

Øvelse med tarmkræftceller i kultur.

Baggrund

Hver 3. dansker bliver ramt af kræft, inden de er blevet 75 år. Tyktarmskræft er den 3. hyppigste kræftform hos både mænd og kvinder, hvor henholdsvis 7.3 og 8.4% af alle kræfttilfælde er i tyktarmen. Tyktarmskræft (kolon cancer) er en kræftform, der udvikler sig som følge af forandringer i slimhindecellerne i tyktarmen. Kræft er generelt en sygdom i kroppens celler, der opstår, fordi nogle celler begynder at vokse ude af kontrol med resten af kroppens celler. Dette kan ske på grund af en genetisk forandring - en mutation - som får de normale celler til at dele sig for meget. Der findes over 200 forskellige kræftformer, og ofte er årsagen et samspil mellem miljø (kost, motion, mm) og arv. Man kan selv gøre meget for at forebygge kræft gennem sin livsstil.

Øvelsens formål:

Formålet med øvelsen er at få indsigt i celledyrkningsmetoder til undersøgelse af vækst af celler i kultur. Til sådanne studier kan der anvendes enten normale celler eller kræftceller. Først studeres udseendet (morfologien) af kræftceller og normale celler i mikroskop. Derefter undersøges effekten af føtalt kalveserum (FCS) og et kemoterapeutikum, etoposide, på kræftceller i kultur. FCS indeholder mange forskellige vækstfaktorer, der er nødvendige for at kunne dyrke celler i kulturer i laboratoriet. Der opsættes et assay med humane tyktarms kræftceller, Caco-2, i kultur, og FCS og etoposide tilsættes til kulturmediet i forskellige koncentrationer, og væksten af cellerne bestemmes ved fluorescensmåling.

Holdinddeling:

Eleverne inddeles i 3 hold, der starter forskellige steder i øvelsesvejledningen:

Kl. 16.30 - ca.17.30:

Hold 1: Subkultivering af celler og opsætning af assay - flowbænk 1 (Kasper)

Hold 2: Subkultivering af celler og opsætning af assay - flowbænk 2 (Janne)

Hold 3: Morfologi af normale celler og kræftceller ved mikroskop (Ditte)

Kl. 18.00 – ca.19.00:

Hold 1 +2: lagttagelse af celler i mikroskop og måling på fluorometer (Ditte, Kasper)

Hold 3: Subkultivering af celler og opsætning af assay i flowbænk (Janne)

Reagenser:

Phosphate buffered saline (PBS) buffer med calcium og magnesium

PBS buffer uden calcium og magnesium

Trypsin-EDTA opløsning

Føtalt kalveserum (FCS)

Alamar Blue farveopløsning

Cellekulturmedier:

Medie med 0% FCS:

Caco-2 Tarmcellemedie (DMEM)	96 ml
Pen / Strep	1,0 ml
Glutamax 100X	2,0 ml

Hepes 1 M 1,0 ml
Kontrollér at pH er ca. 7,4

Medie med 10% FCS:

Caco-2 Tarmcellemedie (DMEM) 86 ml
FCS 10 ml
Pen / Strep 1,0 ml
Glutamax 100X 2,0 ml
Hepes 1 M 1,0 ml
Kontrollér at pH er ca. 7,4

Behandlingsmedier:

Behandlingsmedier med **FCS** fremstilles ved fortynding af FCS i medie uden FCS (0% FCS). Beregn de manglende tal i skemaet, hvis der skal fremstilles 4-5 ml af hver fortynding.

Koncentrationer	ml FCS eller medie med FCS	ml medie med 0% FCS
Medie m 10% FCS	0,5 ml FCS	4,5 ml
Medie m 5% FCS	2 ml medie m. 10% FCS	
Medie m 2,5% FCS	ml medie m. 5% FCS	
Medie m 1,25% FCS	ml medie m. 2,5% FCS	
Medie m 0,625% FCS	ml medie m. 1,25% FCS	
Medie m 0% FCS	ml	

Behandlingsmedier med **etoposide** fremstilles ved fortynding af etoposide opløsning i medie uden FCS (0% FCS).

Etoposide: MW 588,6 g/mol. Konc. 20 mg/ml (stamopløsning) ~ 34mM.

Opl. A: 0,1 ml etop. stamopl. + 0,75 ml medie uden FCS giver en opl. på 4.0 mM

Opl. B: 200µl etop. Opl. A + 1800µl medie uden FCS giver opløsning på 0,4 mM

Beregn de manglende tal i skemaet, hvis der skal fremstilles 4-5 ml af hver opløsning.

Koncentrationer	ml etoposide opløsning	ml medie med 0% FCS
Medie m 40µM Etoposide	0,5 ml Opl. B	4,5 ml
Medie m 20µM Etoposide	2 ml 40µM	
Medie m 10µM Etoposide	ml 20µM	
Medie m 1µM Etoposide	ml 10µM	
Medie m 0,1µM Etoposide	ml 1µM	
Medie m 0µM Etoposide	ml	

Apparatur:

Flowbænk
Inkubator (37°C)
Fluorometer

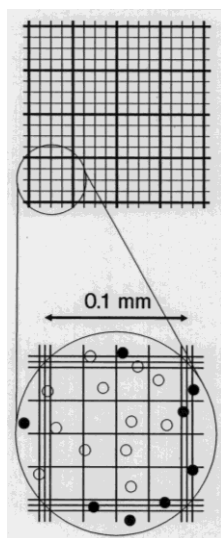
Subkultivering af celler:

Den udleverede flaske med Caco-2 celler subkultiveres:

1. Iagttag cellerne i mikroskop. Fylder cellerne hele bunden af flasken? (vurder hvor konfluente er cellerne i % ?)
2. Opvarm cellekulturmedie, Trypsin-EDTA (1x) og PBS uden Ca og Mg til 37°C
3. Afsug mediet ved cellerne med pipette
4. Vask cellerne 2 gange med 5 ml PBS
5. Tilsæt 10 ml Trypsin-EDTA opløsning (trypsineringen startes)
6. Inkuber cellerne ved 37°C (inkubator) til cellerne har løsnet sig. Hold øje med cellerne i mikroskop og trypsiner kun lige til cellerne er løse (celler tager skade af for lang tids trypsinering). Caco-2 celler trypsineres CA. 5 MIN
7. Tilsæt 5 ml medie med **10% FCS** til dyrkningsflasken (trypsineringen standses)
8. Skyl op og ned med en pipette og overfør cellerne til et centrifugerør
9. Centrifuger cellerne ved 500 x g (0.5 rcf) i 5 min ved stuetemperatur
10. Hæld mediet af – cellerne findes i bunden af røret (pellet)
11. Tilsæt 10 ml medie til cellerne. (man tæller antallet af celler og kan derefter bestemme antal celler pr. ml medie)

Bestemmelse af koncentration af celler:

1. Læg dækglass på tællekammer (hæmocytometer; Figur 1)
2. Udtag 20 µl celleopløsning til tællekammeret
3. Tæl antallet af celler i mikroskop (der tælles i 4 forskellige områder)



Figur 1. Hæmocytometer

4. Indfør tallene i tabellen og beregn gennemsnittet

Antal celler				Gennemsnit

5. Beregn koncentrationen af celler og det totale antal celler:

Antal celler/ml = gennemsnit x 20.000 =

Antal celler ialt = antal celler/ml x antal ml =

Opsætning af assay i 96-brønds plader:

1. Til hver brønd skal vi tilsætte 4000 celler og hver brønd skal indeholde 0,1 ml medie dvs. koncentrationen af celler skal være 20.000 celler/ml.
2. Fremstil 25 ml celleopløsning med 40.000 celler/ml dvs. 1000.000 celler i 25 ml medie.

$$X \text{ ml} \times \text{antal celler/ml} = 1000.000 \text{ celler}$$

↓

$$X \text{ ml} = \frac{1000.000}{\text{antal celler/ml}} =$$

Det vil sige ml celleblanding + ml medie

3. Tilsæt sterilt vand (200 µl) i hver af brøndene skraveret på figuren af cellekulturpladen.
4. Uddel cellerne i Nunc 96-brønds cellekulturplade (100 µl/brønd) efter planen (se Figur 2 og 3),
5. Normalt vil pladerne herefter blive sat i inkubator til næste dag for at cellerne sætter sig fast på bunden.
6. Nu tilsættes behandlingerne ved at 200 µl af de fremstillede behandlingsmedier med FCS og etoposide. Dette foregår række for række, da cellelaget ellers vil tørre ud.
7. Pladen sættes i inkubator i 72 timer.
8. Måling af vækst ved Alamar Blue metoden (544 /596 nm): (Se info på nettet).

NB: Dette er ikke en praktisk del af øvelsen, men der er forberedt en plade, hvor Alamar Blue er tilsat, og hvor væksten af cellerne kan måles fluorometrisk. Janne har forberedt denne plade og vi måler den på et Envision fluorometer.

Procedure: Efter 72 timer afsuges mediet, og der tilsættes farvestoffet Alamar Blue i opløsning. Dette stof skifter farve afhængig af aktiviteten af cellerne. Dvs. brønde hvor cellerne vokser kraftigst har den største farveændring (mest røde).

Figur 2: Cellekulturplade 1 - FCS kurve.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		0 %	0,625 %	1,25 %	2,5 %	5 %	10 %					
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figur 3: Cellekulturplade 2 - etoposide kurve.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		0 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	20 μ M	40 μ M					
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Betragtninger i mikroskop:

Væksten af cellerne betragtes i mikroskop efter behandlingen (72 timer) med henholdsvis FCS og etoposide.

Spørgsmål:

Hvorfor anvendes der ofte kræftceller i cellebiologiske studier, også når man ikke nødvendigvis vil lave kræftforskning?

Hvorfor er det nødvendigt at arbejde sterilt med celler?

Hvorfor tilsættes der antibiotika (penicillin/Streptomycin) til cellekulturmediet?

Hvad er glutamax og hepes, og hvorfor tilsættes det til mediet?

Hvordan virker etoposide?