

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 супернатант до наименьшего объема, при котором не будет нарушен осадок клеток.
3. Далее следует ресуспендировать клетки в среде для заморозки до концентрации 1×10^7 - 5×10^7 клеток/мл в случае использования среды, содержащей сыворотку, или $0,5 \times 10^7$ - 1×10^7 клеток/мл в случае использования среды без сыворотки.
4. Полученную суспензию следует аликвотировать в криовials, 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 вials в изолированную коробку, помещенную в морозильную камеру с температурой от -70°C до -90°C, с последующим перенесением в дьюар с жидким азотом.

Методика заморозки адгезивных культур

1. Непосредственно перед началом работы необходимо провести морфологическую оценку клеток. Особое внимание следует обратить на конfluэнтность 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 определить количество жизнеспособных клеток.
3. Для удаления ростовой среды и концентрирования клеток следует провести центрифугирование суспензии при ~200g в течение 5 минут. Далее с помощью пипетки отбирается супернатант так чтобы, не был нарушен осадок клеток.
4. Клетки следует ресуспендировать в среде для замораживания до концентрации 5×10^6 - 1×10^7 клеток/мл.
5. Перед непосредственной заморозкой полученную суспензию следует аликвотировать в вials 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 дьюар 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 T175 (площадь роста 175 см²) культуры СНО-K1. Необходимо выполнить пересев на 2 T175 (0,6 млн/флакон) и 10 T75 (0,8 млн/флакон). Известно, что с имеющихся двух флаконов T175 снято 26 мл культуральной суспензии с концентрацией клеток 1,4 млн/мл. Рассчитайте объем культуральной суспензии, который вам потребуется для выполнения данного посева: а) X мл/флакон T75, б) X мл/флакон T175,

Дано:	Решение:
2xT175; $V_{T175} = 26$ мл; $C_{T175} = 1,4$ млн/мл.	1. Первым шагом следует определить необходимое количество клеток: 1.1 Для засева 2xT175 $N_{T175} = n \cdot c_{T175} = 2 \cdot 0,6 \frac{\text{млн}}{\text{флакон}} = 1,2 \cdot 10^6 \text{ (клеток)}$
Посевные конц-ии: T175 - $c_{T175} = 0,6$ млн/флакон; T75 - $c_{T75} = 0,8$ млн/флакон.	1.2 Для засева 10xT75 $N_{T75} = n \cdot c_{T75} = 10 \cdot 0,8 \frac{\text{млн}}{\text{флакон}} = 8 \cdot 10^6 \text{ (клеток)}$
Необходимо: 2xT175; 10xT75.	2. Вторым шагом следует определить аликвоту исходной суспензии клеток для засева необходимого числа флаконов: 2.1 Для засева 2xT175 $V_{T175} = \frac{N_{T175}}{C_{T175}} = \frac{1,2 \cdot 10^6 \text{ (клеток)}}{1,4 \frac{\text{млн}}{\text{мл}}} = 0,857 \text{ мл} = 857 \text{ (мкл)}$ 2.2 Для засева 10xT75 $V_{T75} = \frac{N_{T75}}{C_{T75}} = \frac{8 \cdot 10^6 \text{ (клеток)}}{1,4 \frac{\text{млн}}{\text{мл}}} = 5,714 \text{ (мл)}$ 2.3 В сумме необходим объем исходной суспензии: $\sum V = V_{T175} + V_{T75} = 857 \text{ (мкл)} + 5,714 \text{ (мл)} = 6,571 \text{ (мл)}$ 3. Сравним необходимый объем с объемом суспензии, полученной с 2xT175: $6,571 \text{ (мл)} < 26 \text{ (мл)} \Rightarrow \sum V < V_{T175}$ Следовательно, суспензии клеток СНО-K1, полученной с 2xT175 хватит для засева необходимого числа флаконов. 4. Расчёт объема суспензии для засева флаконов: 4.1 Флакона T175:

	$v_{T175} = \frac{V_{T175}}{n} = \frac{0.857 \text{ (мл)}}{2} = 0.4285 \text{ (мл)}$ <p>Следовательно, необходимо 0,4285 мл исходной клеточной суспензии на флакон T175.</p> <p>4.2 Флакона T75:</p> $v_{T75} = \frac{V_{T75}}{n} = \frac{5.714 \text{ (мл)}}{10} = 0.5714 \text{ (мл)}$ <p>Следовательно, необходимо 0,6571 мл исходной клеточной суспензии на флакон T75.</p> <p>Проверка: Пересчет возможно произвести, исходя из посевной концентрации и исходной концентрации клеточной суспензии по формуле:</p> $V_{al} = \frac{c_{\text{пос}}}{c_{\text{сус}}}$ <p>Для T175:</p> $V_{al} = \frac{c_{T175}}{C_{T175}} = \frac{0.6 \frac{\text{млн}}{\text{флакон}}}{1.4 \frac{\text{млн}}{\text{мл}}} = \frac{3}{7} \text{ (мл)} = 0.42857 \text{ (мл)}$ <p>Для T75:</p> $V_{al} = \frac{c_{T75}}{C_{T175}} = \frac{0.8 \frac{\text{млн}}{\text{флакон}}}{1.4 \frac{\text{млн}}{\text{мл}}} = \frac{4}{7} \text{ (мл)} = 0.57143 \text{ (мл)}$
<p>Рассчитайте объем культуральной суспензии для</p> <p>а) X мл/флакон T75,</p> <p>б) X мл/флакон T175.</p>	<p>а) 0,5714 мл/флакон T75,</p> <p>б) 0,4285 мл/флакон T175.</p>

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 T175 флаконов MRC-5, готовых к пересеву. Определите, хватит ли клеточной суспензии для засева 8х T75 за 1 день, 10х T75 за 2 дня до проведения тестов вирусологического контроля и 4х T175 (1,5 млн/флакон) для ведения ПВК. Дайте ответ "Да/Нет" и представьте расчет.

Известно, что:

- объём культуральной суспензии, снимаемой с T175 = 12 мл
- концентрация клеток MRC-5 в культуральной суспензии = 0,7 млн/мл
- для подготовки флаконов T75 за 1 день до проведения вирусных тестов проводится инокуляция 2,2 млн/флакон
- для подготовки флаконов T75 за 2 дня до проведения вирусных тестов проводится инокуляция 1,3 млн/флакон

Дано:	Решение:
<p>5xT175; $C_{T175} = 0,7$ млн/мл; $V_{T175} = 12$ мл.</p>	<p>Необходимое количество клеток возможно рассчитать по формуле:</p> $N_{\text{флакон}} = n \cdot c_{\text{пос}}$ <p>Общее количество клеток (сток):</p> $N_{\text{исх.сusp.}} = n \cdot C_{T175} \cdot V_{T175}$ <p>1. Определим необходимое количество клеток:</p> $N_1 = N_{8xT75} + N_{10xT75} + N_{4xT175}$ $= (n_1 \cdot c_{T75\text{за1день}}) + (n_2 \cdot c_{T75\text{за2дня}}) + (n_3 \cdot c_{T175})$ $= 8 \cdot 2,2 \frac{\text{млн}}{\text{флакон}} + 10 \cdot 1,3 \frac{\text{млн}}{\text{флакон}} + 4 \cdot 1,5 \frac{\text{млн}}{\text{флакон}}$ $= 1,76 \cdot 10^7 (\text{клеток}) + 1,3 \cdot 10^7 (\text{клеток}) + 0,6 \cdot 10^7 (\text{клеток}) = 3,66 \cdot 10^7 (\text{клеток})$ <p>2. Определим количество клеток в исходной суспензии:</p> $N_2 = 5 \cdot 0,7 \frac{\text{млн}}{\text{мл}} \cdot 12 \text{ мл} = 4,2 \cdot 10^7 (\text{клеток})$ <p>3. Сравним два полученных значения:</p> $3,66 \cdot 10^7 (\text{клеток}) < 4,2 \cdot 10^7 (\text{клеток}) \Rightarrow N_1 < N_2$ <p>Следовательно, клеточной суспензии хватит.</p>
<p>Необходимо: 8xT75 за 1 день, 10xT75 за 2 дня, 4xT175 для ведения.</p>	<p>Да, хватит.</p>

4. Молекула РНК длиной 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:
<p>Молекула РНК длиной в 239 нуклеотидов; $c_{\text{РНК}} = 121$ нг/мкл; $M_{\text{рибонуклетотида}} = 340,5$ а.е.м.</p>	<p>1. Найдем массу молекул РНК, содержащихся в нужном объеме:</p> $m_{\text{total}} = c_{\text{РНК}} \cdot V = 121 \frac{\text{нг}}{\text{мкл}} \cdot 1 \text{ мкл} = 121 (\text{нг})$ <p>2. Найдем массу (в а.е.м.) полимера РНК указанной длины и переведем её в единицы СИ:</p> $m_{\text{polymer}} = n_{\text{nucleotides}} \cdot M = 239 \cdot 340,5 \text{ а.е.м.}$ $= 81379,5 (\text{а.е.м.})$ <p>Согласно СИ, $1 \text{ а.е.м.} = 1,66053906660 \cdot 10^{-27} \text{ кг} = 1,66053906660 \cdot 10^{-15} \text{ нг}$. Тогда,</p> $m_{\text{polymer}} = 81379,5 \text{ а.е.м.} \cdot 1,66053906660 \cdot 10^{-15}$ $= 1,35133839 \cdot 10^{-10} (\text{нг})$ <p>3. Зная общую массу всех полимеров РНК и массу одного, найдем их число:</p> $n = \frac{m_{\text{total}}}{m_{\text{polymer}}} = \frac{121 (\text{нг})}{1,35133839 \cdot 10^{-10} (\text{нг})} = 8,95 \cdot 10^{11}$
<p>Какое число копий РНК содержится в 1 мкл?</p>	<p>$N = 8,95 \cdot 10^{11}$ мол.</p>

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:
$n_1 = 30$ цикл; $n_2 = 40$ цикл.	<p>Количество амплифицируемых фрагментов на n-ом цикле рассчитывается по следующей формуле:</p> $A = M \cdot (1 + E)^n, \text{ где}$ <p>A – количество ампликонов; M – начальное количество ДНК-мишеней; E – эффективность реакции.</p> <p>Для условий данной задачи M и E остаются постоянными для двух постановок, т.е. условия реакции, качество реакционной смеси и нуклеотидная последовательность ампликона остаются одинаковыми. Примем E за 100 %, т.е. 1. Тогда то, во сколько раз уменьшилось количество неспецифически амплифицируемых компонентов возможно рассчитать по соотношению:</p> $\frac{A_2}{A_1} = \frac{M \cdot 2^{n_2}}{M \cdot 2^{n_1}} = \frac{2^{n_2}}{2^{n_1}} = \frac{2^{40}}{2^{30}} = 1024$ <p>Проверка: Данное соотношение взято из соображений о том, что при 100 % эффективности ($E = 1$) количество ампликонов будет увеличиваться в два раза за цикл согласно принципу ПЦР:</p> $\frac{2^{n+1}}{2^n} = 2^{(n+1)-n} = 2$
Во сколько раз уменьшилось количество неспецифически амплифицируемых фрагментов?	В 1024 раз.

7. Вам необходимо приготовить раствор с составом: компонент А (450 мл) + компонент В (5 мл) + компонент С (5 мл) + компонент D (10 мл) + 10% компонента F. Какое количество мл компонента F необходимо добавить?

Дано:	Решение:
Компонент А - 450 мл; Компонент В - 5 мл; Компонент С - 5 мл; Компонент D - 10 мл; Компонента F - 10%.	<ol style="list-style-type: none"> Найдем суммарный объем известных компонентов: $\sum V = V_A + V_B + V_C + V_D = 450 \text{ мл} + 5 \text{ мл} + 5 \text{ мл} + 10 \text{ мл} = 470 \text{ (мл)}$ Рассчитаем общий объем раствора: Суммарный объем известных компонентов составляет (100 % - 10%) от общего объема раствора, тогда $V_{total} = \frac{\sum V}{0.9} = 522.2222 \text{ (мл)}$ Вычитанием найдем объем компонента F:

	$V_F = V_{total} - \sum V = 522.2222 \text{ мл} - 470 \text{ мл} = 52.2222 \text{ (мл)}$
Какое количество мл компонента F необходимо добавить?	$V_F = 52.2 \text{ (мл)}$