**1. Опишите процесс закладки банка клеток. Какой криопротектор вы выберете и почему?**

Перед криоконсервацией клетки должны быть охарактеризованы и проверены на загрязнение.

**Методика заморозки суспензионных культур**

1. До начала криоконсервации следует приготовить питательную среду для заморозки и подсчитать жизнеспособность культуры (жизнеспособность культуры, подлежащей криоконсервации, устанавливается отдельно, но она не должна быть ниже 90%). Клетки должны находиться в логарифмической фазе роста.
2. Сперва следует осадить клетки методом центрифугирования при ~200-400g в течение 5 минут. С помощью пипетки следует удалить супернатат до наименьшего объема, при котором не будет нарушен осадок клеток.
3. Далее следует ресуспендировать клетки в среде для заморозки до концентрации 1x107 - 5x107 клеток/мл в случае использования среды, содержащей сыворотку, или 0,5x107-1x107 клеток/мл в случае использования среды без сыворотки.
4. Полученную суспензию следует аликвотировать в криовиаллы, которые затем помещаются на влажный лед или в холодильник при температуре 4°C. После такой “выдержки” в течение 5 минут можно начать процедуру замораживания.
5. Клетки следует замораживать медленно со скоростью 1°C/мин. Этого можно добиться с помощью программируемого холодильника либо поэтапной заморозкой, поместив виалы в изолированную коробку, помещенную в морозильную камеру с температурой от -70°C до -90°C, с последующим перенесением в дюар с жидким азотом.

**Методика заморозки адгезивных культур**

1. Непосредственно перед началом работы необходимо провести морфологическая оценку клеток. Особое внимание следует обратить на конфлюэнтность монослоя, форму клеток, наличие включений и количество отсоединённых клеток. При положительных результатах оценки клетки следует подвергнуть трипсинизации с целью открепления от субстрата. Данную процедуру следует проводить аккуратно, чтобы минимизировать повреждение культуры.
2. После трипсинизации отделенные клетки следует ресуспендировать в полной ростовой среде и определите количество жизнеспособных клеток.
3. Для удаления ростовой среды и концентрирования клеток следует провести центрифугирлвание суспензии при ~200g в течение 5 минут. Далее с помощью пипетки отбирается супернатат так чтобы, не был нарушен осадок клеток.
4. Клетки следует ресуспендировать в среде для замораживания до концентрации 5x106-1x107 клеток/мл.
5. Перед непосредственной заморозкой полученную суспензию следует аликвотировать в виалы для криогенного хранения, затем на мокрый лед или в холодильник с температурой 4°C. Процедуру замораживания следует начать по истечению 5 минут.
6. Клетки следует замораживать медленно, со скоростью 1°C/мин. Этого можно добиться с помощью программируемого холодильника либо поэтапной заморозкой, поместив виалы в изолированную коробку, помещенную в морозильную камеру с температурой от -70°C до -90°C, с последующим перенесением в дюар с жидким азотом.

**Выбор среды для заморозки и криоконсерванта**

Для замораживания клеток обычно используется несколько сред:

Для среды, содержащей сыворотку, компоненты могут быть следующими:

* Полная среда, содержащая 10% глицерина;
* Полная среда, содержащая 10% ДМСО (диметилсульфоксид).
* 50% кондиционирующей среды, 50% среды MEM с 10% глицерина или 10% ДМСО.

Среда для криоконсервации обычно состоит из базовой среды, криоконсерванта и источника белка. Криоконсервант и белок защищают клетки от стресса, вызванного процессом замораживания-оттаивания. Среда без сыворотки обычно или совсем не содержит белка, или содержит его в небольших количествах, но ее все равно можно использовать в качестве основы для криоконсервирующей среды в следующих рецептурах:

Для бессывороточной среды некоторые из распространенных компонентов среды могут быть следующими:

* 50% кондиционирующей бессывороточной среды, 50% бессывороточной среды, содержащей 7,5% ДМСО
* бессывороточная среда, содержащая 7,5% ДМСО и 10% БСА, пригодного для клеточных культур.

Диметилсульфоксид (ДМСО) и глицерин являются двумя распространенными криопротекторами, широко используемыми для поддержания замороженных клеточных линий, которые быстро проникают в клетки и прочно связывают в ней воду.

ДМСО делает клеточную мембрану пористой, что защищает клетку от повреждения при размораживании, в то время как глицерин защищает структуру мембраны и сохраняет природу внутренних белков. ДМСО может вызывать серьезное повреждение клеток из-за токсичности. Глицерин действует за счёт удержания воды внутри клетки, предотвращая тем самым чрезмерное обезвоживание из-за воздействия концентрированных растворов, но его использование может приводить к повреждению клеток осмотическим шоком, особенно после оттаивания.

В данной работе предпочтение будет отдано следующему составу среды для заморозки: полная среда, содержащая 10% глицерина. Предпочтение именно глицерину отдаётся за счёт его низкой токсичности по сравнению с ДМСО и проверкой его действия в качестве криопротектора при длительном хранении культуры (до 1 года, см. источник).

**Источник:** Siddiqui, Md. Saiful & Giasuddin, Md & Chowdhury, SMZH & Islam, Mohammad Rafiqul & Chowdhury, Emdadul Haque. (2015). Comparative effectiveness of Dimethyl Sulphoxide (DMSO) and Glycerol as cryoprotective agent in preserving Vero cells. Bangladesh Veterinarian. 32. 35. 10.3329/bvet.v32i2.30608.

ОФС.1.7.2.0011.15 Требования к клеточным культурам-субстратам производства иммунобиологических лекарственных препаратов.

**2. Имеется 2 флакона формата Т175 (площадь роста 175 см^2) культуры CHO-K1. Необходимо выполнить пересев на 2 Т175 (0,6 млн/флакон) и 10 Т75 (0,8 млн/флакон). Известно, что с имеющихся двух флаконов Т175 снято 26 мл культуральной суспензии с концентрацией клеток 1,4 млн/мл. Рассчитайте объем культуральной суспензии, который вам потребуется для выполнения данного пересева: а) Х мл/флакон Т75, б) Х мл/флакон Т175,**

|  |  |
| --- | --- |
| **Дано:** | **Решение:** |
| 2xT175;  VT175 = 26 мл;  CT175 = 1,4 млн/мл. | 1. Первым шагом следует определить необходимое количество клеток:   1.1 Для засева 2xT175  1.2 Для засева 10xT75   1. Вторым шагом следует определить аликвоту исходной суспензии клеток для засева необходимого числа флаконов:   2.1 Для засева 2xT175  2.2 Для засева 10xT75  2.3 В сумме необходим объём исходной суспензии:   1. Сравним необходимый объём с объемом суспензии, полученной с 2xT175:   Следовательно, суспензии клеток СНО-К1, полученной с 2xT175 хватит для засева необходимого числа флаконов.   1. Расчёт объема суспензии для засева флаконов:   4.1 Флакона T175:  Следовательно, необходимо 0,4285 мл исходной клеточной суспензии на флакон T175.  4.2 Флакона T75:  Следовательно, необходимо 0,6571 мл исходной клеточной суспензии на флакон T75.  **Проверка:** Пересчет возможно произвести, исходя из посевной концентрации и исходной концентрации клеточной суспензии по формуле:  Для T175:  Для T75: |
| **Посевные конц-ии:**  T175 - сT175 = 0,6 млн/флакон;  T75 - сT75 = 0,8 млн/флакон. |
| **Необходимо:**  2xT175;  10xT75. |
| **Рассчитайте объем культуральной суспензии** для  а) Х мл/флакон Т75,  б) Х мл/флакон Т175. | а) 0,5714 мл/флакон Т75,  б) 0,4285 мл/флакон Т175. |

**4. Требуется запланировать ведение клеточной культуры MRC-5 для своевременной подготовки и передачи флаконов на проведение тестов вирусологического контроля, сохранив постоянную ведущуюся культуру (ПВК) в клеточной лаборатории. Имеется 5х Т175 флаконов MRC-5, готовых к пересеву. Определите, хватит ли клеточной суспензии для засева 8x Т75 за 1 день, 10x Т75 за 2 дня до проведения тестов вирусологического контроля и 4x Т175 (1,5 млн/флакон) для ведения ПВК. Дайте ответ "Да/Нет" и представьте расчет.**

**Известно, что:**

* **объём культуральной суспензии, снимаемой с Т175 = 12 мл**
* **концентрация клеток MRC-5 в культуральной суспензии = 0,7 млн/мл**
* **для подготовки флаконов Т75 за 1 день до проведения вирусных тестов проводится инокуляция 2,2 млн/флакон**
* **для подготовки флаконов Т75 за 2 дня до проведения вирусных тестов проводится инокуляция 1,3 млн/флакон**

|  |  |
| --- | --- |
| **Дано:** | **Решение:** |
| 5хТ175;  СT175 = 0,7 млн/мл;  VT175 = 12 мл. | Необходимое количество клеток возможно рассчитать по формуле:  Общее количество клеток (сток):   1. Определим необходимое количество клеток: 2. Определим количество клеток в исходной супензии: 3. Сравним два полученных значения:   Следовательно, клеточной суспензии хватит. |
| **Подготовка:**  За 1 день для T75 необх.:  2,2 млн/флакон;  За 2 дня для Т75 необх.:  1,3 млн/флакон;  Для ведения ПВК на Т175 необх.:  1,5 млн/флакон. |
| **Необходимо:**  8xТ75 за 1 день,  10xТ75 за 2 дня,  4xТ175 для ведения. | Да, хватит. |

1. **Молекула РНК длинной в 239 нуклеотидов имеет концентрацию 121 нг/мкл. Какое число копий РНК содержится в 1 мкл при средней молекулярной массе одного рибонуклеотида равной 340,5 а.е.м.?**

|  |  |
| --- | --- |
| **Дано:** | **Решение:** |
| Молекула РНК длинной в 239 нуклеотидов;  сРНК = 121 нг/мкл;  Mрибонуклетотида = 340,5 а.е.м. | 1. Найдем массу молекул РНК, содержащихся в нужном объеме: 2. Найдем массу (в а.е.м.) полимера РНК указанной длины и переведём её в единицы СИ:   Согласно СИ, 1 а. е. м. = 1.66053906660⋅10−27 кг = 1.66053906660⋅10-15 нг. Тогда,   1. Зная общую массу всех полимеров РНК и массу одного, найдем их число: |
| Какое число копий РНК содержится в 1 мкл? | N = 8.95∙1011 мол. |

**6. При разработке ПЦР методики неспецифичные фрагменты были обнаружены на 30 цикле qPCR. В результате оптимизации методики неспецифичные фрагменты детектировались на 40 цикле qPCR. Во сколько раз уменьшилось количество неспецифически амплифицируемых фрагментов?**

|  |  |
| --- | --- |
| **Дано:** | **Решение:** |
| n1 = 30 цикл;  n2 = 40 цикл. | Количество амплифицируемых фрагментов на n-ом цикле рассчитывается по следующей формуле:  А – количество ампликонов;  М – начальное количество ДНК-мишеней;  Е – эффективность реакции.  Для условий данной задачи М и Е остаются постоянными для двух постановок, т.е. условия реакции, качество реакционной смеси и нуклеотидная последовательность ампликона остаются одинаковыми. Примем Е за 100 %, т.е. 1. Тогда то, во сколько раз уменьшилось количество неспецифически амплифицируемых компонентов возможно рассчитать по соотношению:  **Проверка:** Данное соотношение взято из соображений о том, что при 100 % эффективности (Е = 1) количество ампликонов будет увеличиваться в два раза за цикл согласно принципу ПЦР: |
| Во сколько раз уменьшилось количество неспецифически амплифицируемых фрагментов? | В 1024 раз. |

**7. Вам необходимо приготовить раствор с составом: компонент A (450 мл) + компонент B (5 мл) + компонент C (5 мл) + компонент D (10 мл) + 10% компонента F. Какое количество мл компонента F необходимо добавить?**

|  |  |
| --- | --- |
| **Дано:** | **Решение:** |
| Компонент A - 450 мл;  Компонент B - 5 мл;  Компонент C - 5 мл;  Компонент D - 10 мл;  Компонента F - 10%. | 1. Найдем суммарный объем известных компонентов: 2. Рассчитаем общий объем раствора:   Суммарный объем известных компонентов составляет (100 % - 10%) от общего объёма раствора, тогда   1. Вычитанием найдем объём компонента F: |
| Какое количество мл компонента F необходимо добавить? |  |