|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Jméno a příjmení:** |  |  |
| **Číslo skupiny:** |  |  |
| **Studijní obor:** |  |  |

**Základy kultivace buněk – cvičení (EMKB0311c)**

**DEN 1**

**Náplň cvičení:
• Seznámení se s laboratoří, BOZP, specifika práce s GMO, aseptická práce**

**• Pipetování přesných objemů**

**• Vážení za použití analytických vah**

**• Ředění směsí**

**• Základy aseptické práce v laboratoři**

**• Příprava medií (DMEM F12, RPMI):**

* **Vážení**
* **Ředění**
* **Úprava pH**
* **Antibiotika**

**Teoretická příprava**

**Pipetování**Pipetování pomocí automatické pipety slouží k nasátí přesných objemů kapalin a jejich vypuštění do zvolené nádoby při nezměněném objemu.

**Funkce automatické pipety:**Tlačítko automatické pipety má tři polohy. V klidu (výchozí poloha) je tlačítko v nejvyšší pozici a lze jej postupně stlačit ke kalibrační zarážce (2. poloha). Pro přímé pipetování při nasávání tekutin nejdříve stlačíme píst do 1. polohy a ponoříme špičku pipety do kapaliny. Uvolněním pístu do výchozí polohy vzniká podtlak, který umožňuje nasátí příslušného objemu kapaliny. Pro vypuštění kapaliny stlačíme píst do 2. polohy, dojde tak k úplnému vypuštění celého objemu nasáté kapaliny.

Pro nastavení požadovaného objemu: Nastavíme pipetovací píst do výchozí polohy a pomocí otáčecího mechanismu navolíme požadovaný objem na číselníku. Na některých pipetách je potřeba zmáčknout pojistku chránící před nechtěným otočením pístu.

**V rámci pipetování existují tři základní techniky:**

* **Přímá technika** pipetování doporučená pro vodné roztoky jako pufry, zředěné kyseliny nebo zásady (pipetování reagens do roztoků).

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Klidová pozice** | **1** | **2** | **3** | **4** |
| **První pozice** | ↓ | ↑ | ↓ | ↑ |
| **Druhá pozice** |  |  | ↓ | ↑ |

* **Repetitivní technika** pipetování je doporučená pro opakované dávkování stejného objemu (přidávání do zkumavek nebo na destičky)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Klidová pozice** | **1** | **2** | **3** | **4** |
| **První pozice** | ↓ | ↑ | ↓ | ↑ |
| **Druhá pozice** | ↓ | ↑ |  |  |

* **Reverzní technika** pipetování se doporučuje pro pipetování vzorků, které se nepřidávají nebo nemíchají s jinými roztoky. Tato technika předchází riziku tvorby pěny a bublin a využívá se tedy pro pipetování viskózních roztoků a roztoků s tendencí pěnit.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Klidová pozice** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** |
| **První pozice** | ↓ | ↑ | ↓ |  | ↑ |
| **Druhá pozice** | ↓ | ↑ |  | ↑ | ↑ |

**Postup pipetování (přímá technika):**

1. Nasaďte na automatickou pipetu špičku.
2. Stiskněte píst do první polohy.
3. Ponořte špičku cca 2 mm pod hladinu pipetované kapaliny.
4. Pomalu uvolňujte píst až do výchozí polohy (pozor na vznik bublin ve špičce).
5. Nasátou kapalinu pipetujeme do vybrané nádoby postupným stisknutím pístu do první a následně druhé polohy.
6. Stisknutím tlačítka odstraníme špičku do odpadní nádoby (v závislosti na typu pipety speciální tlačítko, nebo další poloha hlavního tlačítka).

**Vážení**

**Princip metody vážení na vahách**

Tíha, působící na misku vah je převedena na elektrickou veličinu (nejčastěji je měřen elektrický odpor polovodičového článku ve vahách způsobený zatížením misky vah)

**Typy laboratorních vah:**

* **předvážky** – váhy s větším rozsahem měřených hodnot (desítky gramů až kilogramy) a nižší přesností. Na předvážkách si měřené množství připravíme a v případě potřeby jej pak dovážíme na přesných analytických vahách
* **váhy přesné** – určitý mezistupeň mezi předvážkami a váhami analytickými
* **váhy analytické** – kvalitní váhy s velkou přesností na cca 1/10000 měřené hmotnosti

**Postup vážení:**

1. Provede se kontrola vah, tj. kontrola čistoty vah a kontrola vyvážení podle libely. Pro případné čistění se používá štětec. Vyvážení se provádí seřízení polohy vah pomocí otáčení matic na podstavci vah.
2. Zaznamenají se údaje o váze, tj. typ, váživost a přesnost.
3. Po zapojení do proudu a spuštění vah se zkontroluje správnost nulové polohy a počet desetinných míst, na které váha váží.
4. Vážení se naváží přímým způsobem za použití funkce TARA.

**ÚKOL: OPAKOVANÉ PIPETOVÁNÍ PŘESNÉHO OBJEMU**

Pomůcky: zkumavka (0,2 ml; 1,5 ml; 15 ml), H2O, váhy laboratorní, váhy analytické, pipeta 0,1 ml, 1 ml a 10 ml, příslušné špičky na pipety.

Opakovaně 5× napipetuj do příslušných zkumavek **0,01 ml, 0,5 ml 7 ml** vody a zvaž.

Urči směrodatnou odchylku.



|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Měření 1. | Měření 2. | Měření 3. | Měření 4. | Měření 5. | Průměr | Rozptyl | Směrod. Odch. |
| 0,01 ml |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 0,5 ml |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 7 ml |  |  |  |  |  |  |  |  |

**Pufry**
**Kritéria pro výběr vhodného pufru při biologickém výzkumu**

V současné době je známa celá škála pufrů, které jsou vhodné pro různé biologické systémy. Nicméně povědomost o vhodnosti/nevhodnosti pufrů pro biologické experimenty není tak stará a sahá teprve do roku 1966. Tehdy prof. Norman Good z Michigan State University publikoval práci, kde představil kritéria vhodných pufrů a publikoval 20 různých pufrů, které těmto kritériím odpovídají.

**Kritéria vhodnosti pufru dle Gooda:**

* **pKa (disociační konstanta)** mezi 6-8. pKa pufru by mělo být mezi 6-8, protože většina biochemických experimentů vyžaduje rozsah pH 6-8.
* **Toxicita:** Pufr nesmí být v daném biologickém systému toxický.
* **Rozpustnost pufru ve vodě**: Pufr by měl být vysoce rozpustný ve vodě.
* **Omezená permeabilita biologickými membránami:** Významná prostupnost pufru biologickými membránami vede k disproporční akumulaci pufru v subcelulárních prostorech. Biologické membrány nejsou permeabilní pro obojetné pufry (tj. pufry, které nesou pozitivní a negativní náboje na různých atomech molekuly, např. MOPS a HEPES).
* **Inertnost:** Pufr nesmí ovlivňovat studované biochemické reakce a interagovat s kritickými reakčními komponentami. Příklad: citrát je chelátorem vápníku, tudíž nelze citrátové pufry využít při reakcích, kde je jednou z komponent vápník. Dalším příkladem jsou aminové skupiny v Trisu, které reagují s DEPC (diethyl pyrokarbonát) využívaným při inaktivaci RNáz. Obdobně s DEPC reaguje HEPES. Proto v pufrech Tris a HEPES nelze použít působení DEPC.
* **Minimální vliv koncentrace a teploty na disociaci:** To znamená, že při ředění zásobního pufru by nemělo docházet k výrazným změnám pH pufru.
* **Chemická stabilita:** Pufry by měly být při experimentálních podmínkách stabilní.
* **Absorbance:** Pufr by neměl výrazně absorbovat UV při vlnových délkách, které jsou využívány např. pro spektrofotometrické vyhodnocování vzorku.

**Příklady pufrů:** HEPES, PIPES, fosfátový pufr (PBS), směs kyseliny octové a octanu sodného.

**Kultivační médium**

Toto médium se svým chemickým složením a fyzikálními vlastnostmi snaží co nejvíce přiblížit přirozenému prostředí v těle (*in vivo*), tedy tělním tekutinám (lymfě, krevní plazmě, mozkomíšnímu moku atd.). Musí se přísně kontrolovat koncentrace solí a organických živin, hodnota pH, teplota prostředí, ve kterém se vzorek vyvíjí, a mnoho dalších faktorů. Velký důraz se musí klást na sterilitu používaných nástrojů, aby nedošlo ke kontaminaci dané kultury.

Častou součástí živného média je sérum (fetální bovinní sérum), které iniciuje buňky k dělení, a tedy i růst celé kultury (dnes už jsou k dispozici i média nevyžadující doplněk séra). Další součástí tohoto média jsou antibiotika, aby se předcházelo infekci, a tedy i zániku celé kultury.

**ÚKOL: PŘÍPRAVA 50 ml KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ M1 A PB1 (Proveď a zapiš)**

Pomůcky: kádinky, destilovaná voda, váhy laboratorní, pipeta 1 ml a 10 ml, příslušné špičky na pipety, pH metr, DMEM/F12, NaHCO3, FBS inaktivované, Pen/Strep, RPMI 1640, laminární box, zkumavky 50 ml, injekční stříkačky 20 ml, filtry 0,2 µm.

**M1 (kultivace mesenchymálních kmenových buněk):**

* DMEM/F12**:** na přípravu 25 ml média navážíme 0,3 g práškového média DMEM/F12 + 0,1 g NaHCO3, doplníme destilovanou vodou na objem cca 20 ml, roztok média necháme rozpustit, po změření pH dorovnáváme hodnotu pH na 7-7,2. Doplníme objem média na 22,5 ml.
* FBS (10%): Přidáme 2,5 ml FBS do roztoku média.
* Pen/Strep (1%): Přidáme 250 µl antibiotika Pen/Strep.

**PB1 (kultivace mononukleárních buněk periferní krve)**

* RPMI 1640: na 25 ml navážíme 0,26 g média + 0,1 g NaHCO3, doplníme vodou na objem cca 20 ml, roztok média necháme rozpustit, po změření pH dorovnáváme hodnotu pH na 7-7,2. Doplníme objem média na 22,5 ml.
* FBS (10%): Přidáme 2,5 ml FBS do roztoku média.
* Pen/Strep (1%): Přidáme 250 µl antibiotika Pen/Strep.

Navážení, ředění vodou a úprava pH probíhá standardně v laboratoři. Přidání FBS a antibiotik probíhá v laminárním boxu za dodržování základů aseptické práce. Po namíchání obou médií filtrujeme média pomocí injekční stříkačky a 0,2 µm filtrů do nových popsaných 50 ml zkumavek (Typ média, skupina, datum).