

## Øvelsesvejledning: Tarmkræftcellers vækst

### Baggrund

Cellekulturer giver mulighed for at undersøge, hvordan f.eks. kostkomponenter påvirker cellers vækst i et specifikt væv. Da det kan være vanskeligt at få fat i normale celler til sådanne undersøgelser, anvendes ofte kræftceller, som kan købes via cellebanker rundt om i verden. Det første sted kostkomponenterne møder kroppen er i mave-tarmkanalen. Derfor anvendes ofte tarmceller i test af de bioaktive stoffer, der findes i fødevarer. Anvendes der kræftceller til undersøgelserne, vil væksten af kræftceller kunne undersøges, hvilket er interessant, da hver 3. dansker bliver ramt af kræft inden de er blevet 75 år. Tyktarmskræft (kolon cancer) er den 3. hyppigste kræftform hos både mænd og kvinder, hvor 10% af alle kræfttilfælde er i tyktarmen. Tyktarmskræft 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.

Cellekulturer kan også anvendes til at undersøge om nye fodermidler, der potentielt kan reducere metanudledning fra f.eks. køer, kan påvirke koens væv negativt eller mennesker, som drikker komælk.

### 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 er en positiv kontrol, da det indeholder mange forskellige vækstfaktorer, der er nødvendige for at kunne dyrke celler i kulturer i laboratoriet. Der opsættes et assay med humane tyktarmskræftceller, Caco-2, i kultur. FCS og etoposide tilsættes til kulturmediet i forskellige koncentrationer, og væksten af cellerne bestemmes ved fluorescensmåling.

### Reagenser:

Phosphate buffered saline (PBS) buffer med calcium og magnesium

PBS buffer uden calcium og magnesium

Trypsin-EDTA opløsning

Føtalt kalveserum (FCS)

alamarBlue 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 2-5 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 2-5 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 (Envision)

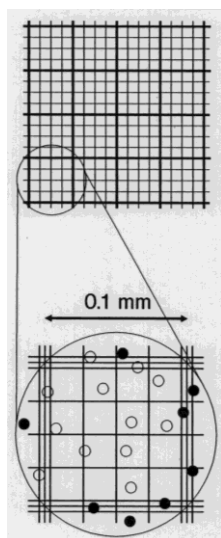
### Subkultivering af celler:

Den udleverede flaske med Caco-2 celler subkultiveres:

1. Iagttag cellerne i mikroskop. Fylder cellerne hele bunden af flasken? (vurdér 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 2 ml PBS
5. Tilsæt 1 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 × g i 5 min ved stuetemperatur
10. Hæld mediet af – cellerne findes i bunden af røret (pellet)
11. Tilsæt 3 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:

$$\text{Antal celler/ml} = \text{gennemsnit} \times 10.000 =$$

$$\text{Antal celler ialt} = \text{antal celler/ml} \times \text{antal ml} =$$

### 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 40.000 celler/ml.
2. Fremstil 5 ml celleopløsning med 40.000 celler/ml dvs. 200.000 celler i 5 ml medie.

$$x \text{ ml} \times \text{antal celler/ml} = 200.000 \text{ celler}$$

↓

$$x \text{ ml} = \frac{200.000}{\text{antal celler/ml}} =$$

Det vil sige  $x$  ml celleblanding +  $y$  ml medie = 5 ml

3. Tilsæt sterilt vand (200  $\mu$ l) i hver af brøndene skraveret på figuren af cellekulturpladen.
4. Uddel cellerne i Nunc 96-brønds cellekulturplade (100  $\mu$ l/brønd) efter planen (se Figur 2 og 3).

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

5. Pladerne sættes i inkubator til næste dag for at cellerne sætter sig fast på bunden.
6. Næste dag: 200  $\mu$ l af de fremstillede behandlingsmedier med FCS og etoposide tilsættes. Dette foregår række for række, da cellelaget ellers vil tørre ud.
7. Pladen sættes i inkubator i 72 timer.
8. Måling af vækst ved alamarBlue metoden (544 /596 nm): (Se evt. info på nettet).

Procedure: Efter 72 t afsuges mediet, og der tilsættes farvestoffet alamarBlue i opløsning. Dette stof skifter farve og fluorescerer afhængig af aktiviteten i cellernes mitochondrier. Dvs. brønde hvor cellerne vokser kraftigst har den største farveændring (mest røde) og størst fluorescens.

**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 $\mu$ M	0,1 $\mu$ M	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	20 $\mu$ M	40 $\mu$ 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?