

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
Список сокращений и условных обозначений	5
Глава 1. Структура лаборатории, оборудование.	
Техника безопасности	6
1.1. Лабораторное оборудование	6
1.2. Правила работы в чистых помещениях	9
Глава 2. Основы работы с малыми лабораторными животными	14
Глава 3. Примеры заданий для выполнения исследовательских работ	25
3.1. Клетки и основы формирования ткани	25
3.2. Биоматериалы	71
3.3. Тканевая инженерия	91
3.4. Методы анализа в регенеративной медицине	104
Авторы и аффилиации	129

Глава 1

СТРУКТУРА ЛАБОРАТОРИИ, ОБОРУДОВАНИЕ. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

При работе в лаборатории необходимо надевать халат, работу с химическими веществами и клеточными продуктами осуществлять в перчатках.

1.1. ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Центрифуги. Различаются по тому, на какие объемы рассчитаны, и по центробежной силе.

Стандартные центрифуги рассчитаны на пробирки объемом 15 и 50 мл, мини-центрифуги — на объемы <2 мл (рис. 1.1).

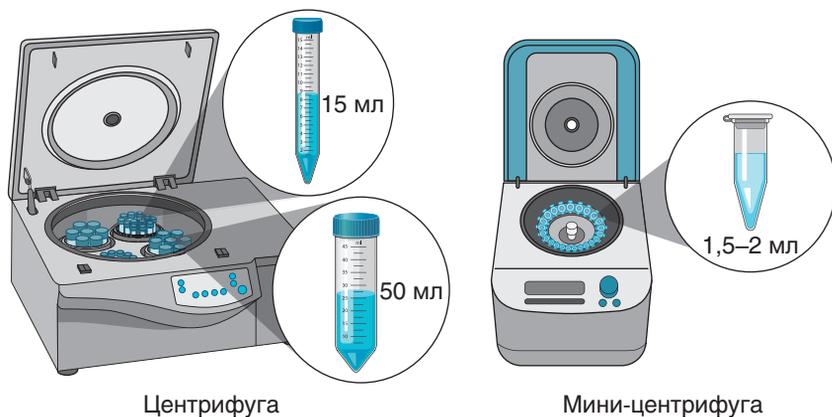


Рис. 1.1. Типы центрифуг, используемых в лаборатории

Центробежную силу выражают либо в rpm (от англ. revolutions per minute — обороты в минуту), либо в rcf (от англ. relative centrifugal force — относительная центробежная сила, выражаемая в единицах гравитации, или $\times g$). Описание протокола центрифугирования чаще всего приводят в единицах rcf, поскольку это более универсальный показатель.

Чтобы перевести rpm в rcf, существует формула, для расчета необходимо знать радиус ротора:

$$\text{rcf} = \text{rpm}^2 \times r \times 1,118 \times 10^{-5},$$

где r — радиус ротора в сантиметрах.

Пипетки. Пипетки разного типа необходимы для переноса жидкостей (рис. 1.2).

Автоматические дозаторы предназначены для объемов от 0,5 до 1000 мкл, обладают высокой точностью. Автоматические пипетки имеют колесо для регулировки точного объема и кнопку для набора жидкости, которая имеет 2 остановки. Существуют несколько видов дозаторов, рассчитанных на разные диапазоны объемов: 100–1000 мкл, 20–200 мкл, 2–20 мкл, 0,5–10 мкл. Если нужно набрать небольшой объем раствора, выбирайте пипетку с максимально близким диапазоном. Нельзя выставлять значения, выходящие за пределы, указанные на пипетке, это может нарушить калибровку или привести к повреждению механизма дозатора.

Как правило, для того чтобы набрать жидкость, кнопку нажимают до первой остановки, одноразовый наконечник погружают в жидкость и медленно отпускают кнопку. После этого переносят пипетку в другой сосуд и нажимают кнопку, чтобы спустить жидкость. Для переноса вязких растворов кнопку нажимают до второй остановки, одноразовый наконечник помещают в раствор, медленно полностью отпускают кнопку и держат пипетку погруженной в раствор в течение некоторого времени, поскольку вязкие жидкости набираются медленно. Переносят пипетку в новый сосуд и нажимают кнопку до первой остановки, остаток раствора возвращают обратно в исходную емкость, нажав кнопку до конца.

Наконечники для автоматических дозаторов бывают с фильтрами и без. Наконечники без фильтра чаще всего используются в общей лаборатории, а наконечники с фильтрами лучше подходят для работ в асептических условиях, снижая риск контаминации клеточных культур. При использовании любого типа наконечников нельзя резко отпустить кнопку, набирая растворы, поскольку это может привести к попаданию жидкости внутрь дозатора. Фильтры в наконечниках немного

снижают данный риск, но не устраняют его полностью. В случае попадания раствора в дозатор, особенно в случае тех, что используются в стерильных условиях, необходимо разобрать дозатор согласно инструкции производителя, промыть его изнутри и при необходимости стерилизовать.

Для переноса растворов объемом от 1 до 25 мл используют серологические пипетки и электрические пипетаторы, которые управляются при помощи двух кнопок — набора (верхняя кнопка) и спуска (нижняя кнопка) жидкости.

При использовании пипетатора важно избегать попадания жидкости внутрь прибора. Для защиты электрической компоненты в серологической пипетке есть небольшой фильтр, а также на входе в пипетатор стоит дополнительный фильтр с размером пор около 0,2 мкм, который способен задержать некоторый объем раствора. При попадании жидкости в фильтр пипетатора необходимо провести его замену.

Пипетки Пастера — стеклянные или пластиковые пипетки, набор жидкости в которые производится за счет небольшой груши на конце. Их удобно использовать в качестве одноразовых пипеток, когда не требуется большой точности в соблюдении объема.

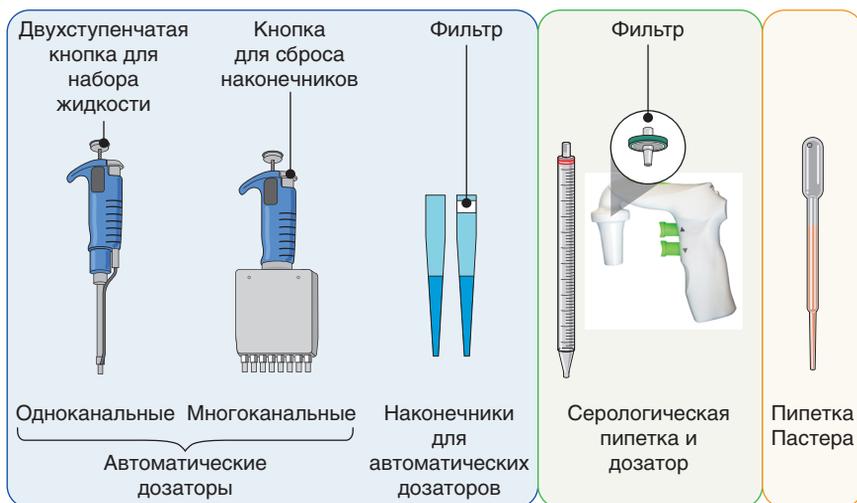


Рис. 1.2. Типы пипеток, используемых в лабораториях для переноса жидкостей

Холодильники. Холодильники разного типа в лаборатории необходимы для хранения растворов, реактивов, экспериментальных образцов и

клеточного материала. Используются холодильники на $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, морозилки на $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, а также низкотемпературные холодильники на $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

1.2. ПРАВИЛА РАБОТЫ В ЧИСТЫХ ПОМЕЩЕНИЯХ

Личная гигиена. Правила работы в асептических условиях в специальных культуральных комнатах, предназначенных для работы с клеточными культурами, могут различаться.

Перед работой в клеточном боксе необходимо помыть руки.

В исследовательских лабораториях чаще всего используют халаты, которые не выносят из культуральной. В некоторых случаях под халат надевают хирургический костюм, а при входе в бокс надевают сменную обувь. В лабораториях, которые готовят клеточные продукты для испытаний, используют полные одноразовые медицинские костюмы. Дополнительно для защиты материала от контаминации используют хирургические одноразовые шапочки и медицинские маски. Обязательно использование одноразовых нитриловых или латексных перчаток.

Оборудование. Культуральные комнаты снабжены всем необходимым оборудованием для проведения работ не выходя из них. Как правило, в чистых помещениях есть собственные холодильники, центрифуги и микроскопы, а также специальное оборудование — инкубаторы и ламинарные шкафы.

Ламинарные шкафы делятся на 3 класса согласно степени защиты оператора и материала. Ключевым элементом, определяющим класс защиты ламинарного шкафа, является организация системы фильтров и потоков воздуха.

Ламинарные шкафы I класса защиты обеспечивают защиту оператора и окружающей среды, используются при работе с опасными агентами.

Ламинарные шкафы II класса защиты оснащены более сложной системой циркуляции воздуха и несколькими блоками High Efficiency Particulate Air или High Efficiency Particulate Arrestance — HEPA-фильтров (рис. 1.3), что позволяет не только защищать оператора, но и поддерживать асептические условия в рабочей зоне.

Оборудование III, максимального, класса защиты предназначено для работы с наиболее патогенными объектами — бактериями и вирусами. Такое оборудование оснащено специальными передаточными шлюзами для материалов, а фронтальное окно полностью закрыто, и работы осуществляются через перчаточные порты, что обеспечивает отсутствие непосредственного контакта оператора с образцами во время работы.

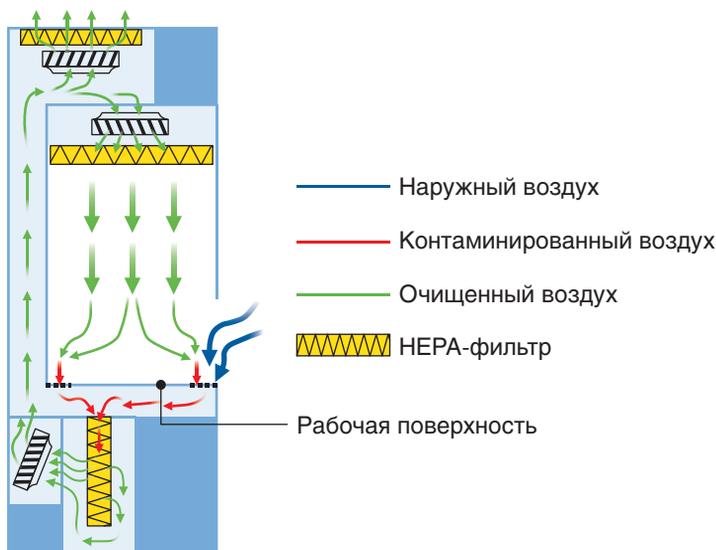


Рис. 1.3. Схема воздушных потоков в ламинарном шкафу II класса защиты

Ламинарные шкафы, как правило, оснащены ультрафиолетовыми (УФ) лампами для стерилизации рабочей зоны до и после проведения экспериментальных работ. Рабочая поверхность сделана из нержавеющей стали, что позволяет обрабатывать ее дезинфицирующими средствами для обеспечения асептических условий работы.

Инкубаторы предназначены для ведения культур клеток и поддержания условий, приближенных к условиям в организме, — $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\% \text{CO}_2$ и влажность. Для поддержания необходимой концентрации углекислого газа к инкубаторам подключают баллон с чистым CO_2 , давление газа в баллоне отслеживают при помощи редуктора. Влажность поддерживают, наливая в специальный поддон дистиллированную воду.

Инкубаторы имеют 2 дверцы, чтобы максимально поддерживать и быстро восстанавливать условия культивирования. На внешней двери инкубаторов, как правило, есть дисплеи, на которых отображаются текущие температура и содержание углекислого газа. Если данные показатели падают и не восстанавливаются, значит: 1) может быть неплотно закрыта одна из дверей, тогда нужно их закрыть и подождать восстановления показателей; 2) в баллоне заканчивается газ, тогда требуется его замена.

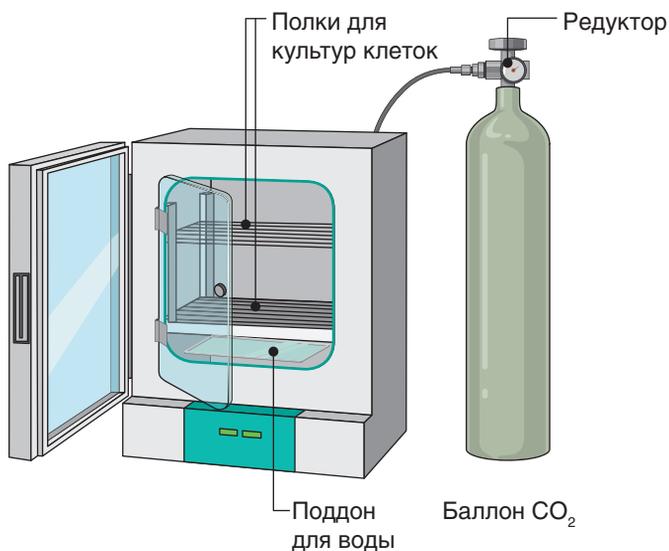


Рис. 1.4. Инкубатор для культур клеток в базовой комплектации

Подготовка культуральной комнаты к работе. Стерилизация ламинарного шкафа УФ-лампой в течение 10 мин.

По возможности использовать очиститель воздуха и/или систему вентиляции.

До начала работы проверить состояние клеточных культур — жизнеспособность, плотность клеток в культуре (чтобы определить необходимый тип манипуляций), наличие признаков контаминации (бактерии, гифы грибов).

В случае контаминации все зараженные культуры и растворы подвергаются утилизации. Факт контаминации необходимо зафиксировать в листе учета контаминаций или сообщить о нем лицу, ответственному за помещения для культуральных работ.

Подготовить все необходимые для работы реактивы и расходные материалы, разместить рядом с рабочим местом. Для проведения рутинных работ с клеточными культурами реактивы необходимо довести до температуры +37 °С на водяной бане.

Правила работы в ламинарном шкафу. Выключите УФ-лампу (если нет автоматического таймера), запустите поток воздуха, только после этого можно полностью открывать ламинарный шкаф (чтобы избежать попадания внутрь наружного воздуха) (см. схему потоков на рис. 1.3).

Обработайте рабочую поверхность 70° этанолом или средством для дезинфекции (например, «Трилоксом»). Перед тем как вносить в ламинарный шкаф реактивы и расходные материалы, их также необходимо обрабатывать 70° этанолом или средством для дезинфекции из пульверизатора.

Чашки Петри / флаконы / планшеты (с клетками или без них), а также реактивы и расходные материалы (индивидуально упакованные серологические пипетки, штативы с наконечниками и т.д.) нельзя открывать вне ламинарного шкафа. В противном случае культура / расходный материал / реактив утилизируется.

В ламинарном шкафу, как правило, есть контейнер для отходов.

При работе с реактивами в разных лабораториях могут быть разные подходы. Если ламинарный шкаф стерилизуется УФ-лампой после каждого пользователя, пробирки и бутылки с реактивами можно оставлять открытыми, предварительно обжигая крышку и горлышко пробирки на спиртовой горелке. Если поток пользователей большой, не рекомендуется держать емкости открытыми — крышка всегда лежит сверху, ее приподнимают только для того, чтобы отобрать необходимое количество реактива. В качестве дополнительной меры защиты ростовых сред от контаминации их можно фильтровать через специальные насадки для шприцов с порами диаметром 0,22 мкм. Важно стараться не пронести руки над открытыми емкостями с реактивами и культурами клеток, так как это повышает риск контаминации.

При работе с дозаторами с надетыми на них наконечниками и серологическими пипетками необходимо следить, чтобы они не касались ничего снаружи от содержимого контейнера с реактивом или культурой клеток. В противном случае наконечник / серологическая пипетка сразу утилизируется. Нельзя одной и той же пипеткой/наконечником набирать реактивы из разных емкостей, а также использовать их для разных культур клеток.

Завершение работы. После завершения работы с клеточными культурами необходимо плотно закрыть все реактивы (если лаборатория позволяет использовать спиртовые горелки, предварительно перед закрытием обжечь крышки и горлышки контейнеров). Все емкости необходимо подписать и убрать на хранение при соответствующих условиях (см. п. «Хранение реактивов»).

Вынести из ламинарного шкафа контейнер для отходов, слить его содержимое согласно внутреннему регламенту лаборатории, тщательно промыть водой и дезинфицирующим средством.