Лабораторна робота № 5

Тема: **Визначення ефективності посіву на чашках Петрі.**

**Мета:** ознайомитися з методикою визначення виживаємості клітин шляхом визначення ефективності посіву на чашках Петрі (методика клонування).

**Обладнання:** лабораторний посуд, гемоцитометр (камера Горяєва), 0,25% трипсин, поживне середовище, дистильована вода, 70% етанол, вата, мікроскоп, трипановий синій, нейтральний червоний.

**Питання для самопідготовки:**

1. Трансформація та імморталізація клітин у культурі

2. Встановлення аутентичності клітин у культурі

3. Методи візуалізації клітин у культурі

4. Крива росту популяції клітин у культурі

5. Сортування кілтин у культурі

6. Диференціювання клітин у культурі

7. Морфологічне дослідження клітин у культурі

8. Хромосомний аналіз клітин у культурі

9. Кількісний аналіз клітин у культурі

10. Дослідження цитотоксичності клітин у культурі

11. Контамінація та шляхи її усунення

12. Культури специфічних клітин

13. Органотипові культури

14. Клонування клітин у культурі

15. Органотипова культура клітин

Хід роботи:

Завдання 1. **Підготовка культури клітин**.

Провести трипсинізацію моношарової культури для отримання суспензії одиничних клітин.

Завдання 2. **Підготування посуду та середовища для посіву.**

1. Пронумеровати чашки Петрі зі сторони дна.
2. Приготувати поживне середовище:
* 50 мл поживного середовища
* Антибіотик із розрахунку 40 мкл/мл
* 5 мл сироватки
1. Розлити у 3 епендорфи по 0,9 мл поживного середовища, 3 епендорфи по 0,5 мл та 1 епендорф – по 0,6 мл

Завдання 3. **Підготовки культури клітин до клонування.**

1. Після інкубації з трипсином додати до культури клітин поживне середовище, що містить сироватку та диспергувати.
2. Підрахувати клітини у гемоцитометрі
3. Зробити наступні розведення клітин:
* 2\*104 – використовувати як основну концентрацію, з якої робити усі наступні розведення;
* 2\*103 кл./мл;
* 200 кл./мл;
* 100 кл./мл;
* 50 кл./мл;
* 20 кл./мл;
* 10 кл./мл.

Розведення провести по схемі:



Завдання 4. **Посів клітин визначеної концентрації**.

1. Посіяти у чашки Петрі з кожної концентрації у 3 мл поживного середовища.
2. Загерметизувати чашку Петрі за допомогою парафіну.
3. Поставити чашки Петрі у термостат при 37 0С на 1-3 тижні.

Завдання 5. **Метод визначення ефективності посіву шляхом клонування у агарі (для суспензыйної культури).**

1. Зробити завд. 2, 3.

2. Приготувати агарову підложку:

- у флакон налити 20 мл дистильованої води та додати 0,4 г агар-агару;

- кип’ятіти до повного розчинення агару;

- проавтокловувати агар-агар, залишити на водній бані;

- відібрати 10 мл 2% агару та змішати з рівним об’ємом поживного середовища (завд.2, п.2);

- розлити у чашки Петрі.

3. Приготувати клітинну суспензію:

- зробити розведення, як у завд. 3, пунк 3.

- з флакону з 2% агаром відібрати 3 мл та додати 7 мл поживного середовища (отримаємо 0,6% агар);

- додати у епендорфи з клітинною суспензією по 1 мл 0,6% агару (отримаємо клітинну суспензію у 0,3 % агарі);

- промаркувати чашки Петрі та розлити з кожного епендорфа у одну чашку.

4. Загерметизувати чашки Петрі.