

**Вопрос 1.** В питательные среды для культивирования клеточных линий млекопитающих добавляется цветовой индикатор pH среды – феноловый красный. Нормальный pH среды варьирует в диапазоне от 7,0 до 7,4.

Предположим, при ежедневном просмотре флаконов с клеточной культурой обнаружили, что цвет среды во флаконах сменился на жёлтый, о чем это говорит?

Ответ: Изменение pH среды в сильноокислую сторону отрицательно сказывается на состоянии клеток в культуре, и поэтому необходимо вовремя предпринимать меры для восстановления физиологических значений pH среды, например, заменить старую питательную среду на новую.

Закисленное состояние питательной среды может быть вызвано как физиологическими процессами, обводнение питательными веществами и выделение метаболитов, так и контаминацией. В последнем случае происходит резкое «закисление» питательной среды, что можно заметить уже через 2-3 суток после посева. Заражение проявляется в виде ореола бактериальной инфекции (помутнение и опалесценция) или грибной (визуально видны тонкие нити на поверхности монослоя). Так же стоит обратить внимание на морфологию клеточной культуры и характеристики монослоя (неспецифическая деградация монослоя и гибель клеток). Проверку на контаминацию проводят с помощью специальных тестов.

**Вопрос 2.** При приготовлении растворов обычно на первом этапе все компоненты смешиваются в необходимых пропорциях в мерном стакане и тщательно перемешиваются на магнитной мешалке с помощью магнитных элементов. Завершающим этапом приготовления является стерилизующая фильтрация в ламинарном боксе. Предположим, возникла ситуация: когда переливали раствор из стакана в емкость с фильтром, магнитный элемент упал на сам фильтр, но при этом визуальных повреждений не было обнаружено.

Можно ли достать магнитный элемент аккуратно пинцетом и продолжить фильтрацию? Ответ обоснуйте.

Ответ: Оператору придется переделывать стерилизующую фильтрацию по ряду причин:

1. Магнитная мешалка упала на фильтр, что в любом случае приводит к его встряхиванию.
2. При работе с пинцетом можно повредить фильтр и внести контаминацию, так как пинцет может быть нестерильным.
3. Визуальный анализ субъективен: повреждения могут быть незаметными;
4. Магнитную мешалку может быть затруднительно убрать.

**Вопрос 3.** Перед вами стоит задача приготовить полную ростовую среду для клеточной культуры Vero.

Ее состав выглядит следующим образом: ИМЕМ + глутамин + пируват натрия + аминокислоты + сыворотка.

Объемы реактивов для приготовления однократного раствора, за исключением сыворотки, стандартные и известны:

ИМЕМ – 450 мл;

Глутамин – 10 мл;

Пируват натрия – 5 мл;

Аминокислоты – 10 мл;

Какое количество сыворотки необходимо добавить в двукратный раствор до конечного содержания 10%?

**Ответ:**

<u>Дано:</u>	<u>Решение:</u>
$V_{\text{ИМЕМ}} = 450 \text{ мл};$ $V_{\text{Глутамин}} = 10 \text{ мл};$ $V_{\text{Пируват натрия}} = 5 \text{ мл};$ $V_{\text{Аминокислоты}} = 10 \text{ мл};$ Сыворотка	Рассчитаем суммарный объём компонентов: $\sum V_i = V_{\text{ИМЕМ}} + V_{\text{Глутамин}} + V_{\text{Пируват натрия}} + V_{\text{Аминокислоты}}$ $= 450 \text{ (мл)} + 10 \text{ (мл)} + 5 \text{ (мл)} + 10 \text{ (мл)}$ $= 475 \text{ (мл)}$
Приготовить: Полную ростовую среду для клеточной культуры Vero с 10% сод-ем сыворотки.	Конечное содержание сыворотки в питательной среде – 10 %. Следовательно, суммарный объём компонентов будет занимать 100 % - 10 % = 90 %. Конечный объём Полной Ростовой Среды можно определить следующим образом: $V_{\text{ПРС}} = \frac{\sum V_i}{0,9} = \frac{475 \text{ (мл)}}{0,9} = 527,8 \text{ (мл)}$ Объём сыворотки можно определить вычитанием из конечного объёма компонентный объём: $V_{\text{сыворотки}} = V_{\text{ПРС}} - \sum V_i = 527,8 - 475 = 52,8 \text{ (мл)}$ <u>Проверка:</u> На долю реактивов для приготовления однократного раствора, за исключением сыворотки, приходится 90 %. На сыворотку (конечное содержание) – 10 %. Можно определить каждый из объёмов, зная конечный и долю компонентов: $\sum V_i = V_{\text{ПРС}} \cdot 0,9 = 527,8 \cdot 0,9 = 475,02 \approx 475 \text{ (мл)}$ $V_{\text{сыворотки}} = V_{\text{ПРС}} \cdot 0,1 = 527,8 \cdot 0,1 = 52,78 \approx 52,8 \text{ (мл)}$
<u>Ответ:</u>	Требуемый объём сыворотки - 52,8 (мл)

**Вопрос 4.** Процедура пересева адгезионной клеточной культуры состоит из следующих стандартных этапов:

- 1) удалить кондиционную среду из флакона с клеточной культурой;
- 2) внести раствор для промывки монослоя (например, раствор Хенкса), распределить по всей площади флакона и удалить из флакона;
- 3) внести раствор для деструкции монослоя (например, трипсин), распределить по всей площади флакона и инкубировать в течение определенного времени в зависимости от культуры клеток;
- 4) просмотреть флакон под микроскопом и убедиться в том, что клетки открепилась от поверхности флакона;
- 5) добавить полную питательную среду (например, ИМЕМ + 10% сыворотки) в объеме 2х от объема трипсина, тщательно ресуспендировать клеточную суспензию и отобрать немного суспензии для подсчета в камере Горяева;
- 6) рассчитать посадочную концентрацию и засеять необходимое количество флаконов.

Для чего перед подсчетом в камере Горяева добавляется полная питательная среда? Возможно ли обойтись без этого этапа, если клетки уже открепились, находятся в суспензии и их можно посчитать?

**Ответ:**

- Перед подсчетом в камере Горяева полная питательная среда добавляется по двум причинам:
  1. Для нейтрализации раствора трипсина, так как клетки не должны продолжительное время находиться в ферментном растворе по причине агрессивного действия данного компонента на клетки. Чем больше времени

культура находится под воздействием протеолитического фермента, тем больше клеток будут погибать и разрушаться, что нежелательно.

2. Без ресуспендирования клетки могут образовывать скопления, которые затруднительно считать.
  3. Концентрацию нужно определять в конечном объёме суспензии, так как именно из неё будет отбираться аликвота, в объёме которой содержится нужное количество клеток, соответствующее посадочной концентрации.
- Обойтись без данного этапа невозможно по указанным выше причинам.