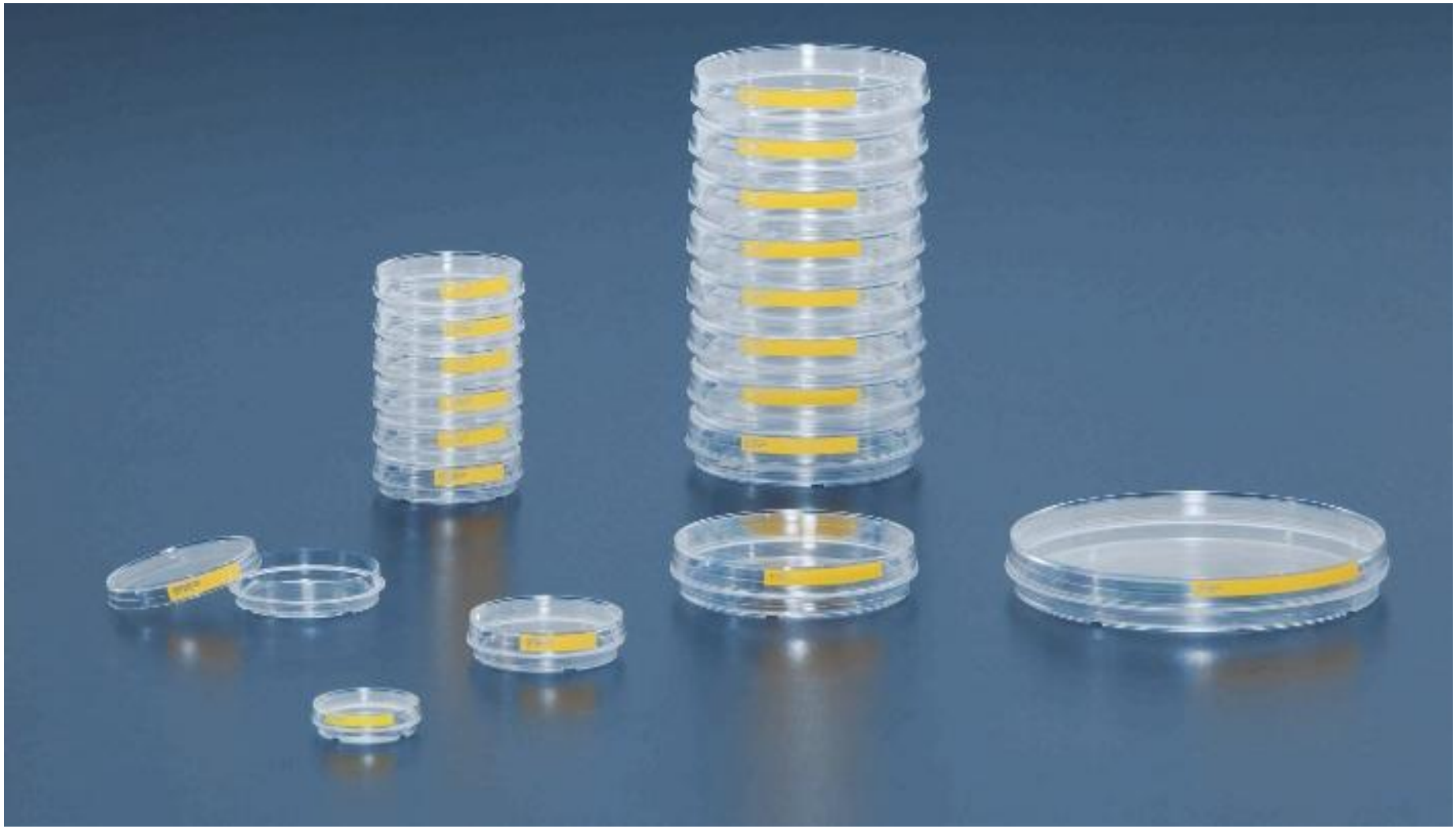
Культура клеток - это выращенные in vitro (вне организма) на специальных средах клетки различных тканей животных и человека, в том числе лейкоциты, сохраняющие присущие им обмен и восприимчивость к определенным вирусам.

ПОСУДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК

ПОСУДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК
чашки Петри

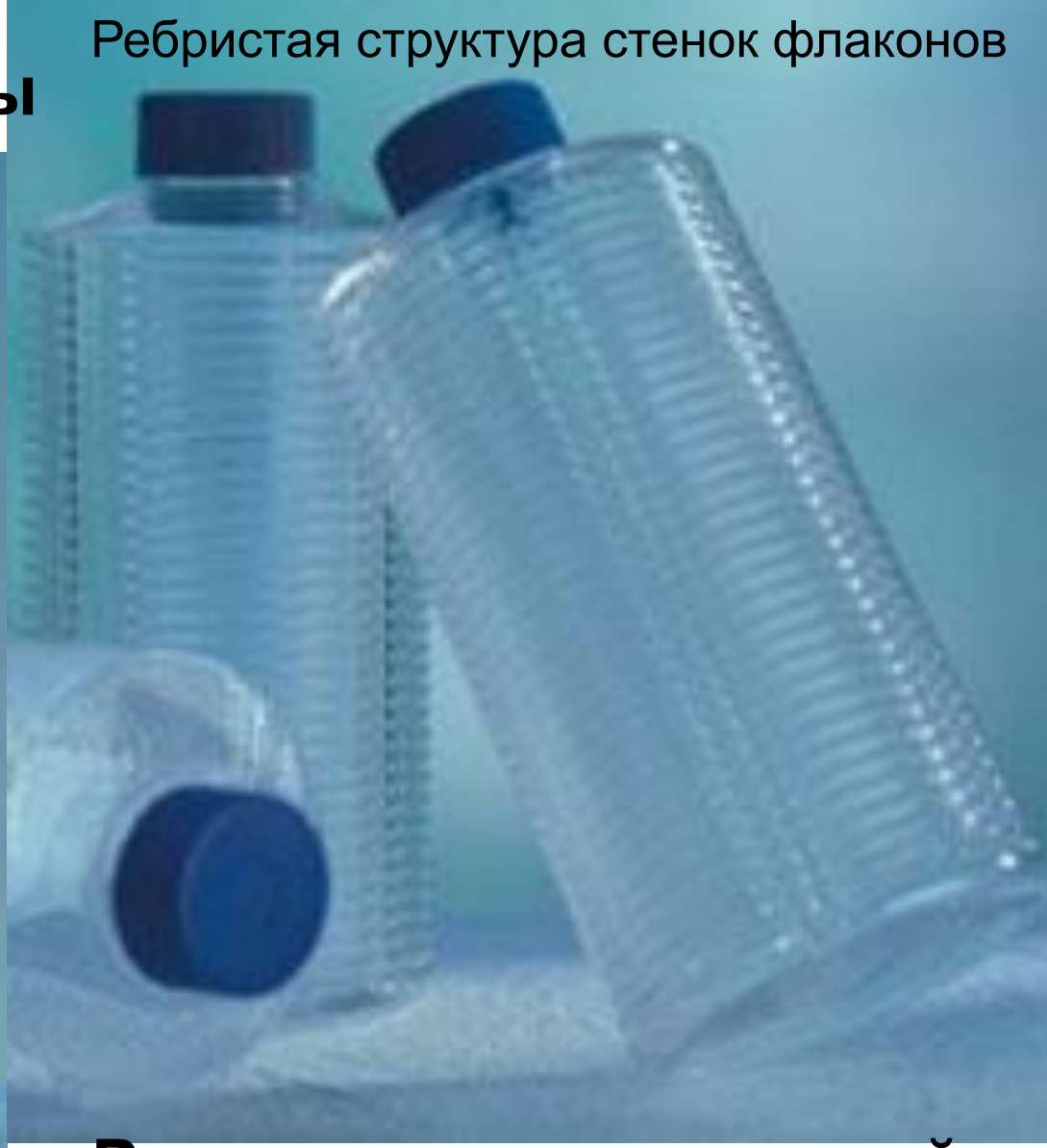


Отделение клеток с рабочей поверхности культуральной посуды механическим способом (www.4science.net).

Примеры скребков для отделения клеток с различной рабочей частью (www.4science.net).

Стандартные роллеры

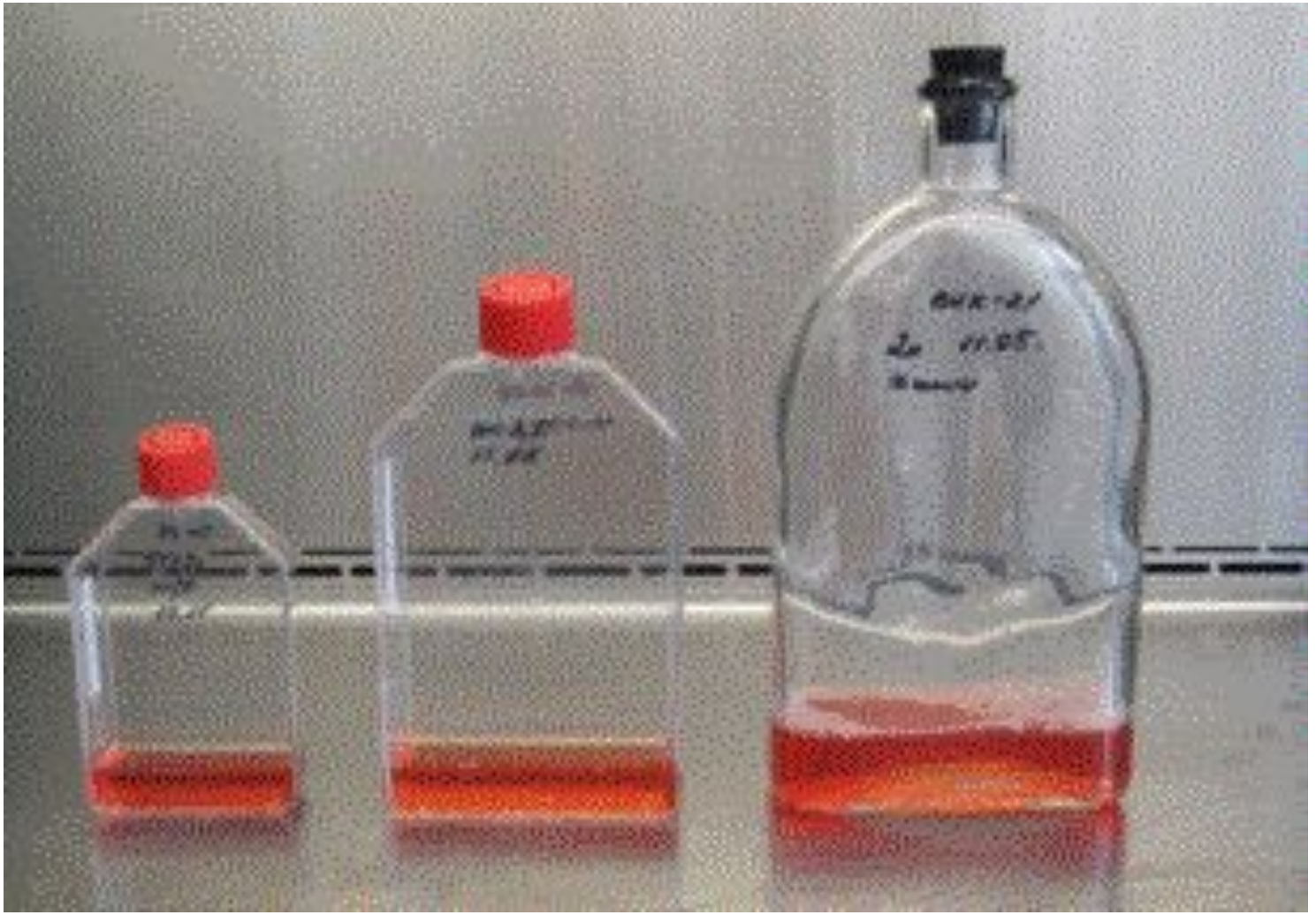
Ребристая структура стенок флаконов



Роллеры с увеличенной поверхностью

Процесс образования монослоя можно пронаблюдать в **инвертированный микроскоп**

Лабораторная посуда для выращивания культур клеток

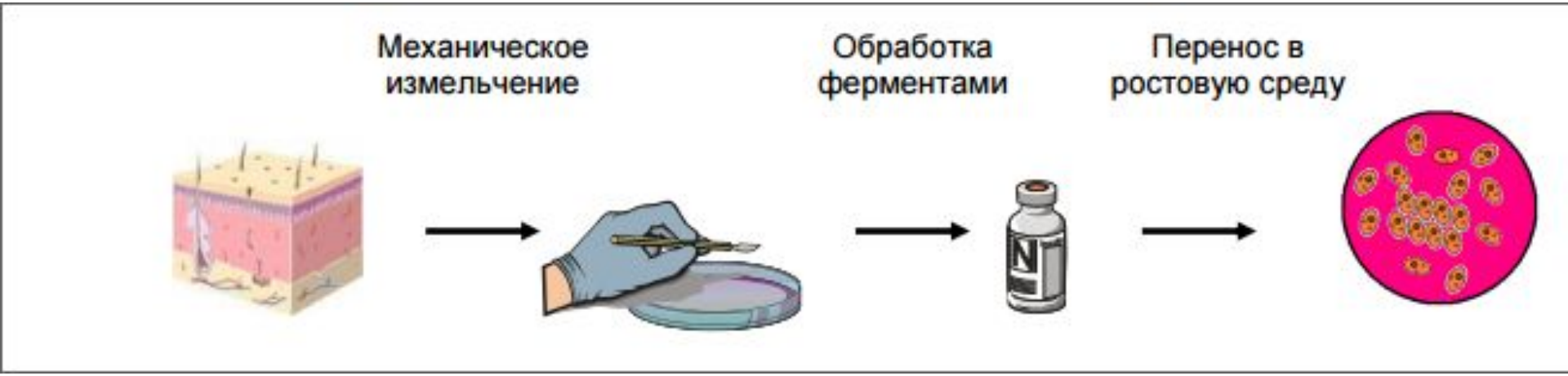


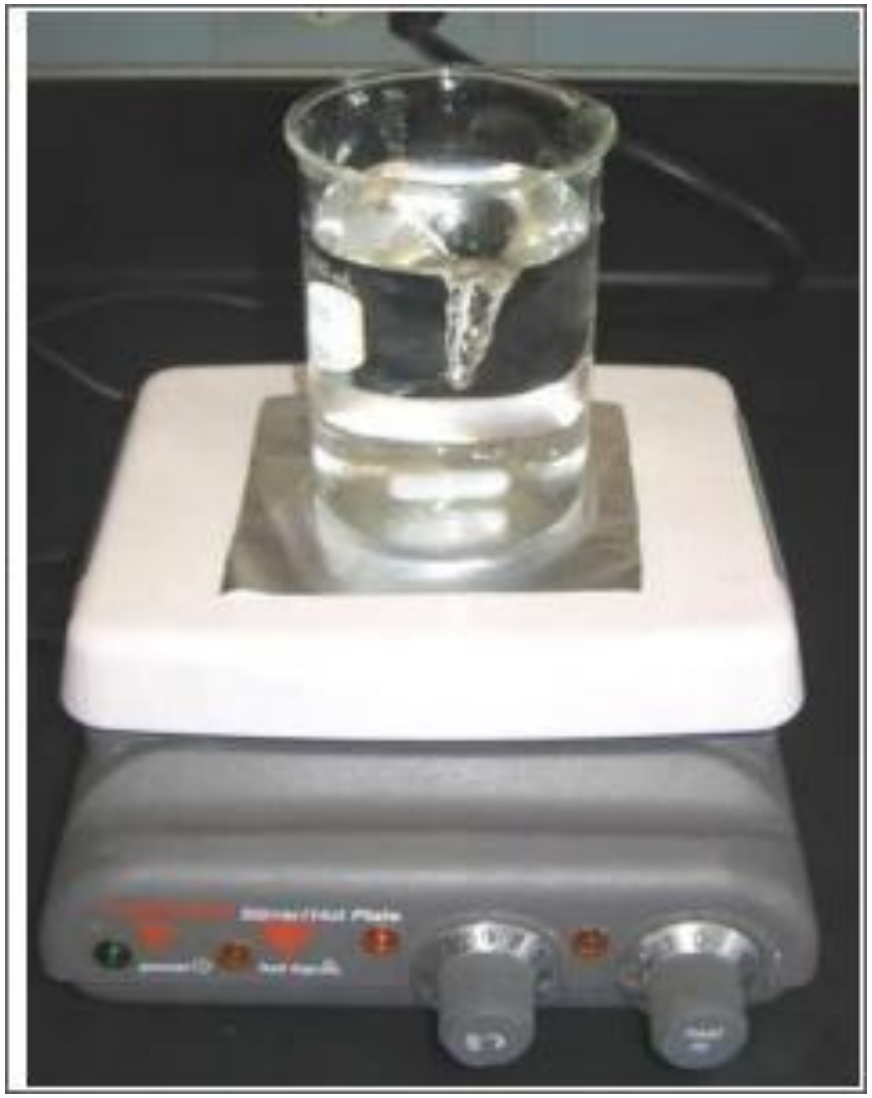
Матрасы с культурой клеток ВНК-21 (почки новорожденного сирийского хомячка) стационарное культивирование

Роллеры с культурой клеток ВНК-21(cl-13), объемом 2, 3, 4 литра

Снятие клеток скребком в культуральном сосуде без предварительной трипсинизации.

Схема получения первичной культуры клеток путем механической и ферментативной дезагрегации



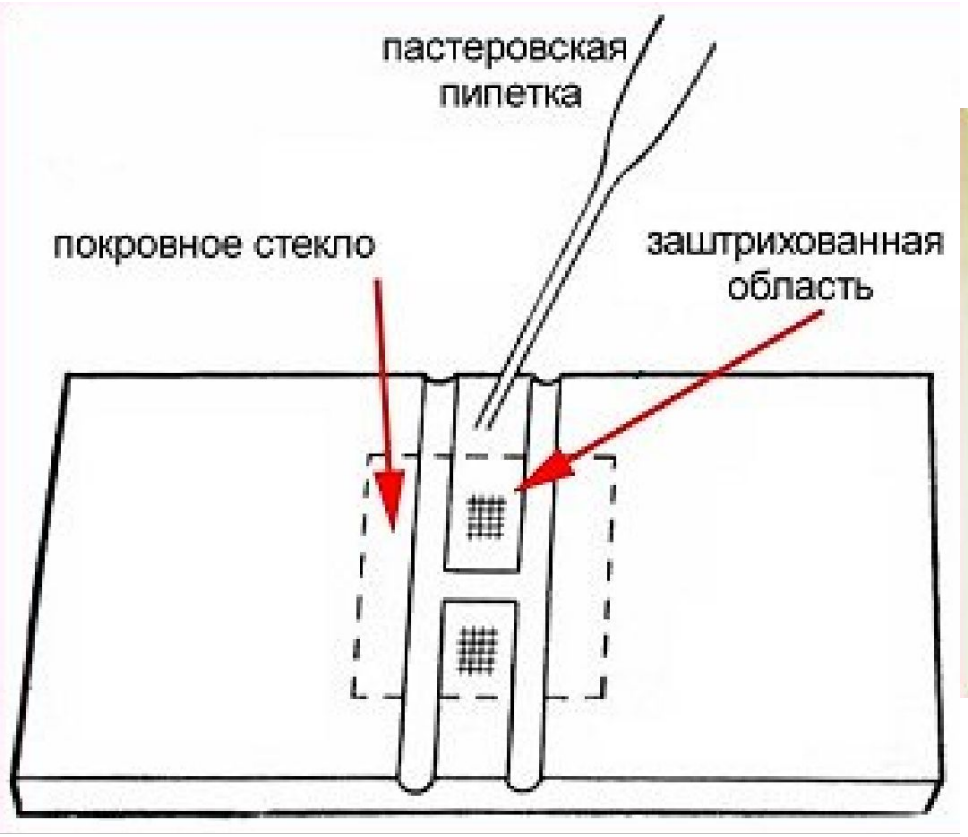


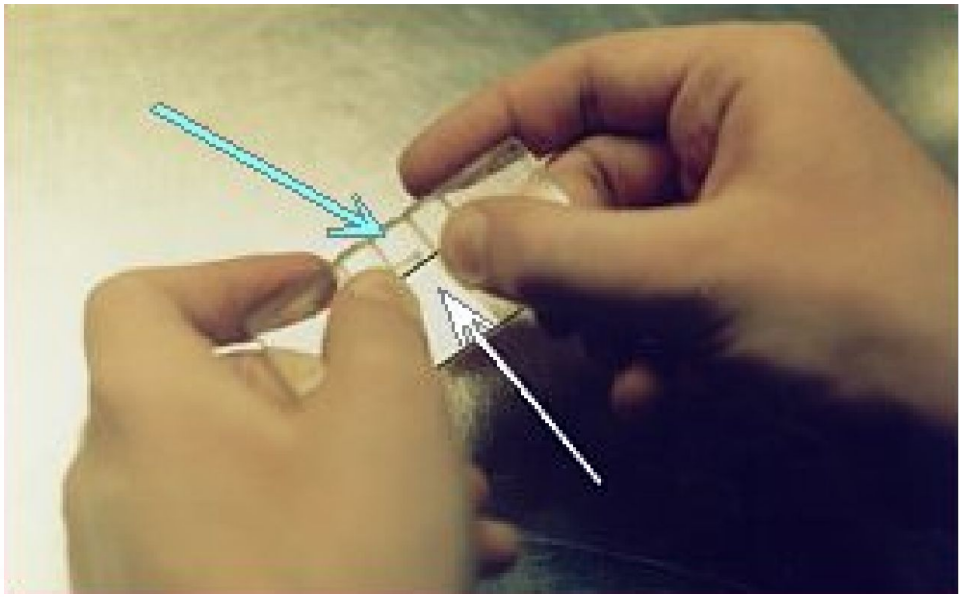
Магнитная мешалка для трипсинизации тканей

Подготовка гемоцитометра.

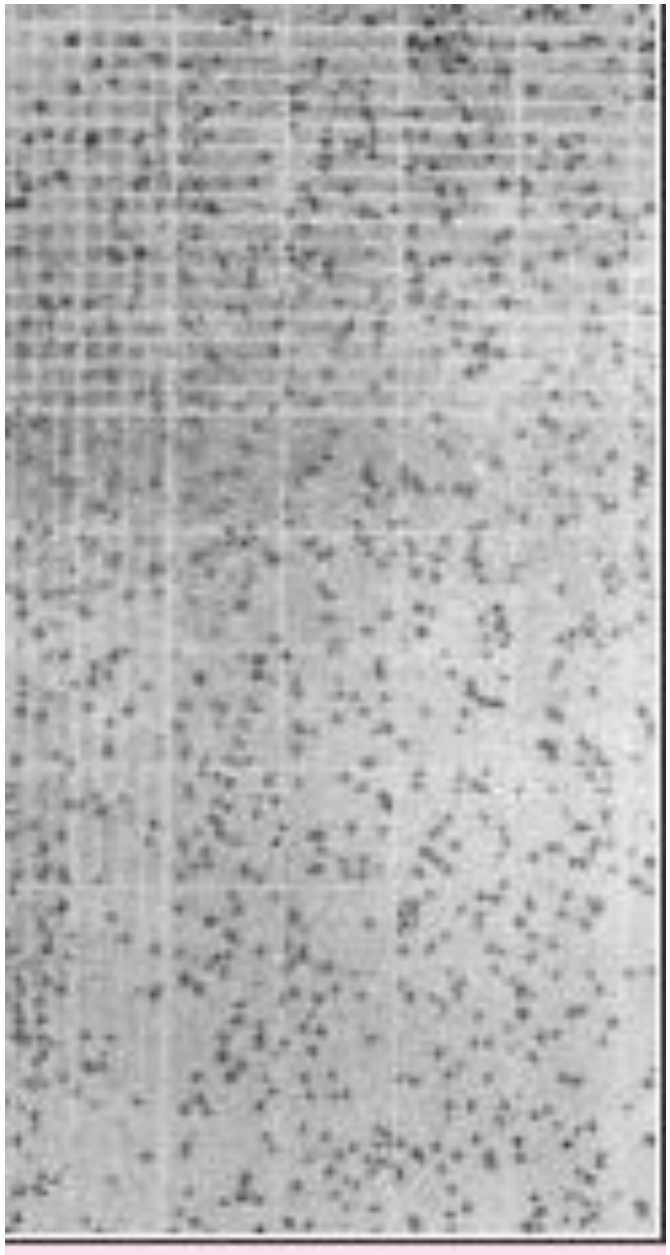
клеточную суспензию добавляют равный объем 0,1%-ного трипанового синего. Этот краситель окрашивает только мертвые клетки. Шлифованное покровное стекло притирают к предметному стеклу гемоцитометра

Подсчет клеток в камере Горяева.



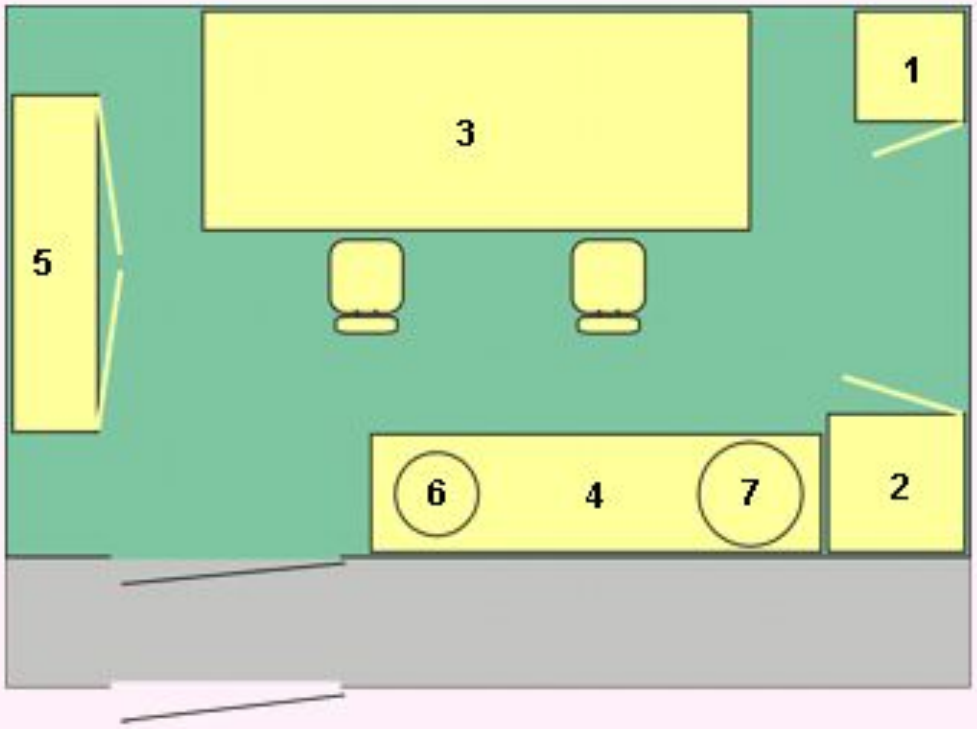


Подсчет живых клеток в гемоцитометре (по R.L.P. Adams)



Подсчитывают количество клеток в четырех больших квадратах в углах каждой из двух заштрихованных бластей. Считают клетки, касающиеся правой и верхней ограничивающих линий, но не клетки, касающиеся левой и нижней ограничивающих линий. Поскольку объем большого квадрата составляет 0,1 мм^3, то, умножив усредненное значение числа клеток в одном квадрате на 10^4, получают количество

ОБОРУДОВАНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНОГО БОКСА

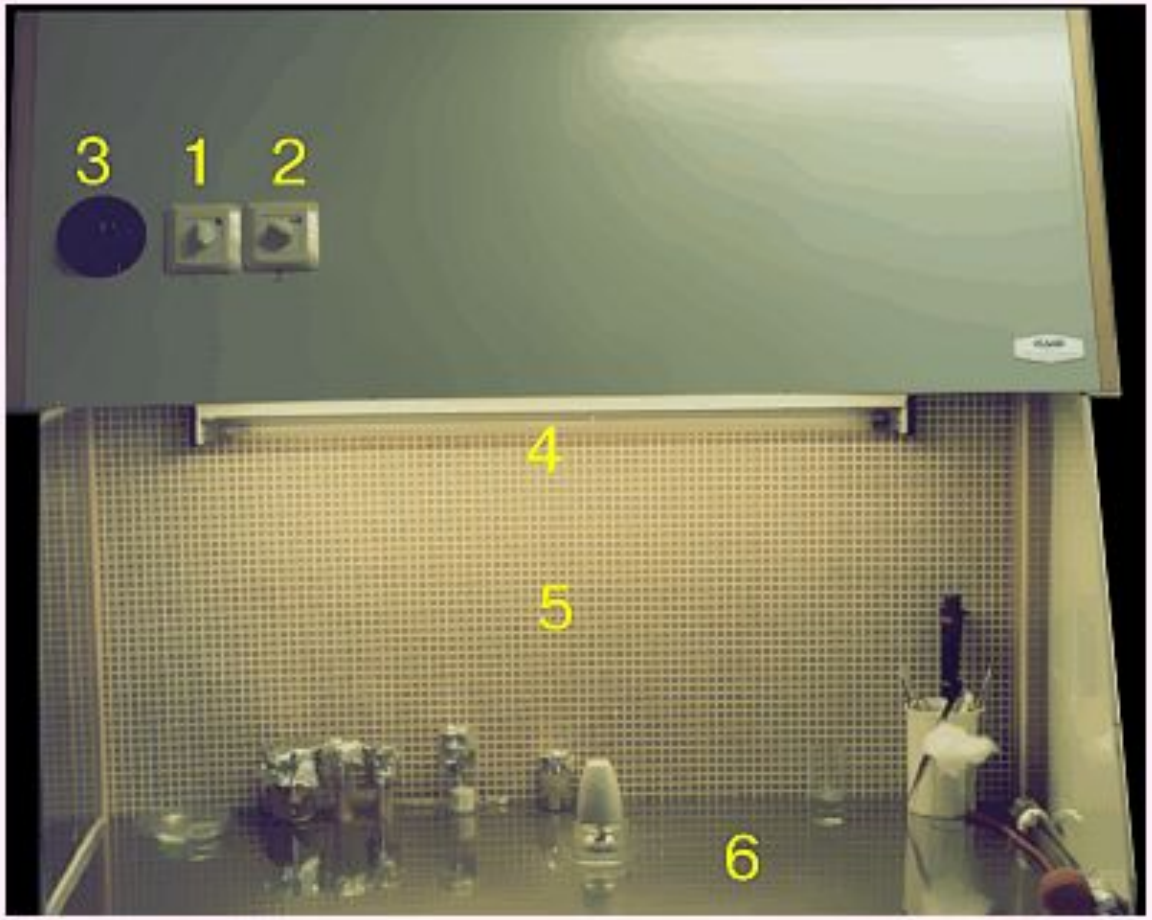


Помещение культурального блока:

предбоксник (серый цвет)
и бокс (зеленый)

1 - CO_2-инкубатор
2 - холодильник
3 - ламинар
4 - стол с микроскопами: световым (6) и инвертированным световым (7)
5 - шкаф с посудой

http://old.kpfu.ru/nilkto/cell/rasdel3/r3_p1.html



1. Включение/ выключение потока воздуха.
2. Включение/ выключение света или ультрафиолета.
3. Регулировка скорости потока стерильного воздуха с задней стенки ламинара.
4. Лампа дневного света и ультрафиолетовая лампа.
5. Задняя стенка с фильтром, через которую осуществляется подача стерильного воздуха (поток стерильного воздуха идет в лицо работающему).
6. Стол ламинара с металлической поверхностью.

Кисти рук должны находиться между горелкой и задней стенкой ламинара.

Посуда,которая применяется при культивировании клеток.

Пластиковые планшеты, Чашки Петри,
Стеклянные флаконы, Плоскодонные бутыли
Сосуды Карреля

Питательные среды готовятся переливанием в один флакон всех составных частей в направлении уменьшения объема (DMEM -> ИГЛА -> среда 199 -> и т. д.).

Все сосуды со знаком "+" залиты рассчитанным количеством среды, приступают к рассеву клеточной суспензии в новые сосуды.

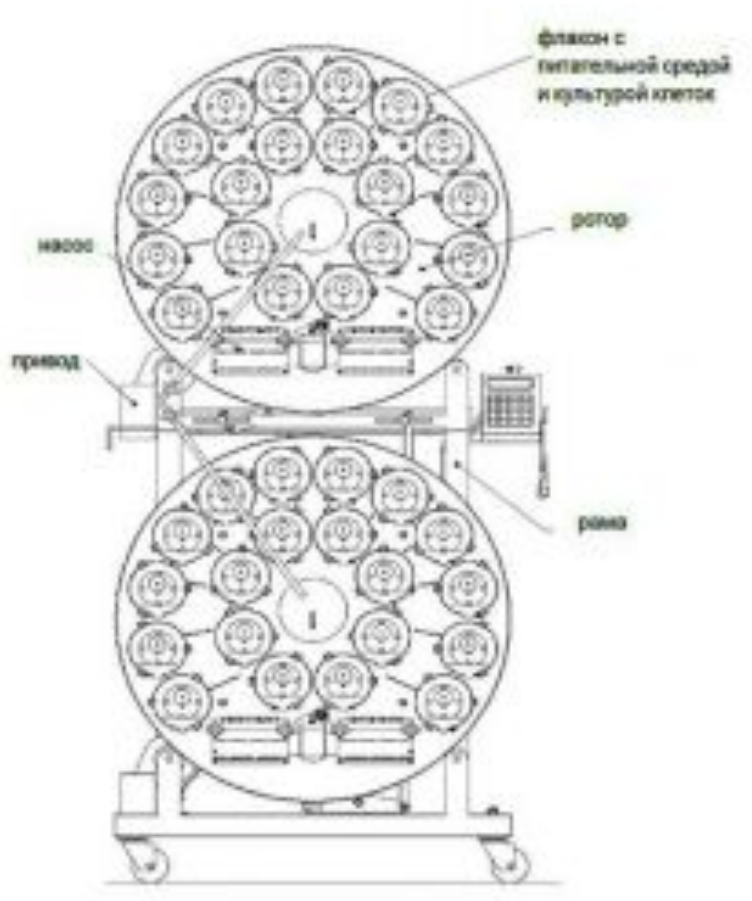
Стеклянная пипетка погружается в сосуд со знаком "+". Клеточная суспензия набирается в пипетку (приблизительно до половины ее высоты) и с силой выпускается обратно в сосуд.

Эта операция проделывается несколько раз для того, тобы дезагрегировать клеточные кластеры и обеспечить в дальнейшем равномерный рассев клеток иприкрепление их к субстрату.

Модульная расширяемая роллерная установка для культивирования клеток CELLROLL

Модульная расширяемая роллерная установка для культивирования клеток CELLROLL

Роллерный биореактор для культивирования клеточных культур: (а) схема, (б) система роллерного культивирования



а

б

Термостат для культивирования культур клеток (www.biophysics.com)

Внутренний объем термостата с инкубируемыми культурами клеток (www.upload.wikimedia.com)

Внутренний объем термостата с инкубируемыми культурами клеток (стационарное культивирование)

Кривая роста клеток в культуре

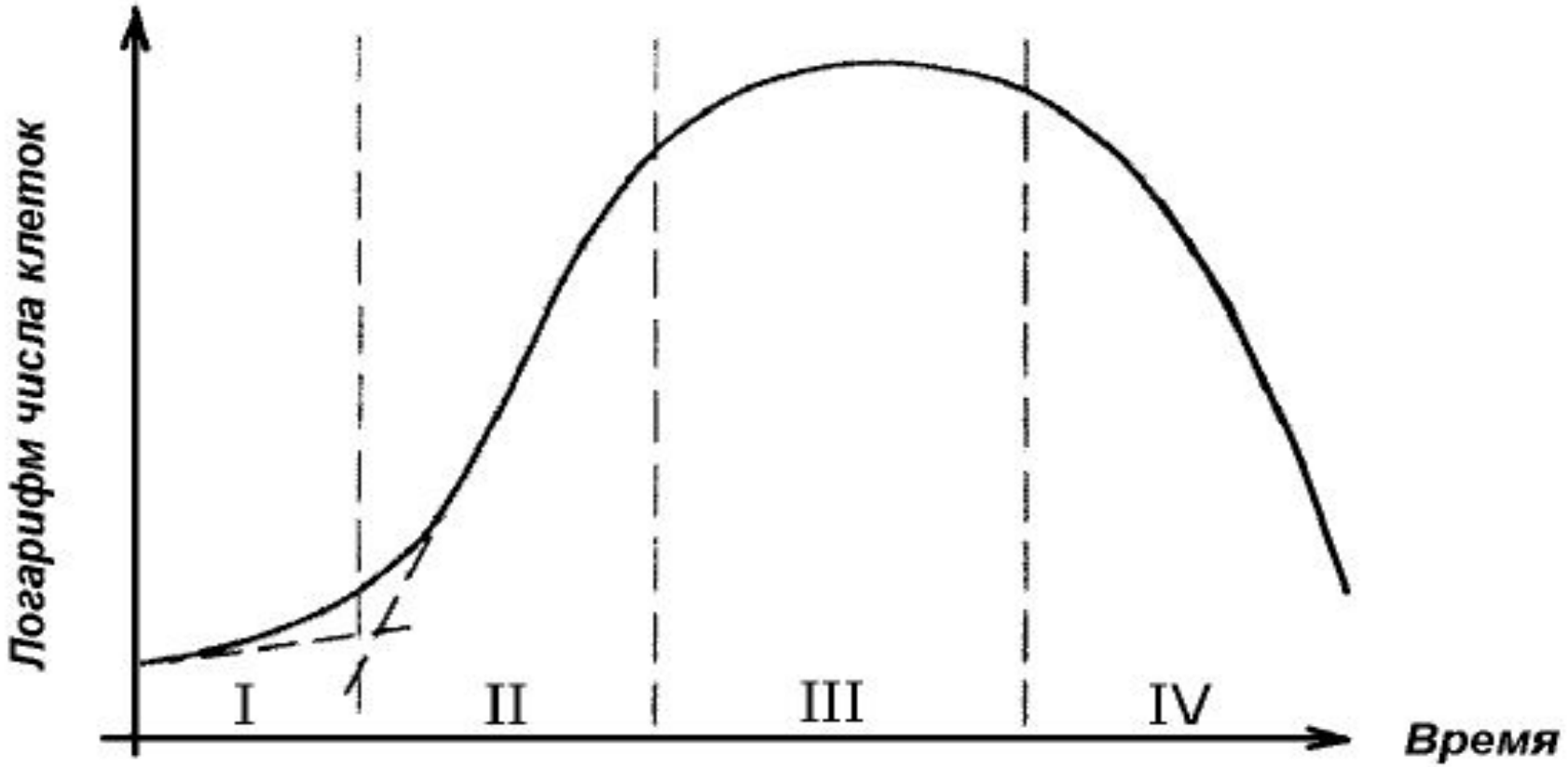
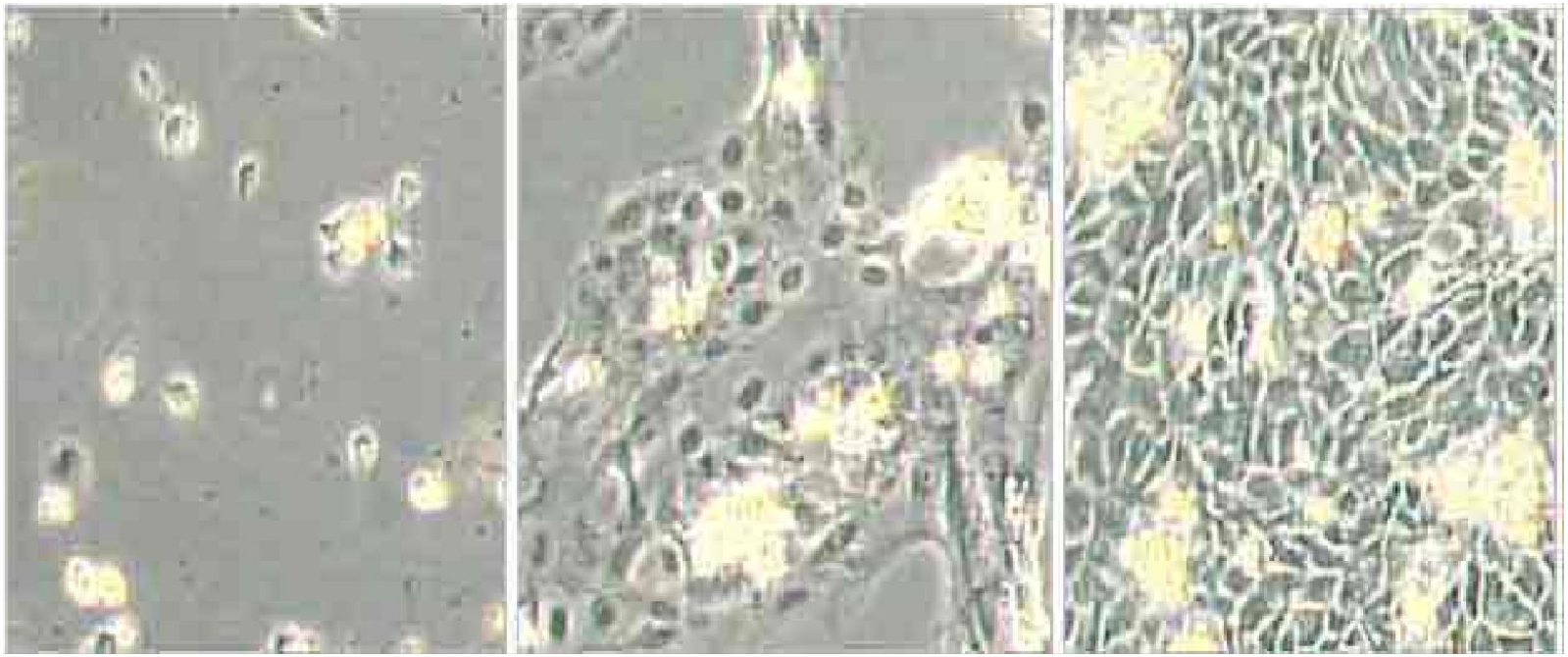


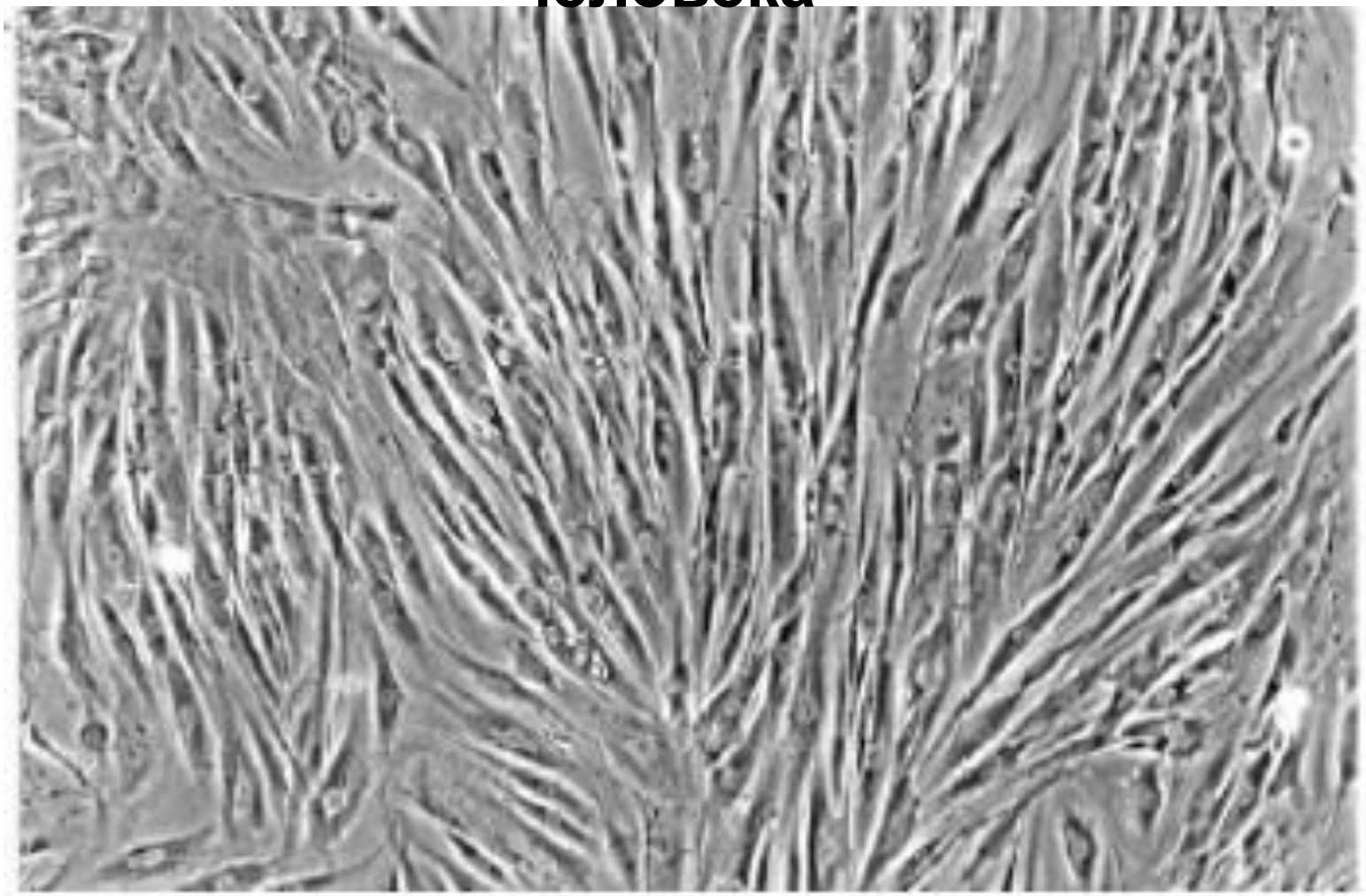
Рис. 8. Фазы роста культуры животных клеток:
I – лаг-фаза; II – фаза логарифмического роста; III – стационарная фаза;
IV – фаза снижения количества клеток и их гибели

Формирование монослоя клеток

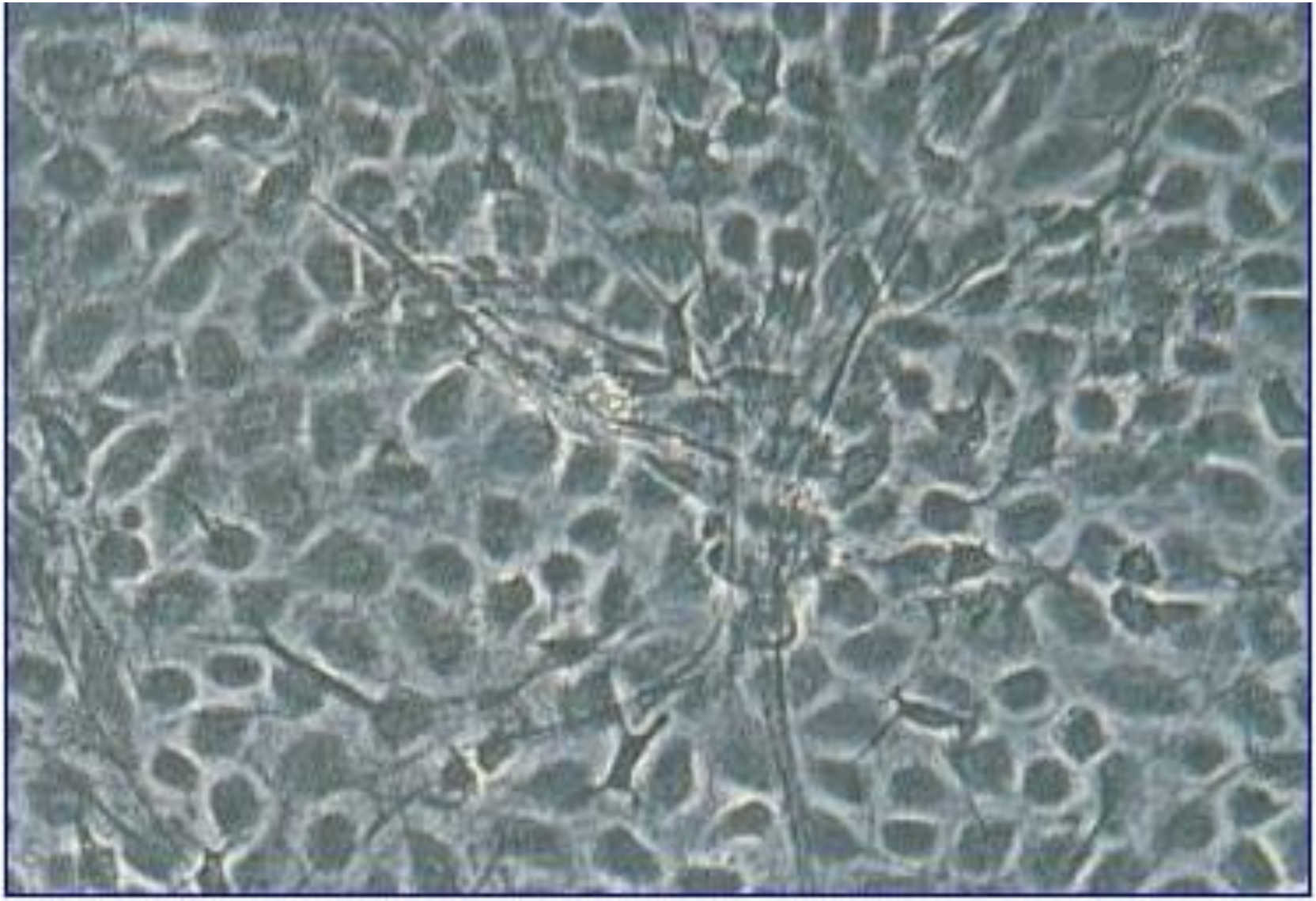
Когда клетки занимают все пространство культурального матраса (это видно невооруженным глазом или при помощи бинокуляра), сливают ростовую среду и используют клетки для заражения или пересева.



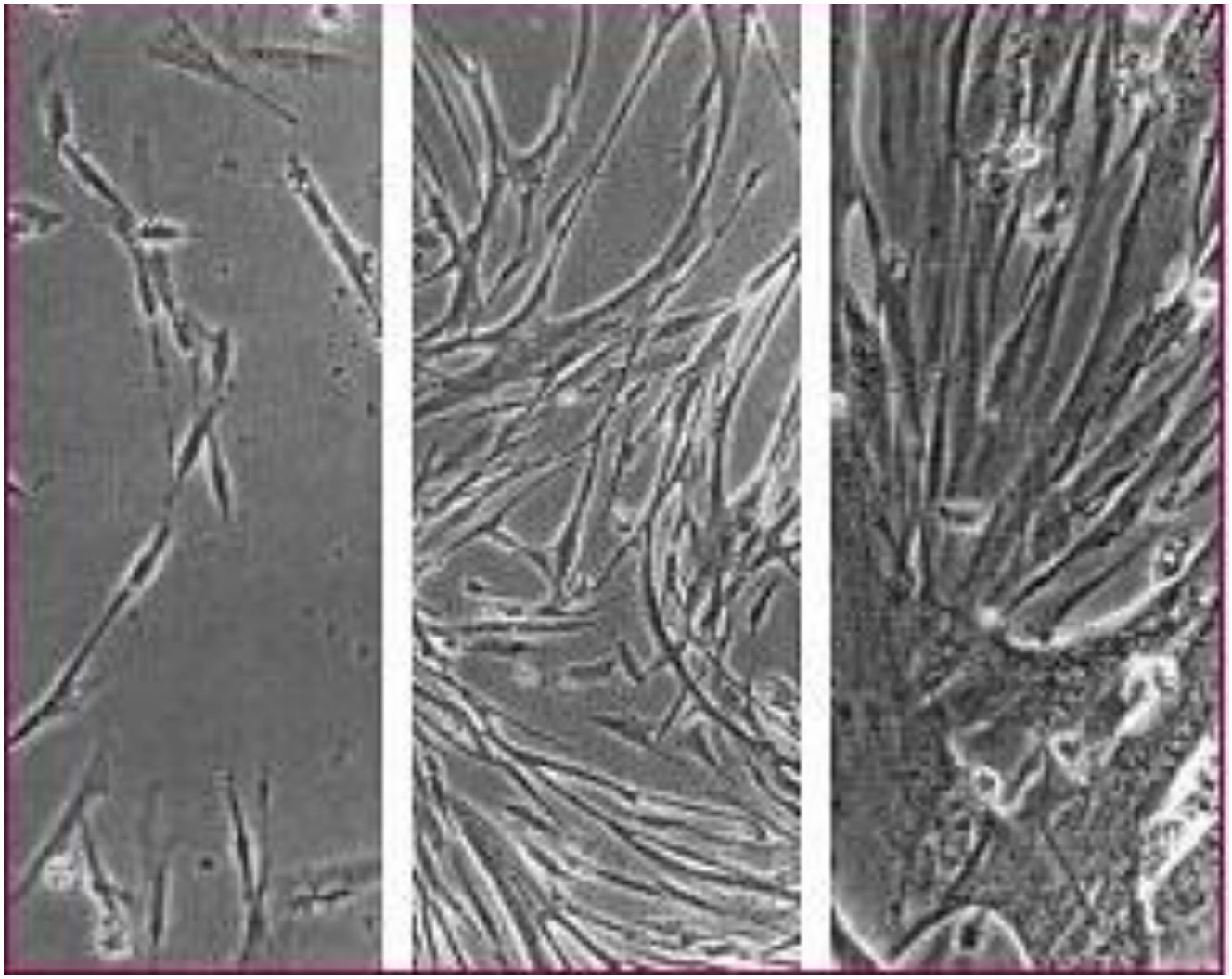
Первичная культура фибробластов человека



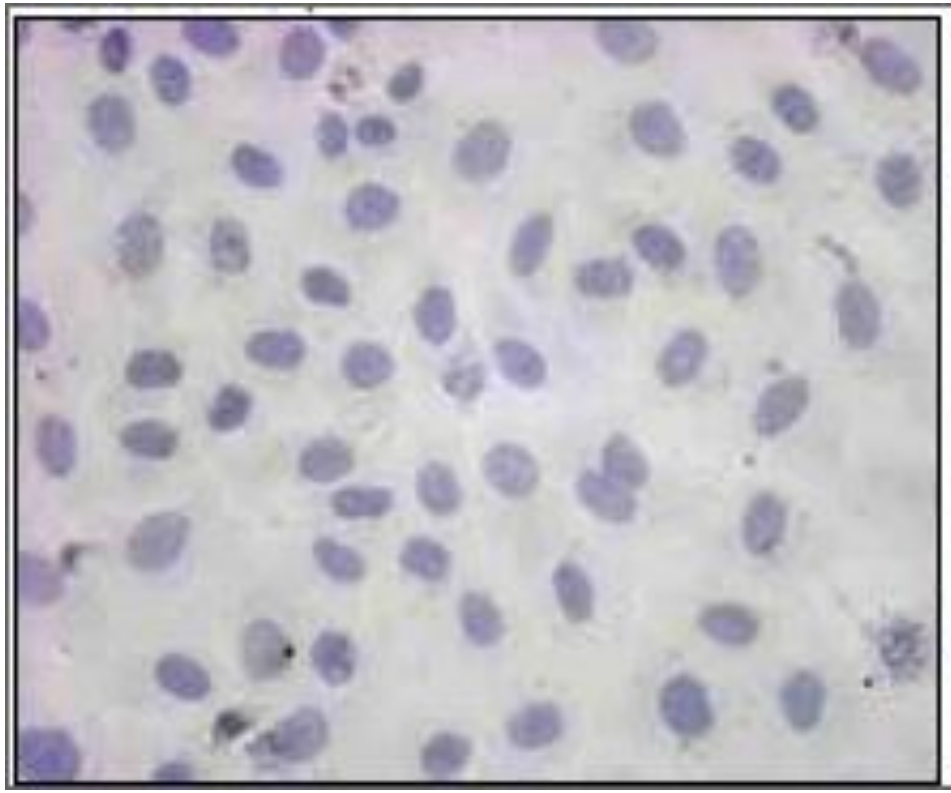
Кардиомиоциты (крыса)



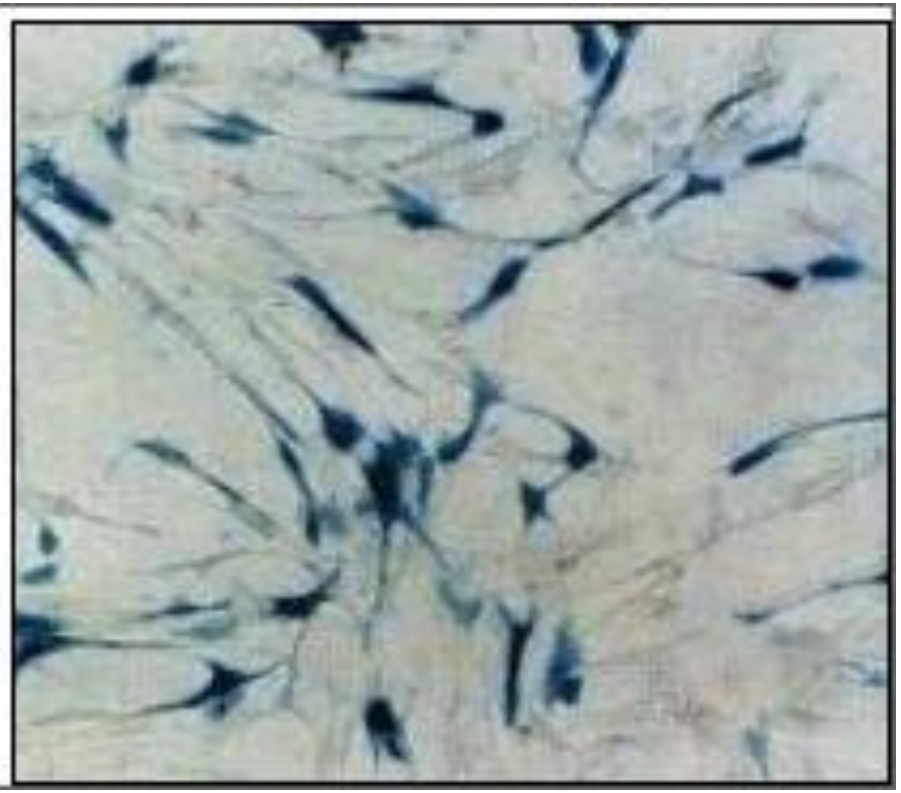
Рост миобластов в культуре



Процесс образования монослоя можно пронаблюдать в инвертированный микроскоп. Клетки, достигшие состояния монослоя, нуждаются в пересеве.



Культура клеток Vero эпителиоподобного типа (www.cdc.gov)



Культура клеток человеческого фибробласта (www.krackeler.com)

Методы выявления и идентификации вирусов в клеточных культурах

Существуют основные методы индикации (обнаружения) вирусов в КК

- по цитопатическому эффекту (ЦПЭ) или цитопатическому действию (ЦПД);
- по выявлению внутриклеточных включений;
- электронной микроскопией;
- с помощью реакции ИФА, ИФ;
- в реакции гемадсорбции;
- по выявлению интерференции вирусов;
- по угнетению метаболизма клеток (цветная проба);
- по образованию бляшек.

В зависимости от свойств вируса и типа заражаемых им клеток взаимодействие вируса с клетками и изменения в них могут быть следующими:

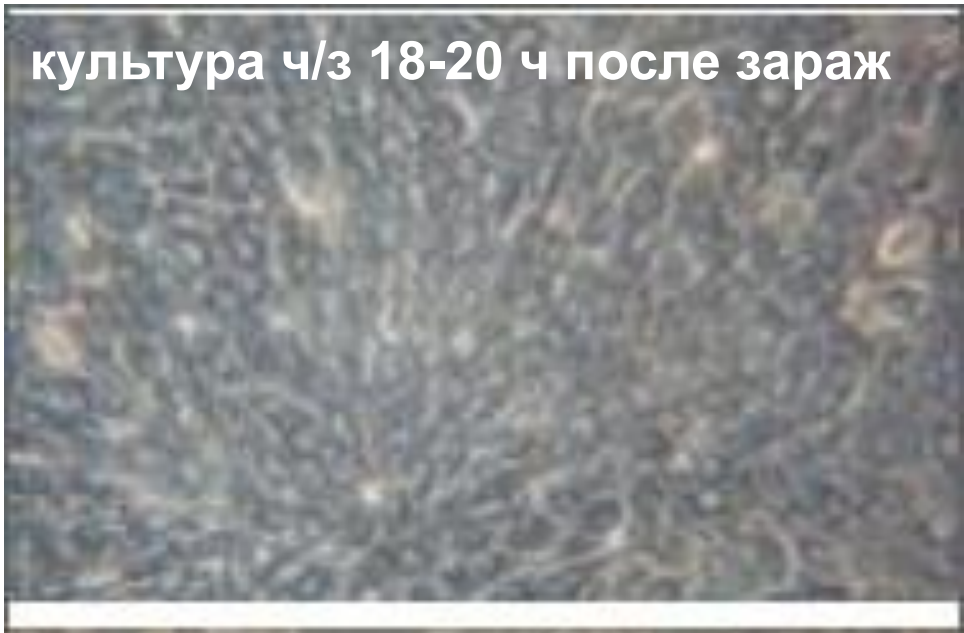
Цитопатический эффект (ЦПЭ) — развитие дегенеративных процессов в клетках.

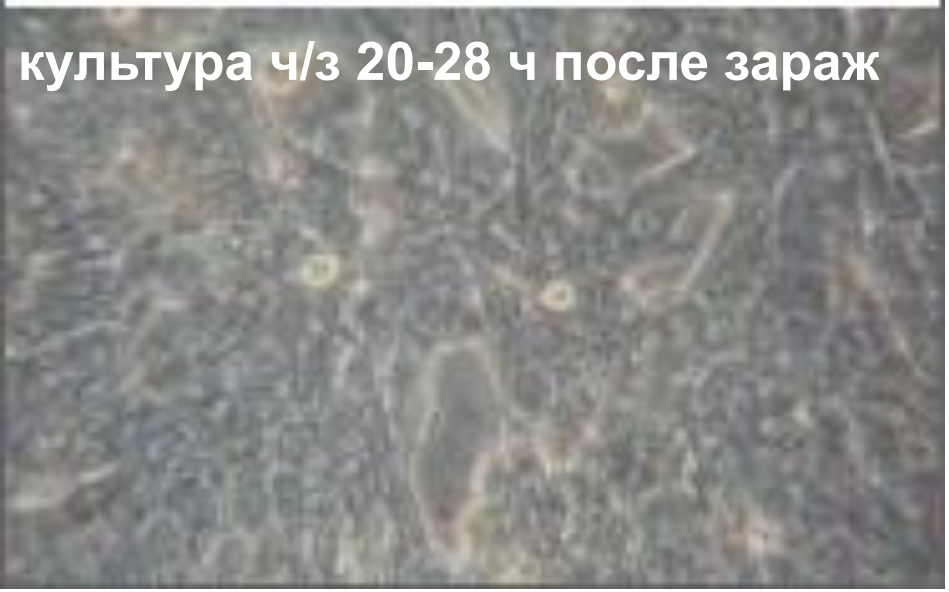
Образование симпластов и синцитиев — гигантских многоядерных клеток в результате слияния цитоплазмы нескольких клеток и митотического деления.

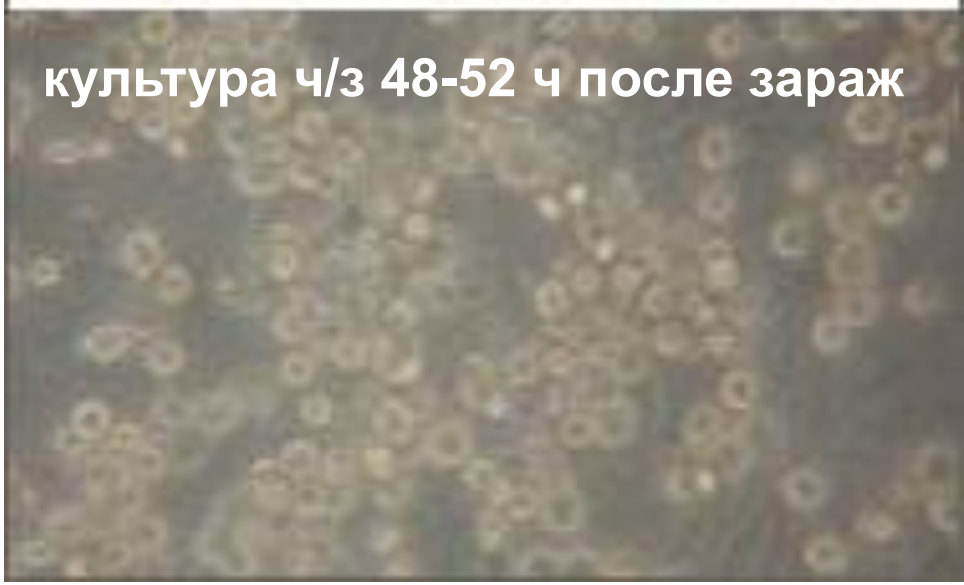
Образование включений — одно из проявлений ЦПЭ.

Увеличение массы вирусов — **образование бляшек** или колоний вирусов (например, у вирусов оспы, кори, полиомиелита и др.)

ЦПД вируса ИРТ КРС штамм «ВНИИЗЖ» в клеточной культуре RBT (×40)



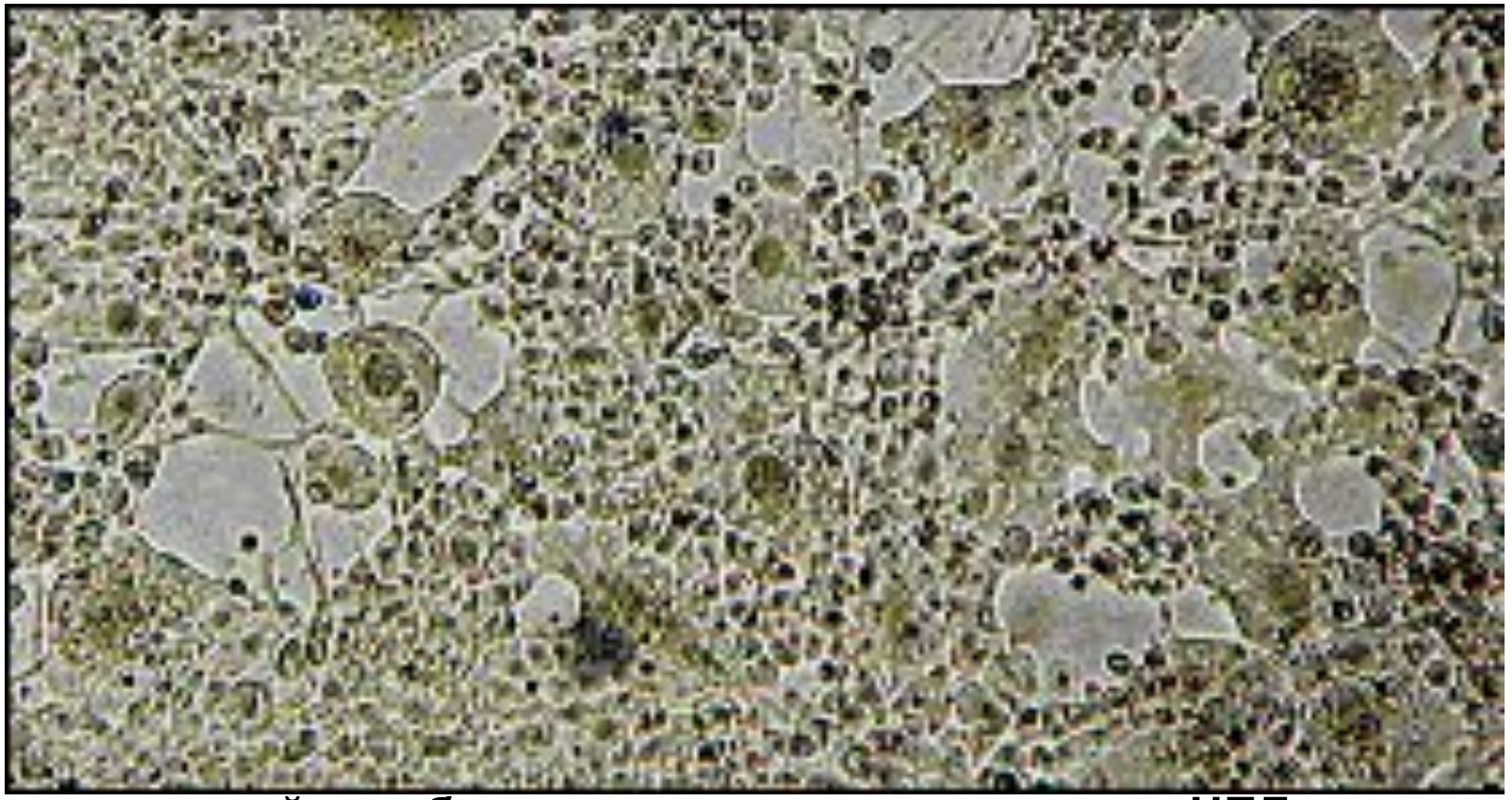




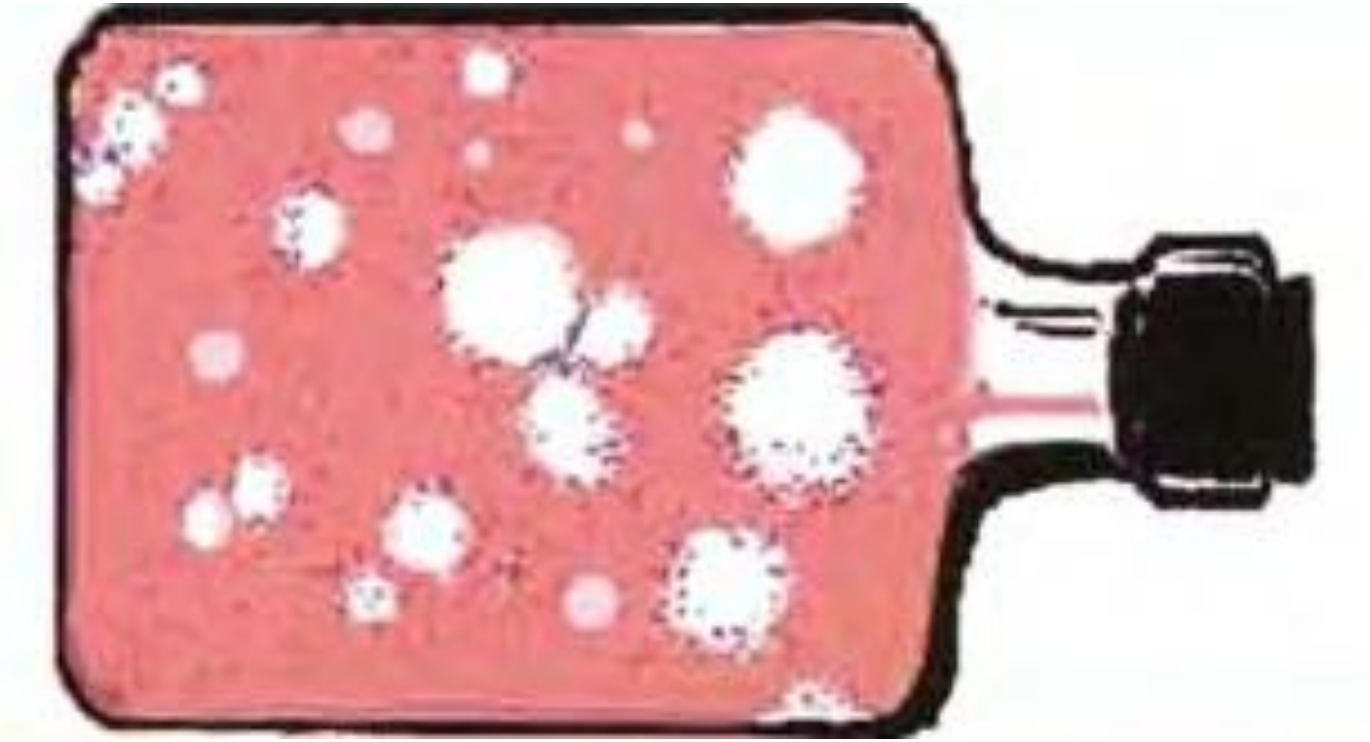
ЦПД в культуре клеток SSF-2 рабдовируса весенней виремии карпа (А)

ЦПД проявлялось в виде округления клеток, разрежения монослоя и появления клеток с длинными тонкими отростками, придающими пораженной культуре клеток вид сеточки

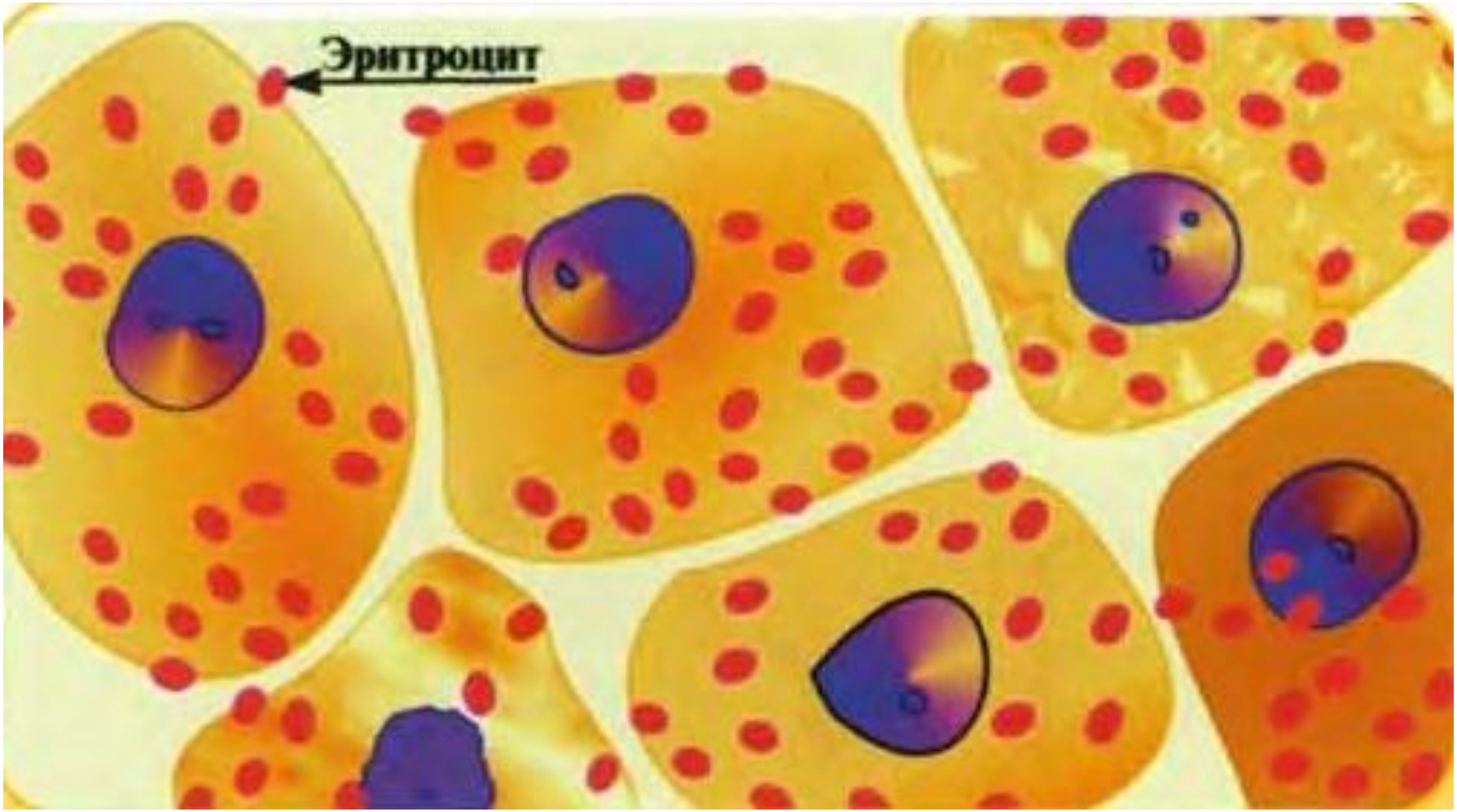
ЦПД в культуре клеток SSF-2 герпесвируса сибирского осетра (Б)



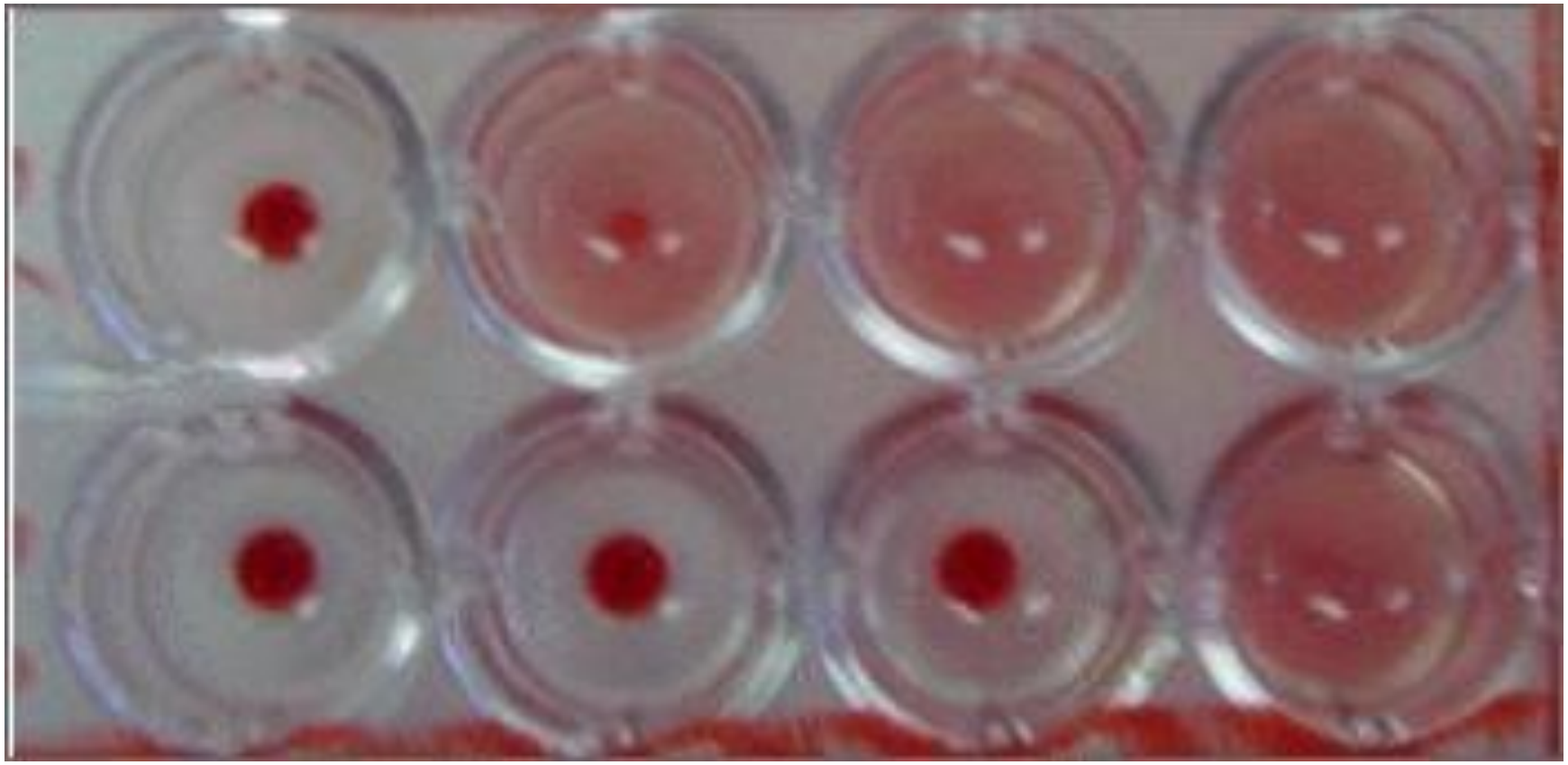
Отличительной особенностью герпесвирусного ЦПД в культуре клеток SSF-2 было слияние клеток и образование многоядерных симпластов. Количество ядер в симпластах м.б. до дести. На поздних стадиях инфекции симпласты постепенно округлялись, приобретая форму шара, который крепился к субстрату длинными отростками. Постепенно симпласты утрачивали связь с субстратом и переходили во взвешенное состояние.



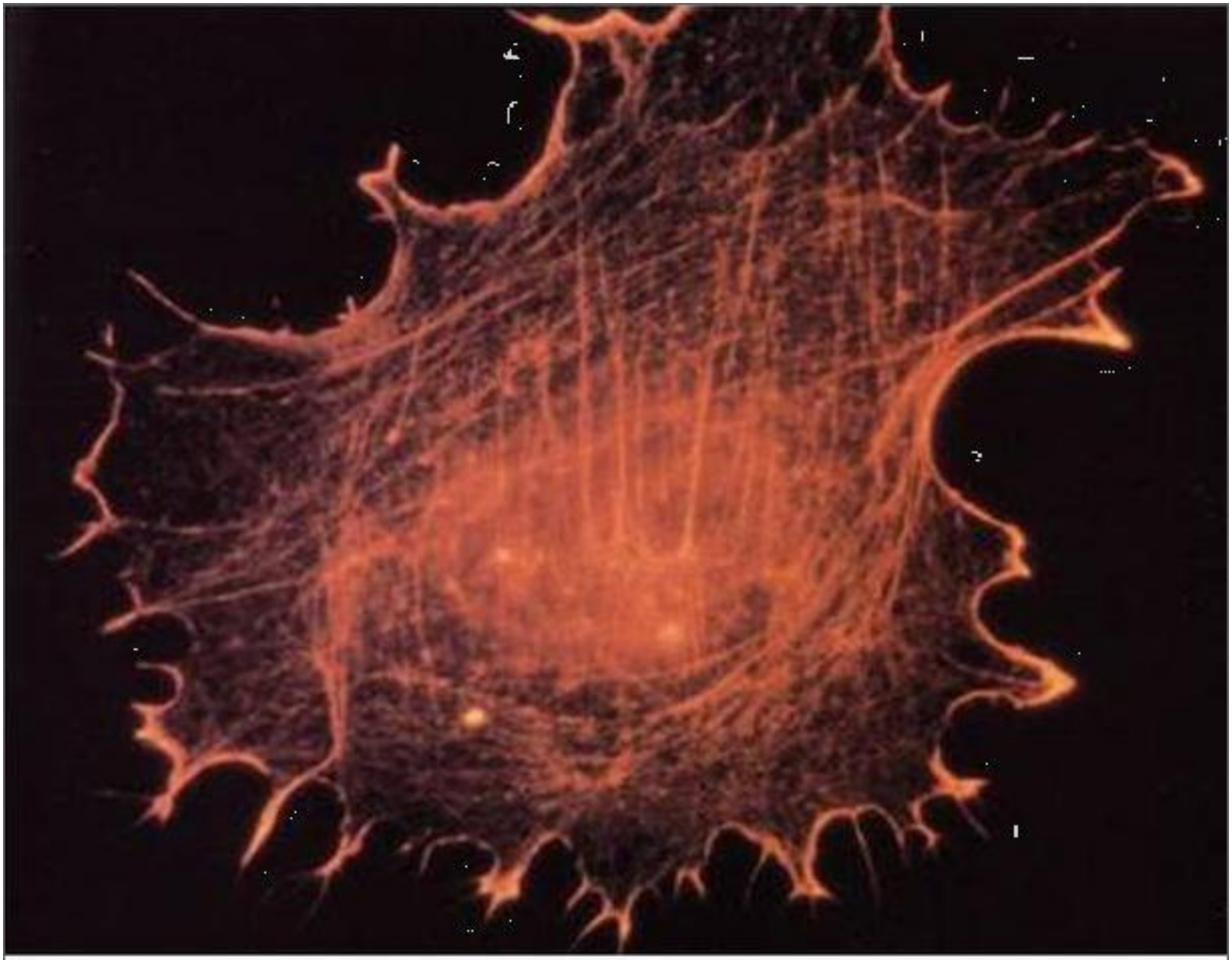
. Метод бляшек



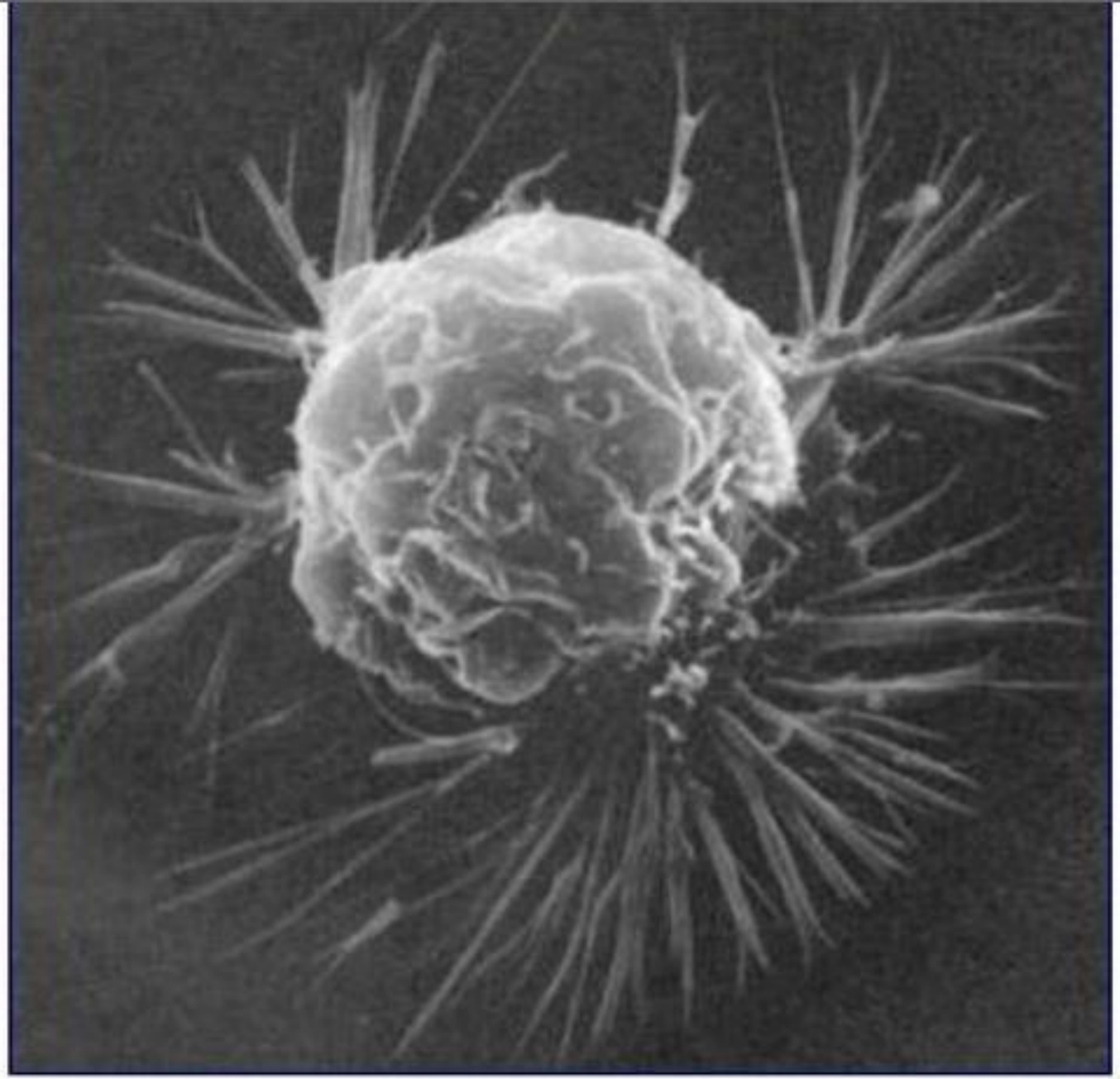
Реакция
гемадсорбции



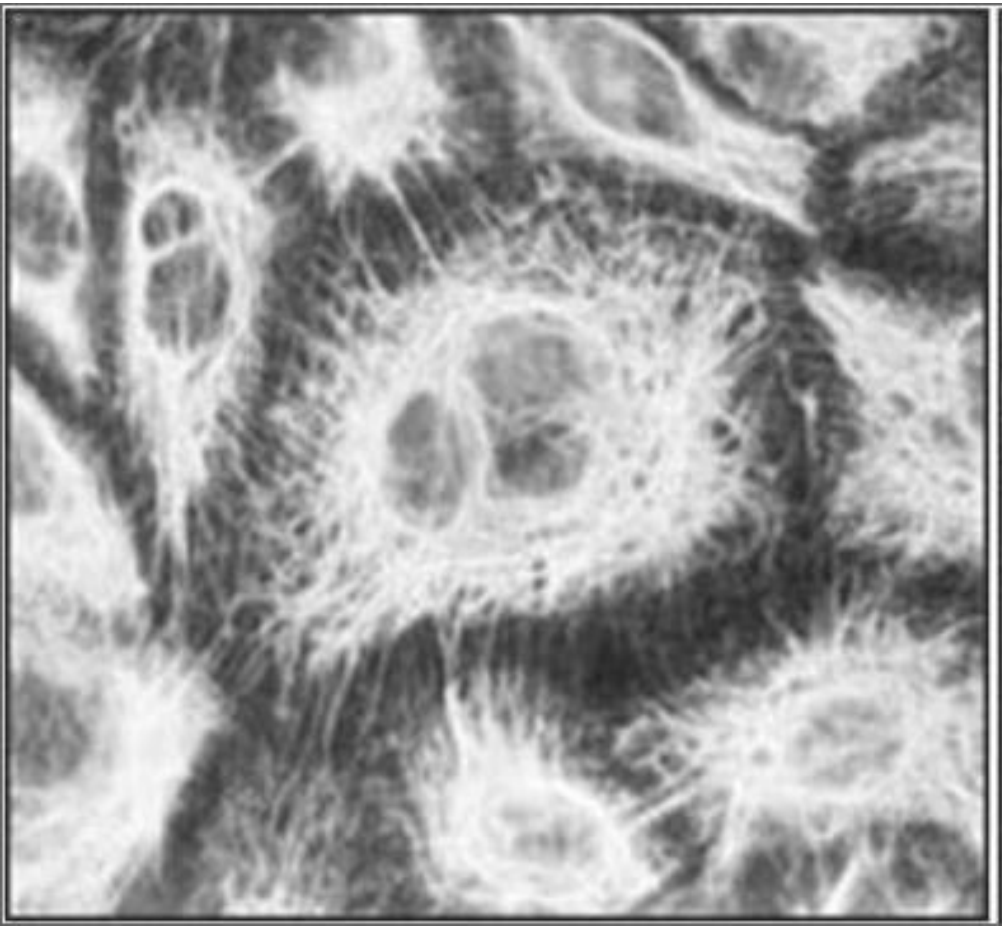
Учёт реакции гемагглютинации

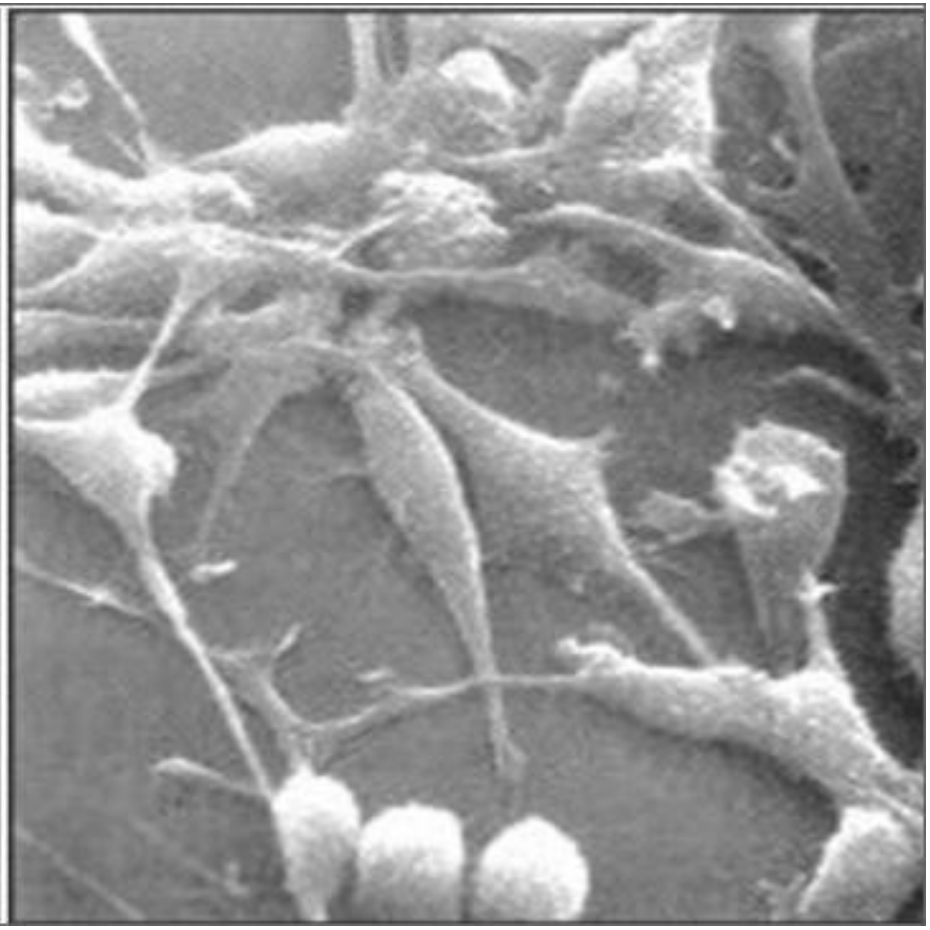


Эндотелиоцит человека



Раковая клетка молочной железы человека





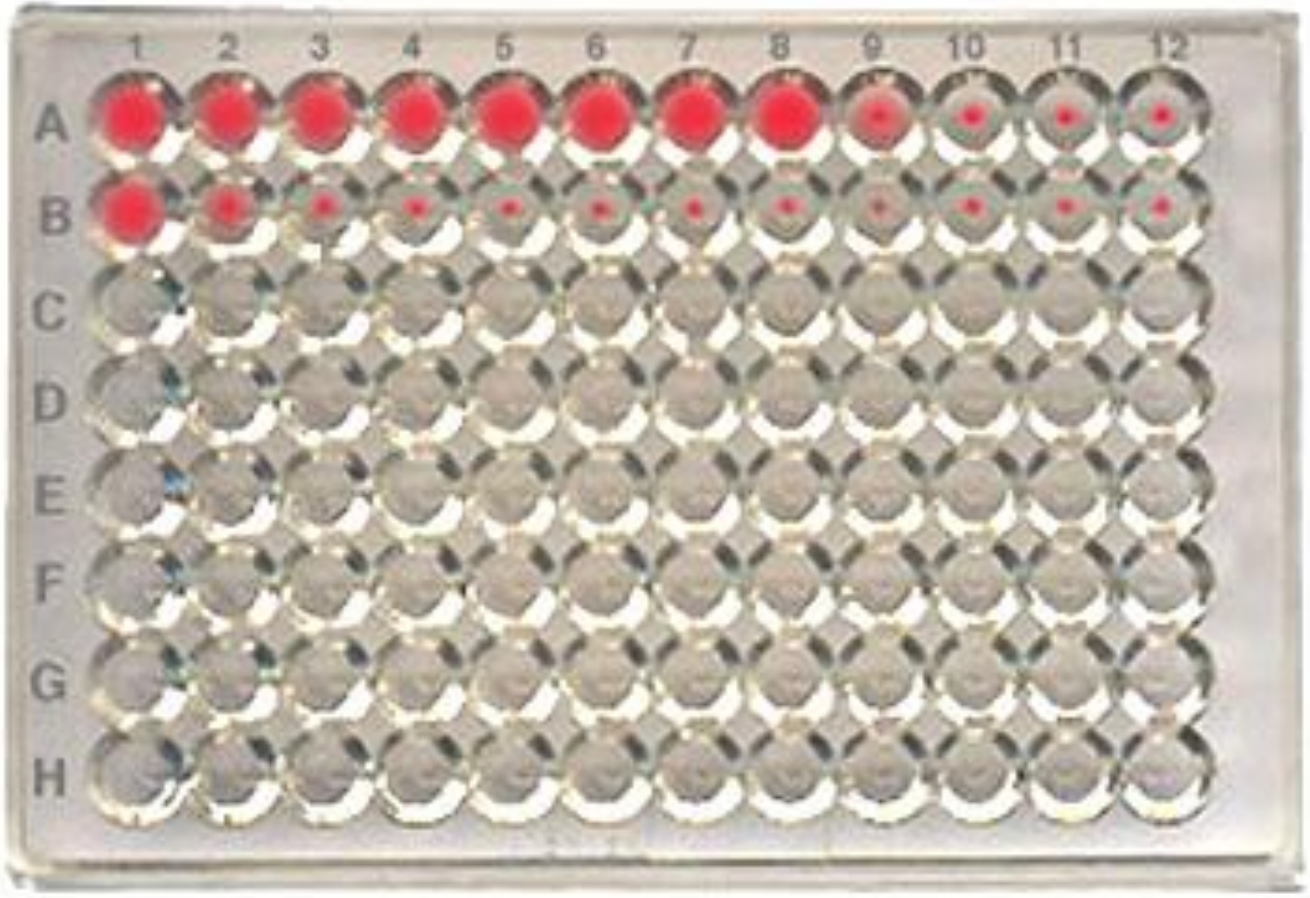
ЭНДОТЕЛИОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА ФИБРОБЛАСТЫ КРЫСЫ

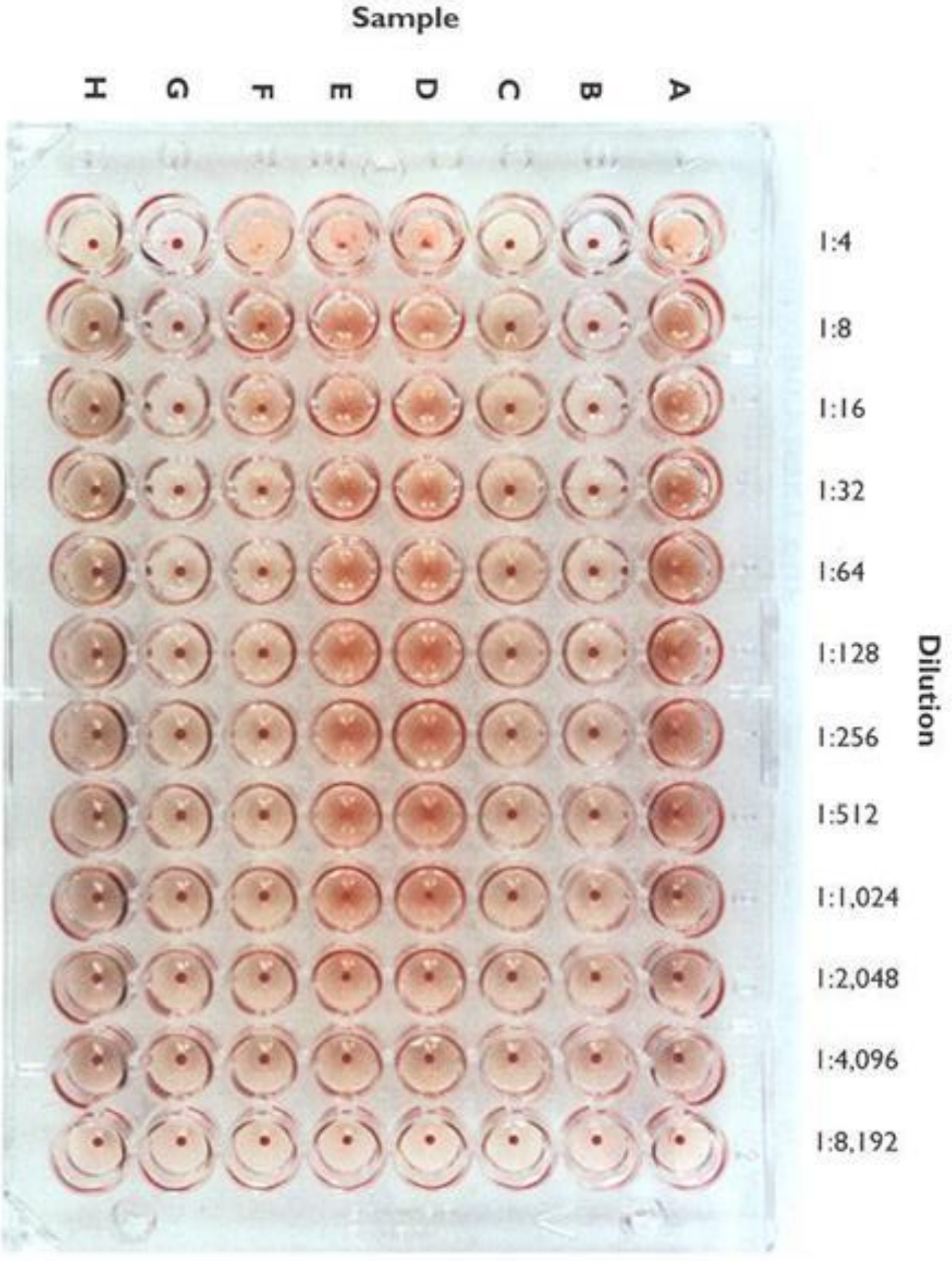
Сосуды для хранения образцов в жидком азоте с электронным контролем уровня азота

Результаты реакции гемагглютинации

Ряд А: лунка 1 - реакция положительная на 4 плюса, 2-8 на 3 плюса, 9-на 2 плюса, 10-на 1 плюс, 11-12 минус.

Ряд – Б: лунка 1-реакция положительная на 3 плюса, 2- на 2 плюса, 3- на 1 плюс, 4-12 – минус




Sample
H
G
F
E
D
C
B
A
1:4
1:8
1:16
1:32
1:64
1:128
1:256
1:512
1:1,024
1:2,048
1:4,096
1:8,192
Dilution