

# BIOLOGIA KOMÓRKI

**BANKOWANIE KOMÓREK**

## WSTĘP

Jedną z rutynowych metod laboratoryjnych stosowanych we współczesnej biologii jest długotrwałe przechowywanie żywych komórek w obniżonej temperaturze. Metoda ta jest szczególnie przydatna dla zabezpieczenia wyselekcjonowanych linii komórkowych o często unikalnych właściwościach (hodowle komórkowe obecnie stanowią podstawowe źródło materiału biologicznego do pracy doświadczalnej) na wypadek utraty komórek bądź zakażenia. Bankowanie komórek pozwala również na przerwanie pracy z danym rodzajem komórek na dowolny okres czasu (nawet na kilka lat), a utrzymanie zamrożonego materiału wymaga niewiele czasu i wysiłku oraz kosztów w porównaniu z prowadzeniem hodowli ciągłej.

Spadek temperatury podczas zamrażania powoduje powstawanie kryształków lodu w środowisku pozakomórkowym, czego skutkiem jest wzrost stężenia substancji rozpuszczonych w medium hodowlanym i dehydratacja komórek. Aby uzyskać maksymalny stopień przeżywalności komórek, należy je stosunkowo wolno zamrażać i szybko odmrażać. Zamrażanie musi być wystarczająco wolne aby mogła zajść dehydratacja, która zapobiega powstawaniu wewnątrzkomórkowych kryształków lodu niszczących struktury komórkowe. Z drugiej strony nie może być zbyt wolne, aby nie dopuścić do nadmiernej dehydratacji i zniszczenia komórek z jej powodu. Optymalna prędkość obniżania temperatury w trakcie zamrażania wynosi dla większości typów komórek od 1 °C do 3°C na minutę. Warunki takie można najprościej uzyskać umieszczając komórki w polistyrenowym pudełku o grubości ścianek ok. 1,5 cm w temperaturze -70°C na okres 2 godzin. Obecnie najczęściej do uzyskania odpowiedniego tempa mrożenia stosowane są zamrażarki programowane, z których po odpowiednim czasie komórki są przenoszone do ciekłego azotu (-196°C). Nieodwracalnemu uszkodzeniu, które często towarzyszy zamrażaniu komórek w dużym stopniu zapobiega zamrażanie w obecności krioprotektantów – najczęściej glicerolu lub dimetylosulfotlenku (DMSO).

Ważnym elementem procesu bankowania komórek jest dobranie odpowiedniej gęstości zamrażanej zawiesiny komórek. Powinna ona być na tyle wysoka, aby po rozcieńczeniu rozmrażanej próbki w stosunku 1:10 lub 1:20 (konieczne dla zmniejszenia stężenia glicerolu lub DMSO) uzyskane stężenie komórek było około 5 razy wyższe od standardowej gęstości komórek przy pasażowaniu.

Przechowywanie materiału w ciekłym azocie znajduje praktyczne zastosowanie w medycynie do przechowywania komórek rozrodczych (komórek jajowych, plemników) oraz zarodków, a także krwi pępowinowej. Obecnie nie ma skutecznej metody takiego przechowywania narządów przeznaczonych do transplantacji (ze względu na utrudnioną penetrację krioprotektantów do wszystkich komórek narządu), dlatego są one przechowywane i transportowane w warunkach chłodniczych (0 - 4°C). Pomimo tego istnieją firmy, które oferują długotrwałe przechowywanie odpowiednio przygotowanego całego ciała ludzkiego (np. ludzi śmiertelnie chorych) w nadziei na rozwój medycyny, który może w przyszłości pozwolić im powrócić do życia.

Odkrycia kriobiologii są wykorzystywane w wielu dziedzinach. Np. enzymy działające w niskich temperaturach znajdują zastosowanie w przemyśle spożywczym, biotechnologii, produkcji proszków do prania oraz oczyszczaniu ścieków.

Przystosowanie do przetrwania w temperaturze poniżej 0°C wykazuje wiele gatunków zwierząt takich jak żaby, arktyczne ryby, owady. Znanym przykładem jest żaba leśna (*Rana silvatica*) występująca w Ameryce Północnej, której organizm podczas zimowej hibernacji jest przystosowany do zamarznięcia pozakomórkowych płynów ustrojowych.

## CEL ĆWICZENIA

Celem proponowanego ćwiczenia jest zapoznanie się z podstawowymi technikami bankowania komórek.

## WYKONANIE ĆWICZENIA

### 1. Przygotować się do pracy pod komorą laminarną (patrz: ćwiczenie „Hodowle komórkowe”)

### 2. Wykonać pasaż komórek:

- z naczynia hodowlanego zlać pożywkę
  - przepłukać komórki 1 ml (sterylnego) PBSu bez jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$
  - po zlaniu PBSu dodać do komórek 0,5 ml trypsyny (w wypadku naczynia o pow. hodowlanej 25  $\text{cm}^2$ ) i umieścić naczynie w inkubatorze (37°C) na ok. 2-3 minuty, kontrolując (pod mikroskopem) co jakiś czas stopień odrywania się komórek od dna naczynia hodowlanego (można przyspieszyć proces odrywania komórek poprzez mechaniczne uderzenie butelką o brzeg dłoni).
  - gdy wszystkie komórki oderwą się, należy zinaktywować trypsynę dodając 2 ml pożywki hodowlanej (z dodatkiem surowicy)
  - przenieść zawiesinę komórek do probówki do wirowania
  - zwirować zawiesinę komórek (1000 obrotów na minutę, 5 minut)
- # **podczas wirowania przygotować mikroskop do pracy w kontraście faz dla obiektywu 20x, wyczyścić (za pomocą waty nasączonej alkoholem) szkiełka podstawowe i nakrywkowe, które będą niezbędne do oznaczania żywotności komórek**
- delikatnie wyjąć probówki z wirówki, przenieść pod komorę laminarną, zdecydowanym ruchem zlać roztwór pożywki znad osadu (peletu) komórek
  - zawiesić pelet komórek w 1 ml świeżej pożywki hodowlanej i dokładnie, ale jednocześnie delikatnie „rozpipetować” (ok. 15-20 razy)

### 3. Oznaczyć liczbę i żywotność komórek:

- policzyć (świeżo rozpipetowane!) komórki w komorze Bürkera (wykorzystać 10  $\mu\text{l}$  zawiesiny komórek)
- określić przy pomocy błękitu trypanu żywotność komórek:
  - na wyczyszczone szkiełko podstawowe nakropić **10  $\mu\text{l}$  roztworu błękitu trypanu w PBS** i następnie **10  $\mu\text{l}$  zawiesiny komórek** (delikatnie wymieszać „rozpipetowując”); pozostawić na 2 minuty, usunąć ewentualne pęcherzyki powietrza, a następnie przykryć czystym szkiełkiem nakrywkowym
  - policzyć w mikroskopie (w kontraście faz) komórki niezabarwione (żywe) i zabarwione na kolor niebieski (martwe), określić wyjściową żywotność komórek w hodowli (obliczyć % komórek żywych)

**4. Przeprowadzić proces bankowania komórek:**

- a) „rozpipetować” ponownie zawiesinę komórek
- b) 0,8 ml zawiesiny komórek przenieść do 1,5 ml probówki typu Eppendorf, dodać 0,1 ml surowicy (FBS) oraz 0,1 ml DMSO (DMSO należy dodawać na końcu) i delikatnie wymieszać
- b) probówki zamknąć, umieścić w pudełku i przenieść do zamrażarki na okres 1 godziny (uwaga: optymalny czas mrożenia w  $-80^{\circ}\text{C}$  wynosi 2 godziny, następnie komórki należy umieścić w butli z ciekłym azotem)

**5. Odbankowanie komórek:**

- a) probówki z zamrożonymi komórkami rozmrozić (umieścić w zlewce z letnią wodą)
- b) rozmrożoną zawiesinę przenieść natychmiast do probówki kalibrowanej i dodawać kroplami 3 ml świeżej pożywki hodowlanej (po dodaniu każdej kropli delikatnie wstrząsnąć probówką w celu przemieszania)
- c) zwirować zawiesinę komórek (1000 obrotów na minutę, 5 minut)
- d) delikatnie wyjąć probówki z wirówki, przenieść pod komorę laminarną, zdecydowanym ruchem zlać roztwór pożywki znad osadu (peletu) komórek
- e) zawiesić pelet komórek w 1 ml świeżej pożywki hodowlanej i dokładnie, ale jednocześnie delikatnie „rozpipetować” (ok. 15-20 razy)
- f) oznaczyć żywotność komórek (patrz punkt 3b)

**6. Zinterpretować otrzymane wyniki.**

**ZAGADNIENIA DO PRZYGOTOWANIA**

Hodowla tkanek, jej rozwój i znaczenie dla rozwoju nauki.

*In vitro* versus *in vivo*, zalety, ograniczenia, klasyfikacja hodowli tkanek.

Środowisko hodowlane.

Linie komórkowe.

Bankowanie komórek.

**ZALECANA LITERATURA**

„Molecular biology of the cell” Fifth edition

Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter

Garland Science Taylor & Francis Group

Part III Chapter 8 Manipulating proteins, DNA, and RNA

Isolating cells and growing them in culture str. 501-510

„Hodowla komórek i tkanek” pod redakcją Stanisławy Stokłosowej, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2006

rozdz. 1 str. 2-6

rozdz. 5 str. 45-50

rozdz. 6 str. 51-60

rozdz. 11 str. 140-152

**ZAGADNIENIA NADOBOWIĄZKOWE**

Biotechnologia.

Hodowle przestrzenne – hodowla narządowa, agregaty, sferoidy, zastosowanie hodowli sferoidów, szczególnie w badaniach procesów powstawania nowotworów, kokultury organotypowe i modele komórkowe.

„Hodowla komórek i tkanek” pod redakcją Stanisławy Stokłosowej, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2006

rozdz. 10 str. 126-139

rozdz.12 str. 157-161, 164-167, 171, 176-178, 180-184.