

Hodowla komórkowa, pasażowanie, wysiewanie i napromienianie komórek w laboratorium radiobiologicznym

1 Hodowla komórkowa

Hodowlę komórkową należy przeprowadzać w sterylnych oraz ściśle określonych warunkach, których parametry zmieniają się w zależności od rodzaju linii komórkowej. W przypadku PC-3 oraz DU-145 temperatura optymalna do rozwoju komórek wynosi $37^{\circ}C$. Z kolei optymalna wilgotność środowiska 95%, a stężenie CO_2 5%. Wszystkie procedury związane z komórkami należy wykonywać przy użyciu komory laminarnej.

2 Pasażowanie komórek

linia komórkowa PC-3 i DU-145

2.1 Przygotowanie pożywki hodowlanej

Optymalna pożywka hodowlana:

- PC-3: roztwór DMEM - F12 (ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium) zawierający 10% FBS (ang. Fetal Bovine Serum) i 0,6% antybiotyku (penicylina-streptomycyna).
- DU-145: roztwór RPMI - 1640 zawierający 10% FBS i 0,6% antybiotyku.

2.2 Pasażowanie

Objętości używanych odczynników zostały podane dla kolby 75 cm^3 .

1. Z butelki z komórkami wylej starą pożywkę hodowlaną.
2. Pobierz 10 ml PBS.
3. Przepłukaj (delikatnie) komórki 10 ml PBSu tak, aby nie splukać komórek ze ścianki.

4. Po wleciu 10 ml PBS przesuuj butelkę po ósemce (w celu lepszego wymieszania) i wylej.
5. Dodaj 2 do 3 ml roztworu trypsyny do butelki.
6. Delikatnie poruszaj butelką, aby trypsyna pokryła całe dno.
7. Umieść komórki (butelkę) w inkubatorze na 5 - 10 min.
8. Po wyjęciu komórek z inkubatora, uderz butelkę z każdej strony (nie uderzaj butelki od dołu).
9. Obserwuj komórki pod mikroskopem (umożliwi Ci to ocenienie, czy warstwa komórek została już rozproszona w roztworze).
10. Dodaj do butelki od 7 do 8 ml medium (tak, aby łącznie było 10 ml).
11. Przepłukaj całą powierzchnię butelki oraz wymieszaj pipetując.
12. Pobierz 1 ml do eppendorfu oraz zostaw butelkę w pozycji pionowej (do tej powierzchni komórki się nie przyklejają).
13. Z eppendorfu z komórkami pobierz 20 - 25 μ l i przelej do drugiego eppendorfu.
14. Do tego samego eppendorfu dodaj 20 - 25 μ l roztworu Trypan Blue.
15. Zawartość eppendorfu wymieszaj pipetując.
16. Pobierz 10 μ l i przelej na płytkę do zliczania komórek (strona A i B).
17. Płytkę do zliczania komórek umieść w automatycznym liczniku komórek EVE (stronę A).
18. Naciśnij przycisk Settings w celu ustawienia odpowiedniego protokołu oraz rozmiaru komórek.
19. Naciśnij przycisk Zoom i wyreguluj obraz za pomocą pokrętki Focus.
20. W celu sprawdzenia obrazu w kilku polach, użyj siatki, która umożliwia poruszanie się po slajdzie.
21. Naciśnij przycisk Count cells, aby uzyskać wyniki pomiarów (total, live, dead, viability), zapisz je.
22. Naciśnij przycisk More data, aby zobaczyć graficzną reprezentację danych.
23. Aby odczytać wynik z drugiej strony (strona B) szkiełka, wyjmij je i odwróć.
24. Wykonaj pomiar analogicznie, jak w przypadku strony A.
25. Przy użyciu automatycznego licznika komórek EVE wykonaj 3 pomiary.

26. Po wykonaniu pomiarów, pozostałe 9 ml zawiesiny komórkowej podzielić do nowych butelek według odpowiednich proporcji*, na przykład: jeśli rozlewasz na 3 butelki po 3 ml zawiesiny to musisz dodać do każdej butelki jeszcze 7 ml medium (do uzupełnienia do 10 ml).

* Zalecany stosunek subkultury od 1:3 do 1:6.

Pasażowanie wykonuj 2-3 razy w tygodniu.



Rysunek 1: a) automatyczny licznik komórkowy EVE, b) płytka do zliczania komórek.

3 Wyszewanie komórek

- linia komórkowa PC-3 ($2,0 \times 10^5$ komórek)
- linia komórkowa DU-145 ($1,8 \times 10^5$ komórek)

3.1 Przygotowanie pożywki hodowlanej przed wysiewaniem komórek

Optymalna pożywka hodowlana, którą wykorzystujemy do wysiewania komórek na szkiełkach nakrywkowych do płytek 6-dołkowych: roztwór DMEM - F12 zawierający 10% FBS i 0,6% antybiotyku (PC-3) oraz RPMI - 1640 zawierający 10% FBS i 0,6% antybiotyku (DU-145).

3.2 Przeniesienie komórek na szkiełka nakrywkowe do płytek 6-dołkowych

Przed przeniesieniem komórek na szkiełka nakrywkowe należy wykonać pasażowanie komórek zgodnie z instrukcją opisaną w Rozdziale 2.2. Po wykonaniu pomiarów, przystępujemy do przeniesienia komórek z butelki na szkiełka nakrywkowe, które zostają umieszczone w płytkach 6-dołkowych do hodowli komórkowej (Rysunek 2):

1. Umieść po jednym szkiełku nakrywkowym do każdego dołka.
2. Pobierz 5 ml medium i dodaj do każdego dołka.
3. Pobierz odpowiednią objętość zawiesiny komórkowej, przyciśnij (delikatnie, aby szkło nie pękło) końcówkę pipety na środku szkiełka i powoli nakrapiaj.
4. Umieść płytkę 6-dołkową w inkubatorze na 2 dni.



Rysunek 2: Szkiełko nakrywkowe i płytka 6-dołkowa.

4 Napromienianie

- linia komórkowa PC-3 (($2,0 \times 10^5$ komórek) x 2), bo 2 szkiełka w środku szalki Petriego)
- linia komórkowa DU-145 (($1,8 \times 10^5$ komórek) x 2), bo 2 szkiełka w środku szalki Petriego)

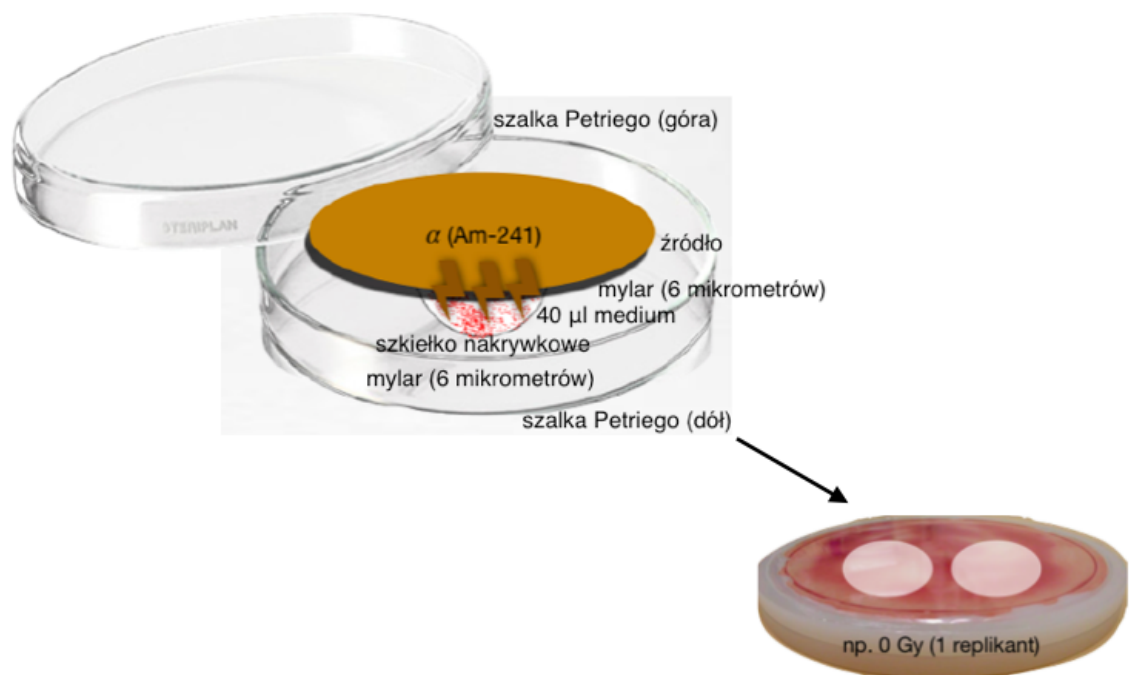
4.1 Przygotowanie pożywki hodowlanej przed napromienianiem

Optymalna pożywka hodowlana, którą wykorzystujemy podczas napromieniania komórek: roztwór DMEM - F12 zawierający 0% FBS i 0,6% antybiotyku (PC-3) oraz RPMI - 1640 zawierający 0% FBS i 0,6% antybiotyku (DU-145).

4.2 Napromienianie komórek

1. Dodaj 18 ml medium do każdej szalki Petriego.
2. Przygotuj dodatkowe szalki Petriego, na których będziesz umieszczać mylar, szkiełko nakrywkowe oraz źródło podczas napromieniania komórek.
3. Wyjmij szkiełko nakrywkowe z jednego dołka z płytki 6-dółkowej i umieść na przygotowanej szalce Petriego, na której został umieszczony mylar.
4. Dodaj 40 μ l medium na szkiełko nakrywkowe.
5. Przykryj mylarem.
6. Umieść źródło promieniowania α (*Ameryk* – 241) na szkiełku nakrywkowym pokrytym mylarem.
7. Ustaw odpowiedni czas (w zależności od mocy dawki, jaką chcesz napromienić komórki) na stoperze i wykonaj napromienianie komórek.
8. Zdejmij źródło promieniowania α oraz folię mylar ze szkiełka i umieść je w szalce Petriego (tej z medium).
9. Wykonaj stosowne oznaczenia na szalce Petriego i umieść ją w inkubatorze na 3-5 dni.

Po 3-5 dniach inkubacji wykonaj izolację egzosomów.



Rysunek 3: Schemat napromieniania komórek.

Tabela 1: Czasy napromieniania komórek w zależności od mocy dawki.

Dawka	0 Gy	2 Gy	6 Gy
Czas napromieniania (mm:ss)	10:00	03:20	10:00