

Základy kultivace buněk – cvičení (EMKB0311c)

Jméno a příjmení:		
Číslo skupiny:		
Studijní obor:		

DEN 3

Náplň cvičení:

- Výměna média přisedlých buněk
- Stanovení konfluency přisedlých buněk, focení
- Rozmrazení suspenzních buněk
- Kultivace rozmrazených buněk
- Počítání buněk
- Příprava skel pro fixaci buněk

Teoretická příprava

Fáze růstu buněčné kultury:

A) **statická fáze** (lag): příprava na buněčné dělení

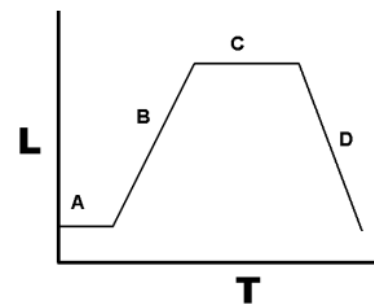
B) **exponenciální fáze** (log): intenzivní množení buněk do vyčerpání živin

C) **stacionární fáze** (plató): počet buněk se nemění, počátek akumulace toxických produktů

D) **fáze odumírání** T (osa x) = čas L (osa y) = počet buněk v kultuře

Při kultivaci snaha o udržení log fáze (exponenciální nárůst počtu buněk), při přílišném nárůstu → kontaktní inhibice – zastavení dělení – před dosažením plató fáze se kultura naředí a nasadí do nových kultivačních nádob v takové hustotě, aby rostla opět exponenciálně.

Konfluence = stav, kdy je vytvořena souvislá vrstva buněk (monolayer), které se vzájemně dotýkají



T (osa x)=čas

L (osa y)=počet buněk v kultuře

DOUBLING TIME

Závisí na vstupní koncentraci buněk, výstupní koncentraci buněk a době kultivace. Vyjadřuje dobu, za kterou se zdvojnásobí počet buněk. Udává nám informaci o rychlosti růstu.

$$DoublingTime = \frac{duration * \log(2)}{\log(FinalConcentration) - \log(InitialConcentration)}$$

<https://www.doubling-time.com/compute.php>

ÚKOL:

- **Výměna média přisedlých buněk.**
- **Stanovení konfluence přisedlých buněk, focení.**
- **Rozmrazení suspenzních buněk (obdoba dne 2).**
- **Kultivace rozmrazených buněk.**
- **Počítání buněk.**
- **Příprava skel pro fixaci buněk.**

Výměna média

Z misky s přisedlými buňkami je odpipetováno médium a je nahrazeno 2 ml čerstvého média (pokojová teplota). Musí být minimalizována doba, po kterou buňky nejsou v médiu i doba, po kterou jsou mimo inkubátor.

Rozmrazení suspenzních buněk (PBMC = mononukleárních buněk periferní krve)

1. Je zkontrolováno zapnutí a nahřátí vodní lázně na 37 °C. V laminárním boxu je nachystáno médium PB1 (pokojová teplota) a 15ml zkumavka pro promytí buněk. Centrifuga je nastavena na 300 g, 4 minuty, je zkontrolováno umístění správného rotoru a nástavců.
2. Kryozkumavka s buňkami je vyhledána v kryobance a na ledu urychleně přenesena k vodní lázni, kde je rozmrazena do doby, kdy je v ní malý kousek ledu. Voda z lázně se nesmí dostat k závitě zkumavky (riziko kontaminace). Následuje přesun do laminárního boxu.
3. Buňky jsou pipetou přesunuty z kryozkumavky do 15 ml zkumavky a POMALU doplněny 5 ml PB1 média. Poté jsou centrifugovány.
4. Peleta je rozsuspendována v 1 ml média. 50 µl je odebráno do zkumavky na počítání množství buněk. Mimo laminární box je přidáno 50 µl trypanové modři.
5. Stanovení počtu buněk a viability pomocí automatického počítáče buněk (Countess II).
6. Nasazení 100 tis. buněk do 2 ml media na 1 jamku 6jamkové destičky.
7. Kontrola přítomnosti buněk pod světelným mikroskopem.
8. Spočítání stejného vzorku na Bürkerově komůrce.

PROVEĎ A ZAPIŠ VÝŠE UVEDENÉ LABORATORNÍ ÚKONY.