

Задание на отбор стажера:

1. Краткий обзор (не более 1 страницы) методов трансфекции клеток: их преимущества и недостатки.

Вид	Методы	Достоинства	Недостатки	Пример
Физические	1) Инъекция и микроинъекция 2) Баллистическая трансфекция 3) Электропорация 4) Фотопорация 5) Сонопорация 6) Магнитофекция	<ul style="list-style-type: none"> • Простые и понятные принципы; • Нет необходимости в использовании носителя (напр., упаковки в капсид вируса, обр-я комплекса с полимером); • Основаны на физическом перемещении нуклеиновых кислот в клетку; • Возможность работать в масштабе одной клетки; • Возможен перенос в конкретные клетки; • Меньшая зависимость от типа клеток и условий. 	<ul style="list-style-type: none"> • Необходимо специализированное оборудование; • Трудоемкость; • Необходима подготовка оператора; • Высокий риск необратимого повреждения клеток и генетического материала. 	Микроигла, «Генная пушка», Атаха Nucleofector, фототрансфекция, магнитофекция
Химические	1) Слияние мембран 2) Липофекция 3) Кальциевая трансфекция 4) Использование катионных полимеров	<ul style="list-style-type: none"> • Невирусный метод доставки; • Высокая эффективность (возможно подобрать оптимальные концентрации реагента); • Относительная простота; • Нет ограничений по размеру трансфицируемого генетического материала; • Большой выбор коммерчески доступных решений; • Эффективны на отдельных клетках и срезах 	<ul style="list-style-type: none"> • Токсичность для некоторых типов клеток; • Разная эффективность трансфекции в зависимости от типа клеток и условий; • Сложно нацелить перенос на конкретные клетки. 	Микровезикулы, экзосомы, ДЭАЭ-декстран, полиэтиленмин, дендример, полибрен, фосфат кальция, DOTAP, DOTMA, DOSPA
Биологические	1) Вирусная трансдукция 2) Агроинфильтрация	<ul style="list-style-type: none"> • Эффективность на одиночных клетках, гистологических срезах и <i>in vivo</i>; • Высокая эффективность; • Простота. 	<ul style="list-style-type: none"> • Потенциальная опасность для исследователя; • Инсерционный мутагенез • Иммуногенность; • Ограничение по размеру ДНК-вставки. 	Аденовирусы, адено-ассоциированные вирусы, лентивирусы, ретровирусы, вирус простого герпеса, вирус Синдбис <i>Agrobacterium tumefaciens</i>

2. Задача: Какой объем (мкл) клеточной суспензии необходим для пересева НЕК293Т?

Условие: адгезионную клеточную линию НЕК293Т необходимо засеять в культуральный флакон площадью 225 см^2 с посевной концентрацией клеток $0,01 \cdot 10^6$ клеток/ см^2 .

Имеется 7 мл клеточной суспензии НЕК293Т с концентрацией клеток $4,3 \cdot 10^6$ клеток/мл.

Дано:	Решение:
<ul style="list-style-type: none"> • Культуральный флакон 225 см^2; • Посевная концентрация $c_{\text{пос}} = 0,01 \cdot 10^6$ клеток/см^2; • Сток суспензии $V_{\text{ст}} = 7$ мл; • Концентрация исходной суспензии $c_{\text{ст}} = 4,3 \cdot 10^6$ клеток/мл. 	<p>Так как культура адгезионная, при расчётах исходить нужно из площади (S) субстрата и посевной концентрации ($c_{\text{пос}}$).</p> <p>1) Находим необходимое число клеток для засева субстрата:</p> $N = S \cdot c_{\text{пос}} = 225 \text{ см}^2 \cdot 0,01 \cdot 10^6 \frac{\text{cells}}{\text{см}^2} = 2,25 \cdot 10^6 \text{ cells}$ <p>2) Рассчитываем аликвоту исходной суспензии, содержащей необходимое количество клеток:</p> $V_{\text{сус}} = \frac{N}{c_{\text{ст}}} = \frac{2,25 \cdot 10^6 \text{ cells}}{4,3 \cdot 10^6 \frac{\text{cells}}{\text{мл}}} = 0,5233 \text{ (мл)} = 523,3 \text{ (}\mu\text{l)}$
Рассчитать: Объем клеточной суспензии для пересева.	<p><u>Проверка:</u> Возможно осуществить пересчёт через фактор разведения (F).</p> <p>1) Рассчитаем общее число клеток в исходной суспензии:</p> $N_{\text{сток}} = V_{\text{ст}} \cdot c_{\text{ст}} = 7 \text{ мл} \cdot 4,3 \cdot 10^6 \frac{\text{cells}}{\text{мл}} = 30,1 \cdot 10^6 \text{ cells}$ <p>2) Рассчитаем необходимое количество клеток:</p> $N_{\text{пересев}} = S \cdot c_{\text{пос}} = 225 \text{ см}^2 \cdot 0,01 \cdot 10^6 \frac{\text{cells}}{\text{см}^2} = 2,25 \cdot 10^6 \text{ cells}$ <p>3) Рассчитаем фактор разведения:</p> $F = \frac{N_{\text{сток}}}{N_{\text{пересев}}} = \frac{30,1 \cdot 10^6 \text{ cells}}{2,25 \cdot 10^6 \text{ cells}} = 13,3778$ <p>4) Рассчитаем объем необходимой суспензии:</p> $V_{\text{сус}} = \frac{V_{\text{ст}}}{F} = \frac{7 \text{ мл}}{13,3778} = 0,5233 \text{ (мл)} = 523,3 \text{ (}\mu\text{l)}$
$V_{\text{сус}} = ?$	<p><u>Общая формула (для однотипных флаконов):</u></p> $V_{\text{сус}} = \frac{S \cdot c_{\text{пос}} \cdot n}{c_{\text{сус}}}, \text{ где}$ <p>S – площадь субстрата; $c_{\text{пос}}$ – посевная концентрация; n – число флаконов; $c_{\text{ст}}$ – концентрация исходной суспензии.</p> <p><u>Общая формула (для разных флаконов):</u></p> $V_{\text{сус}} = \frac{\sum_1^n S_i \cdot c_i}{c_{\text{сус}}}, \text{ где}$ <p>S_i – площадь i-го субстрата; c_i – посевная концентрация i-го субстрата; n – число флаконов.</p>
Ответ:	$V_{\text{сус}} = 523,3 (\mu\text{l})$

3. Необходимо приготовить 500 мл полной ростовой среды для клеточной линии НЕК293Т. Рассчитать объемы компонентов среды:

Реактив	Необходимый объем / концентрация компонента в среде	Исходная концентрация компонентов	Необходимый объем компонентом (мкл)
ДМЕМ без глутамина	90 %	-	$4,5 \cdot 10^5$ мкл = 450 мл
Фетальная бычья сыворотка	10 %	-	$5 \cdot 10^4$ мкл = 50 мл
Глутамин	4 мМ	200мМ	$1 \cdot 10^4$ мкл = 10 мл
Гентамицин	20 мкг/мл	5 мг/мл	2000 мкл = 2 мл