



Zakład Radiobiologii i
Immunologii
UJK

Instrukcje do ćwiczeń oraz zakres materiału
realizowanego na wykładach z przedmiotu
Biotechnologia mikrobiologiczna
na kierunku
biotechnologia

wykład: 15 godzin

ćwiczenia: 60 godzin

Zakres materiału omawiany na wykładach z przedmiotu
biotechnologia mikrobiologiczna

1. Gleba jako źródło drobnoustrojów o znaczeniu aplikacyjnym
2. Czynniki przeciwbakteryjne izolowane z gleby: antybiotyki, bakteriofagi
3. Metody hodowli drobnoustrojów: okresowa, półokresowa i ciągła
4. Bioreaktor – budowa, mierzalne parametry fizykochemiczne, przegląd typów i ich zastosowań
5. Immobilizacja drobnoustrojów – wady i zalety, znaczenie praktyczne
6. Wybrane procesy biosyntezy enzymów, witamin i antybiotyków
7. Przykłady procesów biokonwersji związków organicznych przez drobnoustroje
8. Bioakumulacja i biotransformacja metali
9. Techniki doskonalenia szczepów przemysłowych
10. Metody przechowywanie szczepów

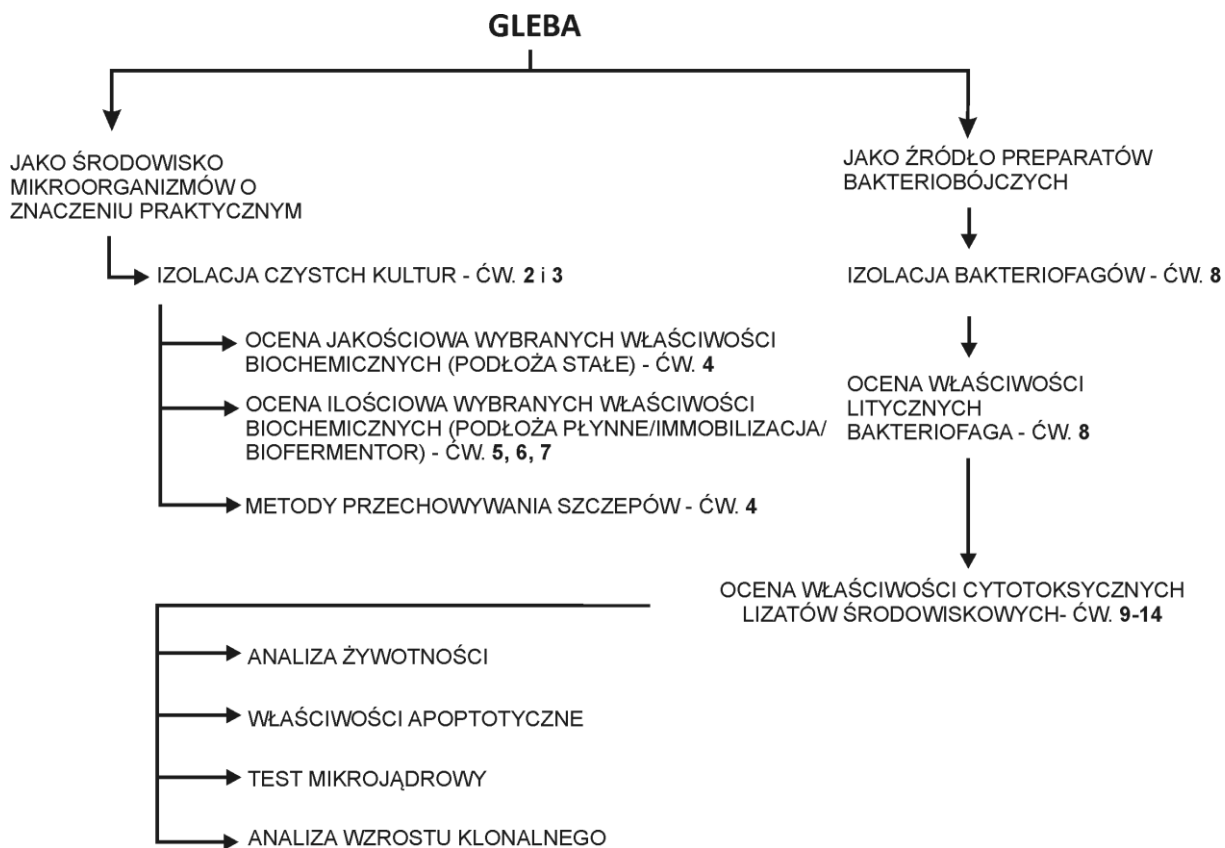
Literatura podstawowa:

- Biotechnologia mikrobiologiczna – ćwiczenia i pracownie specjalistyczne, Praca zbiorowa pod red. Jerzego Długońskiego, Wyd. UŁ 1997
- Podstawy biotechnologii przemysłowej – W. Bednarski, WNT, 2006
- Różalski A, Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej: część I teoretyczna. wydanie II rozdział 6,7,8,15

Artykuły

- Niczyporuk J.S., Bartoszcze M. Fagowe enzymy lityczne – nowe nadzieje w walce z zakażeniami bakteryjnymi. *Przegląd Epidemiologiczny* 2007; 61: 713-721 ([link](#))
- Brzozowska E., Bazan J., Gamian A.: Funkcje białek bakteriofagowych. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 2011; 65: 167-176. ([link](#))
- Duliński R. Biotechnologiczne metody produkcji witamin z wykorzystaniem mikroorganizmów. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 2010; 1 (68), 5-19. ([link](#))
- Bobek B., Smyłła A., Rychter P., Biczak R., Kowalczyk M. Degradacja wybranych poliestrów w glebie z udziałem mikroorganizmów. *Proceedings of ECOpole* 2009; 3: 51-57. ([link](#))

Schemat części praktycznej zajęć



Zestawienie tabelaryczne instrukcji do ćwiczeń

1	Omówienie zasad BHP oraz podstaw teoretycznych cyklu ćwiczeń laboratoryjnych
2	Izolacja z gleby czystych hodowli mikroorganizmów
3	Ocena makro i mikroskopowa hodowli mikroorganizmów, uzyskanie czystych kultur
4	Ocena wybranych właściwości biochemicznych hodowli mikroorganizmów o znaczeniu praktycznym
5	Analiza właściwości lipolitycznych i ureolitycznych immobilizowanych mikroorganizmów
6	Przygotowanie bioreaktora – sterylizacja i kalibracja sond
7	Produkcja biomasy a właściwości lipolityczne – wzrostu bakterii w bioreaktorze
8	Izolacja i analiza właściwości litycznych bakteriofagów
9	Przygotowanie medium hodowlanego, zasady hodowli komórek eukariotycznych <i>in vitro</i>
10	Analiza żywotności komórek A549 i HepG2 traktowanych różnymi stężeniami lizatów środowiskowych
11	Analiza apoptozy komórek A549 i HepG2 traktowanych różnymi stężeniami lizatów środowiskowych za pomocą cytometru przepływowego
12	Analiza częstości mikrojąder w komórkach A549 i HepG2 traktowanych różnymi stężeniami lizatów środowiskowych
13	Analiza przeżywalności komórek A549 i HepG2 traktowanych różnymi stężeniami lizatów środowiskowych – test klonogeny
14	Cytotoksyczność – podsumowanie wyników i ich analiza statystyczna
15	Kolokwium z części praktycznej

Zajęcia realizowane w Zakładzie Mikrobiologii UJK – ćw. 1-8

Zajęcia realizowane w Zakładzie Radiobiologii i Immunologii UJK – ćw. 9-14

Ćwiczenie nr. 1

Temat: Omówienie zasad BHP oraz podstaw teoretycznych cyklu ćwiczeń laboratoryjnych

Ćwiczenie nr. 2

Temat: Izolacja z gleby czystych hodowli mikroorganizmów

Zagadnienia teoretyczne

1. Gleba jako źródło mikroorganizmów
2. Właściwości biochemiczne mikroorganizmów glebowych o znaczeniu praktycznym
3. Podłoża mikrobiologiczne identyfikujące określone właściwości biologiczne
4. Metody stymulacji wzrostu wybranych grup drobnoustrojów

Zadania praktyczne*1. Przygotowanie wyciągu z gleby*

Odważyć 5 g gleby, przenieść do kolby o pojemności 100 ml zawierającej 50 ml 0.1 % roztwór Tween 80 w 0.9% NaCl. Próbkę inkubować 45 min. na wytrząsarce w temperaturze pokojowej.

2. Przygotowanie szeregu rozcieńczeń wyciągu gleby

Przygotować szereg 5 probówek zawierających 9 ml 0.9 % NaCl. Do pierwszej probówki przenieść 1 ml wyciągu glebowego (po opadnięciu większych cząstek), wymieszać przez pipetowanie i przenieść 1 ml do kolejnej probówki. Czynność powtórzyć w kolejnych probówkach. Uzyskane rozcieńczenia wyciągu glebowego (1/10; 1/100; 1/1 000; 1/10 000; 1/100 000) wysiać na poniższe podłoża (po 100 µl, metoda płytek mazanych): podłoże agar-LB, podłoże agar-LB 1/500, podłoże Sabourauda. Płytki inkubować 7 dni w 25°C.

3. Przygotowanie podłoży do izolacji czystych kultur i oceny ich właściwości biochemicznych

Przygotować podłoża według danych w tabeli:

Aktywność biologiczna	Sposób sprawdzenia	Podłoże/skład	Cel/Właściwości
-	Posiew redukcyjny na płytce z agar-LB	Agar-LB/według producenta	Namnażanie bakterii
-	Posiew redukcyjny na płytce z podłożem Sabourauda	Sabourauda/według producenta	Namnażanie grzybów mikroskopowych
-	Posiew redukcyjny na płytce z podłożem agar-LB 1/500	Agar-LB 1/500 według producenta	Namnażanie promieniowców
Proteazy	Posiew redukcyjny na płytce z podłożem agar-LB z dodatkiem odtłuszczonego mleka (kazeina)	Agar-LB/według producenta + 5% mleko odtłuszczone (przefiltrować ϕ 0.2 µM)	Zaobserwować przejrzyste strefy wokół linii wzrostu szczepów hydrolizujących kazeinę
Amylazy	Posiew redukcyjny na płytce z podłożem agar-LB z dodatkiem skrobi	Agar-LB/według producenta + 1% skrobia	Płytki zalać płynem Lugola. Brak fioletowego zabarwienia wokół strefy wzrostu bakterii świadczy o rozkładzie skrobi.
Lipazy	Posiew redukcyjny na płytce z podłożem agar-LB z Tween 80	według producenta + 80 mM CaCl ₂ i 1% (w/v) Tween 80	Zaobserwować strefę wytrąconego wapnia („mydło wapniowe”)
Ureaza	Posiew redukcyjny na płytce z podłożem Christensena	według producenta + 3 % mocznik i czerwień fenolowa	Amoniak uwalniany podczas wzrostu bakterii silnie alkalizuje pożywkę, powodując zmianę jej barwy z żółtej na fioletową

Ćwiczenie nr. 3

Temat: Ocena makro i mikroskopowa hodowli mikroorganizmów, uzyskanie czystych kultur

Zagadnienia teoretyczne

1. Cechy charakteryzujące morfologię makroskopową bakterii
2. Techniki barwienia bakterii

Zadania praktyczne

1. Wykonanie posiewów w celu uzyskania czystych kultur jak również oceny ich właściwości biologicznych na podłożach przygotowanych wg. instrukcji w ćw 2. Posiew szczepów wzorcowych z kolekcji Zakładu Mikrobiologii UJK na powyższe podłoża. Hodowla w temperaturze 25°C, 48 godzin.
2. Barwienie metodą Grama uzyskanych hodowli mikroorganizmów glebowych i obserwacja preparatów mikroskopowych:
Wysuszony rozmaz bakterii barwić wg procedury:
 - a. 1,5 min. fiolet krystaliczny
 - b. 1,5 min. płyn Lugola
 - c. spłukać pod wodą bieżącą, odbarwić i ponownie spłukać
 - d. 8 sek. fuksyna, po czym preparat spłukać wodą
3. Obliczenie ilości bakterii (cfu/ml) na podstawie odczytu wyników z ćwiczenia nr. 2
Ilość bakterii (cfu/ml wyciągu gleby):
Ilość grzybów (cfu/ml wyciągu gleby):
Ilość promieniowców (cfu/ml wyciągu gleby):

Ćwiczenie nr. 5

Temat: Analiza właściwości lipolitycznych i ureolitycznych immobilizowanych mikroorganizmów

Zagadnienia teoretyczne

1. Zasadność immobilizacji szczepów mikroorganizmów
2. Wady i zalety immobilizacji

Zadania praktyczne

1. Do dwóch kolb o pojemności 250 ml dodać 100 ml wody oraz 1.5 g alginianu sodu. Próbkę wymieszać do całkowitego rozpuszczenia na mieszadle magnetycznym i wysterylizować w autoklawie mikrofalowym.
2. Przygotować po 20 ml zawiesiny bakterii środowiskowych w jałowej wodzie destylowanej ($Abs_{600nm}=0.5-0.7$)
3. Po ostygnięciu do próbki dodać zawiesinę bakterii środowiskowych o właściwościach lipolitycznych lub ureolitycznych i wymieszać do uzyskania jednorodnej mieszaniny.
4. Przygotować 100 ml 2.5% roztworu chlorku wapnia w zlewce o pojemności 250 ml. Po rozpuszczeniu roztwór przefiltrować.
5. Z uzyskanej zawiesiny bakterii (lipolitycznych lub ureolitycznych) pobrać po 1 ml (10 razy) i wkraplać powoli do 2.5% roztworu chlorku wapnia.
6. Po 20 min. po ostatnim „wkropleniu” zawiesiny bakterii uzyskane kulki alginianowe z immobilizowanymi bakteriami przepłukać jałową wodą destylowaną.
7. Przygotować hodowle według tabeli:

Kolba (250 ml)	Bakterie (10 ml)	Podłoże (100 ml)	Ocena aktywności	Ocena jałowości
1	zawiesina bakterii ureolitycznych	1/10 LB z 3 % mocznikiem i czerwienią fenolową	pH, 560 nm	CFU/ml płytki lane
2	zawiesina bakterii ureolitycznych immobilizowanych	1/10 LB z 3 % mocznikiem i czerwienią fenolową	pH, 560 nm	CFU/ml płytki lane
3	zawiesin bakterii lipolitycznych	20 mM Tris-HCl 80 mM CaCl ₂ 1% (w/v) Tween 80	450 nm	CFU/ml płytki lane
4	zawiesin bakterii lipolitycznych immobilizowanych	20 mM Tris-HCl 80 mM CaCl ₂ 1% (w/v) Tween 80	450 nm	CFU/ml płytki lane

8. Zmierzyć pH oraz absorbancję hodowli przy odpowiednich do badanych właściwości długościach fal.
9. Ocena aktywności biochemicznej (jak wyżej) oraz jałowości po 3, 18 i 72 h hodowli w temp. 25°C z mieszaniem.

Ćwiczenie nr. 6

Temat: Przygotowanie bioreaktora – sterylizacja i kalibracja sond

Zajęcia prowadzone z wykorzystaniem bioreaktora Biostat B Plus firmy Sartorius ([link](#) do strony producenta). Zostanie omówiona metodyka przygotowania urządzenia wraz z oprzyrządowaniem do przeprowadzenia hodowli bakteryjnej na kolejnych zajęciach.

Zagadnienia teoretyczne

1. Budowa bioreaktora (w tym wykorzystanego na zajęciach)
2. Metody hodowli drobnoustrojów: okresowa, półokresowa i ciągła
3. Typy bioreaktorów

Zadania praktyczne

- złożenie zestawu (bioreaktor, układ grzewczy, moduł sterujący)
- omówienia oraz kalibracji sond
- sterylizacją wraz z jej kontrolą
- omówienie obsługi modułu sterującego pracę bioreaktora

Ćwiczenie nr. 7

Temat: Produkcja biomasy a właściwości lipolityczne –wzrostu bakterii w bioreaktorze

Zagadnienia teoretyczne

1. Budowa bioreaktora (w tym wykorzystanego na zajęciach)
2. Metody hodowli drobnoustrojów: okresowa, półokresowa i ciągła
3. Pojęcie turbidymetrii
4. Ocena ilościowa właściwości lipolitycznych (ćw. 5)

Zadania praktyczne

1. Dzień 1 - Przygotować 3 L podłoża 1/100 LB z dodatkiem 1% (w/v) Tween 80 w bioreaktorze, przeprowadzić kalibrację sondy pH. Sterylizacja układu (121 °C, 30 min.) w autoklawie przez prowadzącego zajęcia.
2. Dzień 2 - Po wyjąłowaniu i schłodzeniu układu, zmontować bioreaktor wraz z modułem grzewczym (ustawić 25 °C) i sterującym (ustawienie warunków wzrostu: kalibracja sond, napowietrzanie, przygotowanie buforów) i pozostawić na 24 godziny (kontrola jałowości).
3. Dzień 3 - przygotować inokulum; 300 ml 1/100 LB z dodatkiem 1% (w/v) Tween 80 zaszczerpić odmłodzoną hodowlą *Bacillus subtilis* (kolekcja Zakładu Mikrobiologii UJK), hodowla 5 godzin w 25 °C z wytrząsaniem. Następnie zaszczerpić (inokulum) medium hodowlane w bioreaktorze z zastosowaniem pompy perystaltycznej, z zachowaniem warunków sterylności. Pobrać jałowo próbnikiem ok. 10 ml medium i ocenić absorbancję przy długości fali 450 nm. Analizę powtórzyć po 72 godzinnej hodowli. Odczytać zmiany gęstości hodowli (pomiar sondy turbidymetrycznej w funkcji czasu).

Ćwiczenie nr. 8

Temat: Izolacja i analiza właściwości litycznych bakteriofagów

Zagadnienia teoretyczne

1. Środowisko jako źródło bakteriofagów
2. Zastosowanie praktyczne bakteriofagów: fagoterapia, fagotypowanie, inżynieria genetyczna
3. Cykl lityczny i lizogenny bakteriofagów

Zadania praktyczne

Izolacja bakteriofagów z gleby

Odważyć 10 g gleby, przenieść do kolby o pojemności 100 ml zawierającej 50 ml wody. Próbkę inkubować 45 min. na wytrząsarce w temperaturze pokojowej. Zawiesinę przesączyć przez bibułę, a następnie przefiltrować przez filtr strzykawkowy o \varnothing 0.45 μm . Do 20 ml przesączu dodać 1 ml chloroformu i wytrząsać energicznie przez 5 min. Próbkę odstawić na 20 min. w celu opadnięcia chloroformu. Górną warstwę zwirować (4000 obr./min; 40 min.), zlać nadsącz do kolby i napowietrzać go przez wytrząsanie w celu odparowania chloroformu

Ocena właściwości litycznych bakteriofagów

Właściwości lityczne uzyskanych fagów określić wobec szczepów wzorcowych: *E. coli*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*. Kontrola pozytywna: bakteriofag T4

Do 20 ml odmłodzonej hodowli bakteryjnej (18 godzinnej) dodać 2 ml uzyskanej przez chloroformowanie zawiesiny fagów i hodować w warunkach optymalnych dla szczepów przez 48 godzin. Następnie przefiltrować hodowlę przez filtr strzykawkowy o \varnothing 0.2 μm . Do 10 ml przesączu dodać 0.5 ml chloroformu i wytrząsać energicznie przez 5 min. Próbkę odstawić na 20 min. w celu opadnięcia chloroformu. Górną warstwę zwirować (4000 obr./min; 40 min.), zlać nadsącz do kolby i napowietrzać go przez wytrząsanie w celu odparowania chloroformu. Hodowlę i chloroformowanie powtórzyć 3-krotnie (6 dni).

Ocena miana faga – test płytek z agarem dwuwarstwowym (łysinkowy)

Wylać cienką warstwę agaru LB do szalki Petriego i poczekać aż zastygnie (30 min.). Do jałowej probówki szklanej dodać 100 μl zawiesiny bakterii oraz 2 ml agaru miękkiego (agar LB $\frac{1}{2}$) schłodzonego do 42°C (łaznia wodna) oraz 200 μl zawiesiny faga. Po wymieszaniu wylać zawartość probówki do wcześniej przygotowanej szalki z zastygniętym agarem LB, delikatnie rozprowadzić po powierzchni i zostawić do zastygnięcia. Szalki przenieść do ciepłarki i hodować w warunkach optymalnych dla szczepów przez 24 godziny.

Ćwiczenie nr. 9

Temat: Przygotowanie medium hodowlanego, zasady hodowli komórek eukariotycznych *in vitro*

Zagadnienia teoretyczne

1. Zasady hodowli komórek eukariotycznych *in vitro*
2. Rodzaje mediów hodowlanych

Zadania praktyczne

Przygotowanie medium hodowlanego do hodowli komórek A549

W sterylnej butelce przygotować 100 ml medium hodowlanego.

Skład medium:

- pożywka F12-HAM
- 10 % surowicy płodowej bydlęcej
- 5 ml antybiotyku (antybiotyk dodajemy do nowo otwartej butelki medium na 500 ml)

Przygotowanie medium hodowlanego do hodowli komórek HepG2

W sterylnej butelce przygotować 100 ml medium hodowlanego.

Skład medium:

- pożywka William's Medium
- 10 % surowicy płodowej bydlęcej
- 5ml antybiotyku (antybiotyk dodajemy do nowo otwartej butelki medium na 500 ml)
- 5ml L-glutaminy (L-glutaminę dodajemy do nowo otwartej butelki medium na 500 ml)

Pasażowanie komórek A549 i HepG2

Obejrzyć komórki pod mikroskopem odwróconym i ocenić czy komórki nadają się do pasażowania. Ściągnąć pożywkę z hodowli. Wlać do szalki 3 ml PBS. Wylać PBS. Dodać do hodowli 1 ml trypsyny. Wstawić do inkubatora na 2 minuty. Dodać do szalki 2 ml pożywki. Oderwać komórki energicznie pipetując. Przenieść 250 μ l zawiesiny komórek do nowej sterylnej szalki i dopełnić odpowiednią pożywką do 5 ml. Obejrzyć komórki pod mikroskopem odwróconym Wstawić do inkubatora.

Literatura:

1. Stokłosa S. Hodowla komórek i tkanek. PWN. Warszawa 2011, wyd.1.
2. Stasiak P, Sznitowska M. Zastosowanie hodowli komórkowych w badaniach biofarmaceutycznych. *Badania farmaceutyczne*. 2010: 66, 3. ([link](#))

Ćwiczenie nr. 10

Temat: Analiza żywotności komórek A549 i HepG2 traktowanych różnymi stężeniami lizatów środowiskowych

Zagadnienia teoretyczne

1. Metody oznaczania żywotności komórek

Zadania praktyczne

Przygotowanie komórek A549 i HepG2 do analizy żywotności

Zlać płyn z nad komórek do próbówki wirówkowej, przepłukać komórki PBS (3 ml), dodać około 1 ml trypsyny i wstawić do inkubatora na 2 minuty, po tym czasie zablokować działanie trypsyny przez dodanie do naczynia hodowlanego 2 ml pełnej pożywki, oderwać komórki od podłoża przez energiczne pipetowanie. Następnie, zawiesinę przenieść do uprzednio przygotowanej próbówki, a następnie połowę objętości przenieść do drugiej próbówki w celu analizy żywotności jodkiem propidyny (analiza w cytometrze przepływowym). Zawiesiny odwirować (900 obr./min., przez 10 min.); nadsącz zlać, a komórki zawiesić w 0,5 ml odpowiedniej pożywki (barwienie błękitem trypanu) lub 100 µl buforu BB (ang. Binding Buffer); analiza w cytometrze przepływowym) i dokładnie rozpipetować.

Przygotowanie buforu BB; rozcieńczenie 1:10 z wodą destylowaną.

Barwienie i liczenie komórek testem z błękitem trypanu przy użyciu mikroskopu świetlnego

W przygotowanej zawieszynie oznaczyć żywotność komórek testem z błękitem trypanu. W tym celu na szkiełko podstawowe nanieść kroplę zawiesziny komórek oraz kroplę wodnego roztworu błękitu trypanu, dokładnie wymieszać i nakryć szkiełkiem nakrywkowym. Po ok. 3 minutach analizować komórki pod mikroskopem świetlnym. Zanalizować 1000 komórek i określić procent komórek żywych (komórki martwe barwią się na niebiesko).

Uwaga: błękit trypanu przy dłuższej inkubacji jest dla komórek toksyczny!

Barwienie i liczenie komórek testem z błękitem trypanu przy użyciu czytnika automatycznego typu ang. cell counter

W przygotowanej zawieszynie oznaczyć żywotność komórek testem z błękitem trypanu przy użyciu cell counter. W tym celu do próbówki typu eppendorf dodać 10 µl zawiesziny komórek oraz 10 µl błękitu trypanu a następnie wymieszać. Pobrać 10 µl zawiesziny komórek i przenieść do komory a następnie analizować w czytniku po wybraniu odpowiednich ustawień.

Barwienie i liczenie komórek testem z jodkiem propidyny przy użyciu cytometru przepływowego

Zawiesinę komórek przenieść do próbek cytometrycznych (hodowle kontrolną podzielić na dwie części i uzupełnić buforem BB do 100 µl) a następnie dodać 5 µl jodku propidyny do wszystkich próbek z pominięciem jednej kontroli, która posłuży do ustawień pomiaru. Inkubować w ciemności przez 15 minut. Po tym czasie dodać 200 µl buforu BB, a następnie analizować komórki w cytometrze przepływowym.

Literatura

Skierski J. Badanie działania cytotoksycznej substancji chemicznych. *Postępy Biologii Komórki* 2008: 35; 147 – 163. ([link](#))

Ćwiczenie nr. 11

Temat: Analiza apoptozy komórek A549 i HepG2 traktowanych różnymi stężeniami lizatów środowiskowych za pomocą cytometru przepływowego

Zagadnienia teoretyczne

1. Pojęcie apoptozy
2. Budowa i zasada działania cytometru przepływowego
3. Metody pomiaru apoptozy

Zadania praktyczne

Przygotowanie komórek A549 i HepG2 do analizy apoptozy

Zlać płyn z nad komórek do próbówki wirówkowej, przepłukać komórki PBS (3 ml), dodać około 1 ml trypsyny i wstawić do inkubatora na 2 minuty, po tym czasie zablokować działanie trypsyny przez dodanie do naczynia hodowlanego 2 ml pełnej pożywki, oderwać komórki od podłoża przez energiczne pipetowanie. Następnie zawiesinę przenieść do uprzednio przygotowanej próbówki, komórki odwirować (900obr./min., przez 10 min.); nadsączyć delikatnie odciągając

Przygotowanie buforu BB (ang. Binding Buffer); rozcieńczenie 1:10 z wodą destylowaną.

Przygotowanie cytometru do pracy

a) Przepłukać cytometr FACS Rince i wodą destylowaną. W tym celu do próbówki cytometrycznej wlać 4 ml FACS Rince, pozostawić ramię odchylone aż pozostanie połowa płynu, wtedy podstawić ramię i poczekać 2 minuty. W analogiczny sposób przeprowadzić płukanie cytometru wodą destylowaną.

b) Wykonać CST – Cytometer Settings Tracking

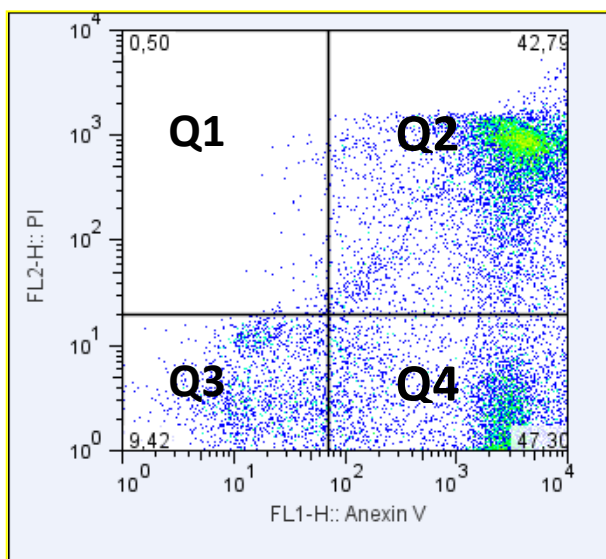
Do próbówki cytometrycznej wlać 350 µl FACS Flow, a następnie dodać 1 kroplę odpowiednich beadsów. Przeprowadzić badanie w cytometrze wybierając ustawienia CST.

Przygotowanie prób do kompensacji

W celu wykonania kompensacji przygotować komórki niebarwione (kontrola), komórki barwione PI (kontrola pozytywna) oraz komórki barwione aneksyną V znakowaną fluoresceiną (kontrola pozytywna) (3 próbówki). W celu wykonania pomiarów przygotować 2 próbówki barwione aneksyną V sprzężoną z fluoresceiną i jodkiem propidyny (PI) (kontrola i kontrola pozytywna). Znakowanie komórek wykonać za pomocą komercyjnego zestawu Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (Becton Dickinson, USA). W tym celu do próbówki z komórkami kontrolnymi dodać 200 µl binding buffer a do próbówki z kontrolą pozytywną dodać 300 µl bufor BB a następnie przenieść po 100 µl zawiesiny komórek do próbek cytometrycznych (komórki z kontroli rozdzielić do dwóch próbek a komórki z kontroli pozytywnej rozdzielić do trzech próbek). Jedną z próbek z komórkami kontrolnymi pozostawić niebarwioną a do drugiej próbówki dodać aneksynę V znakowaną fluoresceiną i PI. Do 1 próbówki z komórkami z kontroli pozytywnej dodać 5 µl jodku propidyny, do drugiej 5 µl aneksyny V, znakowanej fluoresceiną a do trzeciej próbówki dodać aneksynę V znakowaną fluoresceiną i PI. Komórki wymieszać i pozostawić w ciemności na 15-20 minut. Po tym czasie do każdej próbówki dodać 200 µl buforu BB i zrobić kompensację w cytometrze. Następnie przygotować arkusz pracy i wykonać pomiar apoptozy w próbówce z komórkami kontrolnymi i z komórkami z kontroli pozytywnej.

Analiza apoptozy

Po odwirowaniu i odciążeniu nadsącza komórki zawiesić w 100 µl buforu BB i przenieść do uprzednio podpisanych probówek cytometrycznych. Znakowanie komórek wykonać za pomocą komercyjnego zestawu Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (Becton Dickinson, USA). Do każdej probówki dodać 5 µl jodku propidyny i 5 µl aneksyny V, znakowanej fluoresceiną. Komórki inkubować w ciemności, w temperaturze pokojowej przez 15 minut, a następnie dodać do zawiesiny 200 µl buforu BB. Znakowane komórki analizować w cytometrze przepływowym LSR II (Becton Dickinson). Wyróżnić 4 populacje komórek: komórki żywe (annexin-/IP-), komórki we wczesnej apoptozie (annexin+/IP-), komórki w późnej apoptozie (annexin+/IP+) oraz komórki nekrotyczne (annexin -/IP+).



- Q1 – komórki nekrotyczne
- Q2 – komórki w późnej apoptozie
- Q3 – komórki żywe
- Q4 – komórki we wczesnej apoptozie

Literatura

Skotny A., Pucińska J. Współczesna cytometria przepływowa. *Acta Bio-Optica et Informatica Medica. Inżynieria Biomedyczna*, 2013, 19 ([link](#))

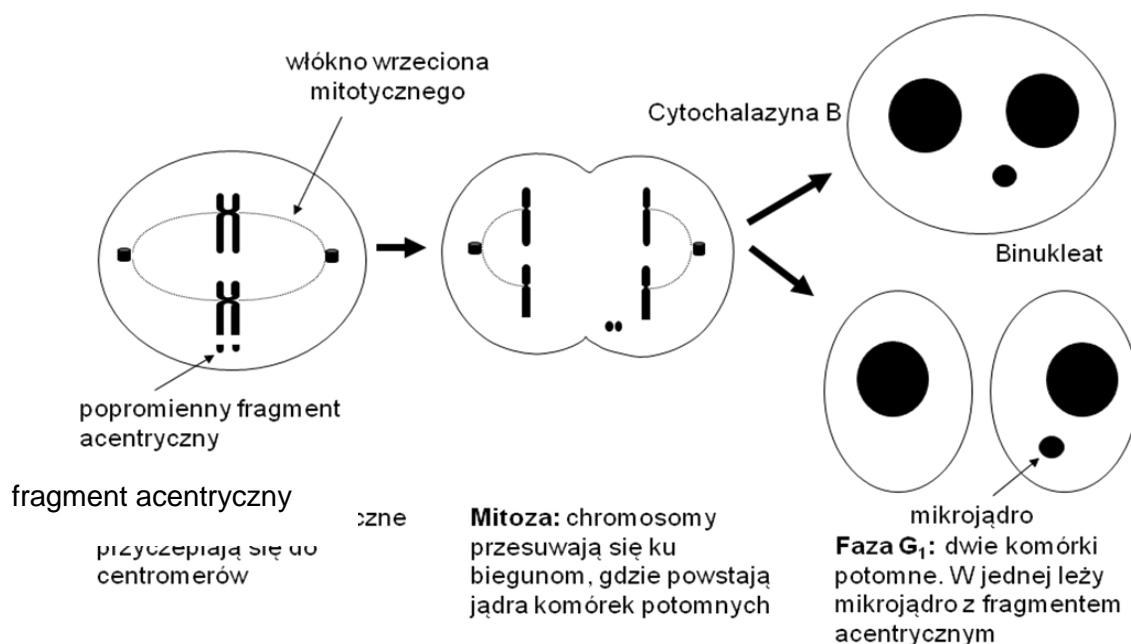
Ćwiczenie nr. 12

Temat: Analiza częstości mikrojąder w komórkach A549 i HepG2 traktowanych różnymi stężeniami lizatów środowiskowych

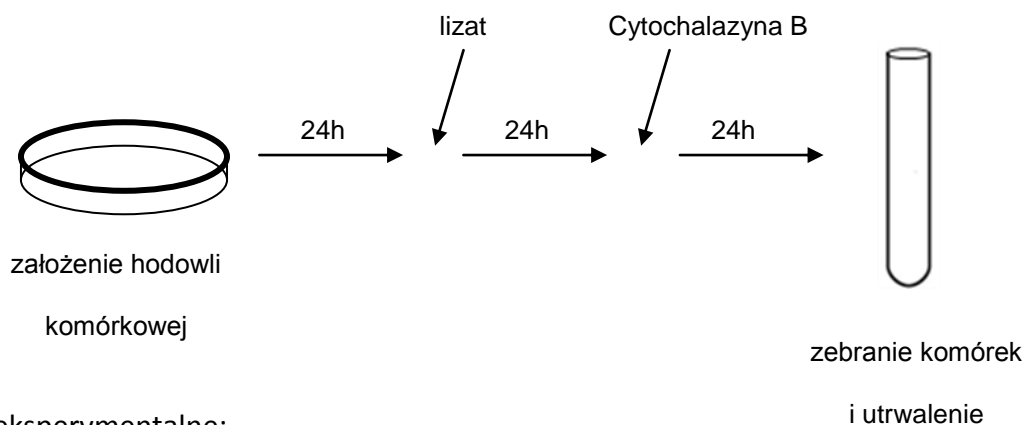
Zagadnienia teoretyczne

Zasady testu mikrojądrowego, Fenech 2003; Mutation Research 534 (2003) 65–75

Schemat powstawania mikrojąder



Schemat eksperymentu



Grupy eksperymentalne:

1. Lizat I, dawki: 50µM, 125µM, 250µM, komórki A549
2. Lizat I, dawki: 50µM, 125µM, 250µM, komórki HepG2
3. Lizat II, dawki: 50µM, 125µM, 250µM, komórki A549
4. Lizat II, dawki: 50µM, 125µM, 250µM, komórki HepG2

Stężenia lizatów (10 mg/ml) na 3ml pożywki hodowlanej (3000μl):

50μM - 15μl

125μM – 37,5μl

250μM - 75μl

Zagadnienia praktyczne

Na ćwiczenia przygotowano hodowle komórek, dodano odpowiednie dawki lizatów oraz cytochalazynę B.

Zebranie komórek

- zlać pożywkę z szalek z komórkami
- przepłukać komórki PBS (3ml)
- dodać po 0,5 ml trypsyny i wstawić komórki do inkubatora na 2 min
- dodać do szalek po 3 ml pożywki hodowlanej
- oderwać komórki od dna szalki przez energiczne pipetowanie
- przenieść zawiesiny komórek do probówek (wcześniej odpowiednio podpisanych)

Utrwalanie komórek

- odwirować komórki, 900 obr/min, 5 min
- odciągnąć supernatant zostawiając ok. 0,5 ml zawiesiny, dodać 5 ml 0,14M KCl (powoli, mieszać na mieszadle), pozostawić na 15 min
- odwirować komórki, 900 obr/min, 5 min
- odciągnąć supernatant zostawiając ok. 0,5 ml zawiesiny, dodać powoli utrwalacza I, zostawić na 10 min
- odwirować komórki, 1000 obr/min, 5 min, zebrać supernatant, dodać powoli utrwalacza II
- czynność e) powtórzyć 2-3 razy
- odwirować komórki, 1000 obr/min, 5 min, zebrać supernatant zostawiając ok. 0,3 ml zawiesiny
- zawiesinę nakropić na umyte etanolem szkiełka podstawowe mikroskopowe
- preparaty suszyć w temperaturze pokojowej kilka godzin

Barwienie komórek

- przygotować w kominku 5% roztwór barwnika Giemsy (w buforze Sorensena)
- barwić preparaty 10 min
- płukać szkiełka w wodzie destylowanej
- suszyć kilka minut

Utrwalanie i wybarwianie kolonii

- zlać pożywkę
- przepłukać komórki zimnym PBS (3ml)
- dodać 3 ml metanolu na 5 min
- zlać metanol i pozostawić szalki do wyschnięcia (ok. 15 min)

Analiza mikrojąder

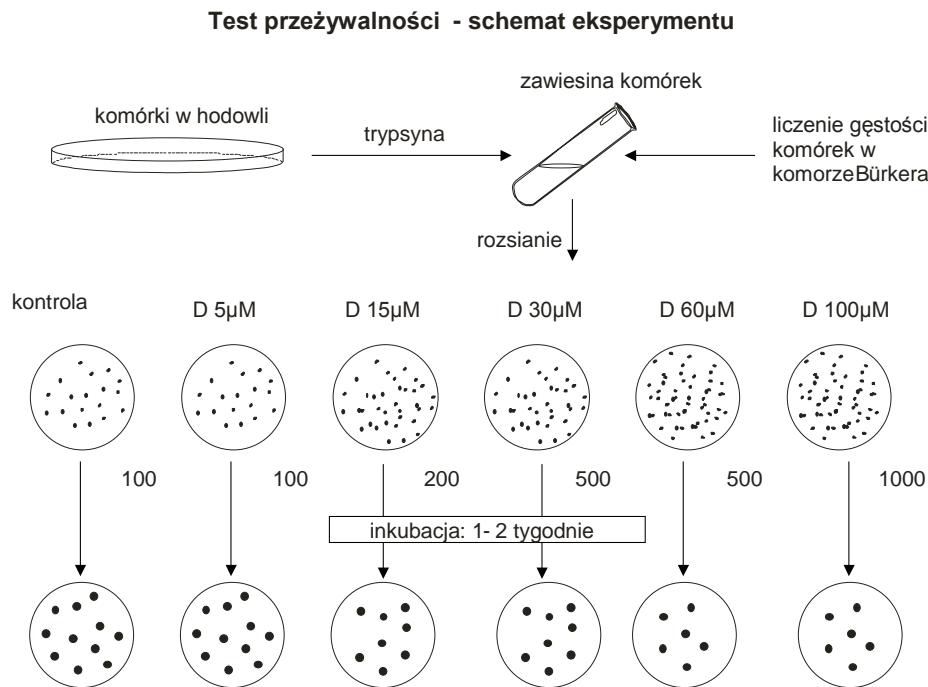
- liczyć mikrojądra występujące wyłącznie w binukleatach i notować na załączonym arkuszu
- zanalizować 500-1000 binukleatów, podać liczbę mikrojąder na 1000 binukleatów

Ćwiczenie nr. 13

Temat: Analiza przeżywalności komórek A549 i HepG2 traktowanych różnymi stężeniami lizatów środowiskowych –test klonogeny

Zagadnienia teoretyczne

Zasady klonogenego testu przeżywalności, Basic clinical radiobiology . Gordon Steel. 2002



Lizat I, dawki: 5µM, 15µM, 30µM, 60µM, 100µM, komórki A549

Lizat I, dawki: 5µM, 15µM, 30µM, 60µM, 100µM, komórki HepG2

Lizat II, dawki: 5µM, 15µM, 30µM, 60µM, 100µM, komórki A549

Lizat II, dawki: 5µM, 15µM, 30µM, 60µM, 100µM, komórki HepG2

Dawki lizatów na 3ml pożywki hodowlanej (3000µl):

5µM - 15µl

15µM - 45µl

30µM - 90µl

60µM - 180µl

100µM - 300µl

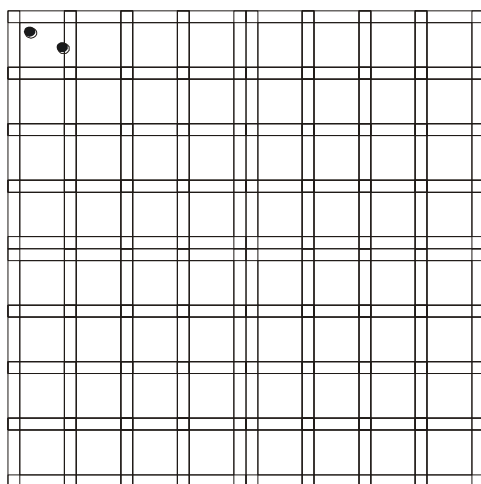
Zagadnienia praktyczne

Przygotowanie zawiesiny pojedynczych komórek

- a) zlać pożywkę z szalki z komórkami
- b) przepłukać komórki PBS (3ml)
- c) dodać 1 ml trypsyny i wstawić komórki do inkubatora na 2 min
- d) dodać do szalki 3 ml pożywki hodowlanej
- e) oderwać komórki od dna szalki przez energiczne pipetowanie
- f) przenieść zawiesinę komórek do probówki

Liczenie komórek w komorze Bürkera

- dobrze wymieszać zawiesinę komórek i po kropli umieścić w komorze Bürkera a następnie policzyć gęstość komórek
- policzyć w jakiej objętości znajduje się 100, 150 i 200 komórek, przygotować odpowiednie rozcieńczenia komórek



- Liczmy komórki w dużych kwadratach.
- Komórki leżące na krawędziach liczymy tylko z dwóch krawędzi (np. górnej i prawej).
- Wyliczamy średnią liczbę komórek w jednym kwadracie.
- W oparciu o policzoną średnią komórek i dane komory Bürkera (powierzchnia dużego kwadratu = $0,04 \text{ mm}^2$, a objętość = $0,004 \text{ mm}^3$) obliczamy liczbę komórek w dowolnej objętości.

Założenie hodowli komórkowych z odpowiednią liczbą komórek wg schematu

- przygotować po 6 szalek na każdą grupę eksperymentalną, odpowiednio je opisać (ważne!)
- do każdej szalki wlać 2 ml pożywki hodowlanej
- do szalek dodać odpowiednią liczbę komórek
- dodać odpowiednią dawkę lizatu środowiskowego
- uzupełnić pożywkę do 3ml
- umieścić hodowle w inkubatorze i inkubować przez 2 tygodnie

Utrwalenie i wybarwienie kolonii

- zlać pożywkę
- przepłukać komórki zimnym PBS (3ml)
- dodać 3 ml metanolu na 5 min
- zlać metanol i pozostawić szalki do wyschnięcia (ok. 15 min)

Wykreślanie krzywej przeżywalności

Policzyć kolonie komórek A549 / HepG2 w hodowlach traktowanych kolejnymi dawkami lizatów środowiskowych oraz w hodowli kontrolnej. Następnie obliczyć wydajność klonowania PE oraz frakcje przeżywalności SF. Wykreślić krzywą przeżywalności.

PE – wydajność klonowania
(plating efficiency)

$$PE = \frac{\text{liczba kolonii}}{\text{liczba komórek}}$$

SF - frakcja przeżywalności
(surviving fraction)

$$SF = \frac{PE \text{ komórek traktowanych}}{PE \text{ komórek kontrolnych}}$$

Dawka (μM)	liczba komórek	liczba kolonii	PE	SF
0	100			1
5	100			
15	200			
30	500			
60	500			
100	1000			