

PROTOKOL ZA PRESADIVANJE ADHERENTNIH STANICA

Na prvoj vježbi presađujemo **stanice HEK293** (imortalne stanice embrionalnog bubrega izolirane iz embrija nepoznatog porijekla 1973. godine).

1. Općenito o stanicama:

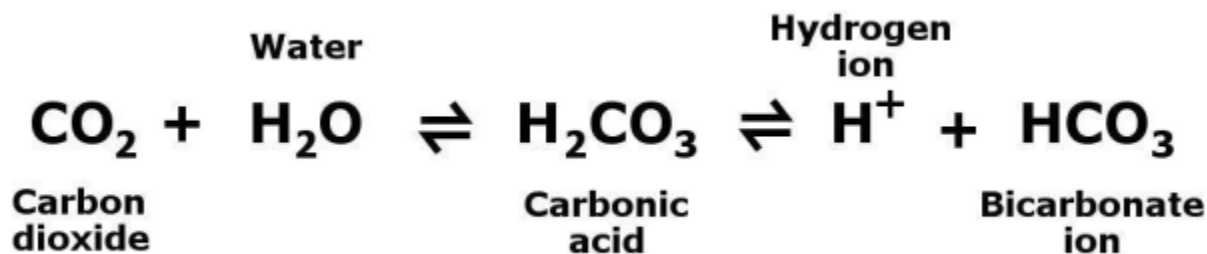
Stanice HEK293 su imortalne (tumorske) stanice embrionalnog bubrega izolirane 1973. godine iz abortiranog embrija nepoznatog porijekla. Stanice su imortalizirane adenovirusom 5 u laboratoriju Alexa van der Eba u Leidenu (Nizozemskoj). Na njima su rađena istraživanja vezana uz gensku ekspresiju i analizu proteina. Često se koriste i u proizvodnji lentivirusnih čestica. U prosjeku imaju **64 – 71 kromosoma** (tumorske stanice nemaju klasičnih 46 kromosoma).

2. Protokol:

Stanice rastu u različitim tipovima medija. Ovisno o staničnom tipu i potrebama rasta, mediji mogu imati više ili manje određenih komponenti. Stanice HEK293 rastu u tzv. **mediju DMEM** (engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium) koji je bogat aminokiselinama, ugljikohidratima, vitaminima, solima i **GLUKOZOM kao osnovnim izvorom hrane**.

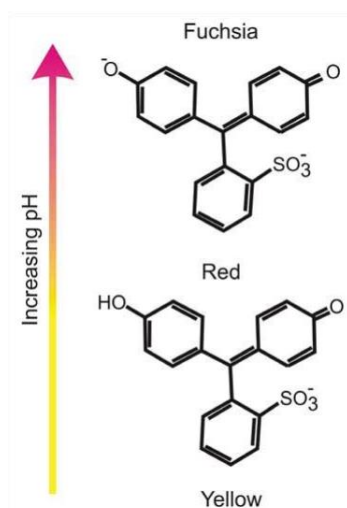
Mediji se **najčešće nadopunjuju SERUMIMA** – dodacima koji su bogati faktorima rasta, hormonima, faktorima za prihvaćanje za podlogu, albuminima, lipidima, transferinima željeza itd. Stanice HEK293 trebaju **10% fetalni goveđi serum** (engl. fetal bovine serum, FBS) u mediju DMEM. Dodatno se u medij mogu dodavati i antibiotici protiv bakterija (penicilin/streptomycin) no nije nužno ukoliko je osoba iskusna u radu sa staničnom kulturom.

Medij također ima i **indikator kiselosti** obzirom da stanice rastu u zatvorenoj CO₂ atmosferi te u samom mediju imaju **pufer** koji održava pH vrijednost, a bazira se na **bikarbonatnom puferu**.



Slika 1. Mehanizam djelovanja bikarbonatnog pufera.

Indikator kiselosti se zove **fenolno crvenilo**. Ako stanice predugo ostanu izvan inkubatora, one će postati **lužnate (ljubičasta boja)**, dok ako se medij **zakiseli** on će postati **žuti**. Stanice stalno izlučuju kisele komponente, stoga je potrebno održavati zatvorenu CO₂ atmosferu u ravnoteži unutar inkubatora. Kada medij postane žuti, stanice su vrlo vjerojatno prerasle podlogu te se medij mora hitno promijeniti jer su potrošene osnovne hranidbene komponente. Kisele komponente koje stanice izlučuju mogu ih potencijalno ubiti. Različiti tipovi stanica različitom brzinom izlučuju komponente i zakiseljavaju medij.



Slika 2. Promjena boje fenolnog crvenila uslijed promjene strukture indikatora (kemijska reakcija zbog promjene pH vrijednosti).

Kemikalije:

- Medij DMEM + 10% FBS
- 0,25% otopina tripsina u fosfatnom puferu (engl. phosphate buffered saline, PBS) + EDTA (engl. ethylenediaminetetraacetic acid)
- Fosfatni pufer (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, pH = 7,4) ili fiziološka otopina (0,9% NaCl)
- Tripansko modriilo (0,4% boja u 1 × fosfatnom puferu)

Napomena: Medij treba zagrijati 20 min na 37 °C u vodenoj kupelji; **tripsin** treba izvaditi na sobnu temperaturu i zagrijati ga 1 min na 37 °C u vodenoj kupelji, **ne dulje jer će početi sam sebe cijepati!** Fosfatni pufer (ili fiziološka otopina) stoji na sobnoj temperaturi kao i **tripansko modriilo**.

Uloge kemikalija:

Medij DMEM + 10% FBS – rast stanica i mogućnost prihvatanja za podlogu. Ako je riječ o **suspenzijskim stanicama** (najčešće limfociti, stanice izolirane iz krvi ili posebni modificirani sojevi prilagođeni rastu u suspenziji poput HEK293 FreeStyle koje u svojem originalnom obliku postoje kao adherentne stanice), njima **serum većinom nije potreban** jer se ne vežu za podlogu na kojoj rastu, a serum je bogat faktorima za adheziju.

Tripsin – odvaja stanice od podloge jer im **cijepa proteine** koji im služe za adheziju na površinu plastike kao i njih međusobno. **Plastika mora biti TRETIRANA (plazmom, polilizinom, kolagenom itd.)** i imati specifičan naboj da bi se proteini mogli vezati za nju (suprotni naboji se privlače dok sama netretirana plastika ima jednaki naboj proteinima za adheziju stanica, stoga se odbijaju). Ako se radi o suspenzijskim stanicama, one rastu na **netretiranoj plastici** jer se ne trebaju vezati za nju da bi rasle.

EDTA – **veže metalne kofaktore** koji su važni za aktivnost adhezijskih proteina čime pojačava odvajanje stanica od podloge.

Tripansko modrilo – **boji mrtve stanice** jer u žive stanice ne može ući zbog cjelovite membrane, a čak i kada uđe, stanica ga izbací zbog aktivnih proteinskih crpki. **Obavezno** se koristi za **brojanje suspenzijskih stanica** jer se kod njih mrtve i žive stanice ne razlikuju morfološki. Kod **adherentnih stanica**, **mrtve stanice** isplivaju na površinu te **se odsíšu sa starim medijem** prije samog procesa presađivanja.

Postupak presađivanja adherentnih stanica (engl. seeding the cells):

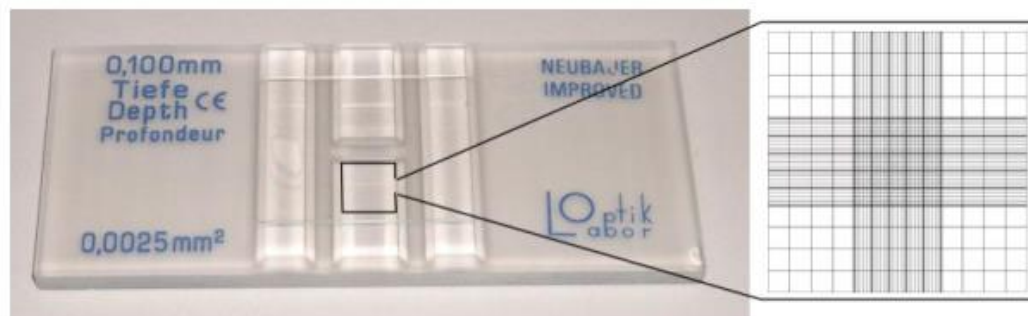
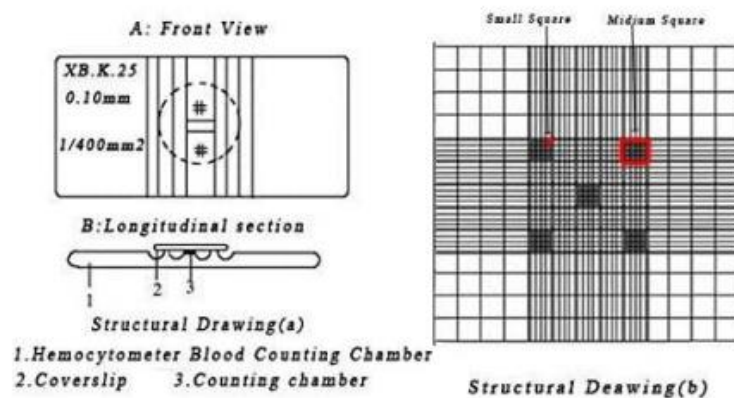
1. Stanicama se mora **ukloniti stari medij** vakuum sisaljkom pošto on više nema glukoze jer se potrošila. U starom mediju se nalaze mrtve stanice koje nemaju aktivne proteine za adheziju te se one odsíšu zajedno s medijem u prvom koraku, a adherentne stanice ostanu zalijepljenje na petrijevoj zdjelici. Medij se odsisava **uz rub petrijeve zdjelice** kako ne bi zagrebali i oštetili stanice.
2. Stanice NE SMIJU DUGO BITI NA SUHOM pa se odmah **isperu** s 2 mL **PBS**-a ili fiziološke otopine kako bi se uklonili zaostaci **seruma** jer on u sebi **ima inhibitore tripsina**.
3. Vakuum sisaljkom uklonimo fiziološku otopinu.
4. Na stanice se dodaje 0,5 ml **tripsina** i stanice se **inkubiraju** 5 min u inkubatoru na 37 °C i 5% CO₂.
5. **Tripsin se inaktivira** minimalno dodatkom **dvostrukog volumena medija sa serumom** u kojem se nalaze inhibitori tripsina, 2 mL DMEM + 10% FBS, kako ne bi razorio stanice.
6. Stanicama se **izmjeri koncentracija** na hemocitometru (stakalce koje ima mrežicu za brojanje s točno određenim volumenom stanica) i izračuna se volumen koji se treba razdijeliti u novu petrijevu zdjelicu. Kod mjerenja koncentracija ako se dodaje tripansko modrilo, mora se uzeti u obzir faktor razrijeđenja.

Napomena: stanice se mogu i odokativno presaditi u omjeru 1:3; 1:4; 1:6 bez mjerenja koncentracije ako to nije potrebno. Suspenzijskim stanicama se uvijek mora mjeriti koncentracija jer ne možemo znati konfluentnost. Stopostotna **konfluentnost** adherentnih stanica se vidi kada popune cijelo dno petrijeve zdjelice.

Stanice je potrebno **pogledati na mikroskop** prije i poslije tripsinizacije kako bi se uočila promjena morfologije.

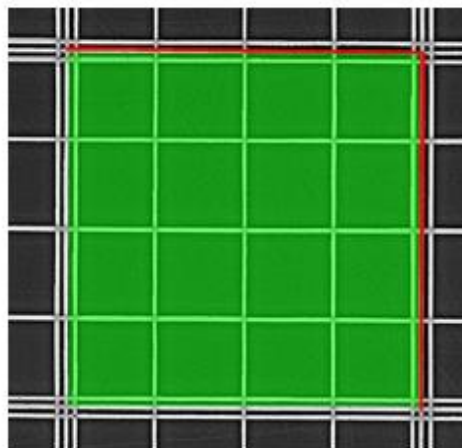
Stanice se mogu brojati na automatskom brojaču ili hemocitometru u svrhu presađivanja:

Hemocitometar je predmetno stakalce s malom mrežicom u središnjem kanaliću koji ima volumen 10^{-4} mL po kvadratu (1 od velikih 9 kvadrata). Sastoji se od **9 glavnih kvadrata** i stanice se **broje u 3 nasumična**, uzima se srednja vrijednost te se **računa broj po mL stanica**. Stanice se mogu dodatno **razrijediti u tripanskom modrilu** u omjeru 1:1 kako bi razlikovali žive od mrtvih, iako se većina mrtvih stanica ispere u prvim koracima nasađivanja.



Slika 3. Prikaz hemocitometra i mrežice za brojanje.

Kod brojanja 1 velikog kvadrata, javlja se problem kada su stanice na rubovima između granica 2 kvadrata. Tada se biraju 2 ruba koja će se uvijek brojati i dva ruba koja se ne broje kako bi statistički preciznije izbrojali stanice.



Slika 4. Crveni rubovi označavaju koja dva ruba smo odabrali za brojanje ako se stanice nađu na njima. Ne moraju se birati ova 2 ruba već odaberemo 2 ruba po želji i uvijek ta 2 ruba izbrojimo zajedno sa cijelom unutrašnjosti kvadrata.

Zadatak:

Morfologija stanica HEK293 prije tripsinizacije: _____

Morfologija stanica HEK293 nakon tripsinizacije: _____

Broj kvadrata =

Broj stanica =

Srednji broj stanica u kvadratima =

Koncentracija:

$$c = \frac{N}{V_{komorice}} = \frac{st}{10^{-4} mL} = \quad st/mL$$

Ako smo razrijedili stanice u tripanskom omjeru 1:1 trebamo uzeti i razrjeđenje (faktor 2) u obzir:

$$c = \frac{N}{V_{komorice}} \times f = \frac{st}{10^{-4} mL} \times 2 = \quad st/mL$$

Broj stanica koje smo imali originalno u petrijevoj zdjelici:

$$N = c \times V = \frac{st}{10^{-4} mL} \times \quad mL = \quad stanica$$

Ako želimo stanice rasaditi u određenoj koncentraciji ili broju, koristimo formulu:

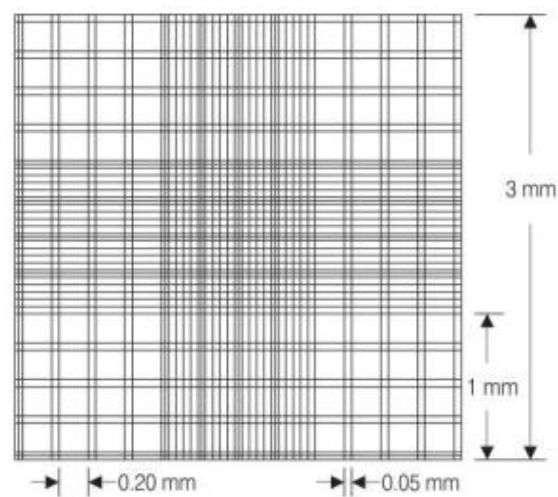
$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

gdje je c_1 koncentracija izmjerena pomoću hemocitometra, V_1 volumen koji trebamo uzeti iz originalne matične suspenzije, c_2 koncentracija koju zadamo sami za rasađivanje i V_2 volumen u cijeloj petrijevoj zdjelici.

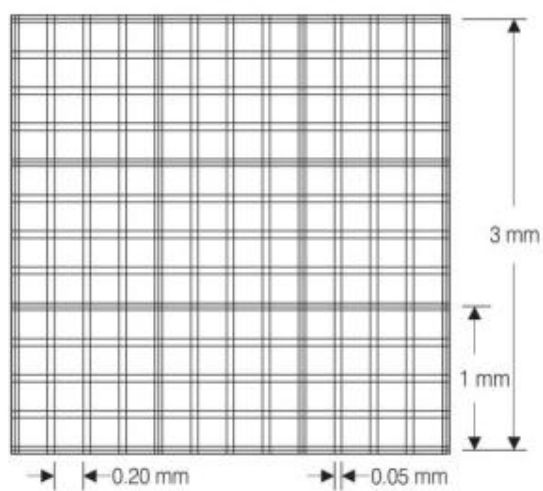
$$\frac{st}{mL} \times V_1 = \frac{st}{mL} \times mL$$

$$V_1 \text{ (stanica)} = \quad mL + \quad mL \text{ medija DMEM} + 10\% \text{ FBS} = \quad mL$$

DODATAK: Vrste hemocitometra.



Slika 5. *Bürker Türk hemocitometar. Ima dodatne linije za preciznije brojanje, ali 9 je glavnih kvadrata.*



Slika 6. *Bürker hemocitometar. Ima 9 glavnih kvadrata, svaki kvadrat je obilježen sa 3 linije.*