

Téma: Buněčné kultury

Úvod:

Buněčné kultury patří v současné době k nejpoužívanějším biologickým modelům. Buněčné kultury živočišných buněk slouží pro studium nových léčiv, kultury rostlinných buněk, mají značný význam ve šlechtitelství a genovém inženýrství při produkci transgenních plodin. Pro úspěšnou kultivaci buněk musí být splněny podmínky prostředí podobné prostředí *in vivo*, které zajišťují kultivační média a inkubátory. Kultivační médium musí obsahovat vyvážený poměr aminokyselin, cukrů, vitamínů, solí, mastných kyselin, antibiotik a stabilizátorů pH, které jsou nezbytné pro růst buněk. Po určité době buňky v kultuře vyčerpají živiny z média či jejich počet stoupne na neúnosnou míru, proto je nutné část buněk odebrat, smísit s novým médiem a přenést do nové kultivační láhve. Práce s buněčnými kulturami vyžaduje zvláštní vybavení a manipulaci. Jedním z hlavních požadavků je udržení sterility, proto je nutno pracovat v aseptickém prostředí, které zabráňuje kontaminaci mikroorganismy (bakterie, viry, houby, paraziti). Sterilní prostředí je zajištěno použitím laminárních boxů neboli flowboxů s horizontálním či vertikálním směrem proudění sterilního vzduchu, používáním sterilních nástrojů, pomůcek, roztoků nádob, dále rozdělením pracovišť na septickou a aseptickou část, dezinfekcí a používáním ochranných pomůcek. Nejjednodušším způsobem, jak vysterylizovat drobnější kovové či skleněné předměty (pinzety), je opláchnutí předmětu 96% ethanolem a následné opálení nad lihovým kahanem. Kromě toho existuje celá řada různých sterilizátorů: parní - autoklávy, horkovzdušné, chemické, radiační. Pro práci v aseptickém prostředí se zásadně doporučuje nošení laboratorního oblečení a gumových rukavic, které se navíc po navléknutí omyjí 96% ethanolem.

Úkol č. 1: Pozorování buněčné kultury inverzním mikroskopem

Materiál: různé buněčné kultury

Pomůcky: inverzní mikroskop

Postup:

1. Seznamte se s použitím inverzního mikroskopu.
2. Pozorujte inverzním mikroskopem různé buněčné kultury v kultivačních lahvích. Sledujte tvar a denzitu buněk.

Úkol č. 2: Práce ve flowboxu

Materiál: různé buněčné kultury

Chemikálie: kultivační média

Pomůcky: flowbox a sada sterilních pomůcek pro práci ve flowboxu

Postup:

1. Před začátkem práce v flowboxu je potřeba zapnout flowbox a zároveň UV záření přibližně na 15 minut.
2. Před prací ve flowboxu otřete pracovní plochu 70% ethanolem. Nasad'te si gumové rukavice a omyjte je 96% ethanolem a nechejte ve flowboxu uschnout.

3. Při práci v boxu je důležité udržovat čistotu a pořádek.
4. V boxu s vertikálním laminárním prouděním je potřeba myslet na to, že NIKDY nepohybujeme rukama či nesterilními pomůckami NAD sterilními předměty, otevřenými nádobami, lahvemi, zkumavkami atp. V případě flowboxu s horizontálním prouděním vzduchu takto nečiníme ZA sterilními předměty.
5. Sterilními špičkami nebo skleněnými pipetami je potřeba manipulovat tak, abychom se nikdy nedotkli ničeho nesterilního.
6. Po ukončení práce je třeba vždy důkladně uklidit pracovní plochu. Tu otřete nejprve destilovanou vodou a poté 96% ethanolem. Pokud jste při práci používali vakuovou pumpu, je potřeba promýt nasávací hadičku 96% ethanolem.

Otázky:

1. Jak se nazývá první buněčná kultura odvozená z lidské tkáně? Kdy byla odvozena a používá se dodnes?
2. Jak se liší inverzní mikroskop od klasického světelného mikroskopu, a proč se využívá k pozorování buněčných kultur v kultivačních nádobách?

Použitá literatura:

AescuLab - systematické laboratorní vzdělávání studentů a pracovníků VaV
v oblasti Life Sciences s podporou e-learningu, úloha číslo AE-203: Práce v aseptickém prostředí, Dolečková.