

Základy kultivace buněk – cvičení (EMKB0311c)

Jméno a příjmení:		
Číslo skupiny:		
Studijní obor:		

DEN 5

Náplň cvičení:

- Stanovení konfluence přisedlých buněk
- Pasážování:
 - EDTA
 - TRYPLE/Trypsin
 - Mechanické
- Postupné vitální zamrazení

Teoretická příprava

Pasážování buněk

Vzhledem k postupnému růstu buněk dojde časem k vyčerpání kapacity kultivační nádoby a nastává plató fáze růstu. Z tohoto důvodu je potřeba buňky odebrat z kultivační nádoby (sklidit), naředit a nasadit znovu. V případě přisedlých buněk je nutné zvolit vhodný způsob oddělení buněk od kultivační nádoby (v závislosti na typu buněk a způsobu kultivace).

Základní způsoby sklízení buněk

- Mechanické (škrabkou, nařezáním kolonií a sebráním pipetou apod.)
- Enzymatické (např. Trypsin/EDTA, Tryple Express)
- Neenzymatická disociace (EDTA)

Vitální mrazení buněk

Pro dlouhodobé uchování buněk a buněčných kultur se používá kryokonzervace v tekuté či plynné fázi dusíku (-196 °C). Při prostém zmrazení ve vodných roztocích (běžně používaná média a pufrů) by došlo k nezvratnému poškození buněk. Z tohoto důvodu je používán kryoprotektant (nejčastěji DMSO) a buňky jsou zamrazovány postupně, aby se předešlo krystalizaci, která by buňky poškodila. Jsou využívány programovatelné řízené zmrazovače nebo speciální kontejnery (např. Mr. Frosty), které jsou uloženy do hlubokomrazicího boxu (-80 °C), kde mají konstantní rychlost poklesu teploty (1 °C za minutu). Po čtyřech hodinách (nebo druhý den) jsou kryozkumavky přeneseny do dusíku.

ÚKOL: PASÁŽOVÁNÍ/SKLÍZENÍ BUNĚK Trypsin/EDTA

1. Odsaj růstové médium a opláchni buňky PBS (stačí stejný objem jako byl růstového média).
2. Přidej pracovní roztok trypsin (0.25 %) / EDTA tak, aby udělal tenkou vrstvu na dně kultivační misky.
3. Můžeš dát tuto misku do inkubátor anebo při pokojové teplotě (RT) přímo pozorovat uvolňování buněk od podkladu. Buňky by měly v trypsinu být 3–5 minut.
4. K uvolněným buňkám přidej kompletní růstové médium obsahující sérum nebo inhibitor trypsinu.

5. Centrifuguj na 300 g 4 minuty.
6. Slij supernatant.
7. Pipetou buňky jemně rozsuspenduj na homogenní populaci, spočítej je (Countess II) a použij do experimentu nebo pasážuj v požadovaném množství.

ÚKOL: MRAZENÍ MSC

- Mrazící médium: M1, 10% FBS, 10% DMSO.
1. Buňky jsou sklizeny Trypsin/EDTA viz výše.
 2. Po odebrání vzorku na spočítání jsou buňky centrifugovány 300 g 4 minuty.
 3. Mezitím je popsána kryozkumavka – buněčná linie, pasáž, počet buněk, datum.
 4. Po centrifugaci je slit supernatant, buňky jsou rozsuspendedovány v 1 ml mrazícího média a přeneseny do kryozkumavky.
 5. Řádně zavřenou kryozkumavku umístit do Mr. Frostyho v lednici (po poslední dvojici přenesen do -80 °C).

ÚKOL: PROVEĎ A ZAPIŠ VÝŠE UVEDENÉ LABORATORNÍ ÚKONY