

«Клеточная инженерия»

Курс лекций кафедры фундаментальной медицины и биологии ВолгГМУ
для студентов медико-биологического факультета

Кость



Натуральный
киллер
НК клетка



T лимфоцит

Нейтрофил



Базофил

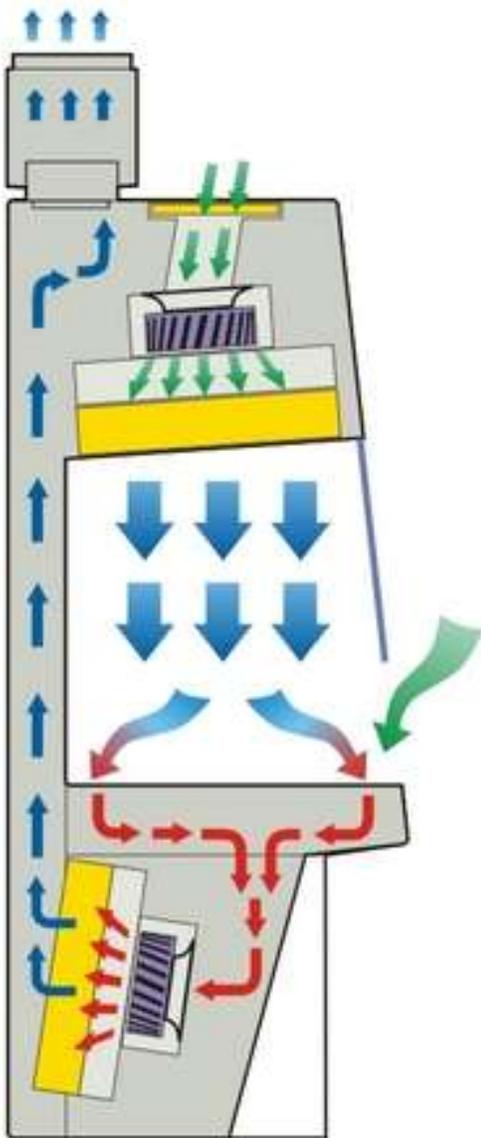
Прогениторная
клетка
лимфоидного

Тема лекции:

«Биология клетки в культуре. Материалы для клеточных технологий и клеточной инженерии. Часть 1».



Ламинарный шкаф



- Данные боксы представляют собой электрооборудование, в основе функциональности которого лежит действие воздушного потока определенной конфигурации, так называемый ламинарный поток, который является своеобразной преградой для выброса опасных соединений из рабочей камеры.
- В оборудовании присутствует система фильтрации. Прежде чем оказаться в закрытом пространстве воздух подвергается очистке несколькими фильтрами. Каждый фильтр способен улавливать частицы определенного размера.
- Помимо этого ламинарный бокс оснащен специальными блоками ультрафиолетового облучения, которые задвигаются под столешницу во время работы бокса.
- Двигатель вентилятора данного оборудования управляется при помощи микропроцессорной системы, что позволяет максимально снизить уровень электропотребления и снизить эффект акустических помех.

Ламинарный шкаф



Все ламинарные боксы оснащены фронтальным прозрачным закаленным стеклом, которое позволяет проводить наблюдение за исследуемым объектом, отделяя при этом рабочую зону от окружающего пространства помещения. Стекло имеет механизм подъема, что позволяет зафиксировать его в необходимом положении и провести обработку рабочей камеры и стекла дезинфицирующими растворами. Учитывая, что ламинарный бокс окрашен порошковым методом, поверхность оборудования может смело подвергаться обработке сильнодействующими дезинфицирующими средствами. Подъемный механизм оснащен датчиком, который подает сигнал в случае неверной фиксации стекла.

Автоклав



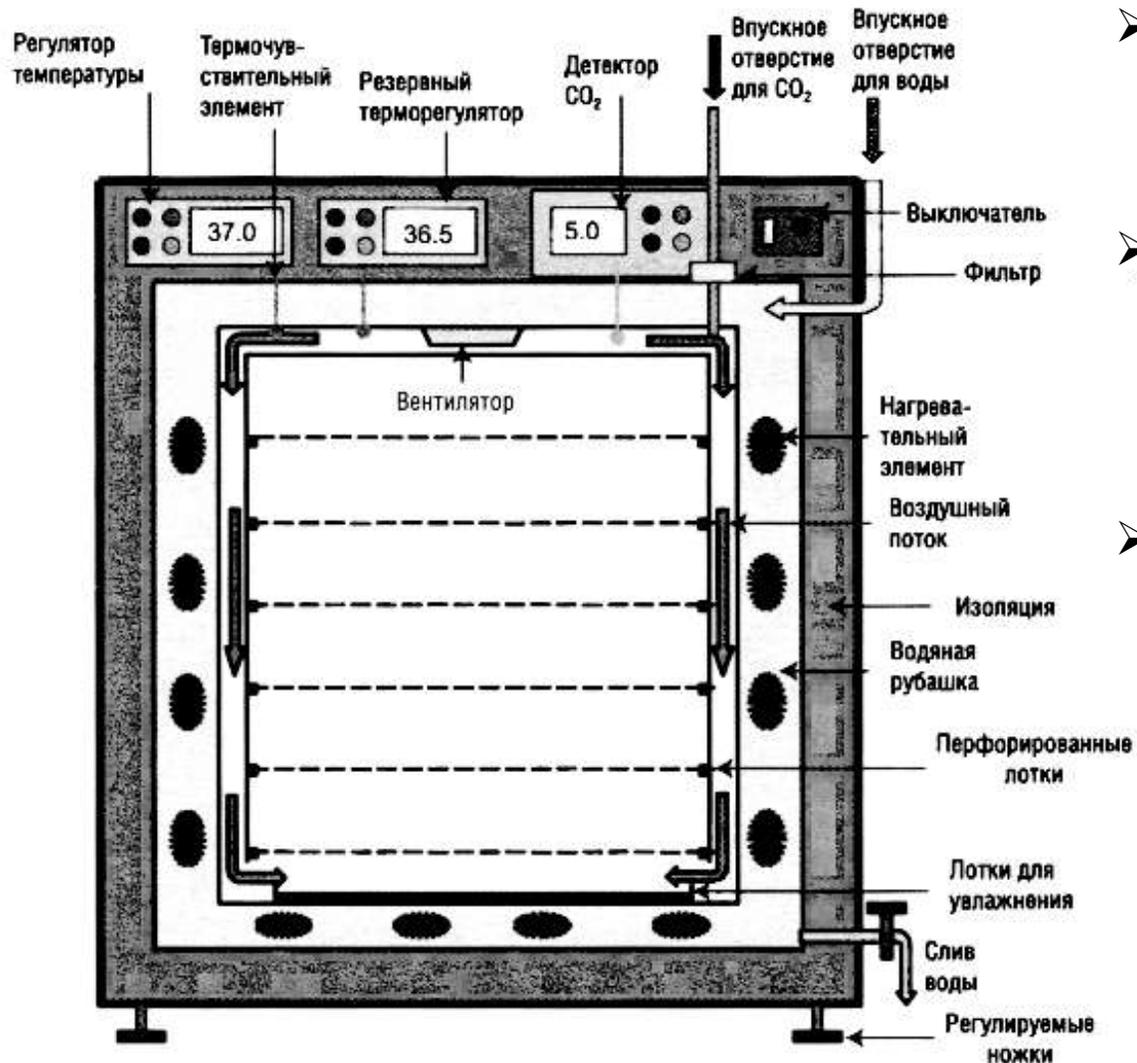
Устройство предназначено для обеззараживания и для стерилизации инструментов и лабораторных принадлежностей — за счет воздействия водяного пара при повышенной температуре и давлении. Также автоклав применяют для стерилизации: питательных сред и буферных растворов; пластикового и стеклянного оборудования; текстильной продукции; биологически-опасных веществ и отходов.

Автоклав



Принцип действия автоклава основан на возрастании температуры кипения воды при повышении давления (при давлении в 1 атм t° кипения воды $99,1^{\circ}\text{C}$, а при давлении в 2 атм. — $119,6^{\circ}\text{C}$). При обычном атмосферном давлении вода закипает при температуре 100°C . При повышении давления на 1 атм ($98,0665$ кПа) сверх обычного, кипячение и парообразование начинается когда температура достигает $120\text{—}120,5^{\circ}\text{C}$. Пар, образующийся при этих условиях, убивает микробов в течение 30 мин. Пар при давлении, превышающем обычное на 2 ат ($196,133$ кПа), имеет температуру 134°C и убивает микробов в течение $15\text{—}20$ мин.

CO₂-инкубатор



- Применяются для создания и поддержания необходимых параметров среды для выращивания биологических проб, культур клеток и тканей.
- Для равномерного распределения тепла во внутреннем пространстве, инкубаторы имеют водяную рубашку, что позволяет избежать холодных пятен.
- Высокий уровень влажности (до 98% при 37°C) позволяет избежать дегидратации образцов. Контроль влажности достигается использованием увлажняющих поддонов, а контроль давления CO₂ — при помощи CO₂-регулирующего оборудования, которое всасывает воздух из инкубатора в отдельную камеру, где определяется концентрация CO₂, а также вводит чистый CO₂ в инкубатор для пополнения дефицита.

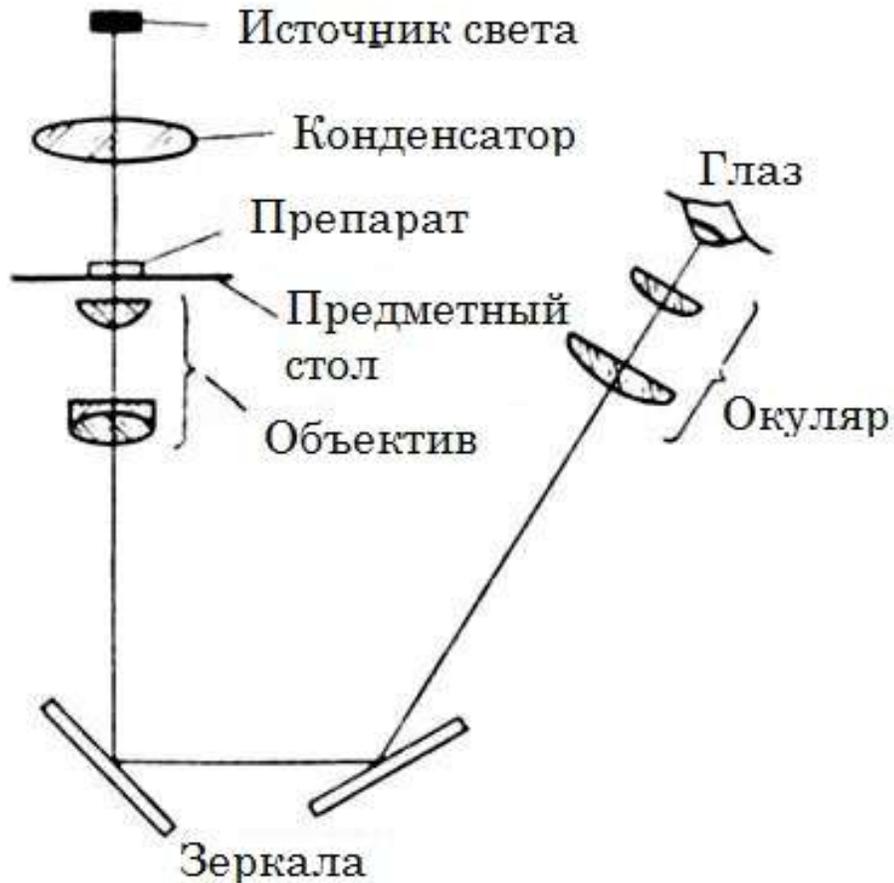
CO₂-инкубатор



Воздух циркулирует вокруг инкубатора путем естественной конвекции или в результате использования вентилятора, который поддерживает как уровень CO₂, так и температурный режим.

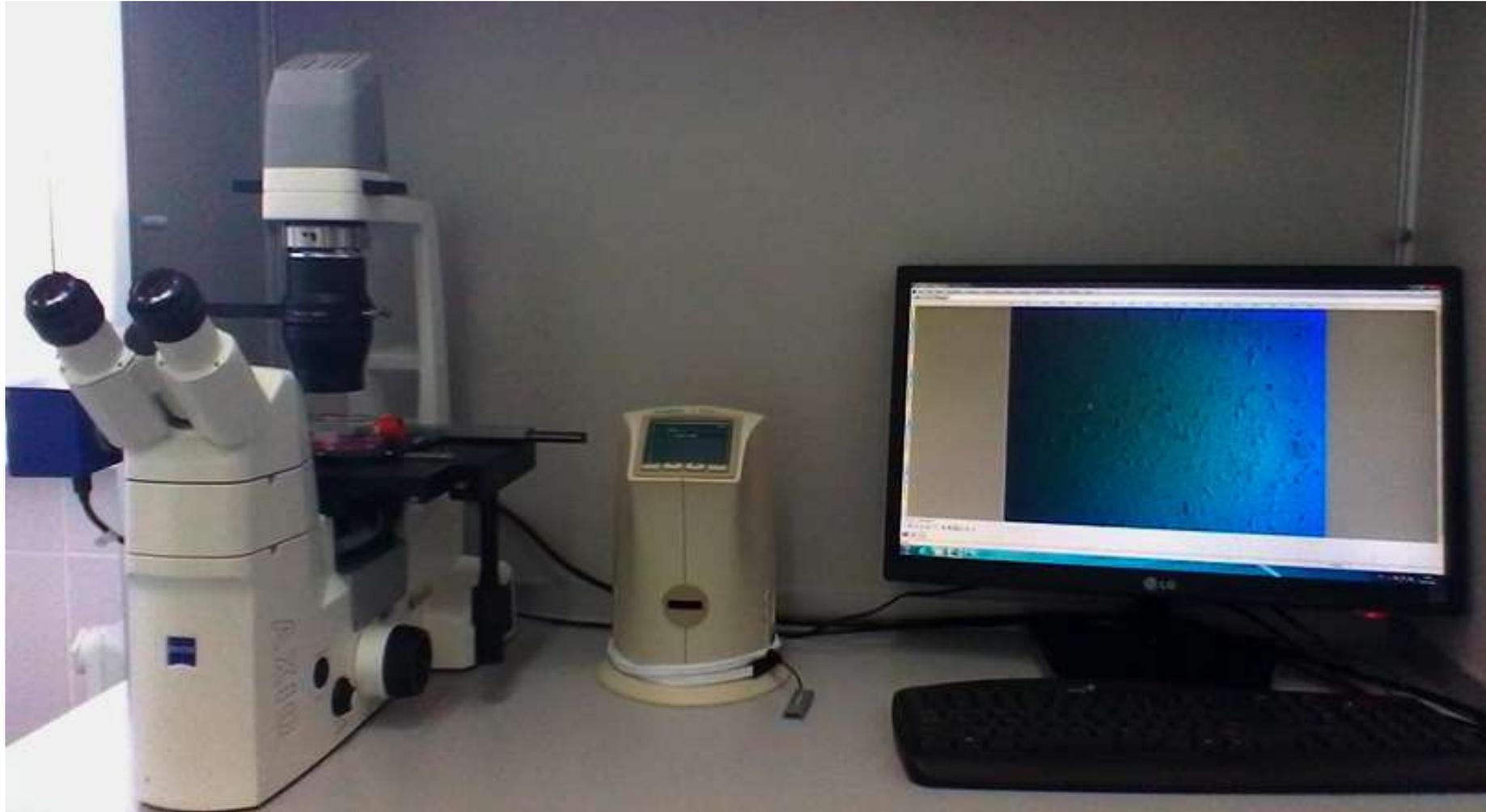
Полки инкубатора обычно перфорированы для улучшения циркуляции воздуха. Однако перфорация может привести к неравномерности распределения клеток в монослойных культурах и различию в клеточной плотности в образцах, располагающихся на разных полках. Такие различия могут возникнуть в результате конвекционных потоков, возникающих над точками контактов чашек с полками по сравнению с дырками в полках, либо могут иметь отношение к областям местного охлаждения, возникающим при открывании дверей.

Инвертированный микроскоп

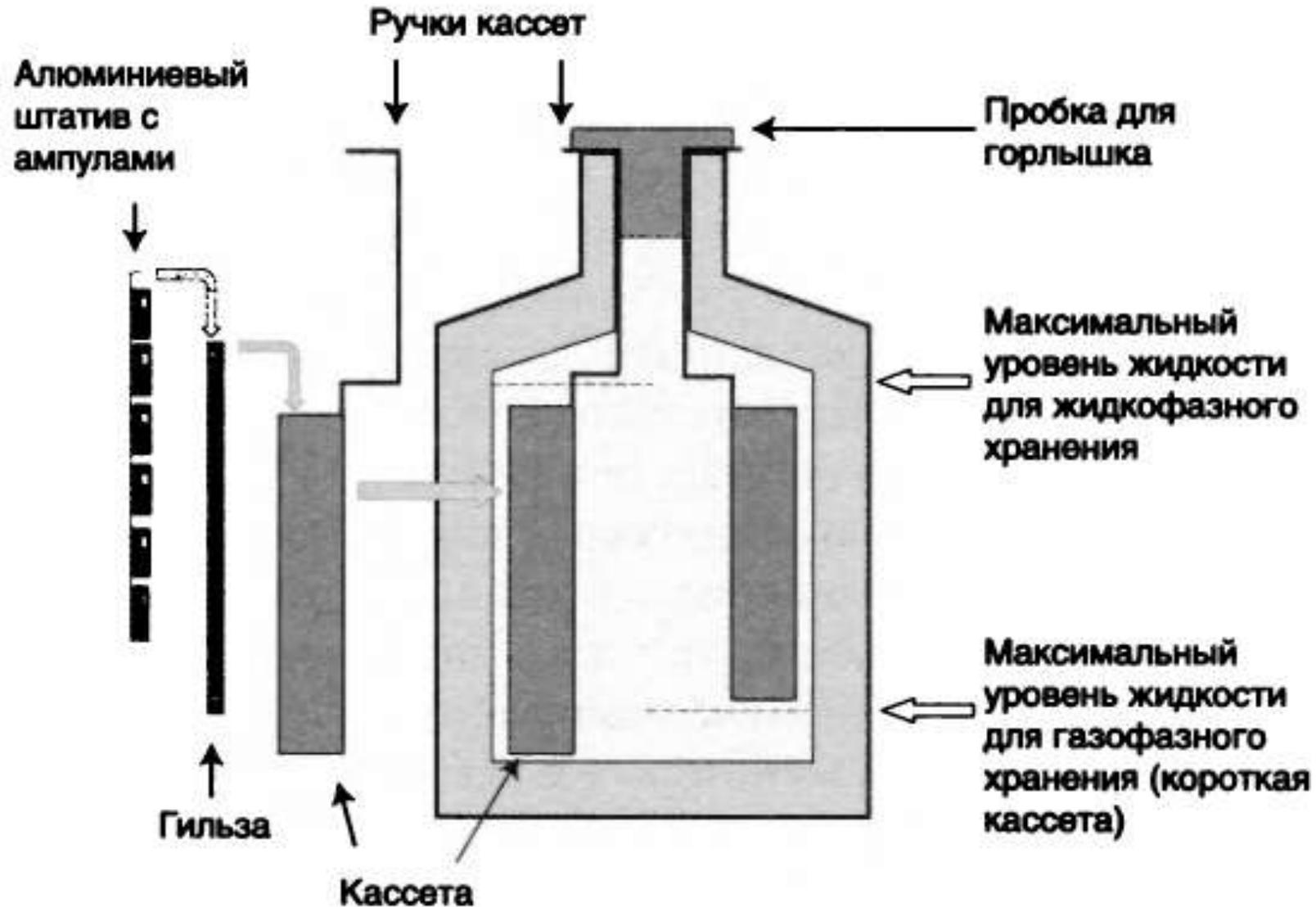


- Инвертированный микроскоп – это оптический прибор с «перевернутой» конструкцией, которая позволяет вести исследование объекта с его нижней стороны.
- Функцию покровного стекла выполняет стеклянное дно лабораторной посуды, через которое и ведется наблюдение. Объективы микроскопа расположены под исследуемым образцом, осветительный конденсор находится сверху.
- Инвертированные микроскопы отличаются меньшим увеличением в сравнении с другими типами приборов. Это связано с тем, что лабораторная посуда имеет более толстое дно (1-3 мм) в сравнении с толщиной покровного стекла (0,17 мм).

Инвертированный микроскоп



Криоконтейнер



Криоконтейнер

Криоконтейнеры представляют собой контейнеры с двойными стенками, вакуумной и многослойной изоляцией, которые предназначены для транспортировки и хранения жидкого азота.

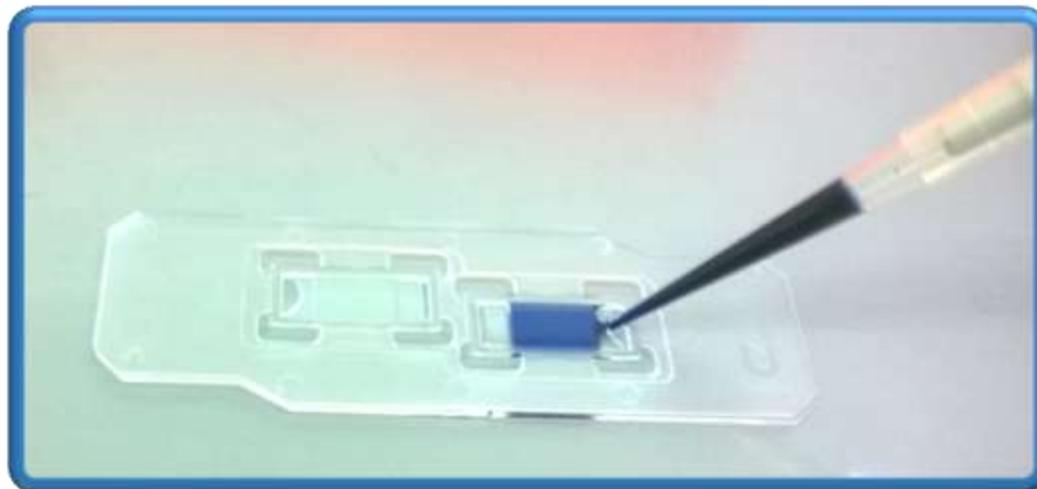
- Отличительная особенность некоторых криоконтейнеров является хранение продукта при низком давлении. Внутренний резервуар высокого давления изготовлен из нержавеющей стали и находится внутри наружной вакуумной рубашки из нержавеющей стали. Система крепления является внутренней, она полностью изготовлена из нержавеющей стали и рассчитана на малые утечки тепла и высокую прочность.
- Пространство между наружным и внутренним сосудами представляет собой систему теплоизоляции. Многослойная изоляция и высокий вакуум обеспечивают длительность хранения продукта. Система теплоизоляции базируется на длительном сохранении вакуума; она герметизируется в заводских условиях. Вакуумное пространство защищено от избыточного давления разрывной диафрагмой с обратным прогибом, которая работает как вторичное предохранительное устройство. Для защиты внутреннего резервуара высокого давления от избыточного давления устройство снабжено предохранительным клапаном.

Криоконтейнер



Оборудование, используемые при работе с культурами животных клеток.

Счетчик клеток



Физико-химические свойства BSS.

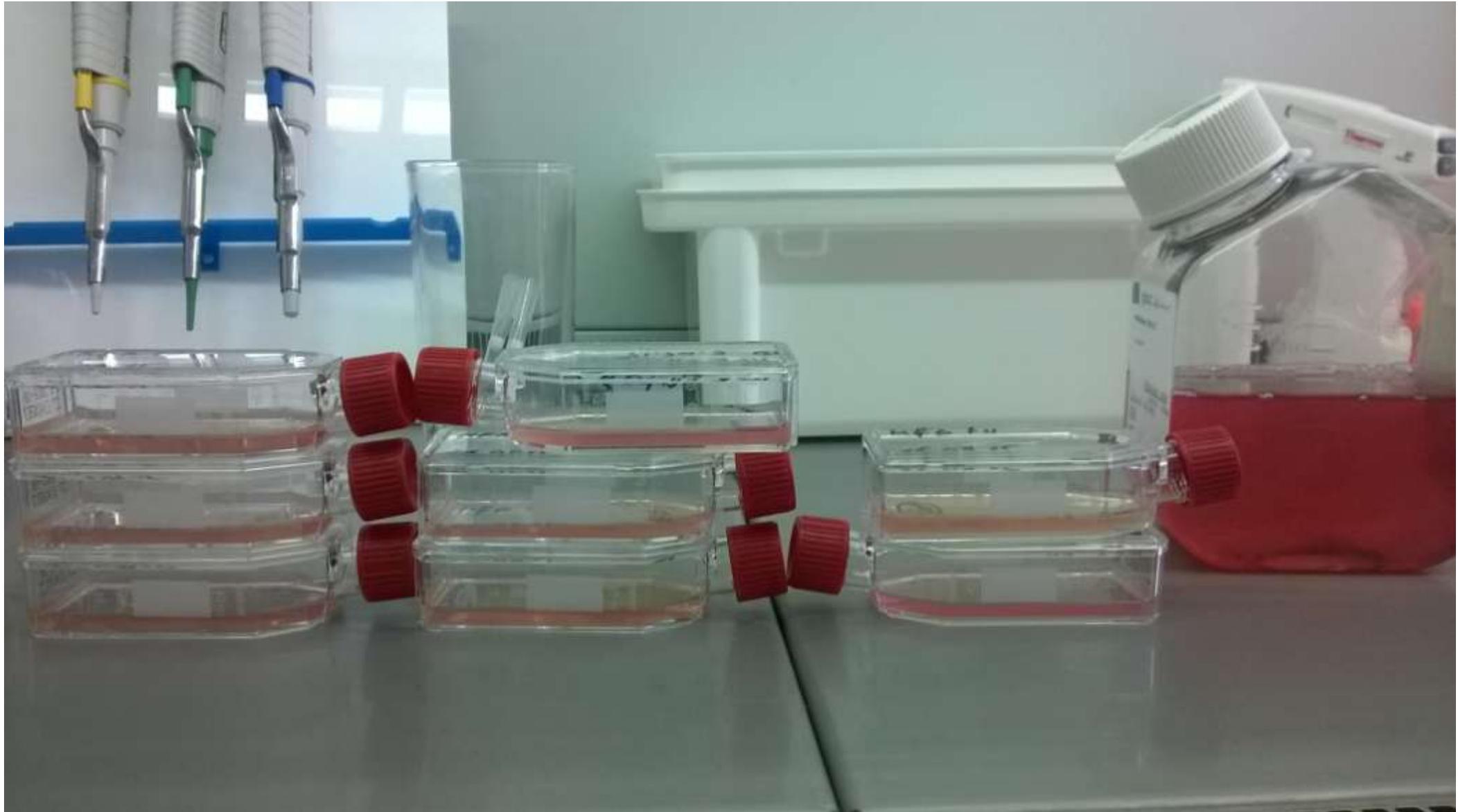
1. pH

Большинство клеток хорошо растут при pH 7,4. Хотя оптимальные значения pH варьируют в относительно небольшом диапазоне для разных клеточных линий, некоторые нормальные фибробласты лучше растут при pH 7,4-7,7, в то время как для трансформированных клеток оптимальное значение pH находится в диапазоне 7,0-7,4. В особых случаях для доказательства полезно проведение кратковременных экспериментов по исследованию эффективности роста или исследования эффективности посева для определения оптимальных значений pH.

В качестве индикатора pH обычно используется феноловый красный. При pH 7,4 он красного цвета, при pH 7,0 становится оранжевым, при pH 6,5 — желтым и лимонно-желтым при более кислых значениях pH. При pH 7,6 цвет индикатора сдвигается в розовую область, при pH 7,8 становится фиолетовым.

Сбалансированные солевые растворы

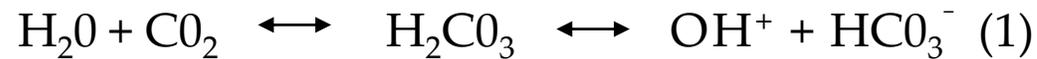
Физико-химические свойства BSS.



Физико-химические свойства BSS.

2. CO₂ и бикарбонат натрия.

Углекислый газ из газовой фазы растворяется в среде, достигает равновесия с ионами HCO₃⁻ и понижает pH. Так как растворенные CO₂, HCO₃⁻ и pH взаимосвязаны, трудно определить главный прямой эффект CO₂. Атмосферное парциальное давление CO₂ будет прямо регулировать концентрацию растворенного CO₂ как функцию температуры. Эта регуляция, в свою очередь, приводит к образованию H₂CO₃, который диссоциирует в соответствии с реакцией



HCO₃⁻ имеет довольно низкую константу диссоциации с большинством доступных катионов и, таким образом, имеет тенденцию реассоциировать, закисляя при этом среду. Конечный результат повышения концентрации атмосферного CO₂ — снижение pH, и, таким образом, эффект повышения парциального давления CO₂ нейтрализуется повышением концентрации би-карбоната:



Повышенная концентрация HCO₃⁻ сдвигает уравнение (1) влево, пока не будет достигнуто равновесие при pH 7.4.

Физико-химические свойства BSS.

3. Осмотическое давление.

Большинство клеток в культуре проявляют довольно широкую толерантность в отношении осмотического давления. Так как осмотическое давление в плазме крови человека составляет 290 мосмоль/кг, резонно допустить, что этот уровень является оптимальным для клеток человека *in vitro*, хотя он может отличаться для других видов (например, для мышей это значение составляет 310 мосмоль/кг. На практике, для большинства клеток допустимо осмотическое давление в диапазоне от 260 мосмоль/кг до 320 мосмоль/кг; выбранного значения следует придерживаться, допуская разброс ± 10 мосмоль/кг. Слегка гипотоническая среда может использоваться при культивировании клеток в чашках Петри или в открытых планшетах для компенсации испарения во время инкубации.

Физико-химические свойства BSS.

4. Температура.

Оптимальная температура для культивирования клеток зависит от

- температуры тела животного, из которого клетки были получены,
- некоторых анатомических вариаций (например, температура кожи и тестикул может быть ниже температуры покоящегося тела)
- учета фактора безопасности, так как могут иметь место небольшие ошибки в регулировке инкубатора.

Таким образом, в целях безопасности, для большинства клеточных линий человека и тепло-кровных животных рекомендуется температура 37 °С, которая немного ниже температуры тела, так как перегревание является более серьезной проблемой, чем переохлаждение.

Сбалансированные солевые растворы

Раствор Эрла (EBSS).

Применяют при высокой концентрации в среде бикарбоната в сочетании с 5% CO₂ в газовой фазе. Обычно используется для суспензионных культур, а также при проблеме слипания клеток.

Фосфатный буфер Дульбекко (PBS).

Буфер схож по составу с HBSS, но в PBS отсутствует бикарбонат, а содержание Na₂HPO₄ и KH₂PO₄ повышено для обеспечения большей буферной ёмкости. Данный буфер не используется в качестве основы для культуральных сред. PBS без кальция и магния (PBS-A) используется чаще всего для промывки монослоя (например перед обработкой трипсином) и для разбавления красителей и реагентов, используемых при культивировании. PBS с кальцием и магнием (DPBS) используется для поддержания pH культуральных сред.

Раствор Хэнкса (HBSS).

Разработан для поддержания культуры клеток в атмосфере без CO₂, таким образом используется для культивирования в закрытых флаконах и в атмосфере воздуха. для промывки клеток перед обработкой трипсином и для диссоциации клеток, используют среду Хэнкса без ионов кальция и магния. Буферный раствор с этими ионами используют для поддержания pH и осмотического баланса культуральных сред, а также для обеспечения клеток неорганическими ионами.