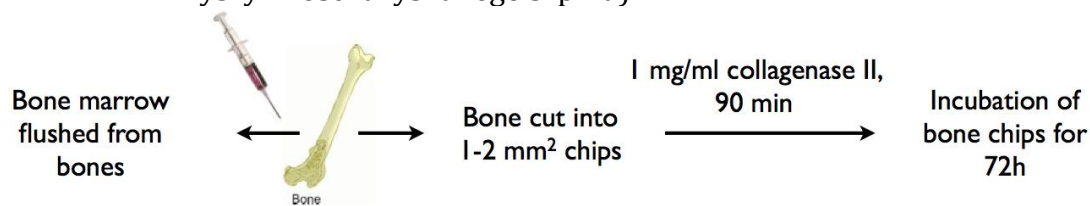
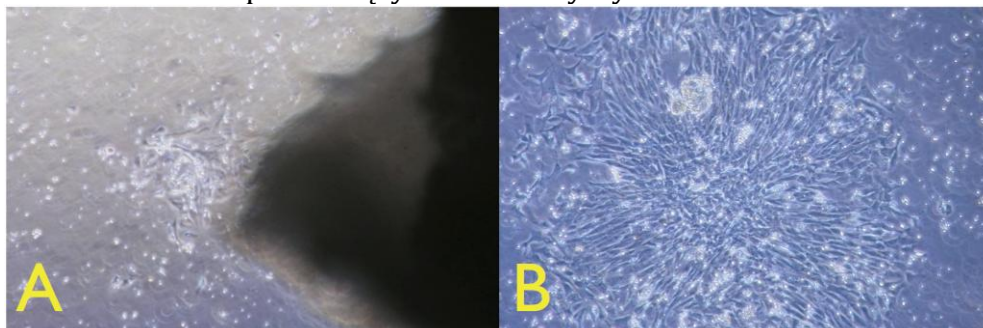


1. Izolacja mysich szpikowych komórek macierzystych mezenchymalnych (MSC).
 - 1.1. Myszy uśpiono za pomocą preparatu AErrane (Baxter, #8DG96323). Wyizolowano i oczyszczono z tkanki mięśniowej kości długie kończyn dolnych. Końcówki kości zostały odcięte. Szpik kostny został wypłukany medium zawierającym jedynie antybiotyki (Penicylina/Streptomycyna, Sigma P0781-100ML, stężenie końcowe penicyliny 100U/ml, streptomycyny 0,1 mg/ml) z kości za pomocą strzykawek.
 - 1.1.1. Wypłukane aglomeraty komórkowe zostały rozbite poprzez pipetowanie a następnie zwirowane przez 10 minut przy 670g w temperaturze pokojowej. Nadsącz odrzucono a pelet komórek rozpipetowano i wysiano na szalki hodowlane o średnicy 100 mm (Sarstedt, 83.1802). Na każdą szalkę wysiewano szpik kostny pochodzący od 2-3 myszy (w zależności od wieku myszy i ilości uzyskanego szpiku).



Ryc. 1 Schemat postępowania w przypadku izolacji MSC z kości trawionych kolagenazą typu II.

- 1.1.2. Kości pocięto na fragment o powierzchni ok 1-2 mm², przeniesiono do stożkowodennej probówki 50 ml typu Falcon i przez 1-2h (aż do uzyskania nieposklejanych fragmentów kości) trawiono za pomocą 1mg/ml kolagenazy typu II (Gibco, #17101-015) w medium hodowlanym w temperaturze 37 °C. W trakcie trawienia próbki wytrząsano z prędkością 250 rpm.
- 1.1.3. Po trawieniu nadsącz zawierający uwolnione komórki rozcieńczono do pełnej objętości probówki (50 ml) a następnie zwirowano przez 10 minut przy 670g w temperaturze pokojowej. Na każdą szalkę wysiewano uwolnione komórki szpikowe w liczbie odpowiadającej ilości szpiku kostnego z 2-3 myszy na szalkę hodowlaną o średnicy 100 mm.
- 1.1.4. Fragmenty kości dwukrotnie przepłukano PBS bez jonów a następnie zawieszono w pełnym medium hodowlanym (α -MEM) i przeniesiono na szalki hodowlane o średnicy 60mm. Na jedną szalkę przenoszono fragment kości pochodzących od 2-3 myszy.



Ryc. 2 Komórki migrujące z fragmentu kości (A). Kolonia adherentnych komórek, które wymigrowały z kości.

- 1.1.5. Szalki z wysianymi komórkami szpikowymi lub fragmentami kości inkubowano w 37°C/5% CO₂ przy 100% wilgotności przez 72h do pierwszej zmiany medium.

- 1.1.6. Kolejne zmiany medium odbywały się w odstępach 2-3 dniowych.
- 1.1.7. Komórki adherentne pochodzenia szpikowego (także komórki, które wymigrowały z kości) pasażowano w momencie uzyskania 90-100% konfluencji.

Protokół opracowany na podstawie: Zhu et al. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. Nature Protocols (2010) vol. 5 (3) pp. 550-560

Kontakt:

Witold Nowak
Zakład Biotechnologii Medycznej
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
email: witold.nowak@uj.edu.pl