

BIOLOGIA KOMÓRKI

Przechowywanie komórek w bankach komórkowych

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. Bankowanie komórek pozwala również na przerwanie pracy z danym rodzajem komórek na dowolny okres czasu. Zamrożone komórki najczęściej przechowuje się w ciekłym azocie.

Zamrażaniu komórek często towarzyszy nieodwracalne uszkodzenie będące wynikiem powstawania dużych kryształków lodu. Zjawisku temu w dużym stopniu zapobiega zamrażanie w obecności krioprotektantów – najczęściej glicerolu lub dimetylosulfotlenku (DMSO). Aby uzyskać maksymalny stopień przeżywalności komórek, należy je stosunkowo wolno zamrażać i szybko odmrażać. Zamrażanie nie może jednak być zbyt wolne, gdyż sytuacja taka sprzyja powstawaniu kryształków lodu. Z drugiej strony czas zamrażania musi być wystarczający na zadziałanie środków zabezpieczających (DMSO, glicerol). Optymalna prędkość obniżania temperatury w trakcie zamrażania wynosi 1 °C/min. Przeprowadzając mrożenie komórek w zamrażarce programowanej można sterować dynamiką mrożenia indywidualnie dla bankowanej linii komórkowej wykorzystując zoptymalizowane protokoły.

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.

CEL ĆWICZENIA:

Celem proponowanego ćwiczenia jest zapoznanie się z procedurą programowanego bankowania komórek w ciekłym azocie.

MATERIAŁY:

- Hodowle *in vitro* ssaczych komórek:
 - # **prawidłowych:** mysich fibroblastów (3T3)
 - # **nowotworowych:** szczurzego mięsakoraka (XC)Komórki rosną w naczyniach hodowlanych w standardowych warunkach hodowli (odpowiednia pożywka, temp. 37°C, 5% CO₂);
- Pożywka hodowlana z dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej (FBS 5-10%) oraz antybiotyków (penicylina, streptomycyna);
- Zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (PBS) bez jonów wapnia i magnezu
- Trypsyna, płodowa surowica bydlęca (FBS), dimetylosulfotlenek (DMSO), 0,2% roztwór błękitu trypanu w PBS
- Eppendorfy, probówki wirownicze, naczynia do bankowania

WYKONANIE ĆWICZENIA:

1. Uformować w grupie ćwiczeniowej sześć dwuosobowych zespołów i przygotować się do pracy pod komorą laminarną
2. Wykonać pasaż komórek:
grupy: 1-3 - komórki mysiego mięsako-raka XC; grupy 4-6 – mysie fibroblasty (3T3)
(nie wyrzucamy naczyń po komórkach!)
usunięcie pożywki, przepłukanie komórek r-em PBSu bez jonów wapnia i magnezu, trypsynizacja, inaktywacja enzymu, wirowanie
3. Po odwirowaniu zawiesić pelet komórek **w 1 mililitrze** świeżej pożywki
4. Przygotować mikroskop do pracy w jasnym polu dla obiektywu 20x
5. Część zawiesiny (10 μ l) wykorzystać do oznaczenia liczby i żywotności komórek:
 - a) policzyć komórki w komorze Bürkera
 - b) określić testem z błękitem trypanu żywotność komórek przed bankowaniem (wynik wyrazić w %) na wyczyszczone szkiełko podstawowe dać kroplę (10 μ l) 0,2% roztworu błękitu trypanu w PBS i kroplę zawiesiny komórek, pozostawić na 1 min, a następnie przykryć szkiełkiem nakrywkowym, policzyć

PROCEDURA BANKOWANIA KOMÓREK:

Przygotować w naczyniu do bankowania **1ml zawiesiny komórek w gęstości 500 tys. komórek/ml** według objętości przedstawionych w tabeli:

Numer grupy:	Zawiesina komórek w pożywce hodowlanej	FBS	Krioprotektant:
GRUPY: 1 i 4	600 μ l	300 μ l	DMSO 100 μ l
GRUPY: 2 i 5	900 μ l	brak	DMSO 100 μ l
GRUPY: 3 i 6	600 μ l	300 μ l	Brak DMSO

UWAGA!!! Wiersz zaciemniony zawiera typowe objętości używane przy rutynowej procedurze bankowania – należy jednak pamiętać, że poszczególne objętości zależą w istotny sposób od: typu komórek, ich wielkości, kondycji, gęstości komórek.

7. Banki z komórkami umieścić w zamrażarce na -80°C

ZEJŚCIE DO BANKU KOMÓREK ZBK UJ

8. Umieścić jeden przygotowany dodatkowo bank komórek w zamrażarce programowanej, ustawić odpowiedni program.

KRÓTKA PREZENTACJA PROWADZĄCEGO

9. Wyjąć zabankowane komórki z zamrażarki na -80°C, przeprowadzić proces „odbankowywania” komórek:
 - a) Szybko rozmrozić komórki (poprzez zanurzenie „banku” w ciepłej wodzie)
 - b) Przenieść zawiesinę komórek do naczynia hodowlanego
 - c) Dodać powoli, po kropli, mieszając delikatnie, **2 ml** ciepłej pożywki
10. Określić testem z błękitem trypanu żywotność komórek po bankowaniu (jak w 5b)
11. Opracować wyniki i sporządzić sprawozdanie z ćwiczeń (wg podanego wzoru)

LITERATURA:

1. Methods in Molecular Biology, vol. 368: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Second Edition. Edited by: J.G. Day and G.N. Stacey © Humana Press Inc., Totowa, NJ – rozdziały 3, 16, 19.
2. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. Am.J.Physiol. 247, 1984
3. Lillford P.J., Holt C.B. In vitro uses of biological cryoprotectants. Phil.Trans.R.Soc.Lond. B(2002) 357,945–951
4. <http://bioinfo.mol.uj.edu.pl/articles/Cebula05>