

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. 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 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. Warunki takie można uzyskać umieszczając komórki w polistyrenowym pudełku o grubości ścianek ok. 1,5 cm w temperaturze -70°C na okres 2 godzin. Zamrożone w ten sposób komórki można następnie przechowywać w ciekłym azocie (-196°C) nawet przez okres kilku lat.

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.

Celem proponowanego ćwiczenia jest poznanie przydatnych dla wszystkich osób korzystających z hodowli komórkowych metod bankowania komórek.

WYKONANIE ĆWICZENIA

1. Przygotować się do pracy pod komorą laminarną.
2. Wykonać pasaż komórek:
 - a) z naczynia hodowlanego zlać pożywkę
 - b) przepłukać komórki 1 ml PBSu
 - c) po zlaniu PBSu dodać do komórek 1 ml trypsyny i inkubować ok. 10 sekund
 - d) zlać nadmiar roztworu enzymu, pozostawiając jedynie niewielką ilość i umieścić naczynie w cieplarni na ok. 2-3 minuty, kontrolując co jakiś czas stopień odrywania się komórek od podłoża
 - e) gdy komórki zaczną się odrywać, należy zinaktywować trypsynę za pomocą 2 ml pożywki hodowlanej z dodatkiem surowicy (można przedtem przyspieszyć proces odrywania komórek poprzez mechaniczne uderzenie butelką o kant dłoni)
 - f) komórki spłukać pożywką z powierzchni, na której rosły, przenieść zawiesinę do probówki i dokładnie, ale jednocześnie delikatnie rozpipetować
 - g) z zawiesiny pobrać 0,2 ml do oznaczenia żywotności i liczby komórek
3. Zamrozić zawiesinę komórek:
 - a) 0,8 ml zawiesiny przenieść do Eppendorfa, dodać 0,1 ml surowicy oraz 0,1 ml DMSO (DMSO należy dodawać na końcu)

- b) probówki zamknąć, umieścić w pudełku i przenieść do zamrażarki na okres 1 godziny (uwaga: optymalny czas mrożenia w -70°C wynosi 2 godziny, a następnie komórki należy umieścić w butli z ciekłym azotem)
4. Przygotować mikroskop do pracy w jasnym polu dla obiektywu 20x.
5. Policzyc komórki w komorze Burkera oraz określić przy pomocy błękitu trypanu % żywych komórek (patrz ćw. „Testy witalności komórek”).
6. Odmrażanie komórek:
 - a) Probówki z zamrożonymi komórkami umieścić w zlewce z letnią wodą bądź odmrozić ogrzewając je „w dłoni”
 - b) rozmrożoną zawiesinę przenieść natychmiast do probówki kalibrowanej i dodawać **powoli, kroplami** 4 ml pożywki hodowlanej
 - c) komórki zwirować przez 5 minut w 1000 obrotów na minutę
 - d) zlać nadsącz, a następnie rozpipetować peletkę w 1 ml pożywki
 - e) pobrać próbkę do liczenia i oceny żywotności komórek
7. Zinterpretować otrzymane wyniki.

ZAGADNIENIA DO PRZYGOTOWANIA

1. Hodowle komórek i tkanek in vitro.
2. Regulacja wzrostu komórkowego.
3. Cytogenetyczna koncepcja onkogenezy.
4. Banki linii komórkowych.