

Zakładanie hodowli pierwotnych fibroblastów z zarodka kurczęcia

PRAKTIKUM Z BIOLOGII KOMÓRKI
(BT 206, BT 231)

Zakładanie hodowli pierwotnych fibroblastów z zarodka kurczęcia

Hodowle komórek *in vitro* są narzędziem badawczym powszechnie wykorzystywanym w badaniach cytofizjologicznych i biochemicznych, jak również są coraz powszechniej stosowane w analizach wpływu czynników egzogennych, w tym testowanych leków i innych substancji biologicznie aktywnych, na fizjologię komórek i ich zespołów. Ich zastosowanie umożliwia prowadzenie badań w ściśle zdefiniowanych warunkach, które można w sposób dowolny modyfikować, wykorzystując materiał biologiczny o zdefiniowanych cechach fenotypowych i genotypowych.

Niezależnie od typu i właściwości fenotypowych komórek hodowanych *in vitro*, ich źródłem zawsze pozostaje tkanka organizmu wielokomórkowego. Procedurę pobrania i adaptacji komórek do warunków hodowlanych (t.j. zakładanie hodowli pierwotnych) podzielić można na trzy etapy:

- izolację tkanki o możliwie największym udziale danego typu komórek
- dysocjację tkanki umożliwiającą izolację komórek
- oczyszczanie uzyskanej populacji z niepożądanych typów komórek

Populacje komórek uzyskane w ten sposób podzielić można na dwie grupy. Do pierwszej zaliczyć można komórki zdolne do podziałów, które po izolacji z tkanki można propagować w hodowli w sposób mniej lub bardziej nieograniczony. Są to przede wszystkim komórki nowotworowe i niektóre typy komórek prawidłowych np. fibroblasty i keratynocyty. Dzięki ich aktywności mitotycznej, hodowle komórek prowadzić można przez dłuższy czas wykorzystując techniki pasażowania, co pozwala na długotrwałe wykorzystanie zdefiniowanego materiału biologicznego do doświadczeń. Na drugim biegunie pozostają komórki terminalnie zróżnicowane, np. neurony i kardiomiocyty, których jedynym źródłem pozostaje tkanka macierzysta.

Cel doświadczenia:

Celem przeprowadzonej procedury jest izolacja i założenie pierwotnej hodowli fibroblastów zarodka kurczęcia. Źródłem komórek jest tkanka łączna pochodząca z 8-10 - dniowych zarodków.

Przebieg doświadczenia:

1. Przygotowanie pożywki:

- Medium MEM (Minimal Essential Medium)
- 1% surowicy kurzej
- 4% surowicy cielęcej
- 10 mM buforu HEPES
- r-ór streptomycyny/penicyliny

Należy przygotować pożywkę MEM zawierającą HEPES i antybiotyki, którą następnie należy wysterylizować poprzez sączenie przez filtr miliporowy i uzupełnić stosownymi objętościami surowicy kurzej i cielęcej.

2. Procedura izolacji:

2a. Izolacja tkanki łącznej z zarodka:

- a) Zarodek wydobyć ze skorupki, oczyścić z błon, zdekapitować, wypatroszyć i pozbać kończyn na wysokości stawu skokowego
- b) Otrzymany materiał, zawierający przede wszystkim tkankę łączną, pokroić nożyczkami chirurgicznymi i zalać ok. 5 ml roztworu PBS i mieszać ok. 1 min. celem odpłukania krwi

2b. Dysocjacja tkanki:

(Najczęściej stosowaną strategią izolacji komórek z tkanki jest dysocjacja tkanki przy użyciu enzymów proteolitycznych. Powszechnie wykorzystuje się trypsynę, która jest stosunkowo tania, niemniej jednak jej działanie jest niespecyficzne, przez co może ona nieodwracalnie uszkadzać wrażliwsze typy komórek; W takim przypadku stosuje się enzymy o działaniu specyficznym np. kolagenazę)

- a) Roztwór PBS usunąć, a fragmenty tkanki zalać ok. 5ml 0.25% r-ro trypsyny
- b) Zawiesinę mieszać aż do pojawienia się zawieszonych komórek, co można stwierdzić po jej zmętnieniu (zwykle następuje to po ok. 3-5 minutach)
- c) W tym czasie przygotować próbkę kalibrowaną zawierającą ok. 5 ml pożywki hodowlanej
- d) Zawiesinę komórek przenieść szklaną pipetą do próbki z pożywką
- e) Zawiesinę wirować 5 min. przy 1000 obr./min.
- f) Po wirowaniu nadsącz zlać a otrzymaną peletkę zawiesić w ok. 5 ml świeżej pożywki i policzyć gęstość zawiesiny w komorze Buerkera
- g) Do naczynia Falcona lub szalki Petriego odmierzyć objętość zawiesiny, w której znajduje się 1 milion komórek, dopełnić pożywką hodowlaną do objętości 10 ml, a naczynie przenieść do inkubatora.

2c. Oczyszczanie hodowli z niepożądanych typów komórek:

(Prosta i stosunkowo wydajną metodą eliminacji niepotrzebnych komórek z hodowli jest tzw. różnicowe osadzanie. Technika ta opiera się na różnej szybkości adhezji do podłoża komórek różnych typów. Np. fibroblasty przyczepiają się do podłoża hodowlanych stosunkowo szybko (po ok. 45 minutach), natomiast komórki innych typów również obecne w izolowanej tkance np. komórki śródbłonna i nabłonka) potrzebują na to więcej czasu)

- a) Po ok. 45 minutach od wysiania komórek do naczynia wymienić w nim płyn hodowlany na świeży usuwając w ten sposób niepożądane komórki

Zagadnienia:

- Hodowle komórkowe in vitro

Zalecana literatura:

- Instrukcja do ćwiczeń
- D. F. Huelser, Mammalian Cell Culture Methods