

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.

CEL ĆWICZENIA

Celem 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 Ca^{2+} i Mg^{2+}
- po zlaniu PBSu dodać do komórek 0,5 ml trypsyny (w wypadku naczynia o pow. hodowlanej 25 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 zainaktywować trypsynę dodając 2 ml pożywki hodowlanej (z dodatkiem surowicy)
- przenieść zawiesinę komórek do próbówki do wirowania
- zwirować zawiesinę komórek (1000 obrotów na minutę, 5 minut)

podczas wirowania przygotować mikroskop do pracy w kontraście faz dla obiektywu 10x, wyczyścić (za pomocą waty nasączonej alkoholem) szkiełka podstawowe i nakrywkowe, które będą niezbędne do oznaczania żywotności komórek

- delikatnie wyjąć próbówki 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”

3. Oznaczyć liczbę i żywotność komórek:

- policzyć (świeżo rozpipetowane!) komórki w komorze Bürkera (wykorzystać 10 μl zawiesiny komórek)
- określić przy pomocy błękitu trypanu żywotność komórek:
 - na wyczyszczone szkiełko podstawowe nakropić **10 μl roztworu błękitu trypanu w PBS** i następnie **10 μl zawiesiny komórek** (delikatnie wymieszać „rozpipetowując”); pozostawić na 2 minuty, usunąć ewentualne pęcherzyki powietrza, a następnie przykryć czystym szkiełkiem nakrywkowym
 - policzyć w mikroskopie 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 probówki mroźniowej, dodać 0,1 ml surowicy (FBS) oraz 0,1 ml DMSO (DMSO należy dodawać na końcu) i delikatnie wymieszać
- c) probówki zamknąć, umieścić w pudełku i przenieść do zamrażarki na okres 1 godziny (uwaga: optymalny czas mrożenia w temp. -80°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”
- 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

Culture of Animal Cells : A Manual of Basic Technique and Specialized Applications. - Freshney RI., 2010 Wiley-Blackwell - Rozdz. 19. Cryopreservation str. 317-327

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