

Учреждение образования  
«Гомельский государственный университет  
имени Франциска Скорины»

**И. И. КОНЦЕВАЯ**

**ОСНОВЫ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ:  
ЛАБОРАТОРИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ТКАНЕЙ**

Практическое руководство

для студентов  
специальности 1-31 01 01-02  
«Биология (научно-педагогическая деятельность)»

Гомель  
ГГУ им. Ф. Скорины  
2023

УДК 606:57.086.83(076)  
ББК 28.041.4я73  
К64

Рецензенты:

кандидат биологических наук А. В. Гулаков,  
кандидат биологических наук Н. В. Чуешова

Рекомендовано к изданию научно-методическим советом  
учреждения образования «Гомельский государственный  
университет имени Франциска Скорины»

**Концевая, И. И.**

К64 Основы клеточной инженерии : лаборатория  
культивирования тканей : практическое руководство /  
И. И. Концевая ; Гомельский гос. ун-т им. Ф. Скорины. –  
Гомель : ГГУ им. Ф. Скорины, 2023. – 46 с.  
ISBN 978-985-577-963-7

Практическое руководство ставит своей целью оптимизировать учебно-познавательную деятельность студентов по усвоению материала темы «Введение в клеточную инженерию» раздела «Введение». Студенты подробно знакомятся с планированием и оборудованием лаборатории культивирования тканей, методами асептики. Издание может быть использовано как на лабораторных занятиях по соответствующим темам курса «Основы клеточной инженерии», так и для самостоятельной подготовки.

Адресовано студентам биологических специальностей.

**УДК 606:57.086.83(076)**

**ББК 28.041.4я73**

**ISBN 978-985-577-963-7**

© Концевая И. И., 2023

© Учреждение образования

«Гомельский государственный университет  
имени Франциска Скорины», 2023

# ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	4
1 Лаборатория: зоны, оборудование, безопасность.....	5
1.1 Планирование.....	5
1.2 Список оборудования лаборатории культивирования тканей...	11
1.3 Оборудование и расходные материалы.....	13
1.4 Требование безопасности.....	20
2 Лаборатория: методы асептики.....	23
2.1 Асептика. Основные понятия.....	23
2.2 Стерилизующие манипуляции.....	28
2.3 Ламинарный шкаф.....	29
2.4 Общие правила соблюдения стерильности.....	33
2.5 Чашки Петри и многолуночные планшеты.....	35
2.6 Приборы и оборудование.....	36
3 Лаборатория клеточной инженерии: протоколы и методики.....	38
3.1 Асептические методы работы в ламинар-боксе.....	38
3.2 Работа на открытой поверхности.....	40
3.3 Манипуляции с чашками и планшетами.....	43
Литература.....	46

## ВВЕДЕНИЕ

Учебный предмет «Основы клеточной инженерии» является одним из фундаментальных биологических дисциплин. Знание основ клеточной инженерии необходимо высококвалифицированному специалисту-биологу для формирования мировоззрения об огромной роли и значимости современных методов работы с клетками прокариот и эукариот. Особую значимость имеет представление биологов о лаборатории культивирования тканей.

Для лабораторной работы студентам предлагаются темы раздела «Введение», «Лаборатория: зоны, оборудование, безопасность», «Лаборатория: методы асептики», «Лаборатория клеточной инженерии: протоколы и методики». Представленный материал способствует расширению и углублению теоретических знаний у студентов.

Материал каждой темы начинается с плана, включает подробное изложение теоретической части и контрольные вопросы, которые можно использовать для текущего контроля усвоения знаний студентами, а также для самоконтроля.

Материалы теоретической части сопровождаются 6 рисунками. Используемый наглядный материал способствует более полному и глубокому пониманию условий работы в лаборатории культивирования тканей, поддержанию стерильности в асептических зонах.

Изложение материала построено в соответствии с программой курса.

Студенты подробно знакомятся с планированием и оборудованием лаборатории культивирования тканей, методами асептики. Студенты, отработавшие материалы, приобретают достаточную теоретическую подготовку и навыки, необходимые в практической работе и при выполнении экспериментальных исследований.

Целью практического руководства является оказание помощи студентам в овладении теоретическими основами по планированию лаборатории культивирования тканей и выработке практических навыков работы с асептическими культурами. Материал издания делает процесс обучения более эффективным и способствует повышению его качества. Практическое руководство может быть использовано на лабораторных занятиях по соответствующим темам курса «Основы клеточной инженерии».

# 1 ЛАБОРАТОРИЯ: ЗОНЫ, ОБОРУДОВАНИЕ, БЕЗОПАСНОСТЬ

- 1.1 Планирование.
- 1.2 Список оборудования лаборатории культивирования тканей.
- 1.3 Оборудование и расходные материалы.
- 1.4 Требование безопасности.

## 1.1 Планирование

Главным требованием, которое характеризует культивирование клеток в отличие от других лабораторных методов, является необходимость поддержания асептических условий. Хотя обычно экономически невыгодно создание и поддержание большой асептической зоны, важно, чтобы все помещения лаборатории, в которой проводятся работы с культурами тканей, были чистыми и не имели сквозного прохода. Появление и внедрение ламинарных боксов (шкафов) значительно облегчило решение этой проблемы и позволило работать с культурами клеток в неспециализированных лабораториях при условии, что размещение оборудования соответствует имеющимся требованиям.

При планировании оборудования помещений нового строящегося здания или уже имеющихся помещений необходимо учитывать **параметры**, которые далее рассмотрим.

### **Вентиляция**

*Равновесие давления.* В идеале культуральные помещения лаборатории должны иметь повышенное атмосферное давление относительно других зон, для того чтобы избежать заноса зараженного воздуха извне. Однако использование материала, выделенного из человеческих тканей, требует создание отрицательного давления в лабораторных помещениях относительно других зон. Чтобы удовлетворить обоим требованиям, предпочтительным является создание буферной зоны с положительным давлением вне культуральных помещений, например, подготовительная зона.

*Ламинарные шкафы.* Внимательно отнеситесь к размещению впускных и выходных систем воздуховода. Предпочтительно располагать ламинарный шкаф так, чтобы поток выходящего воздуха направлялся наружу, обеспечивая лучшую циркуляцию и удаление тепла из помещения (300–500 Вт на каждый ламинарный шкаф). Такое расположение облегчит проведение обеззараживания формальдегидом, если это потребуется.

## **Размещение**

*Количество оборудования.* Количество оборудования в помещениях культуральной лаборатории зависит от количества работающих людей, от того, сколько времени они будут работать еженедельно и какой тип культуры они будут вести.

*Пространство.* Самая большая площадь лаборатории выделяется для манипуляций с культурами, где должны быть размещены ламинарные боксы, счетчики клеток, центрифуги, инкубаторы, микроскопы и некоторые основные реагенты, среды, стеклянная и пластиковая посуда. Вторую по величине площадь следует отдать помещению для мытья, препаративных работ и стерилизации. Третью – комнате для хранения и четвертую – для инкубации. Приблизительное соотношение площади в этих помещениях составляет соответственно 4:2:1:1.

*Асептическая зона.* Помещения для культивирования тканей не должны соприкасаться с комнатами, в которых осуществляются манипуляции с животными. Окна в помещениях для культивирования могут причинять неудобства, приводя к колебаниям температуры в помещении, становясь причиной ультрафиолетовой денатурации сред и инфицированию микроорганизмами.

*Ламинарные шкафы.* Пространство между ламинарными шкафами должно составлять не менее 500 мм для обеспечения свободного доступа к ним и снижения до минимума возможности интерференции воздушных потоков. В это пространство можно поместить передвижную тележку или столик на колесиках, на которых могут располагаться бутылки, флаконы, реактивы, лабораторные журналы.

*Инкубирование.* Обычно большое количество флаконов или флаконы большого объема после герметизации инкубируются в термальной комнате, в то время как открытые чашки и планшеты лучше хранить в СО<sub>2</sub>-инкубаторе с повышенным уровнем влажности.

*Подготовительная зона.* Оборудование для мытья и стерилизации должны быть расположены: 1) близко к асептической зоне, которую они обслуживают; 2) вплотную к стене, выходящей наружу, чтобы обеспечить удаление тепла из печей и потоков пара из паровых вентилях автоклавов.

*Хранение.* Необходимо учитывать масштабы предполагаемого хранения посуды, а также планировать предполагаемый объем работ с клеточными линиями, нуждающимся при хранении в жидком азоте.

## **Реконструирование**

Если предполагается переоборудование существовавших помещений, тщательно выбирайте местоположение, избегая тесноты и ограничения в маневренности.

## **Доступ**

Удостоверьтесь, что полотна дверей открываются достаточно широко, что высота дверей и потолков достаточна для обеспечения установки ламинарного шкафа, инкубаторов, автоклава.

## **Карантин**

Вновь поступившие клеточные линии и биопсийные образцы должны быть исследованы на предмет контаминации микоплазмами и другими возбудителями до того, как они будут переданы в те комнаты, где проводятся работы с основными линиями.

## **Обслуживающие системы и вспомогательные службы**

Комнаты должны быть оборудованы системой фильтрации воздуха, контролирующей давление воздуха.

Оборудование в комнатах должно располагаться так, чтобы не затруднять уборку помещений. Мебель должна прочно прикрепляться к полу или располагаться на подставке или на ножках с тем, чтобы пространство под ней было достаточным для уборки. Пол должен иметь виниловое или иное пылезащитное покрытие, а также небольшое понижение уровня по направлению к стоку в полу, расположенному за дверью комнаты.

Желательно отделить комнаты, непосредственно предназначенные для работы с культурами тканей, от препаративных, моечных и стерилизационных помещений.

Расположите оборудование так, чтобы обеспечить минимум конфликтов среди сотрудников, легкий и близкий доступ к хранилищу, пополняемым запасам без нарушения стерильности в асептической зоне, а также легкое удаление и уничтожение испорченных и загрязненных объектов.

Требуемое обслуживание включает подключение к источникам питания, горючим газам, сжатому воздуху и СО<sub>2</sub> и создание вакуума. Вакуумная установка очень полезна для опорожнения культуральных флаконов. Желательно обеспечить каждое рабочее место индивидуальным перистальтическим насосом или установить один насос на два рабочих места.

Определите количество оборудования, которое должно обеспечиваться бесперебойным электроснабжением. Предпочтительно располагать каждый электрический прибор рядом с розеткой.

**Асептические помещения.** В лаборатории следует обеспечить проведение шести необходимых процессов: стерильных манипуляций, инкубирования, препаративных работ, мытья, стерилизации и хранения. Если используется одна комната, то следует создать «градиент сте-

рильности»: чистая зона для стерильных манипуляций должна быть расположена на одном конце комнаты, наиболее удаленном от дверей, а оборудование для мытья и стерилизации должно быть расположено на другом конце, отделенное подготовительной зоной, инкубационной зоной и хранилищем. Подготовительная зона должна находиться рядом с моечной и стерилизационной зонами, хранилище и инкубаторы должны быть доступны из стерильной зоны.

**Помещение для стерильных манипуляций.** Стерильные процедуры следует проводить в спокойной части культуральной лаборатории, специально выделенной для этих целей (не следует, например, здесь также работать с бактериями либо дрожжами). Через культуральную зону не должно быть сквозного прохода или каких-либо иных действий, связанных с запылением или движением воздуха. Если нет возможности использовать ламинарный шкаф, используйте отдельную комнату или отгороженное пространство для стерильных манипуляций. Рабочая зона в самом простом виде представляет собой поверхность, покрытую ламинатом, преимущественно белую или нейтрально-серую для обеспечения лучшего исследования культур, проведения анатомирования и т. д. Не следует ничего хранить на поверхности этого стола, и все полки над ним должны использоваться только для предметов, связанных со стерильной работой (например, для хранения стерильных пипеток и инструментов).

**Ламинарное оборудование.** Свободностоящие боксы должны располагаться на блокируемых роликах так, чтобы их можно было перемещать при необходимости. Стулья должны быть подходящего веса, с изменяемыми высотой сиденья и углом наклона спинки. Небольшая тележка либо перемещаемый столик должен находиться рядом с каждым ламинарным боксом для материалов, которые могут потребоваться, но постоянно не используются.

**Карантин и изоляция.** Желательно выделить отдельную комнату для карантина и/или изоляции, оснащенную ламинар-боксом II класса безопасности, инкубаторами, морозильником, холодильником, центрифугами, электрической подводкой и другими устройствами.

**Помещения для сервисных служб.** Очень удобно иметь группу помещений, в которых будут располагаться счетчик клеток, микроскопы и т. д. поблизости от зоны стерильных манипуляций, а также разделяющих пространство или отделяющих одну часть комнаты от другой. Сервисные помещения также включают в себя хранилища для стерильной стеклянной посуды, одноразового пластика, пипеток, колпачков и крышек, шприцов и т. д. в закрытых ящиках внизу и открытых полках



над ними. Эти помещения могут также использоваться для другого дополнительного оборудования, например, центрифуги.

### **Инкубация**

Требования к чистоте в зоне инкубации не такие строгие, как для зоны, в которой проводятся стерильные манипуляции, но чистый воздух, низкий уровень физических помех и минимальные перемещения в этой зоне обеспечат более успешное избегание загрязнения пылью и спорами.

Инкубацию можно проводить в отдельных инкубаторах или в термостатируемой (термальной) комнате.

**Термальная комната.** Эта зона не должна иметь каких-то особых конструктивных приспособлений, кроме теплоизоляции, предотвращающей появление холодных участков на стенах.

Отметьте расположение крепежных элементов панелей, чтобы укрепить здесь стеллажи, если они будут использоваться. Используйте разборные полки. Пространство между полками должно иметь высоту не более 500–600 мм, чтобы опоры не позволяли полкам прогибаться. Перфорированные полки устанавливаются на кронштейны, регулируемые по высоте крепления. Полки должны быть плоскими и абсолютно горизонтальными, что исключает падение.

В определенной части термальной комнаты должны быть оборудованы небольшие столы и полки, предпочтительно из нержавеющей стали или твердого пластика. Приспособьте эти столы для установки инвертированного микроскопа, обследуемых флаконов и тетради.

Категорически препятствуйте использованию термальной комнаты для работы с микроорганизмами, такими как бактерии или дрожжи.

Следует отдавать предпочтение лампам накаливания, поскольку флюоресцентные лампы могут вызывать разрушение среды.

Температуру в комнате контролируют с точностью до  $\pm 0,5$  °C в любой момент времени, что зависит от точности и чувствительности контрольной аппаратуры, расположения сенсоров термостата, циркуляции воздуха в комнате, типа теплоизоляции и выделения тепла при работе другого оборудования, находящегося в комнате.

**Нагреватели.** Обогрев обеспечивается путем использования тепловых вентиляторов бытового или промышленного назначения, в зависимости от объемов комнаты. Должна осуществляться максимальная циркуляция воздуха.

**Термостаты.** Термостаты должны быть типа «пропорциональный автоматический регулятор», действовать через реле, обеспечивающее поступление тепла со скоростью, пропорциональной различию между

комнатной температурой и установленным режимом. Предпочтительно использовать датчики (термисторы или термодпары), имеющие высокую чувствительность и высокую температурную проводимость.

*Перегрев.* Проблема нежелательного избыточного поступления тепла может быть результатом: 1) возрастания температуры в окружающей среде в лаборатории в жаркую погоду; 2) увеличения количества тепла, производимого работающим в термальной комнате оборудованием, таким как мешалки, роллерные установки, ламинарные мини-боксы и т. д. Постарайтесь избегать установки теплопроизводящего оборудования.

*Доступ.* Двери должны быть теплоизолированы, легкими и без труда закрываться. Предпочтительны самозакрывающиеся двери. Полезно иметь шлюзную камеру, ведущую в зону культивирования тканей, с полками на обеих сторонах, чтобы культуры могли легко передаваться в комнату.

*Термометр.* Самописец, регистрирующий колебания температуры, необходимо установить в термальной, чтобы регистрационная кривая была видна сотрудникам, работающим в культуральной комнате. Диаграммы должны еженедельно сниматься с самописца.

#### **Дополнительные помещения**

*Помещение для приготовления сред.* Препаративная зона должна быть чистой и тихой, но стерильность не нужна. Пространство рабочего стола должно быть достаточным для размещения весов, рН-метра, для разведения и перемешивания растворов, бутилирования и упаковки различных материалов. Иногда требуется дополнительное оборудование.

*Помещение для мытья посуды.* Лучше располагать моечное и стерилизационное помещения вне культуральной лаборатории, поскольку нежелательно распространение образующихся влажности и тепла. Автоклавы, печи, дистилляторы при возможности располагают в отдельной комнате с мощной системой вентиляции. Моечная зона требует много пространства для замачивания посуды, для расположения моечных машин, если они вам потребуются. На рабочих столах должно быть достаточно места для манипуляций с контейнерами с посудой, сортировки пипеток, упаковки и герметизации оборудования, готового к стерилизации.

Наилучшими являются нержавеющие или полипропиленовые раковины. Раковины должны быть достаточно глубокими и располагаться так, чтобы не приходилось сутулиться при работе.

Тележки или перемещаемые столики часто используются для сбора грязной стеклянной посуды и перераспределения свежестерилизованного оборудования и материалов. Спланируйте место для их размещения.

**Помещения для хранения.** Зона хранения должна располагаться в стерильной рабочей зоне и быть легкодоступна. Холодильники и морозильники установите так, чтобы они были обращены к нестерильной части лаборатории, поскольку двери и компрессорные вентиляторы создают пыль и сквозняки и могут разносить споры грибов. Кроме того, холодильники и морозильники требуют ухода и периодического размораживания, которые лучше проводить отдельно от стерильной рабочей зоны.

Обеспечьте отдельное хранение стерильных и нестерильных объектов, которые должны быть снабжены четкой маркировкой. К ним, например, относятся следующие объекты:

1. Стерильные жидкости при комнатной температуре (растворы солей, вода и т. д.), при 4 °С (среды) и при –20 °С или –70 °С (сыворотки, трипсин, глютамин и т. д.).

2. Стерильная и нестерильная стеклянная посуда, включая бутылки для среды и пипетки.

3. Фильтры и подобные аппараты, стерильные и нестерильные.

4. Перчатки, упаковочные мешки и т. д.

5. Жидкий азот. Сосуды с жидким азотом могут накапливать загрязнения, поэтому следует хранить их в чистой зоне.

## **1.2 Список оборудования лаборатории культивирования тканей**

В случае ограниченного финансирования необходимо определить приоритетные специфические потребности лаборатории культивирования тканей:

– *основные* – оборудование, без которого вы не сможете выполнить работу с достаточной точностью и надежностью;

– *желательные* – оборудование, позволяющее осуществлять культивирование лучше, эффективнее, быстрее или с меньшими затратами труда;

– *полезные* – элементы оборудования, которые улучшают условия работы, уменьшают усталость, обеспечивают проведение более сложного анализа данных или, в целом, делают рабочие помещения более привлекательными.

Потребности в отдельных элементах оборудования часто очень субъективны и являются результатом личных устремлений, наличия в продаже, технических инноваций и давления со стороны коллег. Реальные потребности сформулировать сложнее, но они определяются

объективно типом работы, экономией времени, которое предоставляет это оборудование, более высоким уровнем техники в области асептики, качеством данных, аналитических возможностей и требований к образцам, экономией времени или трудозатрат, количеством людей, которые будут использовать это оборудование, приемлемостью сметы расходов и размеров потенциальной прибыли, а также специальными требованиями, предъявляемыми вашими методиками.

### **Список оборудования лаборатории культивирования тканей**

*Основное оборудование:* ламинарный шкаф, инкубатор (влажный CO<sub>2</sub>-инкубатор), цилиндр 5 %-ного CO<sub>2</sub> для создания газовой атмосферы культивирования, баллоны с жидким CO<sub>2</sub> без сифона (для CO<sub>2</sub>-инкубатора), весы, стерилизатор, холодильник, морозильник, инвертированный микроскоп, раковина для замачивания, раковина для мытья, цилиндры для пипеток, дистиллятор или водоочистительная установка, настольная центрифуга, морозильное оборудование, содержащее жидкий N<sub>2</sub> (~35 л, 1 500–3 000 ампул), сосуд Дьюара с жидким N<sub>2</sub> (~25 л), аппараты для медленного замораживания клеток, магнитная мешалка для суспензионных культур, гемоцитометр, дозаторы, рН-метр.

*Не существенное, но желательное:* счетчик клеток, перистальтический насос, теплая комната (37 °С), самописцы для регистрации температуры в стерилизаторе, автоклаве и горячей комнате, фазово-контрастный, флюоресцентный микроскоп, пломбировщик пипеток, сушка для пипеток, автоматический диспенсер, тележки или перемещаемые столики, высоко- и низкотемпературные сушильные шкафы, роллерные штативы для культур в роллер-сосудах, трубопровод для поступления CO<sub>2</sub> из хранилища, автоматический переключатель баллонов CO<sub>2</sub>.

*Полезные дополнительные приспособления:* моечная машина, низкотемпературный морозильник ( $\leq -70$  °С), измеритель проводимости (кондуктометр), осмометр, заваривающее устройство для полиэтиленовых пакетов (для упаковки стерильного оборудования для длительного хранения), компьютер для ведения регистрационных записей эксплуатации морозильника и база данных по клеточным линиям, счетчик колоний, центрифуга, цифровая камера и монитор для инвертированного микроскопа, видеооборудование для съемок в замедленном режиме, измеритель размеров клеток, портативный прибор для записей температуры для проверки температурного режима в горячей комнате или инкубаторе), дезинтегратор/стерилизатор пластика, аппарат для медленного контролируемого охлаждения клеток (для замораживания клеток), клеточный сортер (активирующий флюоресценцию), конфокальный микроскоп, сцинтилляционный счетчик для микротитрационных планшет, элютриатор.

## 1.3 Оборудование и расходные материалы

### Микроскопы

**Инвертированный микроскоп.** Инвертированный микроскоп применяется для хромосомного анализа, определения контаминации микоплазмами, автордиографии, для оценки состояния культуры, контаминации бактериями и грибами. Актуальным остается регулярное визуальное наблюдение за культурами клеток. Морфологические изменения часто являются первым признаком истощения и старения культуры, а характерные черты микробиологического загрязнения легко распознаются.

Удостоверьтесь, что платформа микроскопа достаточно велика, чтобы поместить большой роллер-флакон между платформой и конденсором в случае, если вам потребуется исследовать такие флаконы. Желательно приобрести прибор с высококачественной оптикой и фазово-контрастным конденсором и объективами с длиннофокусным расстоянием, а также со всем необходимым для CCD-камеры и монитора. Особенно ценно приобрести микроскоп с фототрубкой для цифрового фотографирования или киносъемки. Возрастающее использование зеленого флюоресцентного белка (GFP) для мечения живых клеток означает, что также может понадобиться флюоресцентная оптика.

**Прямой микроскоп.** Прямой микроскоп используется для исследования препаратов автордиографии и хромосомных.

Выбирайте микроскоп с высоким разрешением (Leica, Zeiss или Nikon), со светлопольной оптикой и увеличением объектива до  $\times 100$ ; фазово-контрастным объективом, по крайней мере,  $\times 40$ , но предпочтительно  $\times 100$  и флюоресцентной оптикой с подсветкой и объективами  $\times 40$  и  $\times 100$ . Флюоресцентная оптика будет использоваться для обнаружения микоплазм и исследования флюоресцентных антител. Автоматическая цифровая камера или CCD-оборудование также полезны для фотографической формы регистрации данных или постоянных препаратов.

**Конфокальный микроскоп.** Цитологические исследования флюоресценции меченых клеток при высоком разрешении часто более успешны, если проводятся при помощи конфокального микроскопа. Данные накапливаются, хранятся в цифровом виде и могут быть представлены различными способами, включая создание образа вертикального сечения образца (т. н. Z-сечение), что полезно при осмотре трехмерной культуры.

### Пипетирующие устройства

Пипетирование является одной из наиболее частых повседневных манипуляций с культурами. Хотя резиновая груша или другие простые

приспособления для пипетирования дешевы и просты в использовании, скорость, точность и воспроизводимость результатов значительно повышаются при использовании автоматического пипетирующего устройства (дозатора).

При выборе пипетирующего устройства обратите внимание на вес и удобство в использовании в течение долгого времени. Пипетирующие устройства обычно снабжены фильтром во вкладыше для минимизации переноса загрязнений. Некоторые фильтры одноразовые, некоторые можно использовать повторно после стерилизации.

**Автоматические пипетки.** Эти устройства называются по-разному: дозатор, автоматическая пипетка, пипетман и т. п. Используются для дозирования объемов до 5 мл.

Существуют пипетки с изменяемым объемом и с фиксированным объемом. Сами пипетки обычно не стерилизуют, только пластиковые наконечники этих пипеток нуждаются в стерилизации. Среди ограничений в использовании автоматических пипеток – длина наконечников, определяющая выбор используемых сосудов. Нестерильный корпус пипетки не должен касаться внутренних сторон контейнера.

Предполагается, что внутри автоматическая пипетка стерильна либо не производит перемещения воздуха, достаточного для заражения наконечников. Однако в некоторых ситуациях даже минимальная возможность заражения имеет значение. Например, если вы выполняете серийное субкультивирование ростковой клеточной линии, безопасность и чистота клеток становятся первостепенными, поэтому вы должны использовать либо обычные стеклянные пипетки с ватным фильтром, либо одноразовые пипетки, которые стерильны по всей длине.

Наконечники можно покупать россыпью в больших упаковках, чтобы упаковывать и стерилизовать их в условиях лаборатории. Их можно также покупать уже стерильными и готовыми к использованию.

**Диспенсеры больших объемов.** Когда объем среды в культуральных сосудах превышает 100 мл, для разлива жидкостей можно использовать другие приспособления. Если используется небольшое количество сосудов, удобно применять пипетки объемом 100 мл (BD Biosciences) либо градуированные бутылки или пакеты (Sigma). Если объемы очень большие (около 500 мл и более) либо требуется очень большое количество повторного отмеривания больших объемов, может понадобиться перистальтический насос. Можно разливать большие объемы путем простого переливания через горлышко сосуда, однако такого рода манипуляции ограничиваются однократным действием с предварительным измерением объема переливаемой жидкости.

**Многократное диспенсирование.** Традиционно диспенсер для многократного повторяющегося диспенсирования представляет собой тип оборудования, известный как шприц Корнуэла, в котором жидкость набирается через одно отверстие, а выпускается через другое, при этом используется простой двухходовой клапан. Пружинный поршень шприца делает процедуру полуавтоматической и многократной. Существует неисчислимое количество вариантов такого типа диспенсеров, многие из которых применяются в настоящее время.

**Пипетка с многократно дозируемым объемом.** Диспенсер Perimatic Premier пригоден для многократного диспенсирования и разлива в диапазоне 1–1 000 мл. Если оборудование используется для стерильных операций, следует автоклавировать только доставляющие трубки.

**Автоматизация.** В культивировании тканей было много попыток автоматизировать процесс разлива жидкостей, но только некоторые системы нашли широкое практическое применение.

Появление и широкое применение планшета для микротитрации принесло с собой автоматизацию разлива по ячейкам, учета результатов и т. д. Передаточные устройства, использующие перфорированные лотки или многоканальные пипетки, облегчают пересев из одной плашки в другую. Существуют также миксеры для планшетов и держатели для центрифугирования плашек.

Два вида оборудования заслуживают особого внимания: программируемая одноканальная или мультиканальная автоматическая пипетка Rainin и оборудование для переноса среды и реплицирования плашек Corning Coster Transtar. В технику исследований при помощи культивирования тканей сейчас вводятся роботизированные системы (такие как Packard), что является естественным продолжением микротитрационных систем. Роботы полностью автоматизируют процессы, хотя требуют перепрограммирования при изменении условий аналитических исследований.

**Выбор системы.** Выбор между оборудованием с ручным управлением и сложной автоматизированной системой определяют пять критериев:

- 1) легкость использования и эргономическая эффективность;
- 2) стоимость в соотношении с экономией времени и возрастанием эффективности;
- 3) точность и воспроизводимость в серийных и параллельных партиях;
- 4) легкость стерилизации и действие ее на точность и воспроизводимость;
- 5) механическая, электрическая, химическая, биологическая и радиологическая безопасность.

*Требование безопасности.* Большинство автоматических пипетирующих устройств склонны выпускать жидкость с более высокой скоростью, чем при нормальных ручных манипуляциях.

### **Инкубатор**

Даже при наличии термальной комнаты иногда удобнее иметь дополнительный сухой инкубатор (термостат) с принудительной вентиляцией, температурным контролем с точностью до  $\pm 0,2$  °C и термостатом безопасности, который прекратит нагревание, выключив инкубатор, если температура превысит необходимую. Инкубатор должен быть устойчив к коррозии (например, из нержавеющей стали) и легок для уборки.

Полки инкубатора обычно перфорированы для улучшения циркуляции воздуха. Однако перфорация может привести к неравномерности распределения клеток в монослойных культурах и различию в клеточной плотности в образцах, располагающихся на разных полках. Поэтому при выполнении экспериментов, в которых однородная плотность культуры важна, следует помещать флаконы и чашки на изолирующий кафель или металлический поддон.

**Влажный CO<sub>2</sub>-инкубатор.** CO<sub>2</sub>-инкубаторы более дороги, но простота их использования и постоянный контроль давления CO<sub>2</sub> и температуры компенсируют расходы. Контроль влажности достигается использованием увлажняющих поддонов, а контроль давления CO<sub>2</sub> – при помощи CO<sub>2</sub>-регулирующего оборудования, которое всасывает воздух из инкубатора в отдельную камеру, где определяется концентрация CO<sub>2</sub>, а также вводит чистый CO<sub>2</sub> в инкубатор для пополнения дефицита.

Частая уборка инкубатора, в частности влажного, – важный элемент его эксплуатации, поэтому внутреннее пространство должно легко разбираться, не оставляя недоступных для мытья частей и углов. Вынутые из инкубатора флаконы, чашки либо коробки, содержащие их, при переносе в ламинарный шкаф и дальнейшем использовании должны быть обработаны тампоном с этанолом до открывания.

### **Очиститель воды**

Очищенная вода требуется для прополаскивания стеклянной посуды, растворения порошкообразной среды и разведения концентратов. Для первой цели обычно достаточно деионизованной или обратноосмотически обессоленной воды. Вторая и третья задачи требуют сверхчистой воды (UPW), полученной в результате трех- или четырехступенчатого процесса.

Очищенная вода не должна храниться, ее следует отправлять на повторную очистку, чтобы минимизировать инфицирование водорослями или другими микроорганизмами. Все трубки и резервуары в системе



должны регулярно проверяться (каждые три месяца или около того) на наличие водорослей, промываться гипохлоридом и детергентом (например, Clorox или Chlorox), тщательно промываться проточной водой и ополаскиваться дистиллированной водой перед использованием.

### **Стерилизатор**

Хотя вся стерилизация должна проводиться в автоклаве, пипетки и другое стекло предпочтительно стерилизовать сухим жаром, что позволяет избегать возможности химического загрязнения от парового конденсата и коррозии пеналов для пипеток. Такая стерилизация, однако, требует высокой температуры (160–180 °С) и принудительно вентилируемых печей, чтобы обеспечить прогревание всей массы загруженных материалов.

**Паровой стерилизатор (автоклав).** Самый простой и дешевый способ стерилизации – бытовой автоклав, который создает давление 100 кПа (1 атм) выше атмосферного. Другой вариант – настольный автоклав, имеющий автоматическое программирование и запор безопасности. Напольная модель больших размеров с программируемым таймером, выбором режима вакуумирования до и после стерилизации и температурным регистратором имеет большие возможности, обеспечивает большую вариабельность режима и дает перспективы для соблюдения требования GLP (good laboratory practice, надлежащая лабораторная практика).

«Влажный» цикл (вода, солевые растворы и т. д.) осуществляется без удаления воздуха из камеры до или после стерилизации. Сухие предметы (инструменты, закручивающиеся пробки и т. д.) требуют вакуумирования до начала стерилизации и после стерилизации для удаления пара и обеспечения последующей сушки; в противном случае все предметы останутся влажными, появится опасность заражения из конденсата при сушке.

### **Весы**

Хотя большинство лабораторий получают уже готовые среды для культивирования, иногда дешевле готовить некоторые реагенты на месте. В этом случае вам потребуются весы (электронные весы с автоматическим тарированием – наилучшие), способные взвешивать от 10 мг до 100 г или даже до 1 кг, в зависимости от масштабов работы.

### **Осмометр**

Важным физическим свойством культуральной среды, которое трудно предсказать, является осмолярность. Проводимость определяется концентрацией ионизированных молекул, но в осмолярность могут также вносить вклад неионизированные молекулы. Поэтому осмометр

полезен для проверки приготовленных растворов, регулировки новых композиций питательных веществ или для компенсации осмолярности при добавлении в среду каких-то реагентов. Выбирайте прибор с маленьким объемом анализируемого образца (< 1 мл), поскольку вам может потребоваться измерить осмолярность ценного реагента и точность измерения ( $\pm 10$  мосмол/кг) будет менее важна, чем ценность реагента.

### **Холодильники и морозильники**

Бытовые холодильники и морозильники достаточно эффективны и дешевле, чем специальное оборудование. Большинство реагентов для культивирования тканей хранятся при температуре  $-20$  °С, поэтому сверхглубокое замораживание не требуется.

Хотя использование саморазмораживающихся морозильников нежелательно для некоторых реактивов (ферментов, антибиотиков и пр.), они достаточно полезны для хранения большинства запасов, необходимых для культуры тканей, структура которых позволяет выдержать колебания температуры, а природа менее чувствительна к острому криогенному повреждению. Теоретически сыворотки могут испортиться при колебаниях температуры в саморазмораживающихся морозильниках, но на практике этого не происходит. Многие важные составляющие сыворотки – малые протеины, полипептиды и простые органические и неорганические компоненты – могут быть нечувствительны к криогенному повреждению, в частности, если растворы хранятся в объемах  $> 100$  мл.

**Контейнеры для криоконсервации.** Выбор контейнеров для криоконсервации зависит от размеров и типа системы, которые требуются для ваших нужд.

**Морозильники с управляемым процессом замораживания.** Хотя клетки можно заморозить непосредственно помещением в изолированный шкаф при  $-70$  °С, некоторые клетки требуют различных скоростей охлаждения или сложного программирования скорости охлаждения. Программируемый морозильник (например, Cryomed, Planer) обеспечивает управление процессом замораживания с возможностью изменения параметров замораживания путем впрыскивания жидкого азота в морозильную камеру под контролем заранее установленной программы.

**Низкотемпературный морозильник.** Некоторые препараты или продукты, выделенные из культур, могут потребовать хранения при  $-70$  °С или  $-90$  °С. При этой температуре замерзает вся вода и скорость протекания большинства химических реакций резко ограничивается.

Низкотемпературный морозильник производит большое количество тепла, которое должно отводиться для работы. Такие морозильни-

ки должны располагаться в хорошо вентилируемой или снабженной кондиционером воздуха комнате, чтобы постоянная комнатная температура не превышала 23 °С. Если это невозможно, вложите средства в морозильник, приспособленный для тропических условий.

### **Проточный цитометр**

Этот прибор может анализировать клеточные популяции в соответствии с широким диапазоном параметров, включая светорассеяние, поглощение света и флюоресценцию. Многопараметрический анализ представлен в двух- или трехмерном формате. По типу анализа эти приборы обычно известны как проточные цитометры, но сигналы, которые они порождают, также используют в клеточном сортере с активированной флюоресценцией для выделения индивидуальных клеточных популяций с высокой степенью разрешения.

### **Расходные материалы**

Эта категория материалов включает такие предметы как пипетки, контейнеры для пипеток, пипет-дозаторы с наконечниками, культуральные флаконы, ампулы для замораживания, центрифужные пробирки и стаканы (10–15 мл, 50 мл, 250 мл), одноразовые шприцы и иглы, фильтры различных размеров для стерилизации жидкостей, хирургические перчатки и бумажные полотенца.

**Культуральные сосуды.** Выбор культуральных сосудов определяется: 1) требуемым выходом клеток; 2) типом культуры: монослойная или суспензионная; 3) режимом культивирования.

**Чашки Петри.** Использование чашек Петри может быть достаточно удобно при использовании в эксперименте, не связанном с введением культуры. Чашки Петри полезны для исследования колониеобразования.

**Стерильные контейнеры.** Для иссечения тканей потребуются чашки Петри (9 см), маленькие бутылочки (5 мл), универсальные контейнеры (30 мл) или баночки для хранения (50 мл), пробирки для центрифугирования (15 и 50 мл) и пластиковые пузырьки для консервирования при замораживании в жидком азоте (1 и 2 мл). Удобно использование пузырьков с цветовой маркировкой.

**Шприцы и иглы.** Несмотря на то, что при стандартных манипуляциях использование игл и шприцов не рекомендуется (в связи с опасностью травматизации оператора и проблемами стресса клетки деформацией сдвига), при фильтрации в соединении с фильтрующими насадками шприцы необходимы, а иглы могут потребоваться для экстракции реагентов (лекарственных препаратов) из закупоренных пузырьков.

**Стерилизационные фильтры.** В большинстве лабораторий используются стерилизующие фильтры. Целесообразно иметь в запасе несколько фильтрующих насадок различного размера, например, насадку для шприца (25 мм) и насадку для бутылок или колбу для фильтрования (47 мм).

**Бумажные полотенца и салфетки.** Возле каждого рабочего места или ламинарного шкафа следует обеспечить расположение бумажных полотенец и салфеток.

**Дезинфектанты.** Все биологические материалы после работы предпочтительно отправлять в дезинфицирующий раствор для предупреждения роста в емкостях и для утилизации микроорганизмов, потенциально способных привести к заражению культур. Чаще всего используются дезинфектанты на основе хлора.

## 1.4 Требование безопасности

### Лабораторная безопасность

В дополнение к ежедневным требованиям к безопасности работы, общим для всех рабочих мест, лаборатория клеточных культур характеризуется рядом специфических рисков, связанных с культуральной работой.

### Общая безопасность

Здесь рассматриваются аспекты общей безопасности для лабораторий культивирования тканей и должны использоваться согласно национальным правилам и нормам техники безопасности.

**Оператор.** В сферу ответственности учреждения входит подготовка и переподготовка работников. В обязанности непосредственного руководителя каждого нижестоящего по должности сотрудника входит проверка знаний и правильного выполнения всех действий, а также применения индивидуальных способов защиты, в т. ч. спецодежды.

**Оборудование.** Руководитель подразделения должен назначить ответственного за состояние оборудования, электрическую безопасность и техническую надежность.

**Стеклянные и острые предметы.** Наиболее частыми повреждениями при проведении работ по культуре тканей являются случайные ранения при манипуляциях с разбитым стеклом и шприцевыми иглами.

Избегайте использования шприцов и игл, если только они не требуются для наполнения ампул или отбора жидкости из запаянных пузырьков. Обеспечьте отдельный ящик с жесткими стенками для сбора отработавших колющих предметов и разбитого стекла и не используйте его для общего мусора. Будьте внимательны при установке наконечника или пипетки в пипетирующее устройство либо грушу.

**Химическая токсичность.** Детергенты, которые используются в моечных машинах, обычно представляют собой каустик и могут раздражать кожу, глаза и легкие. По возможности, используйте жидкие детергенты в диспенсирующих устройствах, надевайте перчатки, избегайте процедур, сопровождающихся распылением детергента. Химические дезинфектанты, такие как гипохлорит, должны использоваться с соблюдением всех мер предосторожности, при этом предпочтительны таблетированные формы или жидкие концентраты в емкостях с диспенсерами.

**Газы.** Большинство газов, используемых в культуре тканей ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{N}_2$ ) в малых количествах не оказывают повреждающего действия, но, тем не менее, могут быть опасны при ненадлежащем использовании. Они должны быть заключены в баллоны под давлением, которые затем должны соответствующим образом храниться. Если произойдет значительная утечка газа, то существует риск асфиксии ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ ) или пожара ( $\text{O}_2$ ). В каждом случае необходимы эвакуация и максимальная вентиляция, при интенсивной утечке кислорода вызовите пожарных.

**Жидкий азот.** С жидким азотом связаны три основных риска: обморожение, асфиксия и взрыв. Поскольку температура жидкого азота составляет  $-196\text{ }^\circ\text{C}$ , прямой контакт с жидкостью (при расплескивании и т. д.) или с чем-то другим, особенно металлическим, перед этим подверженным воздействию азота, представляет собой серьезную опасность. Следует надевать перчатки, достаточно толстые для обеспечения изоляции, но достаточно мягкие и гибкие, чтобы не затруднять работы с ампулами. Когда азот переливают или большое количество образцов ставится в морозильник на замораживание, необходимо включать дополнительную вентиляцию. Датчик кислорода и сигнал тревоги должны быть встроены в вентиляционную систему так, чтобы при изменяющемся составе воздуха и снижении уровня кислорода звучал аварийный сигнал и включалась дополнительная вентиляция.

**Ожоги.** Существует три основных источника ожогов: 1) автоклавы, стерилизационные печи и горячие поверхности; 2) манипуляции с предметами, только что вынутыми из автоклавов, печей и горячих плиток; 3) открытое пламя горелки при обжигании предметов. После автоклавирования и стерилизации все предметы необходимо охлаждать. Для манипуляций с горячими предметами следует использовать теплоизолирующие перчатки.

### **Пожаробезопасность**

Возникновение повышенной пожароопасности при культивировании тканей связано с использованием горелки для обжигания предметов и этилового спирта для стерилизации поверхностей и инструментов. Храните спирт в удалении от источников огня; всегда следите за

тем, чтобы спирт для стерилизации инструментов содержался в минимальном объеме в узкогорлой бутылки или колбе, которая не опрокидывается. Спирт для дезинфекции поверхностей не должен использоваться в присутствии открытого пламени. При стерилизации инструментов в спирте с последующим обжиганием их в пламени не возвращайте инструменты обратно в спирт, пока они охвачены огнем.

## **Контрольные вопросы**

1. Перечислите параметры, которые необходимо учитывать при планировании оборудования помещений лаборатории культивирования тканей. Охарактеризуйте эти параметры.

2. Опишите обслуживающие системы и вспомогательные службы при оборудовании комнат лаборатории.

3. Какие процессы следует обеспечить в лаборатории? Охарактеризуйте их подробно.

4. Определите зоны лаборатории культивирования тканей.

5. Охарактеризуйте требования: а) к зоне инкубации; б) термальной комнате.

6. Перечислите и опишите дополнительные помещения лаборатории; поясните их необходимость.

7. Нарисуйте схему расположения основных зон лаборатории при условии: а) размещения в одном помещении; б) размещении в нескольких помещениях.

8. Какие группы оборудования лаборатории выделяют в зависимости от потребностей? Перечислите эти потребности.

9. Охарактеризуйте микроскопы, используемые в лаборатории культивирования тканей.

10. Дайте описание пипетирующих устройств: от примитивных до автоматизированных.

11. Охарактеризуйте сухой инкубатор и влажный CO<sub>2</sub>-инкубатор; укажите их использование при культивировании тканей.

12. Поясните необходимость для лаборатории следующего оборудования: очиститель воды, стерилизаторы, весы, осмометр, проточный цитометр.

13. Дайте характеристику холодильников и морозильников, используемых в лаборатории.

14. Перечислите основные расходные материалы, опишите их.

15. Охарактеризуйте требования к безопасности в лаборатории культивирования тканей.

## 2 ЛАБОРАТОРИЯ: МЕТОДЫ АСЕПТИКИ

- 2.1 Асептика. Основные понятия.
- 2.2 Стерилизующие манипуляции.
- 2.3 Ламинарный шкаф.
- 2.4 Общие правила соблюдения стерильности.
- 2.5 Чашки Петри и многолуночные планшеты.
- 2.6 Приборы и оборудование.

### 2.1 Асептика. Основные понятия

#### **Определение понятий асептика, антисептика, дезинфекция, стерилизация**

*Асептика* – комплекс мероприятий, направленных на предупреждение попадания микробов на (в) какой-либо объект. Создание асептических условий предусматривает дезинфекцию помещений, стерилизацию инструментов и материалов.

*Антисептика* обозначает использование химических веществ, убивающих или подавляющих размножение микроорганизмов, находящихся на коже или слизистых оболочках макроорганизма.

*Дезинфекция* – уничтожение на (в) каком-либо объекте или окружающей среде микробов. Для дезинфекции используют фенол, формалин, спирт, соединения хлора (хлорамин, хлорную известь), йод, сулему, диацид, перекись водорода и т. д., а также термические, лучевые и другие воздействия.

*Стерилизация* – процесс, направленный на полное уничтожение в объекте всех жизнеспособных микроорганизмов и их спор.

Знание и умелое применение методов стерилизации необходимо каждому специалисту в области клеточной инженерии.

#### **Цели асептики**

Заражение микроорганизмами остается главной проблемой культивирования тканей. Бактерии, микоплазмы, дрожжи и споры плесневых грибов попадают в культуру через оператора, из воздуха, с рабочей поверхности, из растворов и многих других источников. Асептические методы работы имеют целью исключить заражение путем установления жестких норм, правил и гарантий того, что каждый сотрудник, использующий оборудование, придерживается их.

Заражение может быть незначительным и ограничиваться одной-двумя культурами, может распространиться на несколько культур и по-

губить весь эксперимент либо окажется обширным и уничтожит все ваши (и даже всей лаборатории) культуры. Перечисленную проблему можно минимизировать, если:

1) при каждой манипуляции с культурами тщательно проверять их визуально, при помощи микроскопа, желательного фазово-контрастного;

2) культуры ведутся без использования антибиотиков, предпочтительно все время, но, по крайней мере, часть времени, для установления скрытого заражения;

3) реактивы проверяются на стерильность (вами или поставщиком) до начала их использования;

4) бутылки со средой и другими реагентами не используются несколькими людьми или для различных клеточных линий;

5) постоянно выполняются стандартные методы стерилизации, уровень стандартов поддерживается на высоком уровне.

Очень важно дублировать визуальный контроль контаминации проведением теста на заражение микоплазмами, особенно если растущая культура выглядит необычно.

#### **Поддержание стерильности**

Соблюдение правил и методов асептики обеспечивает барьер между микроорганизмами окружающей среды вне культуры и чистой, незараженной культурой во флаконе или в чашке. Следовательно, все материалы, которые входят в непосредственный контакт с культурой, должны быть стерильны, а все манипуляции должны проводиться так, чтобы не было прямого контакта между культурой и нестерильным окружением.

Установлено, что барьер стерильности не может быть абсолютным без создания условий, которые значительно затрудняют стандартные манипуляции. Поскольку проверка соблюдения индивидуальных мер предосторожности – очень обширное и затруднительное исследование, все операции адаптируются на основе опыта и здравого смысла исследователя.

Асептические методы представляют собой комбинацию действий, призванных снизить возможность инициирования контаминации. Корреляция между невыполнением какого-то шага и случаями заражения не всегда абсолютна. Оператор может отказаться от выполнения нескольких действий, прежде чем вероятность заражения возрастет так резко, что станет почти неизбежной. К тому же, причина заражения обычно многофакторна, и, следовательно, не существует очевидного простого решения проблемы. Если однажды установленные меры предосторожности постоянно соблюдаются, то случаи заражения имеют место значительно реже и легче обнаруживаются.



Хотя лабораторные условия в настоящее время в большой мере облегчают соблюдение асептики (кондиционирование и фильтрация воздуха, ламинарные шкафы и т. д.), современные лаборатории нередко переполнены персоналом, и оборудование часто используется несколькими людьми. Тем не менее, при жестком соблюдении мер предосторожности не трудно соблюдать стерильность.

### **Стерильная зона**

В отсутствие ламинарного шкафа для стерильных работ следует использовать специальную стерильную комнату. Если это невозможно, выделите тихий угол в лаборатории, с ограниченным доступом и отсутствием выполнения рядом какой-либо другой работы.

В лабораторию клеточной инженерии и молекулярной биологии желательно приобрести бокс биологической безопасности первого класса, который обеспечивает безопасность оператора установки и окружающей среды во избежание перекрестной контаминации (соединения, смешивания, слияния) внутри камеры (рисунок 1).



Рисунок 1 – Бокс биологической безопасности первого класса

При наличии ламинарного шкафа для расположения стерильной зоны следует выбрать место, удаленное от потоков воздуха из дверей, окон и т. д., в этой зоне не должно быть активных перемещений, а также оборудования, которое создает потоки воздуха (центрифуги, холодильники и морозильники и т. д.), кондиционеры должны располагаться так, чтобы потоки воздуха не нарушали работу ламинарного шкафа.

Работа в боксе должна быть ограничена работой с культурами тканей. Зона должна содержаться в чистоте и быть свободной от пыли, а также от оборудования, которое не связано с культивированием тканей.

Все микробиологические процедуры необходимо исключать из асептической зоны работы с культурами клеток и тканей.

Нестерильные манипуляции, такие как манипуляции с животными, отбор проб, окрашивание или экстракция, должны производиться где-то в другом месте.

### **Рабочая поверхность**

Очень важно содержать рабочую поверхность свободной и чистой.

Для этого *следует соблюдать следующие правила:*

- 1) начинайте работу только на совершенно чистой поверхности;
- 2) протрите поверхность тампоном, обильно смоченным 70 %-ным раствором этанола;
- 3) принесите только те предметы, которые вам потребуются для планируемой работы;
- 4) убирайте все, что вам не нужно, протирая поверхность между манипуляциями;
- 5) организуйте ваше рабочее место так, чтобы вы:
  - а) имели свободный доступ ко всем предметам и не тянулись через одни, чтобы достать другие;
  - б) имели для работы большое свободное пространство в центре стола (не только в передней его части). Если вокруг вас будет слишком много оборудования и материалов, возрастет риск контакта наконечника или кончика стерильной пипетки с нестерильной поверхностью. Более того, ламинарный поток в боксе, заставленном посудой и оборудованием, резко нарушается;
  - б) горизонтальный ламинарный поток более устойчив к загромождению разными предметами, но вы и в этом случае должны работать на чистой поверхности, не имеющей препятствий для воздуха между центральной рабочей зоной и HEPA-фильтром;
- 7) организуйте работу так, чтобы все необходимые вам предметы (пипетки, груши для пипетирования, наконечники для автоматических пипеток и др.) находились в поле вашего зрения и не закрывались вашими руками при манипуляции;
- 8) немедленно удаляйте любые загрязнения, протирая затем поверхность 70 %-ным этанолом;
- 9) по окончании работы уберите все, еще раз вымойте и протрите этанолом поверхность.

## **Личная гигиена**

Существуют различные мнения по поводу того, повышает или увеличивает количество микроорганизмов на коже рук частое мытье. Независимо от результатов этой дискуссии, мытье очищает руки и удаляет сухие клетки кожи, которые, в противном случае, могли бы попасть в культуру. Мытье рук также снизит зараженность слабо прикрепленными микроорганизмами, которые представляют наибольший риск для культуры.

Можно надевать хирургические перчатки и периодически протирать их спиртом, но иногда предпочтительной может оказаться работа без перчаток (там, где применение перчаток не обязательно по требованиям биобезопасности), поскольку это позволяет сохранить большую чувствительность пальцев и точность манипуляций.

По требованиям GMP (Good Manufacturing Practice) персоналу требуются шапочки, халаты, накидки и хирургические маски, но в них нет особой необходимости в обычных условиях, в частности, при работе в ламинарном шкафу. Если у вас длинные волосы, завяжите их сзади. При работе в асептической зоне на открытом столе не разговаривайте. Разговоры допустимы при работе в ламинарном шкафу с вертикальным потоком, при наличии стеклянной перегородки между вами и культурой, но и в этом случае следует свести их до минимума. Если у вас простуда, наденьте маску или, еще лучше, не проводите никаких работ с культурами тканей, хотя бы в период выраженного инфекционного процесса.

## **Реагенты и среды**

Реактивы и среды, полученные от промышленного производителя, должны до продажи предварительно подвергаться строгому контролю на стерильность, однако наружная поверхность бутылей и флаконов, в которых они содержатся, не стерильна. Некоторые производители обтягивают бутылки полиэтиленовой пленкой, которая защищает от грязи и позволяет помещать их в водяную баню для размораживания или согревания. Эту пленку следует удалить с бутылки вне ламинарного шкафа. Бутылки после водяной бани или холодильника, освобожденные от упаковки, должны быть обработаны 70 %-ным этанолом.

## **Культуры**

Культуры, полученные из других лабораторий, несут высокий риск, поскольку они могут быть заражены как исходно, так и при транспортировке. Импортированные клеточные линии необходимо всегда подвергать карантину, т. е. все работы с ними производить в отдельном от выращивания других основных культур помещении, а также хранить без использования антибиотиков, пока не будет показано, что поступившие культуры свободны от заражения. Затем их можно присоединить к остальным культурам.

Не стоит постоянно использовать антибиотики, поскольку они могут подавлять, но не уничтожать микроорганизмы, заразившие культуры.

## **2.2 Стерилизующие манипуляции**

### **Протирание поверхностей**

Протирайте все рабочие поверхности 70 %-ным этиловым спиртом до и в процессе работы, в частности после любого разливания, а также по завершении всей работы. Протирайте до начала работы бутылки, флаконы или боксы. Протирание приводит к смыванию надписей, поэтому используйте этанолустойчивый маркер.

### **Закрывание емкостей**

Глубокие закручивающиеся крышечки предпочтительнее пробок, хотя требуется больше внимания хорошему отмыванию детергента из внутренней поверхности резиновых прокладок. При возможности следует использовать полипропиленовые крышки без прокладок. Закручивающиеся колпачки должны быть обернуты фольгой для предохранения горлышка бутылки от отложения пыли, хотя использование глубоких колпачков (например, Duran) делает оборачивание фольгой менее необходимым.

### **Работа с горелкой**

При работе на открытом столе производится обжигание стеклянных пипеток, горлышек бутылей, а также пробок до и после открывания емкостей; вся работа проводится вблизи пламени, в потоках восходящего воздуха, возникающего за счет конвекции. Не оставляйте открытыми бутылки, если вы работаете не в ламинарном шкафу, даже рядом с пламенем. Крышки следует класть на чистую поверхность внутренней стороной вверх и обжигать до того, как ими снова закроют бутылки. Колпачки можно держать в руке во время пипетирования, при этом отпадает необходимость класть их на стол и обжигать.

### **Манипуляции с бутылками и колбами**

При работе на открытом рабочем столе не следует держать открытые бутылки вертикально, наклоняйте их насколько возможно без риска разливания. Штатив для бутылей (MP Biomedical) позволяет удерживать бутылки или флаконы под углом. Культуральные флаконы должны лежать горизонтально, когда их открывают, и затем при манипуляциях следует держать их под углом. Когда вы работаете в ламинарном шкафу, бутылки могут стоять вертикально открытыми, но не допускайте, чтобы ваши руки или другие предметы двигались мимо открытых сосудов или стерильных пипеток, а также воздушных HEPA-фильтров.

## Переливание

Не переливайте жидкости из одной стерильной емкости в другую. Переливание через горлышко допустимо, если та бутылка, из которой выливают, используется однократно, только чтобы перелить все ее содержимое, предварительно измерив объем, в одно приемное устройство или сосуд. Главный риск при переливании через горлышко заключается в появлении жидкостного мостика между внешней стороной бутылки и внутренней.

## 2.3 Ламинарный шкаф

Шкаф ламинарный используется в медицине, фармацевтике, криминалистике, микробиологии, приборостроении, химической промышленности. Выбор определяет назначение, конструкция, классность, исполнение, габариты изделия. Главным преимуществом работы в ламинарном шкафу является то, что рабочая поверхность защищена от пыли и микробного заражения постоянным стабильным потоком фильтрованного воздуха, проходящего над ней.

*Существуют два типа ламинарных потоков:*

- 1) горизонтальный, при котором поток воздуха дует со стороны, противоположной оператору, параллельно рабочей поверхности, и не рециркулирует;
- 2) вертикальный, при котором поток воздуха направляется сверху вниз на рабочую поверхность и либо удаляется, либо рециркулирует (рисунок 2).

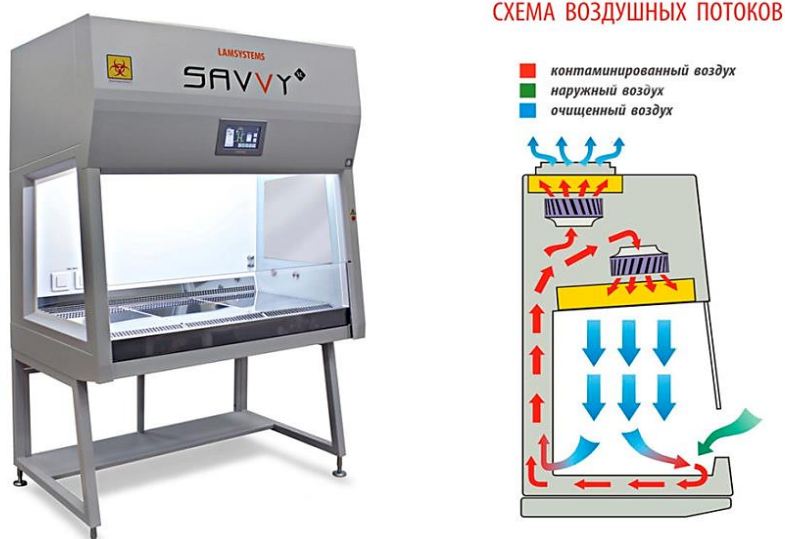


Рисунок 2 – Бокс микробиологической безопасности II класса тип A2: вертикальный воздушный поток

В большинстве ламинарных шкафов 20 % воздуха удаляется и восполняется захватом воздуха перед поверхностью рабочего стола. Такая конфигурация создана для минимизации выхода избытка воздуха с поверхности рабочей зоны. Горизонтальный тип создает более стабильный поток воздуха и лучшую защиту стерильности культур и реагентов; вертикальный тип обеспечивает лучшую защиту для оператора.

На практике большинство лабораторий используют стандартные микробиологические шкафы II класса защиты с вертикальным ламинарным потоком (рисунок 2). Их основное назначение: физическая изоляция (удержание и контролируемое удаление из рабочей зоны) патогенных биологических агентов; предотвращение возможности заражения персонала и контаминации воздуха рабочего помещения и окружающей среды; минимизация риска заражения и перекрестной контаминации продукта.

Если оператор имеет дело с известными возбудителями человека, приемлем бокс для работы с возбудителями III группы патогенности.

**Основные материалы и детали бокса биологической защиты:** рабочая зона лабораторной мебели изготовлена из высококачественной конструкционной стали – материал нержавеющей; боковые панели, передняя стенка выполнены из закаленного стекла, толщина которого зависит от модели конструктивных особенностей; внешний корпус выполнен из холоднокатаной стали, обработан эпоксидным или порошковым покрытием; комплектация оборудования – система фильтров HEPA (High Efficiently Particulate Air) (high-efficiency particulate air высокоэффективный распыленный воздух). Такие фильтры удаляют 99,95 % частиц размерами от 0,3 мкм, система контроля скорости потока; управление – микропроцессорная система, ЖК дисплей, контрольный центр, таймер времени работы ламп; безопасность – система защиты двигателя вентилятора, блокирующие устройства, звуковая аварийная сигнализация, датчики фильтров; визуализация – лампы дневного света, ультрафиолетовые лампы, индикаторы жидкокристаллического экрана.

При повседневной работе проверять качество фильтров необходимо примерно каждые 3–6 месяцев. Первичный фильтр для ламинарного шкафа с горизонтальным потоком можно снять (после выключения вентилятора) и вымыть при помощи мыла и воды. Встроенные первичные фильтры в ламинарных шкафах II класса биологической опасности и боксах с вертикальным потоком могут быть заменены только инженером. Эти фильтры необходимо сжечь или автоклавировать и заменить на новые.

Каждые 6 месяцев HEPA-фильтр над рабочей поверхностью должен проверяться на предмет стабильности и однородности воздушного потока, а также дефектов и прорывов, которые определяются по местному возрастанию воздушного потока и увеличению подсчитанных частиц. Мониторинг, как правило, проводят инженеры-профессионалы на

контрактной основе. В ламинарных шкафах II класса биологической опасности также необходимо производить периодическую замену HEPA-фильтра при снижении качества очищаемого воздуха. Это также должно производиться профессиональным инженером, с соответствующей подготовкой, включающей навыки упаковки и утилизации отработанных фильтров, замены и установки новых.

Если ламинарный шкаф предназначен для работы с объектами, имеющими потенциальную биологическую опасность, до замены фильтра боксы должны быть закрыты и обработаны дезинфектантом.

Регулярная проверка рабочей поверхности должна проводиться еженедельно при любом разбрызгивании и разливании сред и реагентов, рабочая зона немедленно вытирается и стерилизуется 5 %-ным феноловым дезинфектантом или 70 %-ным этанолом. Иногда разлив или разбрызгивание остаются незамеченными, поэтому необходимо периодически проверять чистоту рабочей поверхности. Тампоны, щетки, тканевые салфетки, перчатки, попавшие под рабочую поверхность, при уборке могут попасть на первичный фильтр и нарушить поток воздуха, поэтому будьте внимательны и периодически проверяйте первичный фильтр.

Предпочтительна непрерывная работа ламинарного шкафа, поскольку она позволяет сохранять рабочую зону чистой: любое разливание на фильтре или на рабочей поверхности быстро высыхает в стерильном воздухе и снижается возможность роста микроорганизмов.

Ультрафиолетовый свет также используется для стерилизации воздуха и обработки рабочей поверхности в перерывах между работами. Эффективность ультрафиолетовой обработки несомненна, поскольку свет проникает в щели, куда не может проникнуть этанол или другие дезинфицирующие агенты. Ультрафиолетовая обработка несет в себе радиационную опасность, в частности для глаз, а также может привести к образованию трещин на пластиковых панелях через 6–12 месяцев при одновременном использовании этанола.

#### **Место расположения оборудования**

Ламинарные шкафы с открытым фронтальным окном очень чувствительны к минимальным перемещениям воздушных потоков в комнате, поэтому оборудование необходимо размещать вдали от сквозняков и путей активного перемещения персонала. Между камерой и стеной необходимо оставлять зазор не менее 30 см для удобства технического обслуживания. Пространство над крышкой используется для замены фильтра и регулирования воздушного потока. Минимальное расстояние между верхней плоскостью шкафа и потолком – 35 см.

#### **Техника работы оператора**

К работе с боксами биологической безопасности допускаются работники, прошедшие специальную подготовку. Персонал должен ис-

пользовать перчатки и спецодежду (рисунок 3), степень защиты которой соответствует уровню биобезопасности исследуемой среды. В ходе работы особое значение имеет сохранение целостности воздушных потоков. Движения рук оператора должны быть максимально аккуратными, медленными. Все приборы, инструменты, реагенты, образцы размещаются ближе к задней стенке до включения оборудования. Манипуляции в рабочей зоне проводятся спустя минуту после погружения рук в камеру – это время требуется для восстановления целостности воздушной завесы. Внутри камеры допускается устанавливать ультрафиолетовую лампу. Во время работы важно следить за тем, чтобы не образовалось препятствие для проникновения воздуха через воздухозаборную решетку. Все лишнее необходимо убрать из бокса (рисунок 3).

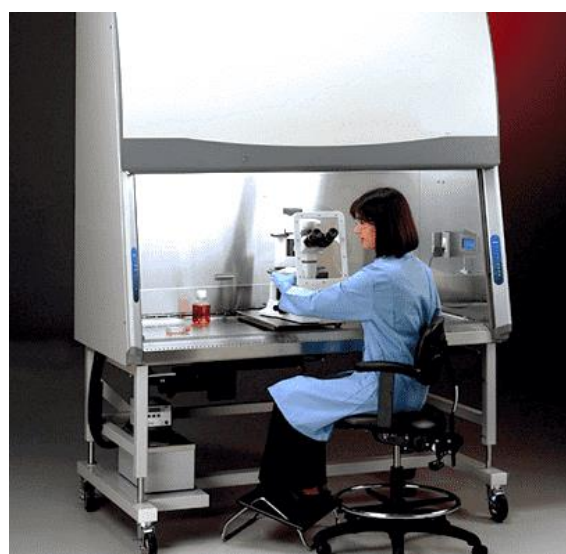
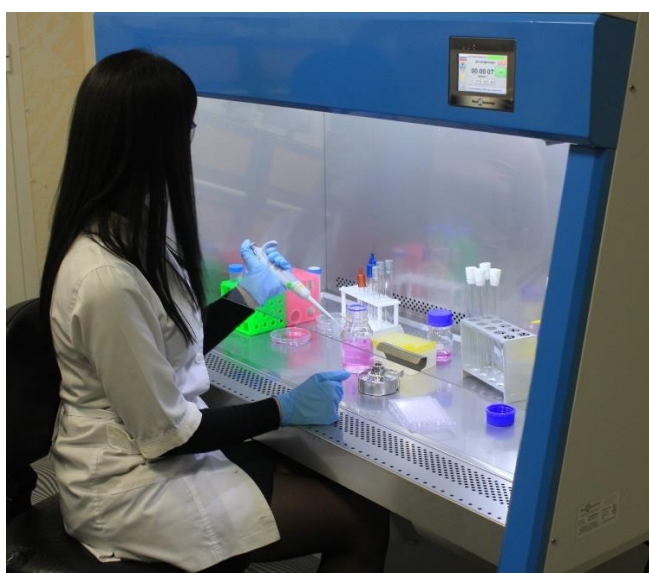


Рисунок 3 – Рабочее место оператора в ламинар-боксе: разные варианты размещения приборов, инструментов, реагентов, образцов



## **Требование безопасности**

Если используется ультрафиолет, следует надевать защитные очки и закрывать все участки кожи, подвергающиеся его воздействию.

**Работа с ламинарным боксом позволяет выполнять следующие задачи:** обеспечивает оптимальные условия для проведения лабораторных опытов, диагностики, анализов; защищает продукты, рабочие материалы от заражения; препятствует вредному воздействию на оператора и ликвидируют выбросы в окружающую среду; позволяет работать с микрофлорой, микроорганизмами.

Применение ламинарных укрытий отличается разнообразием. Рассмотрим некоторые примеры:

1. **Выращивание клеток.** Такие биотехнологии используются для создания антител, искусственных гормонов, ферментов. Оборудование необходимо в тканевой инженерии, для производства вакцин.

2. **Приготовление лекарств.** Многие препараты должны делаться в стерильных условиях, поэтому ламинары стали важной частью оснащения фармацевтических заводов. Боксы позволяют работать с опасными веществами, вирусами.

3. **Сборка электроники.** Обеспыленная зона с определенной влажностью, температурой и давлением важна для приборостроения, производства вычислительной техники.

4. **Оптика и лазерные технологии.** Использование лазерных лучей исключает наличие любых загрязнений. Специальные условия необходимы и для изготовления оптоволокна.

5. **Молекулярная биология.** Анализируется ДНК, производятся диагностика, клонирование и другие воздействия на молекулярном уровне.

6. **Пищевая промышленность.** Приготовление некоторых продуктов требует специфических условий, включающих стерильность.

7. **Криминалистика.** В исследовательских лабораториях анализируются ДНК-материалы и проводятся другие работы.

Использовать лабораторное оборудование для микробиологических исследований можно строго в соответствии с установленными санитарными нормами.

## **2.4 Общие правила соблюдения стерильности**

Суть правил соблюдения стерильности во многом основывается на принципах стандартной лабораторной практики (GLP). Поверхность рабочего места должна быть ровной и чистой, на ней должны находиться

лишь те предметы, которые вам необходимы для работы в настоящее время. Приготовьте все необходимое заранее, чтобы культуры вынимались из инкубатора на менее продолжительный срок, все манипуляции должны производиться так быстро, как это возможно, без препятствий и помех. Предметы на столе должны располагаться в зоне прямой видимости. Избегайте случайного контакта стерильных и нестерильных поверхностей. После работы оставляйте рабочее место чистым.

### **Ламинарный шкаф**

*Следует:* протирать до и после работы; использовать минимум приборов, оборудования и материалов на рабочей поверхности; располагать материалы и оборудование по линии прямой видимости.

*Не следует:* засорять ламинарный шкаф; оставлять ламинарный шкаф в беспорядке.

### **Контроль заражения и действия при заражении**

*Следует:* работать без антибиотиков; регулярно проверять культуру, визуально невооруженным глазом и с помощью микроскопа; упаковывать чашки Петри и многолуночные планшеты в прозрачные коробки.

*Не следует:* открывать зараженные флаконы в зоне работ с культурами; пересевать инфицированные клетки; оставлять заражение без внимания.

### **Импорт новых клеточных линий**

*Следует:* получать из проверенных, заслуживающих доверие источников; выдерживать карантин для новых линий; проверить на микоплазмы; подтвердить происхождение клеток; вести записи.

*Не следует:* получать из источника, отдаленного от первоначального производителя культуры.

### **Экспорт клеточных линий**

*Следует:* проверить на микоплазмы; подтвердить происхождение; послать сопроводительные документы; использовать тройную упаковку.

*Не следует:* посылать зараженные клеточные линии.

### **Стеклянная посуда**

*Следует:* хранить запасы отдельно.

*Не следует:* использовать ту же посуду для процедур, не связанных с культивированием тканей.

### **Флаконы**

*Следует:* наклонять флаконы при пипетировании; заполнять газом при необходимости  $CO_2$ -инкубирования; быстро провентилировать при необходимости штабелирования.

*Не следует:* открывать слишком много флаконов одновременно; инкубировать в  $CO_2$ -инкубаторе, если нет газопроницаемой крышки; укладывать в слишком высокие штабели.

## **Среды и реагенты**

*Следует:* протирать бутылки до помещения их в ламинарный шкаф; открывать только в боксе.

*Не следует:* использовать для нескольких клеточных линий; делить с другими сотрудниками; переливать через край.

## **Пипетирование**

*Следует:* использовать пипетки с ватными пробками; менять пипетку, если она грязная или ватная пробка стала влажной; использовать пластик для агара; выливать жидкости в стакан для отходов при помощи воронки.

*Не следует:* использовать одну и ту же пипетку для разных клеточных линий; делить с другими людьми; создавать аэрозоль; слишком заполнять цилиндры с обезвреживающим раствором.

## **2.5 Чашки Петри и многолуночные планшеты**

Возможность контаминации чашек Петри и многолуночных планшетов повышается в связи со следующими факторами, такими как:

- наличие большой площади поверхности, когда емкости открыта;
- возникновение риска прикосновения к краю чашки при манипуляциях с открытой чашкой;
- риск переноса заражения с рабочей поверхности на чашку через крышку, если крышку кладут вниз краем;
- среда, заполняющая промежуток между крышкой и чашкой в связи с явлением капиллярности, если чашку наклоняли или встряхнули при переноске в инкубатор;
- влажная атмосфера CO<sub>2</sub> инкубатора повышает риск заражения.

### ***Соблюдение следующих правил минимизирует риск заражения***

1. Не оставляйте чашки открытыми на продолжительный период, тщательно следите за открытыми чашками и крышками.

2. При передвижении чашек по рабочей поверхности и перемещении их в инкубатор или из него старайтесь не наклонять и не трясти чашки, чтобы избежать попадания среды на края чашки или крышки и предотвращения заполнения промежутка между крышкой и чашкой, ведущего к контаминации вследствие явления капиллярности. Если среда попала в это пространство, снимите крышку, тщательно удалите среду на наружной поверхности края ватным тампоном, смоченным 70 %-ным этанолом, замените крышку на новую (убедитесь, что маркировка располагается на дне чашки!)

3. При инкубации помещайте чашки и крышки в прозрачную пластиковую коробку, протрите коробку этанолом, когда вынимаете из инкубатора.

## **2.6 Приборы и оборудование**

Все приборы, используемые в технике культуры ткани, необходимо регулярно очищать для избежания накопления пыли и предупреждения микробного роста при случайном разбрызгивании. Заменяемые части, такие как газовые баллоны, должны также протираться перед внесением их в зону работы с культурами тканей. Во время работы следует избегать перемещения приборов и оборудования по асептической зоне.

### **Инкубаторы**

Влажные инкубаторы являются основным источником заражения. Их следует регулярно мыть через определенные промежутки времени (еженедельно или ежемесячно, в зависимости от уровня зараженности атмосферы и частоты использования) с удалением всего содержимого, включая подносы и полки, мытьем внутренней поверхности с нетоксичным детергентом. Следы детергента удаляют 70 %-ным этанолом, которому затем надо дать полностью испариться до установки полок и подносов.

Для предотвращения роста грибов фунгицидный раствор (например, 1 % сульфат меди) можно поместить в увлажняющий лоток на дно инкубатора, но эффективность фунгицидного действия ограничена поверхностями, с которыми осуществляется контакт и такая процедура не может заменить регулярной уборки.

### **Коробки для влажного инкубатора**

Когда проблемы заражения во влажном инкубаторе возникают часто, можно помещать чашки Петри, планшеты и флаконы с ослабленными крышками в пластиковые коробки (или пакеты). Коробки следует протереть до использования, внутри и снаружи, и высушить в стерильном воздухе.

Когда коробки будут вынуты из инкубатора, их также обрабатывают 70 %-ным этанолом до того, как открыть или внести в рабочую зону. Затем чашки аккуратно вынимают, внутренность коробки обрабатывают перед повторным использованием.

### **Культивирование в атмосфере CO<sub>2</sub>**

Общепринятой практикой является ослабление крышек на флаконах при помещении их в CO<sub>2</sub>-инкубатор для проникновения газа внутрь флакона и достижения газового равновесия, однако этот прием повышает риск контаминации. Некоторые производители предлагают флаконы с га-

зопроницаемыми крышечками, обеспечивающими быстрое достижение газового равновесия в атмосфере CO<sub>2</sub> без риска контаминации. Альтернативным выходом является заполнение флаконов стерильной смесью газов и герметичное закрывание их. Это позволяет избежать использования газовых инкубаторов для флаконов и обеспечивает единообразие и быстрое достижение нужного состава газовой среды.

## Контрольные вопросы

1. Дайте определение понятиям «асептика», «антисептика», «дезинфекция», «стерилизация».
2. Поясните цели асептики для лаборатории культивирования тканей.
3. Перечислите условия для минимизации контаминации и поддержания стерильности тканевых культур.
4. Опишите стерильную зону лаборатории. Приведите в качестве примера три самые простые способы организации стерильной зоны, перечислите необходимое для этого оборудование.
5. Перечислите правила содержания рабочей стерильной поверхности.
6. Охарактеризуйте личную гигиену оператора.
7. Поясните условия работы с реагентами и средами, импортированными культурами.
8. Охарактеризуйте стерилизующие манипуляции согласно п. 2.2.
9. Какие два типа ламинарных потоков существуют и как они работают? Их назначение.
10. Зарисуйте в тетради схему вертикального воздушного потока в ламинар-боксе (рисунок 2).
11. Опишите основные материалы и детали ламинар-бокса.
12. Охарактеризуйте место расположения: а) одного ламинар-бокса в помещении; б) двух-трех ламинар-боксов в одном помещении.
13. Поясните принципы расположения приборов, инструментов, реагентов, образцов и т. д. на рабочей стерильной поверхности.
14. Опишите технику работы оператора в стерильной зоне.
15. Рассмотрите рисунок 3 по разным вариантам размещения приборов, инструментов, реагентов, образцов и т. д. на рабочей стерильной поверхности; укажите плюсы и минусы такого расположения при работе оператора.
16. Перечислите и охарактеризуйте задачи, которые позволяют выполнить работы в ламинар-боксах.

17. Охарактеризуйте общие правила соблюдения стерильности.

18. Опишите случаи возможности контаминации чашек Петри, многолуночных планшетов, иного оборудования и приборов. Поясните соблюдение каких правил минимизирует риск их инфицирования.

19. Охарактеризуйте следующие требования к безопасности ламинарного шкафа: размеры рабочей поверхности; устройство рабочей поверхности (цельная, состоит из секций; перфорированная или нет; материал поверхности); шумность; скорость воздушного потока; уборка рабочей зоны; удобство для работы и сидения оператора; наличие/отсутствие переднего экрана.

### **3 ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ: ПРОТОКОЛЫ И МЕТОДИКИ**

3.1 Асептические методы работы в ламинар-боксе.

3.2 Работа на открытой поверхности.

3.3 Манипуляции с чашками и планшетами.

#### **3.1 Асептические методы работы в ламинар-боксе**

##### **Схема**

Очистите и протрите рабочую зону, принесите бутылки, пипетки и т. д. Сначала выполните подготовительные действия (приготовление среды и реактивов), затем культуральную часть работы. В конце работы очистите и вытрите рабочую поверхность 70 %-ным этанолом.

##### **Материалы**

###### *Стерильные:*

- среда Игла 1 × МЕМ с солями Хэнкса и  $\text{HCO}_3$ , без антибиотиков;
- набор пипеток-дозаторов с изменяемым объемом: 1 мл, 5 мл, 10 мл, и 25 мл, наконечники к пипеткам;
- культуральные флаконы 25 см<sup>2</sup> – 10 шт.

###### *Нестерильные:*

- пипетирующее устройство или груша;
- 70 %-ный этанол в пульверизаторе;
- не оставляющие ворса салфетки или щетки;
- абсорбирующие бумажные салфетки;
- цилиндр для пипеток, содержащий дезинфицирующий раствор;

- ножницы;
- маркер с этанол-устойчивыми чернилами;
- ручка, тетрадь, протоколы и т. д.

### **Протокол**

1. Протрите рабочую поверхность и все другие поверхности внутри ламинар-бокса, включая внутреннюю часть переднего экрана 70 %-ным этанолом при помощи салфеток или щетки.

2. Принесите среду и т. д. из холодного хранилища, на водяной бане или иным способом разморозьте принесенные из морозильника реактивы, протрите бутылки спиртом, разместите те, что вам потребуются сначала, в ламинарном шкафу.

3. Соберите пипетки и разместите на штативе с одной стороны рабочего места в доступном месте.

4. Соберите другую стеклянную и пластиковую посуду, инструменты и т. д. и поместите поблизости (на тележке или соседнем столе).

5. Ослабьте, но не снимайте крышки всех бутылок, которые будут использованы.

6. Снимите крышку с тех бутылок, куда вы будете наливать жидкость, откуда будете переносить ее пипеткой. Поместите крышки от бутылок открытой стороной на самом высоком месте рабочей поверхности в дальней части ламинар-бокса за бутылками так, чтобы ваша рука не проходила над ней во время манипуляций. Если вы одновременно используете только одну бутылку и открываете только одну крышку, вы можете после открывания бутылки удерживать крышку в руке между мизинцем и ладонью и после пипетирования снова надевать ее на бутылку.

7. Возьмите пипетку (рисунок 4). Пипетка в пипетирующем устройстве или груше должна располагаться в правильном направлении и под правильным углом в вашей руке. Проследите, чтобы кончик наконечника пипетки не касался внешней стороны бутылки или внутренней поверхности ламинарного бокса. Всегда следите, где находится пипетка. Выполнение этой процедуры нелегко, когда вы овладеваете методами асептики, но это важное требование для успешной работы и со временем вы приобретете опыт.

8. Наклоните бутылку со средой по направлению к пипетке так, чтобы ваша рука не проходила над открытым горлышком и, используя пипетку 5 мл, отберите 5 мл среды и перенесите ее в 25 см<sup>3</sup> флакон, также наклоненный.

9. Повторите еще 4 раза, заполнив 4 флакона. Когда разливаете жидкость в несколько бутылей или флаконов, их можно положить горизонтально на бок. Убедитесь, что флаконы лежат надежно и ваша рука не проходит над открытыми горлышками.



Рисунок 4 – Рабочее место оператора в ламинар-боксе с вертикальным ламинарным воздушным потоком

10. Сбросьте наконечник с пипетки в цилиндр для использованных пипеток, содержащий дезинфицирующий раствор. Наконечники могут быть автоклавированы.

11. Заверните крышки на флаконы.

12. Повторите процедуру, используя пипетку 25 мл для переноса 5 мл в каждый из 5 флаконов.

13. Закройте крышки на бутылках со средой и флаконах. Бутылки могут быть открыты, пока вы работаете, но всегда должны быть закрыты, прежде чем вы покинете место у ламинарного бокса по какой-то причине.

*Замечание:* в ламинарном шкафу с вертикальным потоком не работайте непосредственно над открытым сосудом. При горизонтальном потоке не работайте за открытым сосудом.

14. По завершении операции плотно заверните все крышки, уберите все растворы и материалы, которые больше не требуются, с рабочей поверхности.

## 3.2 Работа на открытой поверхности

### Схема

Очистите и протрите рабочую зону, принесите бутылки, пипетки и т. д. Сначала выполните подготовительные действия. Обожгите в пламени, если необходимо, используемые предметы, сохраняйте рабочую поверхность свободной и чистой. В конце работы очистите и вытрите рабочую поверхность 70 %-ным этанолом.



## Материалы

### *Стерильные:*

- среда Игла 1×МЕМ с солями Хэнкса и  $\text{HCO}_3$ , без антибиотиков;
- набор пипеток-дозаторов с изменяемым объемом: 1 мл, 5 мл, 10 мл, и 25 мл, наконечники к пипеткам;
- культуральные флаконы.

### *Нестерильные:*

- пипетирующее устройство или груша;
- 70 %-ный этанол в пульверизаторе;
- не оставляющие ворса салфетки или щетки;
- абсорбирующие бумажные салфетки;
- цилиндр для пипеток, содержащий дезинфицирующий раствор;
- бунзеновская горелка (или спиртовка) и зажигалка;
- ножницы;
- маркер с этанол-устойчивыми чернилами;
- ручка, тетрадь, протоколы и т. д.

### Протокол (рисунок 5).



Рисунок 5 – Рабочее место оператора на открытой поверхности

1. Протрите рабочую поверхность стола 70 %-ным этанолом.
2. Принесите среду и т. д. из холодного хранилища, на водяной бане или иным способом разморозьте принесенные из морозильника реактивы, протрите бутылки спиртом, разместите то, что вам потребуется сначала, на рабочем столе, оставив остальное поблизости в стороне.
3. Соберите пипетки и разместите на штативе с одной стороны рабочего места в доступном месте.
4. Соберите другую стеклянную и пластиковую посуду, инструменты и т. д. и поместите поблизости (на тележке или соседнем столе).

5. Обожгите горлышки бутылок быстрым движением, повернув их в пламени горелки и ослабьте крышки.

6. Выберите пипетку. Пипетка в пипетирующем устройстве или груше должна располагаться в правильном направлении и под правильным углом в вашей руке. Проследите, чтобы кончик наконечника пипетки не касался внешней стороны бутылки или внутренней поверхности ламинарного бокса. Всегда следите, где находится пипетка. Выполнение этой процедуры нелегко, когда вы овладеваете методами асептики, но это важное требование для успешной работы и со временем вы приобретете опыт.

7. Если вы прикоснулись кончиком носика пипетки к нестерильной поверхности или могли контаминировать ее каким-то иным образом, сбросьте ее в дезинфицирующий раствор для повторного мытья либо последующего автоклавирования, не пытайтесь с ней работать.

*Требование безопасности.* Если вы вставляете наконечник в пипетку или пипетирующее устройство, обратите внимание на то, чтобы не прилагать слишком больших усилий: наконечник пипетки может сломаться при давлении.

Не обжигайте в пламени пластиковые пипетки.

8. Удерживая пипетку в направлении от вас, удалите крышку с первой бутылки, зажав ее между мизинцем и ладонью. Если вы разливаете жидкость в несколько бутылей или флаконов, их можно положить горизонтально на бок. Работая с бутылками, наклоните их так, чтобы ваша рука не проходила над открытым горлышком. Если у вас будут трудности с удерживанием крышки при пипетировании, разместите ее на столе рядом с горелкой открытой стороной вниз. Если бутылки должны оставаться в открытом положении, их следует наклонить так близко к горизонтальному положению, как это возможно, на столе или опоре для бутылок.

9. Обожгите горлышко бутылки.

10. Наклоните бутылку со средой по направлению к пипетке так, чтобы ваша рука не проходила над открытым горлышком.

11. Отберите необходимое количество жидкости и удерживайте ее в пипетке.

12. Обожгите горлышко бутылки и закройте крышку.

13. Снимите крышку с оставшейся бутылки, обожгите горлышко, внесите жидкость, обожгите горлышко, закройте крышку.

14. Плотно заверните все крышки по окончании работы.

15. По завершении операции уберите с рабочей поверхности основные растворы, оставив только те бутылки, которые потребуются.

### 3.3 Манипуляции с чашками и планшетами

#### Схема

Очистите и протрите рабочую зону, принесите бутылки, пипетки и т. д. Сначала выполните подготовительные действия (приготовление среды и реактивов), затем культуральную часть работы. В конце работы очистите и вытрите рабочую поверхность 70 %-ным этанолом.

#### Материалы

##### *Стерильные:*

- среда Игла 1×МЕМ с солями Хэнкса и  $\text{HCO}_3$ , без антибиотиков;
- набор пипеток-дозаторов с изменяемым объемом: 1 мл, 5 мл, 10 мл, и 25 мл, наконечники к пипеткам;
- культуральные флаконы.

##### *Нестерильные:*

- пипетирующее устройство или груша;
- 70 %-ный этанол в пульверизаторе;
- не оставляющие ворса салфетки или щетки;
- абсорбирующие бумажные салфетки;
- цилиндр для пипеток, содержащий воду и дезинфицирующее вещество;
- бунзеновская горелка (или спиртовка) и зажигалка;
- аспирационный насос;
- ножницы;
- маркер с этанол-устойчивыми чернилами;
- ручка, тетрадь, протоколы и т. д.

#### Протокол (рисунок 6).



Рисунок 6 – Манипуляции с чашками (а) и планшетами (б) в ламинар-боксе

1. Удалите среду из чашек. Алгоритм действий для выполнения этой процедуры:

- сложите в штабель чашки/планшеты на одной стороне рабочей зоны;

- включите аспирационный насос;

- выберите пипетку без ватной пробки, вставьте в аспирационную линию;

- поместите первую чашку или планшет в центр рабочей зоны;

- удалите крышку и поместите за чашкой открытой стороной вверх;

- зажмите чашку в ладони так близко к основанию, как можно, стараясь не касаться края чашки, и следите за тем, чтобы рука не проходила над открытой чашкой или крышкой. При наличии некоторой практики, возможно, вы сможете удалять жидкость из чашки, не открывая крышку полностью. Этот метод быстрее и безопаснее, чем описанный выше;

- наклоните чашку и удалите среду. Если нет аспирационного насоса, перенесите среду пипеткой и слейте в стакан с отходами через воронку;

- закройте крышку;

- поставьте чашку на другую сторону рабочей зоны отдельно от необработанных чашек, формируя новый штабель;

- повторите процедуру с остальными чашками или планшетами;

- сбросьте пипетку в цилиндр и выключите насос.

2. Добавьте среду или клетки. Алгоритм действий для выполнения этой процедуры:

- установите в необходимом месте нужные бутылки и ослабьте крышку на той, которую будут использовать;

- поставьте первую чашку в центр рабочей зоны;

- снимите крышку с бутылки и заполните пипетку;

- снимите крышку с чашки и поместите за чашкой;

- добавьте среду в чашку, направляя поток как можно ближе к основанию вдоль по боковой стороне чашки;

- закройте крышку;

- переместите чашку в ту сторону, где чашки стояли первоначально, внимательно следя за тем, чтобы среда не попадала на край и не заполняла пространство между краем чашки и крышкой;

- повторите манипуляцию со второй чашкой и т. д.;

- сбросьте пипетку в цилиндр;

- при определенной практике вы, возможно, научитесь поднимать крышку чашки и добавлять среду, не открывая крышку полностью.

*Замечание:* Если вы добавляете среду в чашку или планшет с клетками, бутылка со средой должна быть подписана маркировкой используемой клеточной линии и не использоваться для других линий.

## **Контрольные вопросы**

1. Охарактеризуйте общую схему работы в ламинар-боксе с вертикальным воздушным потоком.
2. Поясните назначение каждого перечисленного из материалов (стерильных и нестерильных) при работе в ламинар-боксе с культурой тканей.
3. Распишите алгоритм работы в ламинар-боксе с вертикальным воздушным потоком.
4. Опишите правила работы с пипетками в стерильной зоне.
5. Охарактеризуйте правила работы с сосудами, содержащими жидкие среды или иные реагенты.
6. Проанализируйте работу в вертикальном ламинарном потоке и работу на открытой поверхности; укажите отличия в работе.
7. Опишите манипуляции с чашками Петри и планшетами.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Белобородов, В. А. Асептика, антисептика : учеб. пособие / В. А. Белобородов, Е. А. Кельчевская. – Иркутск : ИГМУ, 2022. – 50 с.
2. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии / Л. Б. Борисов [и др.]. – М. : Медицина, 1984. – 256 с.
3. Вечканов, Е. М. Основы клеточной инженерии : учеб. пособие / Е. М. Вечканов, И. А. Сорокина. – Ростов-на-Дону : Юфу, 2012. – 136 с.
4. Желдакова, Р. А. Выделение и идентификация микроорганизмов : учеб.-метод. пособие / Р. А. Желдакова. – Минск : БГУ, 2003. – 36 с.
5. Клеточные технологии. Методы асептики [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://celltechnology.ru/asepsis/asepsis10.html>. – Дата доступа: 30.03.2023.
6. Лысак, В. В. Микробиология: методические рекомендации к лабораторным занятиям и контроль самостоятельной работы студентов / В. В. Лысак, Р. А. Желдакова. – Минск : БГУ, 2002. – 100 с.
7. Концевая, И. И. Микробиология: морфология и структурная организация бактериальной клетки : практ. рук-во для студ. биол. спец. вузов / И. И. Концевая. – Чернигов : Десна Полиграф, 2017. – 44 с.
8. Практикум по микробиологии : учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А. И. Нетрусов [и др.]. – М. : Издательский центр «Академия», 2005. – 604 с.
9. Фрешни, Р. Я. Культура животных клеток : практ. рук-во / Р. Я. Фрешни. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. – 691 с.
10. Rules and Guidance for Pharmaceutical Manufacturers and Distributors. Compiled by the Inspection and Standards Division of the Medicines and Healthcare products Regulatory Agency. – London : Published by the Pharmaceutical Press, 2017. – 1140 pp.

Производственно-практическое издание

**Концевая Ирина Ильинична**

**ОСНОВЫ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ:  
ЛАБОРАТОРИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ТКАНЕЙ**

Практическое руководство

Редактор Е. С. Балашова  
Корректор В. В. Калугина

Подписано в печать 06.12.2023. Формат 60x84 1/16.  
Бумага офсетная. Ризография.  
Усл. печ. л. 2,8. Уч.-изд. л. 3,1.  
Тираж 10 экз. Заказ 643.

Издатель и полиграфическое исполнение:  
учреждение образования  
«Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины».  
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,  
распространителя печатных изданий № 3/1452 от 17.04.2017.  
Специальное разрешение (лицензия) № 02330 / 450 от 18.12.2013.  
Ул. Советская, 104, 246028, Гомель.

