

PODSTAWY BIOLOGII KOMÓRKI

Bankowanie komórek i ocena ich żywotności

Wstęp

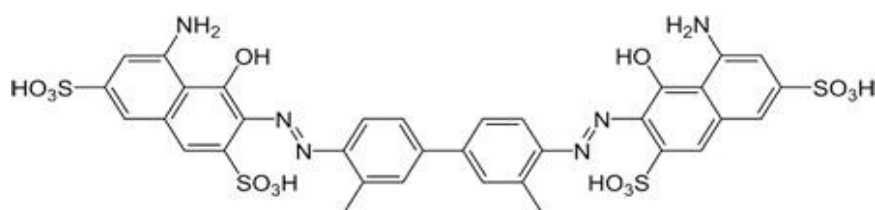
Jedną z rutynowych metod laboratoryjnych stosowanych we współczesnej biologii jest długotrwałe przechowywanie żywych komórek w obniżonej temperaturze. Metoda ta jest szczególnie przydatna dla zabezpieczenia wyselekcjonowanych linii komórkowych o często unikalnych właściwościach. Bankowanie komórek pozwala również na przerwanie pracy z danym rodzajem komórek na dowolny czas. 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.

Bankowaniu należy poddawać komórki będące w dobrej kondycji, gdyż pomimo najwyższej ostrożności i stosowaniu odpowiednich krioprotektantów, proces ten nie jest dla komórek obojętny i może mu towarzyszyć wzmożona ich śmiertelność. W celu oceny kondycji komórek, zarówno przed procesem bankowania, jak i po rozmrożeniu komórek, wskazana jest ocena ich żywotności przy użyciu wybranych testów.

Każda komórka jest układem termodynamicznie otwartym wymieniającym ze swym otoczeniem materię i energię. Wymiana ta odbywa się poprzez błonę komórkową, której właściwości w dużej mierze decydują o kontrolowaniu przez komórkę swego środowiska, co jest niezbędnym warunkiem koordynacji wewnątrzkomórkowych procesów metabolicznych. Ponieważ wszystkie trwałe uszkodzenia błony komórkowej prowadzą do śmierci komórki, większość testów żywotności (witalności) komórek hodowanych *in vitro*, nastawiona być powinna na określenie jej integralności. Alternatywnie szereg technik mierzy stan metaboliczny komórki, w ten sposób wskazując na potencjalną zdolność komórki do prawidłowej aktywności metabolicznej, a w konsekwencji do wzrostu i podziału.

Testy, które wykorzystują naturalną właściwość błony komórkowej jako bariery dla związków, powinny wykorzystywać związki będące anionami w fizjologicznym pH. Nie wnikają one bowiem do żywych komórek ze względu na ujemny ładunek nieuszkodzonej błony, ale po śmierci komórki (gdy błona zostanie trwale uszkodzona i następuje zanik potencjału pomiędzy zewnętrzną, a wewnętrzną stroną błony) przenikają do wnętrza komórki barwiąc cytoplazmę lub/i jądro. Najpowszechniej stosowanym barwnikiem z tej grupy jest błękit trypanu (Ryc. 1), który wybarwia komórki martwe na kolor niebieski, ale podobne zastosowanie mogą mieć również zieleń lizaminowa, eozyna Y i erytrozyna B.



Ryc.1. Wzór strukturalny błękitu trypanu.

Podejściem alternatywnym do technik wykorzystujących wyżej wymienione związki jest zastosowanie substancji, które w formie zestryfikowanej swobodnie penetrują nienaruszoną błonę komórkową, natomiast ich de-estryfikacja powoduje wytrącenie w formie wolnej. Prowadzi to do znacznego nagromadzenia substancji w cytoplazmie. Przykładem takich substancji jest calceinaAM i dwuocian fluoresceiny. Koncentracja fluoresceiny w komórce możliwa jest wyłącznie gdy: (i) błona komórkowa jest nienaruszona i (ii) w komórce aktywne są enzymy, w tym te z grupy esteraz. Taka komórka widoczna jest w mikroskopie fluorescencyjnym, gdyż fluoresceina w niej zawarta emituje światło zielone w odpowiedzi na wzbudzenie światłem niebieskim. Ocenę żywotności usprawnia jednocześnie uwidocznienie komórek martwych, np. dzięki zastosowaniu barwników w minimalnym stopniu zdolnych do penetracji nienaruszonych błon komórkowych, natomiast akumulujących się w uszkodzonych (martwych) komórkach dzięki ich zdolności do wiązania się z kwasami nukleinowymi. W testach tych stosuje się np. jodek propidyny, oranż akrydyny, a przede wszystkim bromek etydydy. Powyższe podejście pozwala na odmienne wybarwienie komórek żywych (na kolor zielony) i martwych (czerwony/pomarańczowy), przez co są one bardzo łatwe do rozróżnienia.

Innymi dość powszechnie stosowanymi procedurami analizy żywotności komórek są testy określające aktywność metaboliczną komórek. Powszechnie stosowanym testem z tej grupy jest test MTT, który umożliwia pomiar aktywności przemian energetycznych w mitochondriach. Mierzy on żywotność komórek za pomocą testu redukcji soli tetrazolowej (MTT - substratu rozpuszczalnego w wodzie, o zabarwieniu białym lub żółtym) do nierozpuszczalnego *formazanu* (o zabarwieniu ciemnoniebieskim). Ilość barwnego zredukowanego MTT jest proporcjonalna do aktywności oksydacyjnej mitochondriów komórki, a w ściśle określonych warunkach doświadczalnych do liczby aktywnych metabolicznie (żywych) komórek w populacji. Sole tetrazolowe są redukowane do formazanu dzięki działaniu dehydrogenazy bursztynianowej, enzymu aktywnego tylko w komórkach o nienaruszonym metabolizmie i łańcuchu oddechowym. Ilość formazanu zostaje obliczona kolorymetrycznie i koreluje z liczbą żywych komórek.

Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z podstawową procedurą bankowania komórek, jak i ocena ich żywotności przy użyciu popularnej metody z zastosowaniem błękitu trypanu.

Wykonanie ćwiczenia

1. Podzielić grupę na 4 mniejsze zespoły.
2. **Wykonać pasaż komórek hodowanych w otrzymanym naczyniu:**
 - a. ocenić liczebność komórek oraz stan hodowli (obserwując „pod światło” dno naczynia hodowlanego, zabarwienie pożywki, klarowność pożywki, jak również dokonać obserwacji komórek pod mikroskopem odwróconym)
 - b. z naczynia zlać płyn hodowlany, po czym natychmiast:
 - c. delikatnie zalać komórki ok. 2 ml roztworu PBS, przepłukać je, po czym roztwór usunąć i natychmiast:
 - d. komórki zalać ok. 1 ml roztworu 0,25% trypsyny z EDTA (trypsynę rozprowadzić dokładnie po całym dnie naczynia) komórki inkubować w obecności trypsyny od 20 sekund do 2 minut, kontrolując („pod światło” i pod mikroskopem stopień odrywania się komórek od podłoża (ewentualnie naczynie wstrząsnąć celem przyspieszenia procesu).

- e. natychmiast po oderwaniu się komórek od podłoża (obserwowanym „pod światło” lub w mikroskopie odwróconym), komórki zawiesić w 2ml pożywki hodowlanej (MEM + 5% surowicy bydlęcej + antybiotyki), w ten sposób inaktywując trypsynę
 - f. uzyskaną zawiesinę komórek przenieść pipetą do probówki wirowniczej, zamknąć i zwirować przez 5 min, przy ok. 300 RCF (wirówka w sali ćwiczeń, ok. 1000 obr./min)
 - g. po odwirowaniu nadsącz zlać, a osad komórek (pelet) zalać 1 ml świeżej pożywki, komórki dokładnie lecz delikatnie rozpipetowując
- 3. Oznaczyć liczbę i żywotność komórek:**
- a. policzyć (świeżo rozpipetowane!) komórki w komorze Bürkera (wykorzystać 10 μ l zawiesiny komórek)
 - b. określić z wykorzystaniem testu z błękitem trypanu żywotność komórek:
 - na wyczyszczone szkiełko podstawowe nakropić 10 μ l roztworu błękitu trypanu w PBS i następnie 10 μ l zawiesiny komórek (delikatnie wymieszać „rozpipetowując”); pozostawić na minutę, 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. PRZYGOTOWAĆ DWIE PROBÓWKI Z KOMÓRKAMI:
 - 1) 300 μ l zawiesiny komórek przenieść do probówki mroźniowej, dodać 150 μ l surowicy (FBS) oraz 50 μ l DMSO (DMSO należy dodawać na końcu) i delikatnie wymieszać
 - 2) 0,5 ml zawiesiny komórek przenieść do probówki mroźniowej
Nie dodając DMSO oraz FBSu
 - c. probówki zamknąć, umieścić pudełku z polistyrenu i przenieść do zamrażarki na 1 godzinę (uwaga: optymalny czas mrożenia w -80°C wynosi 2 godziny, po czym komórki zwykle są umieszczane w butli z ciekłym azotem, bądź z parami ciekłego azotu)
- 5. Przeprowadzić odbankowanie komórek:**
- a. probówki z zamrożonymi komórkami rozmrozić (umieścić w zlewce z letnią wodą)
 - b. rozmrożoną zawiesinę komórek przenieść natychmiast do probówki (15 ml) i dodawać kroplami 3 ml świeżej pożywki hodowlanej (po dodaniu każdej kropli delikatnie wstrząsnąć probówką w celu przemieszania)
 - c. zwirować zawiesinę komórek (300 RCF, 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)

Zakres materiału obowiązujący do ćwiczeń

- Hodowla tkanek, jej rozwój i znaczenie dla rozwoju nauki.
- Hodowle pierwotne i linie komórkowe.
- Bankowanie komórek.
- Testy witalności - rodzaje, zastosowanie, ograniczenia.

Proponowana literatura

„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

Rozdz. 21. Cytotoxicity str. 365-376

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. (dla zainteresowanych)