toto médium se svým chemickým složením a fyzikálními vlastnostmi snaží co nejvíce přiblížit přirozenému prostředí v těle (*in vivo*), tedy tělním tekutinám (lymfě, krevní plazmě, mozkomíšnímu moku atd.). Musí se přísně kontrolovat koncentrace solí a organických živin, hodnota pH, teplota prostředí, ve kterém se vzorek vyvíjí, a mnoho dalších faktorů. Velký důraz se musí klást na sterilitu používaných nástrojů, aby nedošlo ke kontaminaci dané kultury.

Častou součástí živného média je sérum (fetální bovinní sérum), které iniciuje buňky k dělení, a tedy i růst celé kultury (dnes už jsou k dispozici i média nevyžadující doplněk séra). Další součástí tohoto média jsou antibiotika, aby se předcházelo infekci, a tedy i zániku celé kultury.

ÚKOL: PŘÍPRAVA 50 ml KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ M1 A PB1 (Proved' a zapiš)

Pomůcky: kádinky, destilovaná voda, váhy laboratorní, pipeta 1 ml a 10 ml, příslušné špičky na pipety, pH metr, DMEM/F12, NaHCO₃, FBS inaktivované, Pen/Strep, RPMI 1640, laminární box, zkumavky 50 ml, injekční stříkačky 20 ml, filtry 0,2 µm.

M1 (kultivace mesenchymálních kmenových buněk):

- DMEM/F12: na přípravu 25 ml média navážíme 0,3 g práškového média DMEM/F12 + 0,1 g NaHCO₃, doplníme destilovanou vodou na objem cca 20 ml, roztok média necháme rozpustit, po změření pH dorovnááme hodnotu pH na 7-7,2. Doplníme objem média na 22,5 ml.
- FBS (10%): Přidáme 2,5 ml FBS do roztoku média.
- Pen/Strep (1%): Přidáme 250 µl antibiotika Pen/Strep.

PB1 (kultivace mononukleárních buněk periferní krve)

- RPMI 1640: na 25 ml navážíme 0,26 g média + 0,1 g NaHCO₃, doplníme vodou na objem cca 20 ml, roztok média necháme rozpustit, po změření pH dorovnááme hodnotu pH na 7-7,2. Doplníme objem média na 22,5 ml.
- FBS (10%): Přidáme 2,5 ml FBS do roztoku média.
- Pen/Strep (1%): Přidáme 250 µl antibiotika Pen/Strep.

Navážení, ředění vodou a úprava pH probíhá standardně v laboratoři. Přidání FBS a antibiotik probíhá v laminárním boxu za dodržování základů aseptické práce. Po namíchání obou médií filtrujeme média pomocí injekční stříkačky a 0,2 µm filtrů do nových popsaných 50 ml zkumavek (Typ média, skupina, datum).