



Aprēķini un matemātika darbā ar šūnu kultūrām

**Zīdītāju šūnu kultūras
2012.gada 22.marts**



10% Seruma barotne

- DMEM – pamatbarotne (minerāli, a-sk., cukurs)
- F-12 – barotnes piedeva
- Serums (bioloģiski aktīvi proteīni)

- 50 ml 10% seruma barotne:
 - DMEM (3 vienības)
 - F-12 (1 vienība)
 - Serums (10%)

Aprēķiniet katras sastāvdaļas tilpumu!



Hondrocītu diferenciācijas barotne

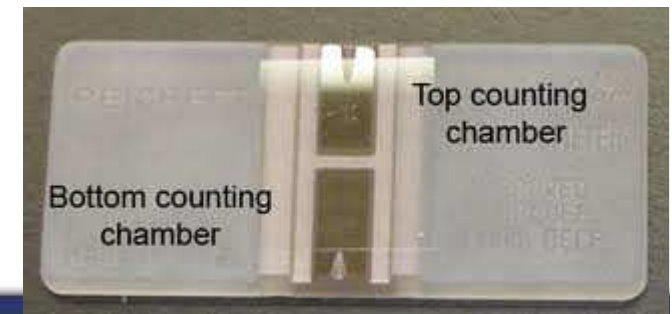
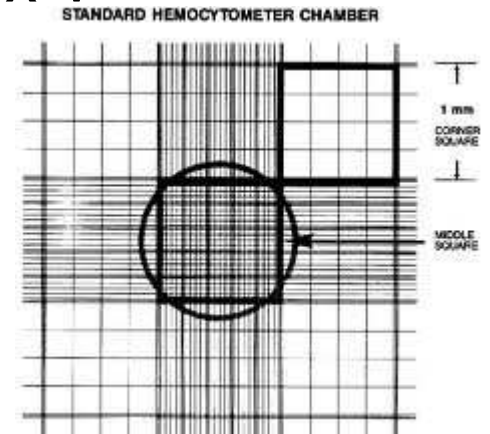
Sastāvdaļa	Izejas šķīdums	Beigu koncentrācija/ daudzums (nepieciešams)	Tilpums
DMEM:F12 3:1			
FBS	100%	0,5%	
L-glutamīns	100x	1x	
Nātrija piruvāts (molmasa 88g/mol)	100mM	100µg/ml	
2-fosfoaskorbāts	5mM	50nM	
Deksametazons	1mM	0,1µM	
TGF-β1	10µg/ml	10ng/ml	
Cilvēka insulīns	10µg/µl	10µg/ml	
		SUM	50ml



Šūnu skaitīšana

- 8 μ l šūnu suspensijas uznes hemocitometrā (skaitīšanas kamerā)
- Izskaita šūnas hemocitometra rūtotajā daļā
- Šūnu skaitu aprēķina pēc formulas $10000 \times n \times V =$ šūnas/ml

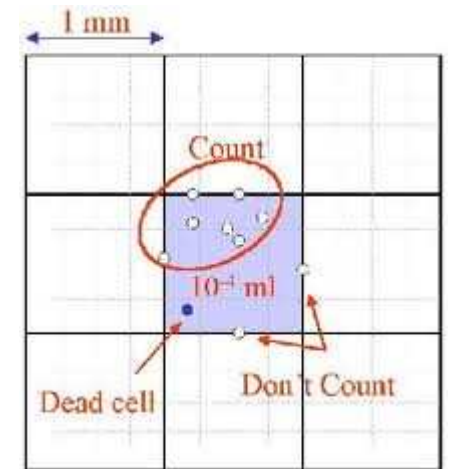
- Aprēķiniet šūnu skaitu
 - a) 1 ml suspensijas, 25 šūnas
 - b) 4 ml suspensijas, 14 šūnas
 - c) 250 μ l suspensijas, 3 šūnas
 - d) 2 ml suspensijas, 342 šūnas





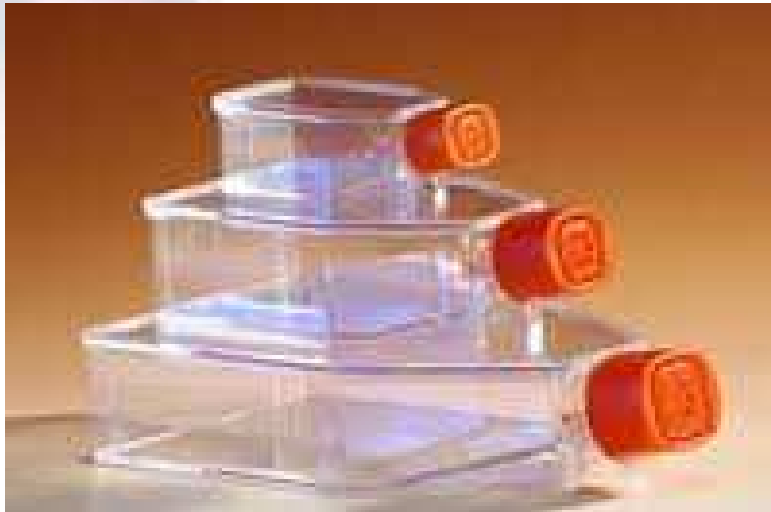
Šūnu izdzīvotība

- Pirms skaitīšanas šūnu suspensiju atšķaida uz pusi ar tripānzilā krāsas šķīdumu
- Tripānzilais iekrāso mirušās šūnas
- Aprēķiniet šūnu izdzīvotības % un šūnu skaitu:
 - a) Sākotnējā suspensija 600 μ l, 5 zilas šūnas, 35 neiekrāsotas
 - b) Sākotnējā suspensija 1 ml, 16 zilas šūnas, 24 neiekrāsotas
 - c) Sākotnējā suspensija 2 ml, 30 zilas šūnas, 10 neiekrāsotas



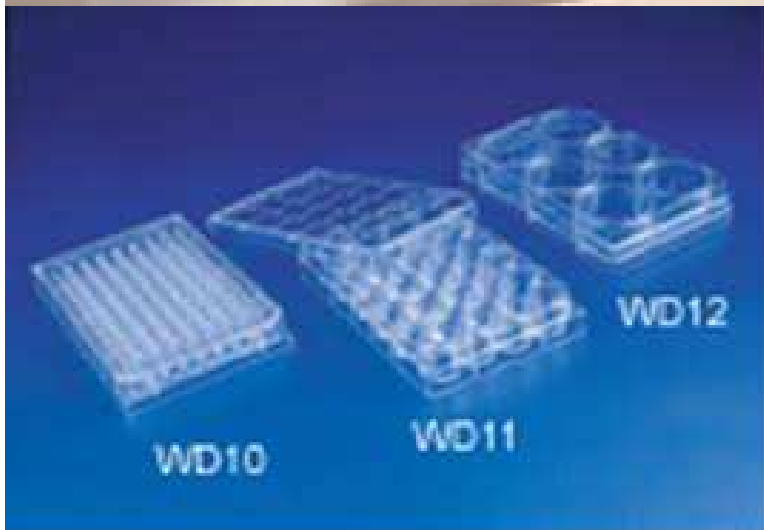


Šūnu kultivēšanas trauki



■ Audu kultūru flakoni

- T25 5ml barotne
- T75 10ml barotne
- T160/T175 20ml barotnes



■ Audu kultūru plates

- 6 (2x3) lauciņu 962 2ml
- 24 (4x6) lauciņu 200 0,5ml
- 96 (8x12) lauciņu <50 0,2 ml

Vidēji iespējams iegūt līdz 1000
HeLa šūnām uz mm²



Šūnu pārsēšana

- Šūnas pārsēj, kad tās sasniegušas konfluenci (~90% virsmas laukuma)
- Pārsējot šūnas, vēlams izsēt vismaz 1/10 no šūnu kultivēšanas traukā iegūstamā šūnu skaita, vai atkarībā no eksperimenta dizaina

Trauks	Šūnu koncentrācija, š/ml	Suspensijas daudzums	Jāizsēj	Tilpums
T25 flakons	850`000	1 ml	1/10	
6lauc. plate	350`000	1 ml	50`000 š./lauc.	
6lauc. plate	150`000	1,5 ml	30`000 š./lauc.	
T75 flakons	2`000`000	250 µl	300`000	



Eksperimenta plānojums

- Mērķis noteikt vielas X (molmasa 150g/mol) ietekmi uz MCŠ kultūrām
- Vielas X $ED_{50}=50\text{nM}$, $LD_{50}=50\text{mM}$
- Viela X pieejama liofilizēta pulvera veidā (99,999% tīrība)
- Kultūrās izmantosiet standarta 10% seruma barotni, kurai pievienosiet vielu X 10mM un 100nM koncentrācijā
- Nepieciešams iegūt:
 - 3 M šūnu HPLC un GC-MS analīzei
 - 500 tk šūnu lizēšanai un RT-qPCR analīzei
 - Vēl idejas, ko varētu testēt?
- Aprakstiet eksperimenta šūnu kultivēšanas daļas gaitu:
 - Kādus audu kultūru traukus izmantosiet?
 - Cik ilgi varētu ilgt kultivēšanas daļa, ja šūnu PDT=60h un sākumā Jums pieejami 1M šūnu
 - Cik dažādas barotnes sagatavosiet? Cik daudz, ja barotni mainīsiet 2x nedēļā?
 - Cik g vielas X Jums vajadzēs?