

**ВИКОРИСТАННЯ КУЛЬТУР КЛІТИН  
ТВАРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ  
У ВІРУСОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ**

Методичні вказівки  
до Лабораторного практикуму  
для студентів ННЦ «Інститут біології»

Методичні рекомендації до Лабораторного практикуму для студентів денної форми навчання ННЦ “Інститут Біології” Київського національного університету імені Тараса Шевченка (Упорядник – Г. В. Коротєєва), Київ, 2013.- 31 с.

Рецензент:

Завідувач відділом іхтіопатології Інституту рибного господарства НААН України, к.б.н., с.н.с **Матвієнко Н.М.**

Завідувач кафедрою Фізіології та екології рослин ННЦ “Інститут біології” Київського національного університету імені Тараса Шевченка проф., д.б.н. **Таран Н.Ю.**

Доцент кафедри загальної та молекулярної генетики ННЦ “Інститут біології” Київського національного університету імені Тараса Шевченка, к.б.н. **Афанасьєва К.С.**

Затверджено вченою радою  
ННЦ «Інститут біології»  
Протокол № 3 від 16 жовтня 2013

Вирощування ізолюваних клітин та тканин *in vitro* набуло широкого розповсюдження в різних сферах біологічної науки – від клітинної й молекулярної біології до новітніх галузей біотехнології. Не можна собі уявити сучасну вірусологічну лабораторію без такої модельної системи, як культура клітин.

Культура клітин – це система, в якій клітини багатоклітинного організму зберігають життєздатність та здатність розмножуватись *in vitro* протягом певного часу, не менше доби. Крім культури клітин, в залежності від виду біологічного матеріалу, вирізняють культуру тканин та органів. Під цим поняттям мають на увазі ріст тканин, органів чи їх частин *in vitro* зі збереженням диференційованого стану цих тканин, їх структури та функцій.

## **Тема 1. ПІДГОТОВКА СКЛЯНОГО ПОСУДУ, ГУМОВИХ ПРЕДМЕТІВ І МЕТАЛЕВИХ ІНСТРУМЕНТІВ ДЛЯ РОБОТИ З КУЛЬТУРАМИ КЛІТИН ТА ТКАНИН**

(6 год.)

Мета заняття. Ознайомитись з різними видами лабораторного посуду та інструментарію, що використовуються для роботи з культурами клітин та тканин як рослинного, так і тваринного походження. Мати уявлення про методи їх обробки. Навчитися готувати скляний посуд, гумові вироби, металевий інструмент для роботи з культурами клітин.

Реактиви: хлорамін, сода, мило, нейтральні миючі засоби, хромпик (100 г біхромату калію на 1 л концентрованої сірчаної кислоти).

Посуд та інструменти: колби, флакони, матраци, склянки, циліндри, лійки, пробірки, піпетки, ножиці, пінцети, скальпелі, леза, шприци, гумові пробки, гумові балони та шланги.

Обладнання: сушильна шафа, пальники, автоклав.

### **Хід заняття**

Обов'язковою умовою успішного культивування клітин поза організмом є особлива чистота і стерильність посуду. У багатьох випадках саме неправильна очистка, миття та стерилізація посуду є причиною неприкріплення клітин до скла або швидкої дегенерації клітинного моношару. Залишки білка у неправильно очищених культуральних флаконах, неповне видалення слідів мила, лугів та кислот під час миття, недостатня стерилізація скляних та гумових предметів – усе це є токсичними факторами для культури клітин.

Для приготування різних розчинів та поживних середовищ з використанням хімічних компонентів аналітичного ступеня чистоти, а також безпосередньо для одержання клітинних культур і роботи з ними застосовують посуд високої якості, виготовлений із термостійкого та кислотостійкого борсилікатного скла. Зокрема, використовують такі види лабораторного посуду та інструментарію:

- 1) матраци різної ємності (50; 100; 250; 500; 1000 і 1500 мл), виготовлені з нейтрального скла типу „Пірекс”;

- 2) пробірки біологічні розміром 14×120 мм, 16×150 мм, 18×180 мм, 21×200 мм, центрифужні діаметром 170 мм і преципітаційні діаметром 3 мм з прозорого безбарвного скла;
- 3) чашки Петрі різного діаметру з прозорого безбарвного скла;
- 4) колби конічні та круглі плоскодонні ємністю – 50, 100, 250, 500 і 1000 мл;
- 5) флакони для поживних середовищ і розчинів ємністю 250 і 500 мл;
- 6) ролерні колби ємністю 500, 1000, 2000 мл;
- 7) піпетки мірні (градуйовані) ємністю 1; 2; 5; 10 мл, виготовлені з трубок прозорого безбарвного скла, що не мають помітної незброєним оком кривизни;
- 8) піпетки Мора ємністю 15; 20; 25; 50 і 100 мл;
- 9) піпетки Пастера;
- 10) скляні лійки, циліндри, склянки для розчинення і зберігання реактивів, посудини для використаного посуду і пробок;
- 11) предметні та покривні скельця;
- 12) пробки гумові № 5, 12, 14, 18, 20, 24, 27, 29, 42, 45;
- 13) інструменти металеві – пінцети великі (анатомічні та хірургічні) і малі (офтальмологічні), ножиці з гострокінцевими, прямими і заокругленими браншами довжиною 10 і 17 см, скальпелі, леза.

1. Обробка нового посуду, що раніше не використовувався.

- 1.1. Прокип'ятити посуд в 1-2%-ному розчині соляної кислоти, щоб запобігти подальшому вилугуванню скла.
- 1.2. Промити щіткою теплою водою з милом або миючим порошком та обполоснути проточною водою.
- 1.3. Занурити посуд на 3 год. у хромпик.
- 1.4. Ретельно промити теплою водопровідною водою, змінюючи її не менш як 30 разів.
- 1.5. Обполоснути холодною проточною водою протягом 15 хв.
- 1.6. Промити щіткою в гарячій воді нейтральним миючим порошком („Лотос”).
- 1.7. Обполоснути в декількох змінах (8-10) водопровідної води.
- 1.8. Багаторазово промити посуд у 3 змінах дистильованої води для запобігання випадіння кристалів солей при його сушінні.
- 1.9. Сушити посуд у стерильній шафі, яка запобігає виділенню пірогенних речовин.
- 1.10. Монтувати посуд, загортаючи у папір і надписуючи на пачках його ємність.
- 1.11. Простерилізувати посуд сухим жаром у сушильній шафі при 180°C протягом 3-4 год.

2. Обробка посуду, що вже використовувався.

- 2.1. Проавтоклаувати посуд при 130°C протягом 30 хв.
- 2.2. Залити посуд на 24 год. 5 %-ним розчином хлораміну, приготуваним безпосередньо перед використанням.
- 2.3. Промити водопровідною водою не менше як 3 рази.

- 2.4. Протягом 1 год. періодично обробляти хромпіком.
- 2.5. Виконати процедури, що вказані у підрозділах 1.4. – 1.11.
3. Обробка металевих інструментів та шприців.
  - 3.1. Промити інструменти та шприци в гарячій воді з милом.
  - 3.2. Промити водопровідною та дистильованою водою.
  - 3.3. Простерилізувати кип'ятінням у дистильованій воді протягом 30 хв.
  - 3.4. Під час роботи в стерильному настільному чи ламінарному боксі інструменти тримати у склянці з 70 %-ним етиловим спиртом.
  - 3.5. Безпосередньо перед використанням інструменти обпалити у полум'ї пальника.
4. Обробка нових гумових предметів.
  - 4.1. Нові гумові пробки, балони і шланги промити в гарячій воді з миючими засобами.
  - 4.2. Прокип'ятити у 5%-ному розчині двовуглекислої соди протягом 1 год.
  - 4.3. Промити у 5 змінах гарячої водопровідної води.
  - 4.4. Промити холодною проточною водою.
  - 4.5. Прокип'ятити у 6 змінах дистильованої води, щоразу протягом 1 год.
  - 4.6. Одразу ж після кип'ятіння гарячу дистильовану воду злити і висушити пробки при кімнатній температурі. Гумові балони і шланги – підсушити в термостаті при 37°C.
  - 4.7. Пробки укласти в пачки по 2-6 штук згідно з номерами, загорнути в папір або целофан, надписати номер.
  - 4.8. Стерилізувати автоклавуванням при 2 атм. впродовж 2 год.
  - 4.9. Якщо описана вище обробка не усуне токсичності гумових предметів для клітин, тоді останні необхідно:
    - 4.9.1. прокип'ятити у 0,05N NaOH протягом 10 хв.;
    - 4.9.2. промити водопровідною водою;
    - 4.9.3. промити у 4%-ній соляній кислоті протягом 10 хв.;
    - 4.9.4. промити водопровідною водою;
    - 4.9.5. прокип'ятити 5 разів у свіжих порціях дистильованої води.
5. Обробка гумових предметів, які вже використовувалися.
  - 5.1. Проавтоклаувати 40 хв. при 1,5 атм.
  - 5.2. Очистити щіткою від забруднень.
  - 5.3. Прокип'ятити продовж 30 хв. у водопровідній воді з нейтральним миючим засобом.
  - 5.4. Обполоснути декілька разів проточною і один раз дистильованою водою.
  - 5.5. Прокип'ятити у 2 змінах дистильованої води, щоразу протягом 1 год.
  - 5.6. Обполоснути у 3 змінах дистильованої води.
  - 5.7. Виконати процедури, що вказані у підрозділах 4.4. – 4.6.
6. Обробка покривних скелець.
  - 6.1. Занурити скельця по одному у 0,1N розчин NaOH.
  - 6.2. Промити протягом 10-12 год. у проточній воді.

- 6.3. Обполоснути дистильованою водою.
- 6.4. Висушити на чистій тканині.
- 6.5. Стерилізувати сухим жаром у скляних чашках Петрі при 180°C протягом 3-4 год.
7. Монтування посуду.
  - 7.1. Культуральні матраци та флакони закрити алюмінієвою фольгою. Ватно-марлеві пробки не використовувати: при стерилізації сухим жаром вони іноді обвуглюються і внутрішня поверхня посуду викривається токсичним для клітин нальотом смолянистих речовин.
  - 7.2. Пробірки укласти отвором донизу по 80-100 штук у металеві контейнери, які щільно закрити.
  - 7.3. При необхідності у пробірки вставити ватно-марлеві пробки, загорнути у папір для стерилізації в пачки по 10-15 штук, автоклавувати при 1,5 атм. протягом 40 хв.
  - 7.4. До чашок Петрі підібрати кришки і загорнути у папір по одній або декілька штук, автоклавувати при 1,5 атм. протягом 40 хв.
  - 7.5. Колби для розчинів і поживних середовищ закрити ватно-марлевими пробками і зверху обгорнути паперовою обгорткою.
  - 7.6. Всмоктуючий отвір піпеток закрити ватою. Жмуток вати повинен бути не дуже щільним, але й не повинен вільно рухатись у піпетці. Для того, щоб волокна не заважали, щільно зажати піпетку пальцем, отвір піпетки з ватою обпалити. Готові по роботі піпетки по одній або кілька штук обгорнути папером, надписати їх ємність і вказати стрілкою гострий кінець, тоді укласти в металеві пенали по 10-30 штук.
  - 7.7. Скляний посуд необхідно стерилізувати сухим жаром при 180°C упродовж 3-4 год. у сушильній шафі, в яку помістити запаяну контрольну ампулу з сахарозою, що плавиться при температурі близько 180°C.

### **Контрольні питання**

1. Чому для культивування клітин та тканин поза організмом використовують посуд особливої чистоти, очищений спеціальним способом і простерилізований?
2. Які види посуду необхідні для вирощування культур клітин?
3. Назвати етапи обробки нового посуду.
4. Чи є різниця в методі обробки нового посуду і такого, що вже використовувався?
5. Як готувати металевий інструментарій та шприци для роботи з культурами клітин?
6. Описати обробку гумових предметів, які використовують при культивуванні клітин.
7. Як монтують посуд та інші необхідні предмети для культивування клітин?
8. Охарактеризувати методи стерилізації посуду, металевого інструментарію й гумових предметів.

## Тема 2. ПРИГОТУВАННЯ СОЛЬОВИХ РОЗЧИНІВ – МІНЕРАЛЬНОЇ ОСНОВИ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ ТВАРИННИХ КЛІТИН ТА ТКАНИН ПОЗА ОРГАНІЗМОМ

(6 год.)

Мета заняття. Ознайомитись з видами сольових розчинів – обов'язкового компоненту всіх поживних середовищ для культивування тваринних культур клітин. Приготувати сольові розчини: фізіологічний, Хенкса, Ерла, Тірде.

Реактиви: всі необхідні реактиви, вказані у прописі приготування названих сольових розчинів, бідистильована вода.

Посуд та інструменти: колби хімічні та мірні, піпетки, флакони для автоклавування розчинів, лійки, фільтри Зейтца-Гейма, азбестові, мембранні, паперові, ватно-марлеві пробки, фільтрувальний папір, шпателі, ступки, товкачки.

Обладнання: автоклав, рН-метр, ваги.

### Хід заняття

1. Приготування розчину Хенкса.
  - 1.1. Сольовий розчин Хенкса готують з основних концентрованих розчинів А, В, С та розчину індикатору фенолового червоного в розведенні 1:1000.

В 1 л розчину А міститься (г):

NaCl	- 160,0;
KCl	- 8,0;
MgSO <sub>4</sub> ×7 H <sub>2</sub> O	- 2,0;
MgCl <sub>2</sub> ×6 H <sub>2</sub> O	- 2,0;
CaCl <sub>2</sub>	- 2,8.

Усі перелічені інгредієнти, крім CaCl<sub>2</sub>, розчинити в 500-700 мл бідистильованої води. CaCl<sub>2</sub> розчинити в 50 мл бідистильованої води, перемішати з першим розчином і довести загальний об'єм бідистильованою водою до 1 л; довести рН готового розчину до 6,1 - 6,2. Профільтрувати розчин крізь фільтрувальний папір, розлити в чисті флакони будь-якої ємності (не більше як <sup>2</sup>/<sub>3</sub> об'єму флакона), закрити флакон ватно-марлевою пробкою і паперовою обгорткою та надписати. Автоклавувати при 0,7 атм. протягом 10 хв. Зберігати при кімнатній температурі.

- 1.2. В 1 л розчину В міститься (г):

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×12 H <sub>2</sub> O	- 2,6;
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	- 1,2;
глюкоза	- 20,0.

Фільтрація, режим автоклавування та умови зберігання такі самі, як для розчину А; рН довести до 6,6 -6,8.

- 1.3. Для приготування розчину С 14 г NaHCO<sub>3</sub> розчинити в 1 л

бідистильованої води і профільтрувати крізь стерилізуючий фільтр (азбестовий чи мембранний). Зберігати у посудинах з гумовими пробками при кімнатній температурі.

1.4. Приготувати розчин фенолового червоного (індикатор).

1 г фенолового червоного у вигляді порошку помістити в ступку, додати 28,2 мл 0,1N розчину NaOH, розтерти; одержану суміш перелити в мірну колбу. Ступку ретельно промити водою для того, щоб усі частки барвника потрапили до колби. Довести об'єм розчину до 1 л, пропустити розчин крізь паперовий фільтр, розлити в посудини з ватно-марлевими пробками, стерилізувати при 1,5 атм. протягом 30-40 хв. і зберігати при кімнатній температурі.

1.5. Приготувати в мірній колбі по 50 мл розчинів А і В та 20 мл робочого розчину фенолового червоного в розведенні 1:1000 і довести бідистильованою водою до 1 л. Щоб запобігти подвійній стерилізації, розчини А і В можна злити в нестерильному вигляді.

Автоклавування суміші проводити при 1,5 атм. протягом 30-40 хв.

Для одержання робочого розчину на кожний літр указаної суміші стерильно додати 25 мл розчину С; рН готового розчину Хенкса - 7,6 - 7,8.

2. Приготування збалансованого сольового розчину Ерла.

2.1. Усі вказані нижче речовини (г) точно послідовно розчинити в бідистильованій воді:

NaCl	- 6,8;
KCl	- 0,4;
MgSO <sub>4</sub> ×7 H <sub>2</sub> O	- 0,2;
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ×7 H <sub>2</sub> O	- 0,14;
CaCl <sub>2</sub> ×6 H <sub>2</sub> O	- 0,39;
глюкоза	- 1,0;
NaHCO <sub>3</sub>	- 0,4;
феноловий червоний	- 0,01.

Перед тим, як додавати у розчин хлористий кальцій (CaCl<sub>2</sub>×6 H<sub>2</sub>O), розчинити його в невеликій кількості води і додати краплями у загальний розчин; рН готового розчину 7,0 - 7,1. Розчин профільтрувати крізь фільтр Зейтца-Гейма чи мембранний фільтр.

3. Приготування фізіологічного розчину.

3.1. Розчинити 8,5 г хлористого натрію в 1 л бідистильованої води.

4. Приготування розчину Тіроде.

4.1. Зважити й розчинити в 1 л бідистильованої води всі вказані речовини у такій кількості (г):

NaCl	- 8,0;
KCl	- 0,2;
CaCl <sub>2</sub>	- 0,2;
MgCl <sub>2</sub> ×6 H <sub>2</sub> O	- 0,1;



NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	- 0,05;
NaHCO <sub>3</sub>	- 1,0;
глюкоза	- 1,0.

- 4.2. Концентрацію водневих іонів (рН розчину) довести до 7,0 за допомогою розчину соди (NaHCO<sub>3</sub>). Під час роботи з культурами тканин рН розчину можна довести до 7,2 - 7,4. Іноді як індикатор водневих іонів у розчин додають 0,002 % фенолового червоного. Розчин профільтрувати крізь фільтр Зейтца-Гейма або свічки Беркефельда чи Шамберлана.

### Контрольні питання

1. Що таке сольовий розчин?
2. Охарактеризувати функції фізіологічних сольових розчинів.
3. Назвати склад сольових розчинів Ерла, Хенкса, Тіроде.

## Тема 3. ПРИРОДНІ ПОЖИВНІ СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ ТВАРИННИХ КЛІТИН ТА ТКАНИН

(6 год.)

Мета заняття. Ознайомитись з призначенням, складом та способами приготування природних поживних середовищ. Приготувати такі поживні середовища: плазму крові, сироватку крові, курячий ембріональний екстракт.

Матеріали: кров тварин і птахів, курячі ембріони, стерильний пісок.

Реактиви: парафін, гепарин (у розведенні 1:500), фізіологічний розчин, розчин Хенкса, ефір, 70 %-ний етиловий спирт.

Посуд та інструменти: пробірки хімічні та центрифужні, піпетки Пастера та мірні на 1 і 2 мл, широкогорлі посудини, ступки, товчачики, ножиці, пінцети, ватні пробки, гумові балони зі шлангом для піпеток, ексикатори, шприци.

Обладнання: автоклав, центрифуга та 10000 хв<sup>-1</sup>, термостат, холодильник.

Всю наступну роботу здійснюють у суворо стерильних умовах, з дотриманням правил асептики та використанням стерильного посуду й інструментарію.

### Хід заняття

1. Одержання плазми крові.
  - 1.1. Для того, щоб запобігти зсіданню крові, поверхню центрифужних пробірок необхідно покрити шаром парафіну. Для цього треба налити в чисті центрифужні пробірки по 0,5 мл розплавленого парафіну, закрити ватними пробками та проавтоклаувати у вертикальному положенні.
  - 1.2. Перед тим, як застосовувати, пробірки підігріти, а потім охолодити при повільному обертанні таким чином, щоб парафін не потрапляв на

пробки, а рівномірно розподілявся по поверхні пробірок.

- 1.3. Для одержання плазми кров у тварин брати натще, приспавши тварину ефіром. Потім зробити кровопускання серцевою пункцією або розтинанням грудної порожнини. Взятую кров (шприцом або піпеткою Пастера) помістити в парафіновані центрифужні пробірки та відцентрифугувати при  $2500 \text{ хв.}^{-1}$  протягом 15 хв. Щоб запобігти зсіданню крові, можна використовувати гепарин у розведенні 1:500.
2. Одержання сироватки крові.
  - 2.1. Кров тварини взяти вказаним вище способом (п.1.3.), але без використання гепарину.
  - 2.2. Налити кров у стерильні високогорлі посудини, ополоснувши їх фізіологічним розчином, витримати в термостаті при  $37^\circ \text{C}$  протягом 20-30 хв. Потім відділити згусток від стінок посудини стерильною скляною паличкою чи піпеткою та залишити кров у холодильнику на 1-2 доби.
  - 2.3. Відцентрифугувати пробірки з кров'ю при швидкості  $1000 \text{ хв.}^{-1}$  протягом 10 хв. Сироватку відібрати в стерильні пробірки.
3. Приготування курячого ембріонального екстракту.
  - 3.1. Вийняти курячі ембріони з термостата після інкубації протягом 10 днів при  $38^\circ \text{C}$ . Дотримуючись правил асептики, розітнути яйце, витягти ембріон на чашку Петрі, відсікти ножицями (обробленими спиртом) голову. Ембріон помістити у фарфорову ступку, подрібнити ножицями, а потім розтерти товкачиком з додаванням невеликої кількості стерильного піску.
  - 3.2. На кожний ембріон додати 1-2 мл розчину Хенкса. Одержану суспензію відцентрифугувати при  $2000 \text{ хв.}^{-1}$  протягом 15 хв. Надосадову рідину зібрати в стерильні пробірки піпеткою Пастера.

### **Контрольні питання**

1. Дати загальну характеристику поживних середовищ, які застосовуються для культивування тваринних клітин.
2. Навести класифікацію поживних середовищ для культур клітин.
3. Як застосовуються природні поживні середовища?
4. Чим відрізняються методи одержання сироватки та плазми крові тварин?
5. Описати методику приготування курячого ембріонального екстракту.
6. Охарактеризувати ростові та підтримуючі поживні середовища.
7. У чому полягає функція сироватки при культивуванні клітин?
8. Назвати переваги та недоліки використання безсироваткових середовищ.
9. Чому використовують безсироваткові поживні середовища?

#### Тема 4. ОДЕРЖАННЯ ПЕРВИННО-ТРИПСИНІЗОВАНОЇ КУЛЬТУРИ КЛІТИН З НИРКИ БІЛОГО ЩУРА (12 год.)

Мета заняття. Ознайомитись з принципом, на якому заснований метод приготування первинно-трипсинізованих культур клітин. Оволодіти методикою одержання первинно-трипсинізованої культури клітин з нирки білого щура.

Матеріали: нирки білого щура.

Реактиви: фізіологічний розчин, трипсин чи версен (0,25%-ний розчин), відповідно підібране синтетичне поживне середовище, ефір, йод, 70 %-ний етиловий спирт.

Посуд та інструменти: колби, фарфорові ступки, пінцети, ножиці, марля, ексікатор, голки, препарувальна дошка, піпетки, матраци, пробірки, гумові пробки, гумові балони зі шлангом для піпеток.

Обладнання: магнітна мішалка з магнітами, термостат, центрифуга на 10000 хв.<sup>-1</sup>, світловий мікроскоп, камера Горяєва, склянки з дезрозчином (5%-ний розчин хлораміну).

#### Хід заняття

„Первинною” називається культура, для одержання якої клітини, тканини чи органи взяті безпосередньо з організму. Культура вважається первинною до першого субкультивування. Принцип методу одержання первинних культур клітин полягає в тому, що шматочки тканини диспергують, головним чином, ферментами для одержання суспензії клітин з наступним вирощуванням їх у вигляді моношару. Якщо при цьому використовують трипсин, то таку культуру називають „первинно-трипсинізованою”.

Одержання первинно-трипсинізованої культури клітин з нирки білого щура. Витягти нирки у білого щура. Для цього тварину посадити в ексікатор та приспати за допомогою ефіру. Потім розташувати на препарувальній дошці спиною догори, продезинфікувати шкіру йодом, інструменти - спиртом. Зробити на спині в поперековому відділі хрестоподібний розріз та виїняти нирки. Звільнити їх від капсул, промити фізіологічним розчином та подрібнити ножицями на фрагменти розміром 1-2 мм.

1. Обробити нирки розчином протеолітичних ферментів. Використати 0,25%-ний розчин трипсину або версену, підігрітий до 32°C. При цій температурі вихід клітин максимальний.
2. Здійснити повторну дрібну трипсинізацію. В колбу зі стерильним магнітом помістити подрібнену тканину, додати підігрітий до 37°C трипсин. Кількість його повинна бути такою, щоб тканина, яка осіла, була вкрита на 1,5-2 см. Колбу з тканиною помістити в термостат при 37°C на 10-15 хв. Після інкубації трипсин злити, замінити його свіжою порцією з додаванням синтетичного поживного середовища. Колбу з тканиною та магнітом поставити на магнітну мішалку на 10-15 хв.

(швидкість перемішування повинна бути такою, щоб забезпечити швидке перемішування тканини з утворенням невеликого заглиблення рідини над магнітом, але без спінювання). Надосадову рідину (суспензію клітин у трипсині) профільтрувати крізь марлю і центрифугувати при  $800 \text{ хв.}^{-1}$  протягом 5 хв. До тканини, що залишилася у колбі, додати свіжу порцію поживного середовища без трипсину. Колбу з тканиною знову поставити на магнітну мішалку і т.п. Коли тканина в колбі втратить рожевий колір, шматочки розбухнуть та наберуть білястого відтінку (настане виснаження тканини), трипсинізацію припинити. До осаду додати певний об'єм поживного середовища і відпіпетувати.

- Зробити підрахунок клітин у камері Горяєва. Приготувати препарат з краплини суспензії і помістити камеру Горяєва на предметний столик мікроскопа. Якщо в поле зору потрапить конгломерат клітин, в яких окремі ядра оточені великою кількістю цитоплазми, то кожне ядро рахують за одну клітину. Загальну кількість клітин визначають за формулою:

$$x = \frac{(a + b + c) \times 5 \times 1000}{0,9} \times n, \quad (1)$$

де  $x$  – кількість клітин в 1 мл;

$a, b, c$  – кількість клітин у 3 довільно вибраних стовпчиках;

$(a + b + c) \times 5$  – сумарна кількість клітин у 15 стовпчиках;

0,9 – об'єм камери Горяєва, мм<sup>3</sup>;

1000 – кількість мм<sup>3</sup> у см<sup>3</sup>;

$n$  - коефіцієнт розведення суспензії.

Відповідно до результатів підрахунку клітинну суспензію розвести поживним середовищем до необхідної концентрації і розлити в матраці та пробірки з розрахунку 200-300 тис. клітин в 1 мл поживного середовища. Посівна доза на матрац об'ємом 100 мл – 2-3 млн. клітин. Закрити гумовими пробками та помістити в термостат при 37°C.

### **Контрольні питання**

- У чому полягає суть одержання первинних клітин культур тканин?
- Назвати первинні культури, що застосовуються у вірусології.
- Пояснити принцип методу трипсинізації клітин.
- Перелічити відомі методи трипсинізації.
- Як провести протеолітичну дезагрегацію органів?
- Що означає поняття „посівна доза клітин”?
- Для чого необхідно здійснювати підрахунок клітин?

## Тема 5. ОДЕКРЖАННЯ ПЕРВИННО-ТРИПСИНІЗОВАНИХ КУЛЬТУР КЛІТИН ІЗ ШКІРНО-М'ЯЗЕВОЇ ТКАНИНИ КУРЯЧИХ ЕМБРІОНІВ, ЩО РОЗВИВАЮТЬСЯ

(12 год.)

Мета заняття. Оволодіти методикою одержання первинно-трипсинізованої культури клітин із шкірно-м'язової тканини курячих ембріонів, що розвиваються.

Матеріали: шкірно-м'язова тканина курячого ембріону.

Реактиви: фізіологічний розчин, трипсин чи версен (0,25%-ний розчин), відповідно підібране поживне середовище (199), ефір, йод, 70 %-ний етиловий спирт.

Посуд та інструменти: колби, підставки під яйця, пінцети, ножиці, марля, голки, піпетки, матраци, пробірки, гумові пробки, гумові балони зі шлангом для піпеток.

Обладнання: магнітна мішалка з магнітами, термостат, центрифуга на 10000 хв.<sup>-1</sup>, світловий мікроскоп, камера Горяєва, склянки з дез.розчином (5%-ний розчин хлораміну).

### Хід заняття

Клітини, ізольовані від тварини після народження, відносяться до зрілих. Чим більше їх вік, тим трудніше їх культивувати. Саме тому особливо перспективним є одержання культур з тканин ембріонів. Як правило, культури, отримані з ембріональних тканин, характеризуються кращим виживанням та більш активним ростом у порівнянні з культурами з відповідних дорослих тканин. Це відображає більш низький рівень спеціалізації та наявність стовбурових клітин в ембріонах. Серед ембріональних тканин найчастіше використовують ембріональні тканини курча, миші та людини. Особливо вигідними є курячі ембріони 10 -12 добового віку. Вони використовуються для культивування вірусів та виготовленню вірусних вакцин ще з 1931 р.

1. Провести овоскопування 10-12 денних курячих ембріонів. Відібрати яйця з рухливими ембріонами та добре вираженими судинами. На шкарлупі простим олівцем відмітити границі повітряної камери та розташування зародка.

2. Поверхню шкарлупи протерти йодованим спиртом на обпалити. Стерильним ножицями зрізати шкарлупу на 2-3 мм вище границі повітряної камери, розірвати підшкарлупну та хоріоналантоїсну оболонку та за шийку виждати ембріон у стерильну чашку Петрі.

3. У ембріона видалити голову, кінцівки та внутрішні органи. Отриманий шкірно-м'язовий мішок промити фізіологічним розчином, перенести у нову стерильну чашку Петрі та подрібнити на шматочки 3-4 мм.

4. Подрібнену тканину 2-3 рази промити розчином Хенкса від слизу та кров'яних елементів до отримання прозорих зливних вод і перенести у колбу для трипсинізації.

5. У колбу додати розчин трипсину або версену (0,25%), підігрітого до 35-37°C (співвідношення тканини та ферменту 1:3), і стоять в термостат при 37°C на 30 хв. Після закінчення терміну інкубації фермент повністю злити. У колбу додають розчин ферменту з додаванням синтетичного поживного середовища (1:2), вносять стерильний магніт та ставлять на магнітну мішалку на 15 хв. (кількість поживного середовища та ферменту повинна бути такою, щоб тканина, яка осіла, була вкрита на 1,5-2 см).

6. Надосадову рідину (суспензію клітин у трипсині) профільтрувати крізь марлю і центрифугувати при 800 хв.-1 протягом 5 хв. До тканини, що залишилася у колбі, додати свіжу порцію поживного середовища без трипсину. Колбу з тканиною знову поставити на магнітну мішалку і т.п. Коли тканина в колбі втратить рожевий колір, шматочки розбухнуть та наберуть білястого відтінку (настане виснаження тканини), трипсинізацію припинити. До осаду додати певний об'єм поживного середовища (середовище 199) і відпіпетувати.

7. Зробити підрахунок клітин. До 1 мл завису клітин додати рівний об'єм трипанового синього, внести в камеру Горяєва і підрахувати кількість живих фібробластоподібних - заокруглених та прозорих (мертві клітини набувають синього забарвлення, а еритроцити, які не зараховуються при підрахунку, але мають характерну овальну форму). Підрахунок проводять за формулою наведеною в лабораторній роботі № 3 п.5.

8. Суспензію клітин розвести середовищем 199 (з додаванням сироватки ВРХ до 7-10%) до посівної концентрації  $5-10 \times 10^5$  кл/мл і вносять в культуральні флакони.

Успіх культивування клітин в значній мірі залежить від посівної дози. При малій кількості клітин не спостерігається утворення моно шару навіть при тривалому культивуванні. При дуже великій кількості клітин відбувається інтенсивна їх проліферація, і клітини, що формують моношар, значно раніше старіють та швидше спостерігається їх неспецифічна дегенерація.

### **Контрольні питання**

1. Які чинники впливають на ріст клітин у культурі?
2. У чому переваги використання ембріональних тканин для отримання первинних культур?
3. Назвати ембріональні культури, що застосовуються у вірусології.

## **Тема 6. МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ КОНТРОЛЬ ПРИ РОБОТІ З КУЛЬТУРАМИ КЛІТИН (12 год.)**

Мета заняття. Оволодіти методами мікробіологічного контролю при роботі з культурами клітин.

Матеріали: флакони з клітинами, що культивуються.

Реактиви: фізіологічний розчин, 70 %-ний етиловий спирт, тіогліколове середовище (ТГС), м'ясопептонний бульйон (МПБ), м'ясопептонний агар (МПА), середовище Сабуро рідке.

Посуд та інструменти: піпетки, чашки Петрі, матраци, пробірки, ватно-марлеві пробки, мікробіологічна петля, гумові балони зі шлангом для піпеток.

Обладнання: термостат, склянки з дезрозчином (5%-ний розчин хлораміну).

### Хід заняття

Вірусологічні дослідження, які проводяться з використанням клітинних культур, потребують постійного контролю присутності сторонніх мікроорганізмів (контамінантів) – вірусів, бактерій, грибів, мікоплазм та клітин інших клітинних культур. На відміну від організму людини, імунна система якого володіє багатьма різноманітними механізмами захисту від інфекцій, клітини в культурі *in vitro* захищені лише обережністю роботи дослідника.

Бактеріальні та грибові ураження створюють додаткові труднощі при культивуванні клітин в культурі, проте у своїй більшості вони добре проявляються та легко виявляються, і, значить, призводять до менш серйозним наслідкам, ніж більш непомітне ураження мікоплазмами. Попередити розмноження та знищити бактерії, мікоплазми та гриби вдається за допомогою протимікробних препаратів (антибіотики та ін.), які додаються в ростові середовища безпосередньо перед їх використанням. Хоча при тривалому культивуванні клітинних культур застосування антибіотиків не бажано. Тому при роботі з клітинами необхідно дотримуватися стерильних умов роботи, для запобігання забруднення мікроорганізмами, та проводити адекватні тести для оцінки їх ефективності.

1. Для контролю стерильності з метою виявлення можливої контамінації аеробними та анаеробними бактеріями та грибами використовуються наступні середовища: тіогліколове середовище (ТГС), м'ясопептонний бульйон (МПБ), м'ясопептонний агар (МПА), середовище Сабуро рідке.

2. Підготовка середовищ для контролю. Перед використанням зазначені середовища (рідкі) розлити по 10 мл в бактеріологічні пробірки; МПА розплавити, налити по 5 мл, зробити скошений агар та закрити ватно-марлевими пробками.

3. Виконання контролю на стерильність.

3.1. Відібрати 4-5 пробірки із зазначеними середовищами, в кожному пробірці внести по 0,5 мл середовища, сироватки або клітинної суспензії. Посів провести піпеткою об'ємом 1,0 мл, рівномірно випускаючи її вміст, починаючи зі дна до поверхні. На поверхню скошеного агару досліджуваний розчин внести мікробіологічною петлею.

- 3.2. Пробірки інкубувати, за виключенням пробірок з середовищем Сабуро, при температурі 37С і спостерігають впродовж 5 днів. Середовище Сабуро залишити при кімнатній температурі і спостерігати впродовж 7 днів. Пробірки з універсальним напіврідким середовищем –ТГІ для виявлення бактерій помістити в термостат (37С), а для виявлення мікроскопічних грибів залишають при 20-22С.
4. Облік результатів. Облік результатів провести шляхом огляду пробірок, що були засіяні. Ознаки бактеріального росту на рідких середовищах – рівномірне помутніння середовища, утворення осаду на дні пробірки, утворення зерен на стінках пробірки або появи плівки на поверхні поживного середовища. Ознаки бактеріального росту на МПА: поява колоній різної форми та розмірів. Ознаки росту плісняв та дріжджів на середовищі Сабуро – формування плодових у товщі або споро утворюючої плівки на поверхні, ріст дріжджових клітин у товщі середовища.
5. При наявності росту мікроорганізмів культури клітин викидають, не проводячи лікування.

### **Контрольні питання**

1. Назвіть причини контамінації клітин в культурі?
2. Опишіть методи виявлення можливої контамінації культури клітин?
3. Назвіть ознаки бактеріального росту на рідких та твердих поживних середовищах?

## **Тема7. КЛАСИФІКАЦІЯ, ОПИС ТА СУБКУЛЬТИВУВАННЯ СТАБІЛЬНИХ КЛІТИННИХ ЛІНІЙ**

(6 год.)

Мета заняття. Ознайомитись з поняттями „клітинний штам”, „клітинна лінія” та „стабільна клітинна лінія”. Оволодіти методикою субкультивування стабільної клітинної лінії.

Матеріали: стабільна клітинна лінія.

Реактиви: фізіологічний розчин, трипсин (0,25%-ний розчин), відповідно підібране синтетичне поживне середовище з невеликою кількістю сироватки.

Посуд та інструменти: матраци, пробірки, піпетки, гумові пробки, гумові балони зі шлангом для піпеток, склянки з дезрозчином.

Обладнання: термостат, центрифуга на 10000 хв.<sup>-1</sup>, камера Горяєва, світловий мікроскоп.

### **Хід заняття**



„Штамом клітин” чи „клітинним штамом” називається популяція однорідних клітин за однією або декількома специфічними властивостями (маркерами). „Клітинна лінія” – це культура клітин, одержана з первинної культури після першого субкультивування. Складається з різнотипних клітин, які спочатку присутні в первинній культурі. „Стабільна клітинна лінія” – клітинна лінія, яка має здатність субкультивуватися *in vitro* не менше 70 разів до безмежної кількості.

Середовище, яке звичайно використовують для підтримки росту стабільних клітинних ліній HeLa та Нер-2, містить 45 % гідролізату лактальбуміну, 45 % середовища 199 і 10 % телячої сироватки з додаванням антибіотиків (200 ОД пеніциліну і 100 ОД стрептоміцину на 1 мл).

1. Субкультивування стабільної клітинної лінії.
  - 1.1. З матраца з моношаром клітинної культури видалити поживне середовище, промити клітини фізіологічним розчином. Налити в матрац підігрійтий до 37°C трипсин (так, щоб покрити клітини). Культуру з трипсином інкубувати в термостаті при 37°C протягом 10-15 хв. Обережно злити трипсин, налити невелику кількість поживного середовища.
  - 1.2. Легким струшуванням зняти клітини зі стінки флакона в середовище і центрифугувати при 1000 хв.<sup>-1</sup> упродовж 10 хв. Надосадову рідину злити, а до осаду клітин додати відповідну кількість поживного середовища (у формулі 1, наведеній в темі 5, вона позначена як "n") і відпіпетувати.
  - 1.3. Помістити краплю клітинної суспензії до камери Горяєва і зробити підрахунок клітин під мікроскопом. Кількість клітин в одиниці об'єму (в 1 мл) визначають за формулою 1, наведеною у темі 5.  
Відповідно до результатів підрахунку клітинну суспензію розвести поживним середовищем до необхідної концентрації і розлити в матраци та пробірки з розрахунку 100-200 тис. клітин на 1 мл. Закрити гумовими пробками і помістити в термостат при 37°C.

### **Контрольні питання**

1. Назвати характерні властивості стабільних клітинних ліній.
2. Перелічити переваги стабільних клітинних ліній у порівнянні з первинними.
3. Які методи культивування стабільних клітинних ліній вам відомі?
4. Охарактеризувати суспензійне культивування клітин поза організмом.
5. У чому полягає суть ролевого культивування клітин поза організмом?
6. Описати методику субкультивування стабільних клітинних ліній.

## Тема 8. КУЛЬТИВУВАННЯ ВІРУСІВ ЛЮДИНИ І ТВАРИН НА СТАБІЛЬНИХ КЛІТИННИХ ЛІНІЯХ

(6 год.)

Мета заняття. Ознайомитись з основними умовами використання культур клітин та тканин для виділення вірусів. Оволодіти методиками одержання матеріалу, що містить вірус (носоглотковий змив людини, легені мишей, алантоїсну рідину курячого ембріона). Опрацювати методику зараження ними культури клітин.

Матеріали: носоглотковий змив, легені мишей, алантоїсна рідина курячого ембріона.

Реактиви: фосфатно-буферний розчин або сольові розчини (див. тему 2), напівсинтетичне або синтетичне поживне середовище (див. тему 6), бідистильована вода, бульйон, антибіотики (пеніцилін та стрептоміцин), суспензія еритроцитів людини чи тварини, культура клітин в матрацах, поживне середовище без сироватки, фізіологічний розчин, ефір, 70 %-ний етиловий спирт.

Посуд та інструменти: пробірки хімічні та центрифужні, ступки, товкачки, планшетки, піпетки, гумові балони зі шлангом для піпеток, ватні тампони, препарувальна дошка, пінцети, ножиці, скальпель, склянки з дезрозчином.

Обладнання: центрифуга на  $10000 \text{ хв}^{-1}$ , світловий мікроскоп, термостат.

### Хід заняття

1. Одержання матеріалу, що містить вірус, з носоглоткового змиву людини.
  - 1.1. Носоглотковий змив одержати прополоскуванням горла 10 мл стерильної дистильованої води або бульйону. Взяти проби можна за допомогою тампонів, зануривши їх у пробірки з 5 мл фосфатно-буферного розчину або напівсинтетичного поживного середовища.
  - 1.2. Відцентрифугувати рідину для видалення зайвих часток при  $1500 \text{ хв}^{-1}$  протягом 10 хв.
  - 1.3. Обробити надосадову рідину антибіотиками. На 1 мл рідини додати 1000 ОД пеніциліну та 500 ОД стрептоміцину і після 30 хв. контакту при кімнатній температурі використати для зараження культури тканин.
  - 1.4. Після кількох днів інкубації наявність вірусу в культуральній рідині визначити за допомогою реакції гемаглютинації (РГА).
2. Одержання матеріалу, що містить вірус, з легенів мишей.
  - 2.1. Проінфіковану вірусом тварину приспати за допомогою ефіру, розітнути обробленими 70 %-ним етиловим спиртом інструментами, витягти легені і розтерти товкачиком у стерильній ступці.
  - 2.2. Для одержання суспензії додати фосфатно-буферний розчин або розчин Хенкса (у співвідношенні 1:10 - 1:20) і центрифугувати при  $3000 \text{ хв}^{-1}$  протягом 20 хв.
  - 2.3. До надосадової рідини додати антибіотики (див. п.1.3.) та використати

цю рідину для зараження культури клітин.

Наявність вірусу в клітинах культури після кількох днів інкубації визначити за допомогою РГА з культуральною рідиною.

3. Одержання алантоїсної рідини курячих ембріонів, що містить вірус.
  - 3.1. Проінфіковані вірусом курячі ембріони охолодити в холодильнику протягом 5-10 год. для того, щоб звузилися кровоносні судини.
  - 3.2. Проглянути під овоскопом курячі ембріони і позначити межу повітряної камери та великі кровоносні судини.
  - 3.3. Обробити шкаралупову оболонку йодом, надбити її в центрі над повітряною камерою.
  - 3.4. Дотримуючись правил асептики, піпетками Пастера відсмоктати алантоїсну рідину, збираючи її у стерильні пробірки.
4. Зараження культури клітин.
  - 4.1. Для зараження матеріалом, що містить вірус, відібрати пробірки з суцільним шаром клітин (продивитись під світловим мікроскопом).
  - 4.2. Поживне середовище видалити і в кожен пробірку внести по 0,1-0,2 мл матеріалу, який досліджується. Після 30 - 60 хв. контакту з клітинами матеріал видалити і залити культуру підтримуючим середовищем. За нього звичайно править середовище 199 без сироватки або 0,5 %-ний розчин гідролізату лактальбуміну з 5%-ною прогрітою телячою сироваткою.

Для кожної проби матеріалу використати 4 - 6 пробірок з культурою клітин. Таку саму кількість пробірок без внесення матеріалу, що містить вірус, у кожній серії досліджень залишити як контроль, додавши в них 1 мл поживного середовища.
  - 4.3. Усі пробірки інкубувати за оптимальної для даного вірусу температури та щодня продивлятися під мікроскопом при малому збільшенні на виявлення морфологічних змін у клітині.

Більшість вірусів викликає зміни, що проходять у дві фази. У першій фазі клітини заокруглюються, їхні контури стають більш чіткими, а далі настають дегенеративні зміни, які часто залежать від вірусу (зернистість, вакуолізація цитоплазми) і переходять у більш помітні пошкодження клітин аж до їх цитолізу та відшарування від скла.

Окремим варіантом цитопатичного ефекту є утворення величезних клітин (полікаріоцитів), що можуть уміщувати до 1000 ядер, а також поява ядерних чи цитоплазматичних тілець-включень. Проліферативні зміни виражаються в утворенні багат шарових скупчень клітин.

### **Контрольні питання**

1. Дати визначення поняттю „цитопатична дія вірусів”.
2. Які форми ЦПД вам відомі?
3. Назвати фактори, від яких залежить прояв ЦПД вірусів.
4. Як одержують матеріал для виділення вірусів від людини, тварин, курячих ембріонів?

5. Охарактеризувати методику зараження культур клітин матеріалом, що досліджується.
6. Як враховують ЦПД вірусів на культури клітин?

**Тема 9. ОДЕРЖАННЯ „ЧИСТИХ” ЛІНІЙ (КЛОНІВ)  
КЛІТИННИХ ШТАМІВ  
(6 год.)**

Мета заняття. Ознайомитись з поняттям „клон” та принципом його вирощування. Одержати клони клітинних штамів за методами Сенфорда; Пака, Маркуса і Чиечура; Ченка і Московича; Уїлді і Стокера; за методом розведень.

Матеріали: суспензія клітин ссавців, синтетичне поживне середовище, плазма крові.

Реактиви: хлороформ, трипсин, парафін.

Посуд та інструменти: чашки Петрі, предметні та покрівні скельця, пробірки, матраци, піпетки Пастера, мікропіпетки, гумові балони зі шлангом для піпеток.

Обладнання: світловий мікроскоп, термостат, рентгенівська установка.

**Хід заняття**

„Клоном” (*по-грецьки проросток*) називають генетично однорідну популяцію клітин, вирощену з однієї ізольованої клітини. Першу успішну спробу одержання чистої культури клітин ссавців з однієї клітини було здійснено в 1935 році Моеном.

1. Одержання клона за методом Сенфорда.
  - 1.1. Зробити капіляр з відтягнутого над вогнем кінчика піпетки Пастера.
  - 1.2. Сильно розведену суспензію клітин затягнути в капіляр, потім запаяти його з обох боків у полум’ї пальника.
  - 1.3. Витримати в термостаті при 37°C протягом 15 год.
  - 1.4. Продивитися клітини під мікроскопом, вибираючи ділянки капіляра, що містять одну клітину, на відрізьку довжиною 4,5 мм.
  - 1.5. Простерилізувати зовнішню поверхню капіляра хлороформом протягом 15 хв. Обломити за допомогою пінцета трубку в чашці Петрі таким чином, щоб клітина залишилася в ділянці капіляра. Витягти цю ділянку, ввести в згусток плазми та інкубувати доти, поки виросте достатня для субкультивування кількість клітин.
2. Одержання клона методом Пака, Маркуса і Чиечура. У 1956 році Пак, Маркус і Чиечур розробили ефективний метод клонування на моделі клітин HeLa. В його основі лежить принцип висівання сильно розведеної клітинної суспензії на збагачене поживне середовище у вигляді шару клітин, опромінених рентгенівськими променями.
  - 2.1. Клітини HeLa у дозі  $2 \times 10^5$  стерильно посіяти на 4 мл відповідно підібраного синтетичного поживного середовища у чашки Петрі

діаметром 6 см.

- 2.2. Через 5 - 18 год., коли клітини прикріпилися до скла, опромінити їх дозою 4000 - 5000 Р.
- 2.3. Видалити поживне середовище та замінити свіжим, що містить 30% сироватки ссавців, 40% синтетичного середовища та 30% розчину Хенкса. Помістити чашки в термостат при 37°C. Через кожні 4 доби змінювати середовище. Серед опромінених клітин через 7 - 10 діб виростають окремі колонії. Чашку Петрі проглянути під мікроскопом. Цей метод при максимально дрібній трипсинізації, яка забезпечує цілісність клітин, дає 100% позитивних результатів.
3. Одержання клона методом Ченка і Московича (ізоляція колоній).
  - 3.1. Помістити в чашку Петрі діаметром 6 см 30 - 36 покривних скелець, поверхню яких покрити 1 мл відповідно підібраного синтетичного поживного середовища. Внести в чашку попередньо трипсинізовану клітинну суспензію у великому розведенні, що містить приблизно 150 клітин в 4 мл. Обережним обертальним рухом розподілити клітини на поверхні пластинок.
  - 3.2. Помістити чашку в термостат та інкубувати при 37°C протягом 2-20 год. доти, доки клітини не прикріпляться до скла.
  - 3.3. Видалити рідку фазу, під мікроскопом відібрати пластинки з поодинокими клітинами і перенести в пробірку, що містить 1 мл середовища. Інкубувати клітини при 37°C до розвитку колоній. У період вирощування піпетувати колонії для суспендування клітин. Вирощувати клітини, доки не утвориться моношар.
4. Одержання клона методом Уїлді і Стокера.

Цей метод дозволяє виділяти клітини під контролем мікроскопа.

  - 4.1. Приготувати тонкі піпетки Пастера. Для цього із звичайної піпетки Пастера пінцетом у полум'ї газового пальника витягнути тонкий капіляр.
  - 4.2. Для виділення клонів у чашку Петрі діаметром 6 см внести 30 мл рідкого парафіну, на який після застигання помістити по обводі чашки 10 маленьких крапель відповідно підібраного поживного середовища на відстані близько 5 мм одна від одної. Потім у центрі чашки помістити декілька крапель клітинної суспензії, що містить близько 100 клітин.
  - 4.3. Поставити чашку на предметний столик мікроскопа, набрати в мікропіпетку невелику кількість поживного середовища і, дивлячись у мікроскоп, затягнути в піпетку окрему клітину. Кінцем піпетки внести клітину в одну з крапель середовища на чашці Петрі. Коли по одній клітині внесено в усі 10 крапель, чашку закрити і помістити в термостат при 37°C.

Для успішного клонування важливо підібрати необхідний розмір краплі середовища. Оптимальний діаметр становить 4-5 мм (0,005 - 0,01 мл середовища); Ефективність клонування залежить від клітин. Здорові клітини, які швидко ростуть, дають кращі результати.

5. Одержання клона методом розведень.
- 5.1. Відібрати матрац з гарним моношаром клітин. Видалити з нього поживне середовище і зняти клітини за допомогою трипсину. (Умови роботи з трипсином уміщені в темі 5).
- 5.2. Зробити розведення клітин з відповідно підібраним поживним середовищем (0,5 мл суспензії клітин та 4,5 мл середовища).
- 5.3. Помістити стерильно в чашки Петрі з твердим поживним середовищем 0,05 - 0,1 мл суспензії розведених клітин (100 клітин на чашку Петрі) та інкубувати при 37°C протягом 10 днів.

### Контрольні питання

1. Що означає поняття „чиста” лінія клітинного штаму?
2. Що лежить в основі клонування клітин?
3. Чим викликана необхідність застосування клонів у вірусології?
4. Охарактеризувати методи одержання клонів клітинних штамів за Сенфордом, Ченком, Московичем.
5. Назвати основні етапи одержання клонів клітинних штамів за методами Пака, Маркуса й Чисчура.
6. На чому ґрунтується метод клонування за Уїлді і Стокером?
7. Перелічити основні умови клонування.
8. Як застосовують клонові штами клітинних культур у біології та вірусології?

## Тема 10. **ТИТРУВАННЯ ВІРУСІВ І АНТИТІЛ МЕТОДОМ БЛЯШОК** (6 год.)

Мета заняття. Вивчити феномен цитопатичної дії вірусу на забарвлені моношарові культури клітин у вигляді утворення знебарвлених бляшок. Оволодіти методикою титрування вірусів і антитіл методом бляшкоутворення.

Матеріали: матеріал, який містить вірус; сироватка; одношарова культура клітин.

Реактиви: фізіологічний розчин, поживний агар (1%-1,5%-ний агар Дифко і відповідно підібране синтетичне поживне середовище, (див. тему 6), нейтральний червоний.

Посуд та інструменти: матраци; пробірки, піпетки, гумові балони зі шлангом для піпеток.

Обладнання: термостат.

### Хід заняття

У 1954 р. Дюльбекко і Фогт розробили оригінальний метод титрування і виділення варіант-штамів вірусу поліомієліту. Він полягав в утворенні на забарвленому моношарові культури клітин у місцях цитопатичної дії вірусу знебарвлених бляшок (плям), звідси й походить назва методу.

1. Встановлення титру вірусу методом бляшок.
- 1.1. Приготувати одношарову культуру з гарним моношаром у посудинах з

плоскою рівною поверхнею (флаконах Карреля, матрацах).

- 1.2. Видалити первинне поживне середовище та дворазово промити клітинний моношар фізіологічним розчином. Нанести на шар клітин по 0,2 мл різних розведень вірусу. Залишити матраци для адсорбції вірусу при 37°C на 30 – 60 хв.
- 1.3. Приготувати агарове покриття (43°C) з додаванням нейтрального червоного для забарвлення клітин. Покрити заражений моношар клітин поживним агаром. Після застигання агару помістити заражені культури в термостат та інкубувати при 37°C. Результати враховувати наступного дня.
- 1.4. Зробити підрахунок бляшок у світлі, що проходить на темному фоні. Бляшки чітко помітні у вигляді круглих світлих ділянок на загальному червоному фоні прижиттєво забарвлених нейтральним червоним клітин. Кількість вірусу, що здатна утворювати одну бляшку, позначають як одну бляшкоутворюючу одиницю (1 БУО). Титр вірусу виражають у бляшкоутворюючих дозах (БУД), що містяться в 1 мл, та підраховують за формулою:

$$A = \frac{a \times b}{y}, \quad (2)$$

де  $A$  – кількість бляшкоутворюючих доз в 1 мл;

$a$  – середня кількість бляшок на одну чашку;

$b$  – фактор розведення;

$y$  – об'єм матеріалу, що містить вірус, внесений в одну чашку.

У тих випадках, коли для титрування використовують не одне, а кілька розведень, формула набуває іншого вигляду:

$$A = \frac{K_n}{y} \times n, \quad (3)$$

де  $n$  – середня кількість негативних колоній, які було знайдено при зараженні моношару різними розведеннями вірусу;

$K_n$  – найбільша кратність розведення;

$y$  – об'єм розведення, яке вносять у чашку.

Приклад: при зараженні клітин нирок мавпи вірусом поліомієліту в дозі 0,2 мл та розведеннях  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  середня кількість бляшок становила відповідно 107, 19 і 7. Визначаємо значення  $n$ :

$$n = \frac{N_1 + N_2 + \dots + N_{(n-1)} + N_n}{K_n \times \left( \frac{1}{k_1} + \frac{1}{k_2} + \dots + \frac{1}{k_{(n-1)}} + \frac{1}{k_n} \right)}, \quad (4)$$

у даному випадку  $N_1=107$ ;  $N_2=19$ ;  $N_3=7$ ;  $k_1=10^{-3}$ ;  $k_2=10^{-4}$ ;  $k_3=10^{-5}$ .

Отже:

$$n = \frac{107 + 19 + 7}{100000 \times \left( \frac{1}{1000} + \frac{1}{10000} + \frac{1}{100000} \right)} = \frac{133}{111} = 1,2;$$

відповідно:

$$A = \frac{100000}{0,2} \times 1,2 = 600000 \text{ БУД/мл.}$$

### Контрольні питання

1. Дати визначення поняттю „бляшка”.
2. Що таке титр вірусу в бляшкоутворюючих одиницях (БУО)?
3. Як вираховують кількість бляшкоутворюючих доз в 1 мл, коли для титрування використовують декілька розведень вірусу?

## Тема 11. ТИТРУВАННЯ ВІРУСІВ І АНТИТІЛ МЕТОДОМ КОЛЬОРОВОЇ РЕАКЦІЇ (12 год.)

Мета заняття. Ознайомитися з властивостями вірусів, на яких заснований метод кольорової реакції. Відпрацювати комплекс методик титрування вірусів та антитіл кольоровою реакцією.

Матеріали: культура клітин, матеріал, що містить вірус, імунна сироватка.

Реактиви: розчин трипсину чи версену, відповідно підібране поживне середовище (див. тему 6) з додаванням індикатора фенолового червоного, стерильне вазелінове масло.

Посуд та інструменти: матраци, пробірки, гумові балони зі шлангом для піпеток, планшетки, склянки з дезрозчином.

Обладнання: центрифуга на 10000 хв.<sup>-1</sup>, стерильний бокс, термостат.

### Хід заняття

Кольорова реакція запропонована Солком, Янгнером та Уордом у 1954 році для титрування вірусу поліомієліту. На цей час застосовується для вивчення різних вірусів. Основана на зміні кольору поживного середовища, яке містить індикатор феноловий червоний, в результаті накопичення в ньому продуктів клітинного метаболізму, що знижують концентрацію водневих іонів. За наявності життєдіяльних клітин рН середовища зміщується в кислий бік і його колір змінюється з червоного на жовтий. Коли ж клітини інфіковані вірусом, вони дегенерують і колір поживного середовища не змінюється, тобто залишається червоним. Таким чином, про наявність вірусу в клітинах культури можна судити за кольором поживного середовища в пробірках.

1. Методика визначення дози клітин.
  - 1.1. Визначити метаболічну активність клітин та її стабільність. Для цього



клітини, які вирости в матрацах, зняти підігрітим до 37°C 0,25%-ним розчином трипсину (або 0,02%-ним розчином версену: на матрац ємністю 1 л потрібно 30-50 мл версену). Для кращого відшарування клітин від скла треба витримати їх з трипсином 10 - 15 хв. при 37°C (з версеном відповідно 20-40 хв). Струснути матрац та одержати суспензію клітин, яку відцентрифугувати при 1000 хв.<sup>-1</sup> протягом 10 хв. Надосадову рідину злити, осад використати для подальшої роботи.

- 1.2. Додати до осаду поживне середовище та приготувати різні концентрації клітин в 1 мл:  $20 \times 10^3$ ,  $50 \times 10^3$ ,  $75 \times 10^3$ ,  $100 \times 10^3$ ,  $150 \times 10^3$ ,  $200 \times 10^3$ ,  $300 \times 10^3$ ,  $400 \times 10^3$ . Кожну концентрацію клітин випробувати у 2 пробірках (у кожному з них внести по 0,75 мл клітинної суспензії і по 0,6 - 0,8 мл стерильного вазелінового масла). Пробірки у вертикальному положенні інкубувати в термостаті при температурі 36°-37°C. Через 18 - 20 год. провести підрахунок титрування.

За дозу клітин приймають мінімальну кількість клітин, що здатна в результаті своєї життєдіяльності змінити вихідну концентрацію водневих іонів від 7,5 - 7,6 до 7,0 і нижче (жовтий колір поживного середовища) протягом 18 - 20 год. при температурі 36°-37°C.

2. Відпрацювання методики титрування вірусу в кольоровій реакції (табл. 2).
    - 2.1. Приготувати 10-кратне розведення матеріалу, що містить вірус, і з кожного розведення внести по 0,25 мл не менше як у 2 пробірки.
    - 2.2. Довести клітинну суспензію до титру і в кожному пробірці з вірусом додати 1 дозу клітин в об'ємі 0,25 мл.
    - 2.3. Довести об'єм суміші вірусу з клітинами до 0,75 мл додаванням 0,25 мл поживного середовища (0,25%-ний розчин гідролізату лактальбуміну з антибіотиками).
    - 2.4. Внести в усі пробірки по 0,6 - 0,8 мл вазелінового масла.
    - 2.5. Для перевірки того, чи мають використані в досліді клітини необхідну концентрацію та достатню метаболічну активність, поставити контроль клітинної суспензії з 1; 0,5; 0,25 дози клітин. Кожну дозу внести не менше як у 2 пробірки і довести до 0,75 мл поживним середовищем. Усі пробірки інкубувати в термостаті при 36°-37°C. Результати реакції враховувати через 5 - 7 діб, коли в пробірках з контрольною дозою клітин змінюється колір середовища (табл. 2). Вважають, що доза клітин була взята правильно, якщо у пробірках з повною дозою значення рН знижується до 6,8 (колір яскраво-жовтий), у пробірках з 0,5 дози – колір жовтий або оранжево-рожевий, а з 0,25 дози – залишається червоним. При врахуванні реакції слід мати на увазі, що у пробірках з вірусом клітини гинуть і колір середовища не змінюється (залишається червоним). Там, де вірус відсутній, середовище жовтіє. Оранжевий колір свідчить про часткову загибель клітин.
- Титром вірусу вважають те найбільше розведення, яке при внесенні його у пробірку з клітинною суспензією пригнічує метаболізм 50% клітин

культури. Його обчислюють за методом Ріда і Менча та позначають як ЦПД<sub>50</sub> (цитопатична половинна доза).

3. Відпрацювання методики титрування антитіл у кольоровій реакції.  
Методика ґрунтується на тому ж принципі, що й попередня.
- 3.1. Приготувати двократні розведення сироватки, починаючи з 1:4, 1:8, 1:16, і т.д. до 1:1024. Внести по 0,25 мл сироватки в кожному розведенні не менше як у 2 пробірки.
- 3.2. Розведення вірусу готувати з таким розрахунком, щоб у 0,25 мл містилося 100 ЦПД<sub>50</sub> і додавати цю кількість у кожен пробірку з сироваткою. Суміш вірусу і сироватки витримати 1 год. при кімнатній температурі. Після цього додати в усі пробірки по 0,25 мл клітинної суспензії, розведеної до титру, і по 0,8 мл вазелінового масла. Використовувати стандартний вірус у культурі тканини (табл. 3).
- 3.3. Провести такі контрольні дослідження:
  - 1) контроль дози клітин за тією ж методикою, що і при титруванні вірусу;
  - 2) контроль токсичності сироватки (до 0,25 мл сироватки в найменшому розведенні додати 0,25 мл суспензії клітин у робочій дозі, 0,25 мл поживного середовища замість вірусу і 0,8 мл вазелінового масла);
  - 3) контроль дози вірусу повинен становити 10; 1; 0,1 ЦПД<sub>50</sub>. Для цього з робочого розведення вірусу, що містить 100 ЦПД<sub>50</sub>, треба приготувати 3 послідовних 10-кратних розведень. Внести по 0,25 кожного з них у 4 пробірки, а потім додати по 0,25 мл клітинної суспензії та по 0,8 мл вазелінового масла (табл. 4).



Схема контролю вірусу

Інгредієнти	Кількість ЦПД у 0,25 мл.			
	100	10	1	0,1
Вірус	0,25	0,25	0,25	0,25
Клітинна суспензія	0,25	0,25	0,25	0,25
Поживне середовище	0,25	0,25	0,25	0,25
Вазелінове масло	0,8	0,8	0,8	0,8

Усі пробірки кольорової реакції інкубувати в термостаті при 36°-37°С. Результати враховувати на 5 - 7 добу, як при титруванні вірусу. У пробірках з повною нейтралізацією вірусу антитілами колір середовища стає жовтим (тому що вірус не руйнує клітин і вони залишаються живими, виділяючи у середовище продукти життєдіяльності). Але якщо сироватка не нейтралізує вірус, колір середовища залишається червоним (тому що вірус руйнує клітини і в середовищі не накопичуються продукти їхнього метаболізму). При частковій нейтралізації вірусу середовище набуває оранжевого кольору.

Титром сироватки вважають її найбільше розведення, яке запобігає пригніченню метаболічної активності 50 % клітин (колір середовища у цих пробірках жовтий). Позначається ЦПД<sub>50</sub>.

### Контрольні питання

1. На якому принципі ґрунтується кольорова реакція?
2. Дати визначення титру вірусу за кольоровою реакцією.
3. Перелічити етапи постановки кольорової реакції для титрування вірусів.
4. Як врахувати кольорову реакцію при титруванні вірусу?
5. Дати визначення титру антитіл у сироватці за кольоровою реакцією.
6. З якою метою здійснюють інактивацію противірусних сироваток?
7. Охарактеризувати етапи постановки кольорової реакції з метою титрування антитіл у сироватках.
8. Описати врахування кольорової реакції при титруванні антитіл.

## Теми 12. ТИТРУВАННЯ ВІРУСІВ МЕТОДОМ ГЕМАДСОРБЦІЇ (6 год.)

Мета заняття. Ознайомитися з явищем гемадсорбції. Оволодіти методиками титрування вірусів реакціями гемадсорбції та затримки гемадсорбції.

Матеріали: культура тканин, матеріал, який містить вірус, суспензія еритроцитів (мурчака, мавпи, курей, барана, людини 0 групи), сироватка.

Реактиви: фізіологічний розчин, розчин Хенкса, відповідно підібране поживне середовище (див. тему 6).

Посуд та інструменти: пробірки, піпетки, гумові балони зі шлангом для піпеток.

Обладнання: світловий мікроскоп.

### Хід заняття

У 1957 році Фогель та Щолоков встановили, що еритроцити курей та морських свинок адсорбуються на клітинах нирок мавпи, заражених вірусом грипу. При цьому дегенеративні зміни виявляються при малому збільшенні світлового мікроскопа. Далі було встановлено, що це явище можна спостерігати і з іншими вірусами, які мають гемаглютинуючі властивості.

1. Титрування вірусу методом гемадсорбції.
  - 1.1. Клітини, попередньо заражені вірусом, двічі відмити охолодженим фізіологічним розчином, додаючи в кожену пробірку з культурою по 1 мл. Тоді додати в пробірку по 0,8 мл фізіологічного розчину та по 0,2 мл 0,4%-ної суспензії еритроцитів мурчака (у фізіологічному розчині або розчині Хенкса). Витримати пробірки 30-40 хв. у нахиленому положенні в холодильнику для адсорбції еритроцитів (для респіраторних вірусів – 3 - 5 хв., вірусів кліщового енцефаліту – 10-15 хв., вірусу вісповакцини – 20 - 30 хв.). Вийняти з холодильника, злегка струснути.
  - 1.2. Перед врахуванням реакції видалити з пробірок поживне середовище, а клітини промити фізіологічним розчином. Врахувати реакцію, продивляючись пробірки після струшування під світловим мікроскопом при малому збільшенні.

За позитивної реакції еритроцити адсорбуються на уражених вірусом клітинах у вигляді грона винограду, розеток, ланцюгів, стрічок. За негативної реакції моношар повністю вільний від еритроцитів. Вони плавають у надосадовій рідині або осідають на дно пробірки.

Специфічність реакції гемадсорбції контролюється додаванням еритроцитів тих самих видів тварин або людини з 0 групою у пробірки з незараженою культурою тканини. У контрольних пробірках адсорбції еритроцитів не відбувається, а якщо й відбувається, тоді при струшуванні пробірок еритроцити змиваються у надосадову рідину.
2. Постановка реакції затримки гемадсорбції.
  - 2.1. Помістити пробірки з культурами тканин, зараженими вірусом, у термостат та інкубувати протягом часу, необхідного для позитивної реакції гемадсорбції.
  - 2.2. Видалити з пробірок поживне середовище та промити клітини фізіологічним розчином. У частину пробірок додати по 0,2 мл нерозведеної або розведеної 1:10 специфічної сироватки і 0,8 мл розчину Хенкса. У контрольні пробірки замість сироватки внести розчин Хенкса по 0,1 мл, усі пробірки залишити при кімнатній температурі.
  - 2.3. Через 15 - 30 хв. внести в усі пробірки по 0,2 мл суспензії еритроцитів (0,4 % - 0,5 %-ної), залишити їх у нахиленому положенні на 10-30 хв. (залежно від типу вірусу), обережно струснути та врахувати результати,

продивляючись пробірки при малому збільшенні під світловим мікроскопом. У пробірках, в яких специфічна сироватка відповідає типу вірусу, гемадсорбція відсутня, у контрольних, навпаки, яскраво виражена.

### **Контрольні питання**

1. Для чого застосовують реакцію гемадсорбції у вірусологічних дослідженнях?
2. На чому засноване явище гемадсорбції?
3. Які віруси можна ідентифікувати за допомогою реакції гемадсорбції?
4. Охарактеризувати етапи постановки реакції гемадсорбції.
5. Охарактеризувати етапи постановки реакції затримки гемадсорбції.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

### Основний:

1. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков.–М.: Мир, 1983.–264 с.
2. Блажевич О.В. Культивирование клеток: Курс лекций / О. В. Блажевич – Мн.: БГУ, 2004. – 78 с.
3. Голубев Д.Б., Соминина А.А., Медведева М.Н. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии.–Ленинград: Медицина, 1976.–224 с.
4. Карышева А.Ф., Сюрин В.Н. Руководство по практической вирусологии.– Кишинев: Штиинца, 1980.–212 с.
5. Культура животных клеток. Методы / Под ред. Р.Фрешни.–М.: Мир, 1989.– 334 с.
6. Практикум із загальної вірусології: Навчальний посібник / За ред. А.Л. Бойка.–К.: ВЦ „Київський університет”, 2000.–270 с.
7. Сергеев В.А., Собко Ю.А. Культуры клеток в ветеринарии и биотехнологии. – К.: Урожай, 1990.–152 с.
8. Троценко Н.И., Белоусова Р.В., Преображенская З.А. Практикум по ветеринарной вирусологии. – М.: Агропромиздат, 1989.–288 с.
9. Culture of Cells for Tissue Engineering, edited by Gordana Vunjak-Novakovic and R. Ian FreshneyCopyright, 2006 John Wiley & Sons, Inc.

### Додатковий:

1. Атанасов А. Биотехнология в растениеводстве. Новосибирск: ИЦиГО СО РАН, 1993. – 242 с.
2. Лярски З. Диагностика вирусных болезней животных. – М.: Колос, 1980.– 400 с.
3. Методы лабораторной диагностики вирусных болезней животных.–М.: Агропромиздат, 1986.–351 с.
4. Методы общей бактериологии. Т.3 / Под ред. Ф. Герхардта.–М.: Мир, 1984.–264 с.
5. Практикум по общей вирусологии / Под ред. И.Г.Атабекова.–М.: Издательство Московского университета, 1981.–192 с.
6. Сергеев В.А. Репродукция и выращивание вирусов животных.–М.: Колос, 1976.–304 с.
7. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования/ Под ред. М.О. Биргера.–М.: Медицина, 1973.–456 с.