

Министерство сельского хозяйства и продовольствия
Республики Беларусь

Витебская ордена «Знак Почета» государственная
академия ветеринарной медицины

Кафедра эпизоотологии и инфекционных болезней животных

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КУЛЬТУР КЛЕТОК

Учебно-методическое пособие для студентов факультета
ветеринарной медицины по специальности 1-74 03 02 «Ветеринарная
медицина» и слушателей ФПК и ПК по ветеринарным специальностям

Витебск
ВГАВМ
2021

УДК 619: 614.48
ББК 48.173
ПЗ5

Рекомендовано к изданию методической комиссией факультета ветеринарной медицины УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» от 30 марта 2021 г. (протокол № 18)

Авторы:

доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор *П. А. Красочко*; доктор ветеринарных наук, профессор *И. А. Красочко*; кандидат ветеринарных наук *Н. И. Костюк*; кандидат ветеринарных наук, доцент *Р. Б. Корочкин*; магистр ветеринарных наук *Е. И. Волосюк*; магистр ветеринарных наук *Л. Н. Кашипар*; научный сотрудник *А. Н. Бурко*; биолог *Е. Ф. Казакова*; ветеринарный врач *М. В. Барсукова*; ветеринарный врач *С. Е. Бритик*

Рецензенты:

доктор ветеринарных наук, профессор *В. С. Прудников*;
доктор медицинских наук, профессор *И. И. Генералов*

Питательные среды для культивирования культур клеток :
ПЗ5 учеб.-метод. пособие для студентов факультета ветеринарной медицины по специальности 1-74 03 02 «Ветеринарная медицина» и слушателей ФПК и ПК по ветеринарным специальностям / П. А. Красочко [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2021. – 40 с.

В пособии освещены вопросы классификации, подготовки и применения питательных сред для культивирования первичных, перевиваемых и суспензионных культур клеток. Учебно-методическое пособие предназначено для студентов факультетов ветеринарной медицины, слушателей факультетов повышения квалификации, практических ветеринарных специалистов, специалистов государственных ветеринарных служб.

УДК 619: 614.48
ББК 48.173

© УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», 2021

Содержание

План проведения лабораторно-практических занятий по вирусологии и биотехнологии со студентами	4
Введение	7
Терминология	9
Типы сред для культивирования клеток	11
Критерии выбора питательной среды	20
Состав питательных сред	23
Подготовка компонентов питательных сред	26
Приготовление питательных сред	29
Проверка качества питательных сред	32
Среды для замораживания	35
Список использованной литературы	37

ПЛАН

проведения лабораторно-практических занятий по вирусологии и биотехнологии со студентами

Тема 1. Культивирование вирусов в культуре клеток

Цель занятия: ознакомить студентов с общими сведениями о культурах клеток, солевыми растворами и питательными средами, рецептурой их приготовления, а также с этапами подготовки стеклянной посуды при получении и культивирования клеточных культур.

Материалы и оборудование:

Среда 199, среда Игла, 5%-ный гемогидролизат, 0,5%-ный гидролизат лактальбумина, растворы Хенкса и Эрла, 0,25%-ный раствор трипсина, 0,2% раствор Версена, 7,5%-ный раствор бикарбоната натрия, 3%-ный раствор уксусной кислоты, смонтированная для стерилизации посуда (пробирки, культуральные флаконы, пипетки, резиновые пробки), таблицы по теме.

Вопросы к занятию:

1. Типы культур клеток.
2. Подготовка посуды.
3. Растворы и питательные среды, применяемые при культивировании культур клеток.

Регламент времени:

Проверка самостоятельной подготовки студентов (15-20 мин)

Изложение преподавателем вопросов темы (30 мин)

- типы культур клеток.
- подготовка посуды для культивирования клеток.
- растворы и питательные среды, применяемые при культивировании культур клеток.

Самостоятельная работа студентов (40 мин)

- ознакомиться с солевыми растворами и питательными средами, рецептурой их приготовления.
- отработать технику подготовки посуды для стерилизации.
- провести регулировку рН в одном из солевых растворов и питательной среде.

Подведение итогов и вопросы домашнего задания (5 мин)

Содержание занятия:

Преподаватель регистрирует отсутствующих, объявляет тему и определяет цель занятия. Проводит опрос студентов по вопросам домашнего задания. Далее преподаватель разъясняет сущность культивирования клеток и использование культур клеток в вирусологии. Затем преподаватель демонстрирует посуду для культивирования, основные питательные среды и солевые растворы. После этого студенты приступают к самостоятельной работе, изучая основные принципы культивирования клеток *in vitro*. В конце занятия преподаватель подводит итоги занятия, контролирует закрепляемость знаний и дает задание на дом.

Тема 2. Получение первично-трипсинизированных культур клеток

Цель занятия: ознакомить студентов с техникой получения первичных культур клеток методом трипсинизации.

Материалы и оборудование:

Чашки Петри, стерильные хирургические инструменты, магнитная мешалка, колба с магнитиком для трипсинизации, пластмассовые центрифужные пробирки, раствор Хенкса или Эрла, 0,25%-ный раствор трипсина, 199 питательная ростовая среда, сыворотка крови, антибиотики, стерильные пластиковые культуральные флаконы, маркер.

Вопросы к занятию:

1. Получение первично-трипсинизированной культуры клеток.
2. Техника подсчета клеток в камере Горяева и посев клеточной суспензии в культуральные флаконы.

Регламент времени:

1. Проверка самостоятельной подготовки студентов (15-20 мин).
2. Изложение преподавателем вопросов темы (30 мин):
 - общая характеристика первичной культуры клеток.
 - отбор развивающихся куриных эмбрионов для получения первичной культуры клеток (куриных фибробластов).
 - методика трипсинизации.
 - подсчет клеток в камере Горяева и посев их по пробиркам и культуральным флаконам.
3. Самостоятельная работа студентов (40 мин).
4. Подведение итогов и вопросы домашнего задания (5 мин)
 - клеточные и гуморальные механизмы противовирусной защиты.
 - перевиваемые культуры клеток.
 - техника заражения культуры клеток.
 - формы цитопатического действия (ЦПД) вирусов.

Содержание занятия:

• Преподаватель регистрирует отсутствующих, объявляет тему и определяет цель занятия. Проводит опрос студентов по вопросам домашнего задания. Далее преподаватель разъясняет методики первичной трипсинизации тканей и получения первично-трипсинизированных культур клеток. Затем студенты выполняют самостоятельную работу по получению первичной культуры клеток. Преподаватель обязательно контролирует процесс получения культур клеток, обращает внимание на использование электрооборудования (магнитной мешалки).

В конце занятия преподаватель подводит итоги занятия, контролирует закрепляемость знаний и дает задание на дом.

Тема 3. Перевиваемые культуры клеток

Цель занятия: ознакомить студентов с некоторыми перевиваемыми культурами клеток, диплоидными культурами клеток, техникой заражения культуры клеток, изучить формы ЦПД вирусов.

Материалы и оборудование:

Пробирки с культурами первично-трипсинизированных и перевиваемых клеток (в норме и зараженные вирусом), подставки для пробирок, пастеровские пипетки, градуированные пипетки, микроскопы, раствор Хенкса, питательная поддерживающая среда, вирусодержащий материал, антибиотики, штатив с регулируемым дном для пробирок, таблицы.

Вопросы к занятию:

1. Перевиваемые культуры клеток и их преимущества перед первичными культурами клеток.
2. Методика заражения культур клеток и формы ЦПД вирусов.

Регламент времени:

1. Проверка самостоятельной подготовки студентов (15-20 мин)
2. Изложение преподавателем вопросов темы (30 мин)
 - общая характеристика перевиваемых культур клеток.
 - основные приемы получения перевиваемых культур клеток.
 - заражение культур клеток вирусодержащим материалом.
 - учет ЦПД вирусов.
3. Самостоятельная работа студентов (40 мин)
 - ознакомиться с методикой получения перевиваемых культур клеток.
 - изучить морфологию первично-трипсинизированных и перевиваемых культур клеток в норме (незараженные вирусом).
 - изучить формы ЦПД вирусов в клеточном монослое.
4. Подведение итогов и вопросы домашнего задания (5 мин)
 - клеточные и гуморальные механизмы противовирусного иммунитета.
 - виды лабораторных животных и методы их заражения.
 - взятие крови, получение сыворотки, плазмы, эритроцитов и лейкоцитов.

Содержание занятия:

Преподаватель регистрирует отсутствующих, объявляет тему и определяет цель занятия. Проводит опрос студентов по вопросам домашнего задания. Далее преподаватель разъясняет сущность получения стабильных культур клеток, их достоинства и недостатки, а также области применения в вирусологической практике. Студенты самостоятельно изучают примеры перевиваемых культур клеток, конспектируют область их применения в вирусологии. В конце занятия преподаватель подводит итоги занятия, контролирует закрепляемость знаний и дает задание на дом.

Для углубленного изучения студентами данной темы и освещения запланированных вопросов при проведении лабораторно-практического занятия ниже приводятся краткие теоретические и практические сведения и основные положения нормативных документов Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

Выращивание клеточной культуры является одним из основных методов исследований в биологических науках. Это общий термин, используемый для удаления клеток, тканей или органов у животного или растения и их последующего помещения в искусственную среду, способствующую их выживанию и/или пролиферации (росту). В процессе деления культивируемые клетки для осуществления процессов метаболизма требуют наличия ряда органических и минеральных веществ. Для обеспечения живых клеток всеми необходимыми веществами используют *питательные среды*. Понятие «питательная среда для культивирования клеток» не имеет ничего общего с питательной средой для культивирования микроорганизмов.

Основные условия окружающей среды для оптимального роста клеток - контролируемая температура, субстрат для прикрепления клеток, а также подходящая питательная среда для выращивания, термостати СО₂инкубатор, который поддерживает правильную рН и **осмоляльность**. Наиболее важным и решающим шагом при получении и выращивании клеточных линий является выбор подходящей питательной среды для культивирования клеток в условиях *in vitro*. В питательной среде должен присутствовать необходимый набор из неорганических ионов, аминокислот и витаминов.

Считается, что наиболее существенным из всех компонентов является наличие глюкозы и L-глутамина, поэтому при использовании любой среды содержание этих компонентов необходимо строго контролировать – оно должно составлять 1-4 мМ и 2 мМ соответственно. Среда для культивирования клеток обычно содержит подходящий источник энергии и соединения, которые регулируют клеточный цикл.

Различают искусственные (синтетические и полусинтетические) и естественные питательные среды.

Естественные питательные среды — это биологические жидкости (сыворотка крови, эмбриональный экстракт, **асцитическая жидкость**, коровья амниотическая жидкость, тканевые экстракты и др.). Питательные среды из естественных компонентов применяют редко, главным образом для выращивания вновь изолированных тканей в начале культивирования и для поддержания очень прихотливых тканей животных. Кроме того, содержание необходимых компонентов в среде трудно поддается стандартизации.

Полусинтетические питательные среды представляют собой естественные среды, подверженные первичной ферментативной обработке. К таким средам относят гомогидролизаты, гидролизат лактальбумина, аминокептид и др.

Лучшими средами являются *искусственные питательные среды*, в которых содержание всех необходимых компонентов строго контролируется. К их числу относят синтетическую среду 199. Она содержит 60 компонентов: 10 аминокислот, 17 витаминов, 8 минеральных солей, 10 компонентов, входящих в состав нуклеиновых кислот и др.

В зависимости от назначения среды подразделяются на *ростовые* и *поддерживающие*. Ростовые применяются в первой фазе культивирования клеток,

когда необходимо стимулировать клетки на максимально ускоренный рост и размножение. Они богаты питательными веществами, что способствует активному размножению клеток – обычно это достигается добавлением к среде нормальной сыворотки крови в количестве от 10% до 40%. Чаще с этой целью используют сыворотки крови теленка или его плода, так как она в большой степени обеспечивает размножение клеток и практически не ингибирует вирус. Сыворотку крови получают из благополучных по инфекционным болезням хозяйств от здоровых животных.

После получения сыворотка крови инактивируется при 56⁰С в течение 30 минут и подвергается стерилизации методом стерилизующей фильтрации или облучением Гамма лучами. Хранят сыворотку крови в замороженном состоянии при температуре –20⁰С сроком 12 месяцев. Сыворотка крови предварительно тестируется для исключения ингибирования в отношении вирусов.

Поддерживающие среды применяют во второй фазе культивирования клеток после заражения культуры клеток вирусами. Они поддерживают жизнеспособность клеток. В поддерживающих средах обычно снижают содержание сыворотки до 2% или полностью ее исключают. Также в состав питательных сред могут входить антибиотики, не токсичные для культур клеток, для уничтожения микрофлоры: пенициллин (100 ЕД/мл) стрептомицин (50 ЕД/мл) и другие антибактериальные средства широкого спектра действия.

Таким образом, питательные среды являются одним из самых важных компонентов для культивирования культур клеток и накопления вирусов при проведении научных исследований, промышленном биотехнологическом производстве противовирусных вакцин.

В настоящем учебно-методическом пособии мы рассмотрим важные аспекты по подготовке состава, методов изготовления и применения питательных сред.

ТЕРМИНОЛОГИЯ

Чтобы помочь определить, какой тип среды подходит для тех или иных клеток и экспериментальных условий, полезно прояснить некоторые принятые обозначения.

Базовая среда – среда без дополнительных ростовых компонентов.

Классическая среда – готовая к использованию среда с проверенным временем составом для экспериментов с культивируемыми *in vitro* клетками, например: Игла, DMEM, MCDB-105, RPMI-1640, 199 и др.

Кондиционированная среда – содержит секретлируемые клетками факторы роста, белки и цитокины, например, «Бесклеточный культуральный супернатант». Используются для «привередливых» и «требовательных» клеток, которым требуются специфические вещества-медиаторы, чтобы расти, или чтобы их захватывать.

Культуральная среда – служит для создания и точного поддержания постоянных контролируемых условий для неделящихся клеток.

Среда с определенным химическим составом – содержит известные химические вещества в известной концентрации. Сыворотка отсутствует, либо ее заменяют специфические факторы роста. Может содержать компоненты животного происхождения, например белки: альбумин, трансферрин и др.

Среда для диссоциации – реагент для субкультивирования (пересева) клеток, не содержащий ионов кальция Ca^{2+} и магния Mg^{2+} , представляющий собой раствор хелатирующей ионы металлов этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) в фосфатном буферном растворе. Используется как альтернатива раствору трипсина с ЭДТА при работе с индуцированными **плюрипотентными** стволовыми клетками.

Среда для дифференцировки – предназначена для создания условий для превращения недифференцированных клеток-предшественников в более специализированные по форме и функциям клетки. Используется для дифференцировки, например: клеток скелетной мускулатуры, хондроцитов, остеобластов, преадипоцитов и др.

Среда для замораживания – включает в себя базовую среду и криопротектор, например, диметилсульфоксид (ДМСО), а также большое количество сыворотки или компонентов, ее заменяющих. Служит для создания клеточных банков и длительного хранения замороженных клеток в сосудах Дьюара, заполненных жидким азотом N_2 , обеспечивает оптимальную клеточную жизнеспособность и выживаемость после размораживания.

Среда для выращивания клеток – готовая к использованию среда, содержащая все компоненты, состав которых оптимизирован для выращивания клеток конкретного типа. Вызывает интенсивный рост и деление клеток.

Набор для приготовления среды для выращивания клеток – базовая среда и дополнительные ростовые компоненты, упакованные по отдельности, но поставляемые в одном наборе для возможности точно контролировать время и количество дополнительных ростовых компонентов.

Дополнительные ростовые компоненты – концентрированные факторы роста, цитокины и питательные вещества, добавляемые к базовой среде.

Среда для прикрепления – усиливает прикрепление клеток к поверхности. Подходит для нейронов или иных клеток, которым нужны специфические условия или добавки для распластывания и прикрепления.

Бессывороточная среда – не содержит телячью сыворотку (FBS) или иные типы сыворотки. Используется в протоколах, требующих строго определенных условий, воспроизводимости и контроля состава среды от партии к партии.

Бедная среда – среда, не содержащая сыворотку, питательные вещества и / или факторы роста. Используется, если клетки должны быть лишены каких-то веществ перед экспериментом или обработкой, или для синхронизации клеточного цикла.

Среда без компонентов чужеродного происхождения – имеет определенный химический состав и не содержит компонентов животного или человеческого происхождения. Применяется для стволовых клеток или других экспериментов, когда нужно избежать вариабельности клеток вследствие присутствия неопределенных компонентов чужеродного происхождения. Все компоненты, такие как сыворотка или альбумин, полностью заменены на рекомбинантные или синтетические факторы роста, аминокислоты, витамины, липиды, инсулин и др.

ТИПЫ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК

Клетки животных можно культивировать с использованием полностью натуральной среды или синтетической питательной среды вместе с некоторыми натуральными продуктами (Таблица 1).

Таблица 1 – Типы природных и искусственных питательных сред. (PBS – фосфатно-солевой буфер, DPBS – фосфатный буфер Дульбекко, HBSS – раствор Хэнкса, EBSS – раствор Эрла)

Вид среды	Тип среды	Примеры	Использование
Натуральная питательная среда	Биологические жидкости	плазма, сыворотка, лимфа, сыворотка плаценты человека, амниотическая жидкость	
	Экстракты тканей	Экстракт печени, селезенки, опухолей, лейкоцитов и костного мозга, экстракт эмбрионов крупного рогатого скота и эмбрионов кур	
	Сгустки (свернувшаяся кровь)	коагулянты или плазменные сгустки	
Искусственная питательная среда	Сбалансированные солевые растворы	PBS, DPBS, HBSS, EBSS	Формируют основу сложных сред
	Базальные среды	MEM DMEM	Первичная и диплоидная культура
	Сложные среды	RPMI-1640, IMDM	Поддерживает широкий спектр клеток млекопитающих

Натуральные питательные среды

Природные питательные среды состоят исключительно из натуральных биологических жидкостей. Натуральные среды очень полезны и удобны для широкого спектра культур клеток животных. Основным недостатком природных питательных сред является их низкая воспроизводимость из-за недостатка знаний о точном составе этих природных сред.

Искусственные питательные среды

Искусственные или синтетические среды готовятся путем добавления питательных веществ (как органических, так и неорганических), витаминов, солей, газообразных O_2 и CO_2 , белков сыворотки, углеводов, кофакторов (связующих). Разнообразие искусственных сред было разработано для удовлетворения одной или нескольких целей:

1. Немедленное выживание (сбалансированный солевой раствор с определенным рН и осмотическим давлением).
2. Длительное выживание (сбалансированный солевой раствор с добавлением различных форм органических соединений и / или сыворотки).
3. Бессрочный рост.
4. Специализированные функции.

Искусственные питательные среды сгруппированы в четыре категории:

1. Сыворотко-содержащая питательные среды.

Нормальная и фетальная бычья сыворотка крови являются наиболее распространенными добавками в питательной среде для культивирования клеток животных. Они используются в качестве недорогой добавки для обеспечения оптимальной питательной среды. Сыворотка обеспечивает носители или хелаторы для лабильных или нерастворимых в воде питательных веществ, гормонов и факторов роста, ингибиторов протеаз, а также связывает и нейтрализует токсичные компоненты.

2. Питательные среды без сыворотки.

Наличие сыворотки в средах имеет много недостатков и может привести к серьезным ошибочным интерпретациям в иммунологических исследованиях. Разработан ряд бессывороточных сред. Эти среды обычно специально разработаны для поддержки культуры одного типа клеток, таких как Knockout Serum Replacement и Knockout DMEM от Thermo Fisher Scientific для стволовых клеток, и включают определенные количества очищенных усилителей роста, липопротеинов и других белков, которые в иных условиях обычно есть в сыворотке. Эти среды также называются «определенными культуральными средами», поскольку компоненты в этих средах известны.

3. Химически определенные питательные среды.

Эти среды содержат незагрязненные ультрачистые неорганические и органические ингредиенты, а также могут содержать чистые белковые добавки, например стимуляторы роста. Их составляющие вырабатываются в бактериях или дрожжах с помощью генной инженерии с добавлением витаминов, холестерина, специфических аминокислот и жирных кислот.

4. Безбелковые питательные среды.

Безбелковые питательные среды не содержат белка и содержат только небелковые компоненты. По сравнению со средами с добавлением сыворотки использование не содержащих белок сред способствует ускорению роста клеток и экспрессии белка и облегчает последующую очистку любого экспрессируемого продукта. Препараты, такие как MEM, RPMI-1640, не содержат белков, а белковая добавка вносится отдельно при необходимости.

Состав питательных сред

Питательные среды содержат смесь аминокислот, солей, витаминов, глюкозы и других питательных веществ и доступны либо в виде порошка, либо в виде жидкости. Требования к этим компонентам варьируются в зависимости от разновидностей клеток, и эти различия частично ответственны за большое количество составов среды, которые предлагаются производителями. Каждый компонент выполняет определенную функцию, описанную ниже:

Буферные системы

Регулирование рН является критическим для оптимальных условий культивирования и обычно достигается с помощью одной из двух буферных систем:

Натуральная буферная система

В естественной буферной системе газообразный CO_2 балансируется с содержанием CO_3/HCO_3 в питательной среде. Культуры с естественной буферной системой должны поддерживаться в воздушной атмосфере с 5-10% CO_2 , как правило, в инкубаторе с CO_2 . Естественная буферная система является недорогой и нетоксичной.

HEPES

Химическая буферизация с использованием цвиттер-ионного органического буферного агента HEPES обладает превосходной буферной способностью в диапазоне рН 7,2-7,4 и не требует контролируемой газовой атмосферы. HEPES относительно дорог и токсичен при более высокой концентрации для некоторых типов клеток. Также было установлено, что HEPES значительно повышает чувствительность питательных сред к фототоксическим эффектам, вызванным воздействием флуоресцентного света (рисунок 1).

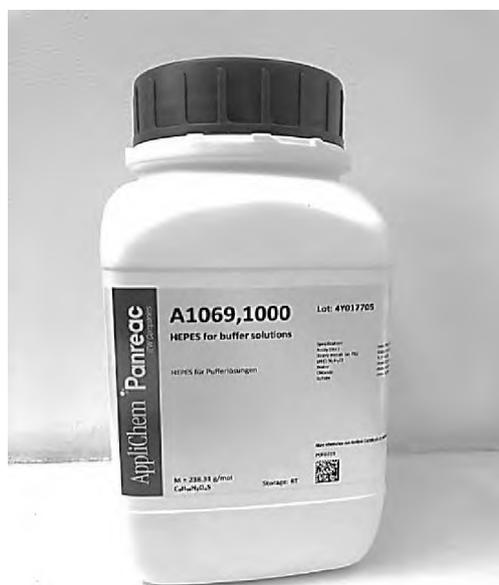


Рисунок 1 - Флакон с цвиттер-ионным органическим буферным агентом HEPES

Феноловый красный

Большинство коммерчески доступных питательных сред включают феноловый красный в качестве индикатора рН, что позволяет осуществлять посто-

янный мониторинг pH. Во время роста клеток питательная среда меняет цвет при изменении pH из-за метаболитов, выделяемых клетками. При pH 7,4 он красного цвета, при pH 7,0 становится оранжевым, при pH 6,5 - желтым или лимонно-желтым при более кислых значениях pH. При pH 7,6 цвет индикатора сдвигается в розовую область, при pH 7,8 становится фиолетовым. Наиболее оптимальным значением для клеточных культур является pH 7,4.

Тем не менее, есть определенные недостатки использования фенолового красного:

1. Феноловый красный имитирует действие некоторых стероидных гормонов, в частности эстрогена. Таким образом, целесообразно использовать среду без фенолового красного для исследований с использованием чувствительных к эстрогену клеток, таких как ткань молочной железы.

2. Присутствие фенолового красного в некоторых бессывороточных препаратах влияет на гомеостаз натрия-калия. Этот эффект может быть нейтрализован включением в среду сывороточного или бычьего гормона гипофиза.

3. Феноловый красный может исказить результаты в исследованиях проточной цитометрии.

Неорганическая соль

Неорганическая соль в среде помогает сохранить осмотический баланс и помогает регулировать мембранный потенциал, обеспечивая ионы натрия, калия и кальция.

Аминокислоты

Аминокислоты являются строительными блоками белков и, следовательно, являются обязательными ингредиентами всех известных сред для культивирования клеток. Незаменимые аминокислоты должны быть включены в питательные среды, поскольку клетки не могут синтезировать их сами по себе. Они необходимы для пролиферации клеток, а их концентрация определяет максимально достижимую плотность клеток. Особенно важен L-глутамин, незаменимая аминокислота. L-глутамин обеспечивает азот для НАД, НАДФН и нуклеотидов и служит вторичным источником энергии для обмена веществ. L-глутамин является нестабильной аминокислотой, которая со временем превращается в форму, которая не может использоваться клетками, и поэтому должна добавляться в среду непосредственно перед использованием. При добавлении большего количества L-глутамина следует соблюдать осторожность, чем требуется в исходной рецептуре среды, поскольку его разложение приводит к накоплению аммиака, а аммиак может оказывать вредное воздействие на некоторые клеточные линии. Концентрации L-глутамина в средах для культивирования клеток млекопитающих могут варьироваться от 0,68 мМ в среде 199 до 4 мМ в модифицированной Дульбекко среде Игла. Среда для культивирования клеток беспозвоночных может содержать до 12,3 мМ L-глутамина. Добавки, такие как глутамакс, более стабильны и могут заменить глутамин для длительного культивирования медленных клеток. Основными поставщиками L-глутамина для клеточной культуры является Sigma (G7513).

Незаменимые аминокислоты также могут быть добавлены в среду для замены тех, которые были истощены во время роста. Дополнение среды незаме-

ними аминокислотами стимулирует рост и продлевает жизнеспособность клеток.

Углеводы

Углеводы в форме сахаров являются основным источником энергии. Большинство питательных сред содержат глюкозу и галактозу, однако некоторые содержат мальтозу и фруктозу.

Белки и пептиды

Наиболее часто используемые белки и пептиды - это альбумин, трансферрин и фибронектин. Они особенно важны в бессывороточных средах. Сыворотка является богатым источником белков и включает в себя альбумин, трансферрин, апротинин, фетуин и фибронектин. Альбумин является основным белком в крови, который связывает воду, соли, свободные жирные кислоты, гормоны и витамины и транспортирует их между тканями и клетками. Связывающая способность альбумина делает его подходящим для удаления токсичных веществ из среды для культивирования клеток.

Апротинин является защитным средством в системах культивирования клеток, стабильным при нейтральном и кислотном pH и устойчивым к высоким температурам и деградации протеолитическими ферментами. Он обладает способностью ингибировать несколько сериновых протеаз, таких как трипсин. Фетуин - это гликопротеин, обнаруженный в сыворотке плода и новорожденного в более высоких концентрациях, чем в сыворотке взрослого человека. Он также является ингибитором сериновых протеаз. Фибронектин является ключевым игроком в прикреплении клеток. Трансферрин является белком транспорта железа, который служит для доставки железа к клеточной мембране.

Жирные кислоты и липиды

Они особенно важны в бессывороточных средах, поскольку обычно присутствуют в сыворотке.

Витамины

Многие витамины необходимы для роста и размножения клеток. Витамины не могут синтезироваться клетками в достаточных количествах и поэтому являются важными добавками, необходимыми в культуре тканей. Опять же, сыворотка является основным источником витаминов в клеточной культуре, однако, среды также обогащены различными витаминами, что делает их подходящими для конкретной клеточной линии. Витамины группы В чаще всего добавляются для стимуляции роста.

Микроэлементы

Микроэлементы часто добавляют в бессывороточные среды, чтобы заменить те, которые обычно содержатся в сыворотке. Микроэлементы, такие как медь, цинк, селен и трикарбоновые кислоты, являются химическими элементами, которые необходимы в незначительных количествах для правильного роста клеток. Эти микроэлементы необходимы для многих биологических процессов, например, для поддержания функциональности ферментов.

Дополнительные компоненты

Полная среда для выращивания, рекомендуемая для определенных клеточных линий, требует дополнительных компонентов, которых нет в базальной среде и сыворотке. Эти компоненты, добавки, помогают поддерживать пролиферацию и поддерживать нормальный клеточный метаболизм. Хотя такие добавки, как гормоны, факторы роста и сигнальные вещества, необходимы для нормального роста некоторых клеточных линий, всегда лучше принимать следующие меры предосторожности: поскольку дополнение дополнительных веществ может изменить осмоляльность всей среды роста, что может негативно повлиять на рост клеток, всегда лучше перепроверить осмоляльность после добавления добавок. Для большинства клеточных линий оптимальная осмоляльность должна составлять от 260 мосм/кг до 320 мосм/кг.

Срок годности питательных сред изменяется после добавления добавок. Полные среды, содержащие белковые добавки, имеют тенденцию разрушаться быстрее, чем одни базальные среды.

Антибиотики

Несмотря на соблюдение правил стерильности, в лабораториях, работающих с клеточными культурами, бывают случаи бактериальной, микоплазменной, грибковой контаминации клеточных культур. Источником контаминации могут быть исследователи, сыворотка, воздух, а также трипсин. Основой подбора антибиотиков, обладающих способностью убивать микроорганизмы, являются результаты бактериологического анализа загрязнений и тестирования эффективности действия на них антибиотиков. Наиболее часто для борьбы с бактериальными загрязнениями используют пенициллин, стрептомицин, гентамицин, для борьбы с микоплазмами – канамицин, миокризин и тилозин, а с грибами - фунгизон (амфотерицин В). Регулярное использование антибиотиков для клеточной культуры не рекомендуется, поскольку антибиотики могут замаскировать загрязнение микоплазмами и устойчивыми бактериями.

Сыворотка

Сыворотка является необходимым компонентом большинства питательных сред для культивирования клеток. Сыворотка играет роль предохранительного физиологического буфера, участвует в процессах адгезии, распластывания и миграции клеток, является источником питательных веществ. Сыворотка крови служит источником защитных веществ, предохраняющих клетки от повреждений (γ - и β -глобулины).

В состав сыворотки входят факторы роста, которые способствуют клеточной пролиферации, а также факторы адгезии и вещества, обладающие анти-трипсиновой активностью, способствующие прикреплению клеток. Сыворотка (см. рисунок 2) также является источником минеральных веществ, липидов и гормонов. Эмбриональная телячья сыворотка (см. рисунок 3) по сравнению с сыворотками особей различных возрастов содержит повышенное количество эстрадиола, эстриола и прогестерона. Для большинства клеточных культур используется телячья сыворотка, эмбриональная бычья, сыворотка крупного рогатого скота и лошадей. Телячья и эмбриональная бычья сыворотка используется более широко, их применяют для большинства требовательных линий клеток и

для клонирования. В зависимости от клеточных культур для роста клеток используют от 5% до 40% сыворотки крови животных.



Рисунок 2 – Сыворотка крови крупного рогатого скота



Рисунок 3 – Эмбриональная сыворотка крови крупного рогатого скота

Дополнение питательных сред сывороткой выполняет следующие функции:

- Переносит липиды, гормоны, минеральные вещества.
- Обеспечивает осмотическое давление, буферную емкость.
- Подавляет активность трипсина.
- Вызывает прикрепление клеток к субстрату.
- Увеличивает пролиферативную активность клеток.
- Он также обеспечивает минеральными веществами, такими как Na^+ , K^+ , Zn^{2+} , Fe^{2+} и др, необходимыми для различных функций, в том числе активации ферментов.
- Обеспечивает дыхание, энергетический метаболизм.
- Вызывает рост и дифференцировку клеток.
- Повышает накопление глюкозы и аминокислот клетками.
- Сывороточный альбумин служит переносчиком и депо ненасыщенных жирных кислот.

Из-за присутствия как факторов роста, так и ингибиторов роль сыворотки в клеточной культуре очень сложна. К сожалению, помимо выполнения различных функций, использование сыворотки в тканевых культурах имеет ряд недостатков. Таблица 2 показывает преимущества и недостатки использования сыворотки в средах.

Таблица 2 - Преимущества и недостатки использования сыворотки в питательных средах

Преимущества сыворотки в питательных средах	Недостатки сыворотки в питательных средах
Сыворотка содержит различные факторы роста и гормоны, которые стимулируют рост и функции клеток	Разные партии сыворотки могут значительно различаться по своим свойствам
Помогает в прикреплении клеток	Каждая партия подвергается тестированию на эффективность посева, кривой роста, сохранение свойств культуры клеток, токсичность и стерильность
Способствует распластыванию клеток	Может содержать некоторые факторы, сдерживающие рост
Действует как буферный агент, который помогает поддерживать рН питательных сред	Является источником антител, микоплазм, вирусов, бактерий и токсических продуктов.
Функции как связывающий белок	Присутствие сыворотки в среде может помешать очистке и выделению продуктов культивирования клеток
Служит источником защитных веществ, предохраняющих клетки от повреждений	Влияет на процесс взаимодействия вируса и клетки
	Высокая стоимость эмбриональной телячьей сыворотки

Другие компоненты

Для суспензионной культуры может быть добавлен Pluronic F-68 в количестве 0,1% для уменьшения силы поверхностного натяжения воды и уменьшения пенообразования.

Растворы

В практике культивирования клеток *in vitro* наиболее широко используются сбалансированные солевые растворы Хенкса или Эрла.

Состав сбалансированных солевых растворов:

Раствор Хенкса: на 1л бидистиллированной воды 8,0 г NaCl, 0,4 г KCl, 0,1 г MgSO₄ 7H₂O, 0,14 г CaCl₂, 0,06 г KH₂PO₄, 0,06 г NaH₂PO₄, 1,0 г глюкозы, 0,02 г фенолрота, 0,07 г NaHCO₃ (см. рисунок 4).

Раствор Эрла: на 1л бидистиллированной воды 6,8 г NaCl, 0,4 г KCl, 0,1 г MgSO₄, 0,2 г CaCl₂, 0,125 г NaH₂PO₄, 2,2 г NaHCO₃, 1,0 г глюкозы (см. рисунок 5).



Рисунок 4 – Раствор Хэнкса



Рисунок 5 – Раствор Эрла

Эти сбалансированные солевые растворы используют для приготовления всех питательных сред, так как они обеспечивают сохранение pH, осмотическое давление в клетках и соответствующую концентрацию необходимых неорганических веществ. Кроме того, их применяют при различных манипуляциях с культурой клеток (отмывание от ростовых сред, разведение вируса и т. д.).

При культивировании клеток применяют диспергирующие растворы трипсина и версена (см. рисунки 6 и 7). Раствор трипсина (0,25%-ный на фосфатном буфере) используют для разделения кусочков тканей на отдельные клетки и для снятия слоя клеток со стекла. Раствор версена – натриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (0,02%-ный на растворе Хенкса) – используют для снятия клеток со стекла. Все растворы стерилизуют при соответствующих режимах автоклавированием.



Рисунок 6 – Раствор Трипсина



Рисунок 7 – Раствор Версена

КРИТЕРИИ ВЫБОРА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

Выбор питательной среды для культивирования клеток чрезвычайно важен и существенно влияет на успех экспериментов по культивированию клеток. Выбор питательной среды зависит от типа клеток, которые необходимо культивировать, а также от назначения культуры и ресурсов, имеющихся в лаборатории. Различные типы клеток имеют очень специфические требования к росту, поэтому наиболее подходящие среды для каждого типа клеток должны быть определены экспериментально. В общем, всегда хорошо начинать с MEM для адгезивных клеток и RPMI-1640 для суспензионных клеток.

Минимальная необходимая среда Игла (MEM)

MEM была одной из первых широко используемых питательных сред и была разработана Гарри Иглом из более простой базальной среды (BME) (см. рисунки 8 и 9). MEM содержит сбалансированный солевой раствор, незаменимые аминокислоты и пируват натрия. Он разработан с пониженной концентрацией бикарбоната натрия (1500 мг/л) для использования с 5% CO₂. Поскольку MEM является несложной средой, она обычно обогащена дополнительными добавками или более высокими уровнями сыворотки, что делает ее пригодной для широкого круга клеток млекопитающих.



**Рисунок 8 - Среда Игла МЭМ
сухая**



**Рисунок 9 - Среда Игла МЭМ
жидкая**

Модифицированная Дульбекко среда Игла (DMEM)

DMEM имеет почти вдвое большую концентрацию аминокислот и в четыре раза больше витаминов, чем MEM, а также нитрат трехвалентного железа, пируват натрия и некоторые дополнительные аминокислоты (см. рисунок 10 и 11). Первоначальная композиция содержала 1000 мг/л глюкозы и впервые была сообщена для культивирования эмбриональных клеток мыши. Доказано, что дальнейшая вариация с 4500 мг/л глюкозы является оптимальной для культиви-

рования различных типов клеток. DMEM является базальной средой и не содержит белков или агентов, способствующих росту. Таким образом, она требует дополнения, чтобы быть «полной» питательной средой. Чаще всего она дополняется 5-10% фетальной бычьей сывороткой (FBS). DMEM использует буферную систему бикарбоната натрия (3,7 г/л) и, следовательно, требует искусственного уровня CO₂ для поддержания необходимого pH. Порошковый носитель составлен без бикарбоната натрия, потому что он имеет тенденцию к выделению газа в порошкообразном состоянии. Порошковая среда требует добавления 3,7 г/л бикарбоната натрия при растворении в воде. DMEM первоначально использовался для культивирования эмбриональных стволовых клеток мыши. Было обнаружено, что он широко применим в первичных мышечных и куриных клетках, исследованиях образования вирусных бляшек и контактного ингибирования.



**Рисунок 10 - Среда Игла ДМЭМ
сухая**



**Рисунок 11 - Среда Игла ДМЭМ
жидкая**

Среда 199

Среда 199 разработана в 1950 году для культивирования фрагментов сердца из эмбриона цыпленка (см. рисунок 12). Для среды характерны широкий спектр питательных веществ и невысокая их концентрация. Используется без добавок как поддерживающая для первичных клеток, а с сывороткой как ростовая среда для быстро размножающихся клеток. Нормальные, сохраняющие специфические функции клетки на стандартных средах не размножаются (если не трансформированы). Для оптимального роста клеток обычно добавляют 5 - 20% фетальной (эмбриональной) сыворотки.

RPMI-1640

RPMI-1640 является питательной средой общего назначения с широким спектром применения для клеток млекопитающих, особенно гематопозитиче-

ских клеток (см. рисунок 13). RPMI-1640 был разработан в Roswell Park Memorial Institute (RPMI) в Буффало, Нью-Йорк. RPMI-1640 является модификацией McAoy's 5A и был разработан для долгосрочной культуры лимфоцитов периферической крови. RPMI-1640 использует бикарбонатную буферную систему и отличается от большинства сред для культивирования клеток млекопитающих своим типичным составом pH 8,0. RPMI-1640 поддерживает рост широкого спектра клеток как при монослойном, так и суспензионном культивировании клеток. При правильном добавлении сыворотки или адекватной замены сыворотки RPMI-1640 имеет широкий спектр применений для клеток млекопитающих, включая культуру свежих человеческих лимфоцитов, протоколы слияния и рост гибридных клеток.



Рисунок 12 - Среда 199 жидкая



Рисунок 13 - Среда RPMI 1640 жидкая

DMEM / F12

DMEM / F12 - это смесь DMEM и Ham F-12 и является чрезвычайно богатой и сложной средой. Он поддерживает рост широкого спектра типов клеток как в сыворотке, так и в бессывороточных составах. Буфер HEPES включен в состав в конечной концентрации 15 мМ, чтобы компенсировать потерю буферной способности, вызванную удалением сыворотки.

Питательная среда Дульбекко модифицированная Искувом (IMDM)

IMDM - это высокообогащенная синтетическая среда, хорошо подходящая для быстро размножающихся клеточных культур высокой плотности. IMDM является модификацией DMEM, содержащей селен, и имеет дополнительные аминокислоты, витамины и неорганические соли по сравнению с DMEM. Он содержит нитрат калия вместо нитрата трехвалентного железа, а также содержит HEPES и пируват натрия. Он был разработан для роста лимфоцитов и гибридом. Исследования показали, что IMDM может поддерживать мышинные В-лимфоциты, кроветворную ткань из костного мозга, В-клетки,

стимулированные липополисахаридом, Т-лимфоцитами и различными гибридными клетками.

Питательные среды от коммерческих поставщиков доступны в трех формах:

1. Порошковая форма: она должна быть подготовлена и стерилизована исследователем.
2. Концентрированная форма: разбавляется исследователем.
3. Рабочий раствор: для непосредственного использования без дополнительных манипуляций.

Порошковая питательная среда является наименее дорогой, но ее необходимо стерилизовать. Желательно провести фильтрование и стерилизацию питательной среды перед добавлением сыворотки, так как пенообразование, которое происходит в присутствии сыворотки, денатурирует белок. Фетальные бычьи или конские сыворотки могут быть добавлены после фильтрации. Питательную среду всегда следует проверять на стерильность, помещая ее в инкубатор с CO₂ при 37°C на 72 часа перед использованием, чтобы убедиться, что партия не загрязнена. Среду следует хранить при температуре 4°C. Поскольку некоторые компоненты питательной среды могут быть чувствительны к свету, ее следует хранить в темноте.



Рисунок 14 – Гидролизат мышечных белков ферментативных сухой (ФГМС-с)



Рисунок 15 – Питательная среда ФГМС жидкая

СОСТАВ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Из синтетических сред наиболее широкое применение нашли среда 199 и среда «Игла». В состав среды 199 входит более 60 компонентов: 20 аминокислот, 17 витаминов, компоненты нуклеиновых кислот, источники липидов, 8 минеральных солей и другие вещества. В состав среды «Игла» также входит не менее 60 компонентов, включающих аминокислоты, витамины, углеводы и т. д.

Во все питательные среды и некоторые солевые растворы добавляют индикатор феноловый красный (0,002%) для визуального контроля pH среды, который не оказывает токсического воздействия на клетки и вирусы. При сниже-

нии рН среда желтеет, что позволяет определять момент ее закисления продуктами метаболизма клеток до уровня, требующего замены среды на свежую; при сдвигах рН в щелочную сторону растворы принимают красно-малиновый цвет.

При нейтральном значении рН (7,2–7,4) цвет среды оранжево-красный. Для регулирования рН солевых растворов и питательных сред используют 7,5%-ный раствор бикарбоната натрия (NaHCO_3) и 3%-ный раствор уксусной кислоты (CH_3COOH).

Питательные среды Игла (MEM) и 199 могут быть приготовлены в производственных условиях по следующей прописи (см. таблица 3 и 4).

Таблица 3 - Рецепт питательной среды Игла (DMEM) на солевом растворе

№ п/п	Наименование компонентов	Ед. изм.	Квалификация	Количество (г/л)
1	1-аргенин	г	фармакоп.	0,126
2	1-цистин	-/-	-/-	0,028
3	1-глутамин	-/-	-/-	0,292
4	1-гистидин HCl	-/-	-/-	0,0429
5	1-изолейцин	-/-	-/-	0,05
6	1-лейцин	-/-	-/-	0,05
7	1-лизин HCl	-/-	-/-	0,073
8	1-метионин	-/-	-/-	0,015
9	1-Фенилаланин	-/-	-/-	0,033
10	1-треонин	-/-	-/-	0,048
11	1-триптофан	-/-	-/-	0,010
12	1-тирозин	-/-	-/-	0,036
13	1-Валин	-/-	-/-	0,045
14	Са-пантотенат	-/-	чда	0,001
15	Холин хлорид	-/-	-/-	0,001
16	Фолиевая кислота	-/-	-/-	0,001
17	1-инозитол	-/-	-/-	0,002
18	Никотинамид	-/-	-/-	0,001
19	Пиридоксаль	-/-	-/-	0,001
20	Рибофлавин	-/-	чда	0,0001
21	Тиамин HCl	-/-	чда	0,001
22	Кальций хлористый $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$	-/-	хч	0,26
23	KCl	-/-	хч	0,40
24	$\text{MgO}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	-/-	хч	0,20
25	NaCl	-/-	хч	6,80
26	NaHCO_3	-/-	хч	2,00
27	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	-/-	чда	0,158
28	Д-глюкоза медиц.	-/-		1,00
29	Фенолрот импорт. (натриевая соль)	-/-		0,017
30	Пенициллин	млн ЕД		0,10
31	Стрептомицин	млн ЕД		0,10

Таблица 4- Рецептúra питательной среды 199 (Паркера) на солевом растворе

№№ п/п	Наименование компонентов	мг/л
а) аминокислоты,		
1	Глицин	50,0
2	L-аргенин-НСl	70,0
3	L-цистин	20,0
4	L-гистидин-НСl	20,0
5	L-лизин-НСl	70,0
6	L-пролин	40,0
7	L-оксипродин	10,0
8	L-тирозин	40,0
9	DL-аланин	50,0
10	DL-аспаргиновая кислота	60,0
11	DL-глутаминовая кислота-НСl	150,0
12	DL-лейцин	120,0
13	DL-изолейцин	40,0
14	DL-метионин	30,0
15	DL-фенилаланин	50,0
16	DL-серин	50,0
17	DL-треонин	60,0
18	DL-триптофан	20,0
19	DL-валин	50,0
б) витамины,		
1	биотин	1,0
2	фолиевая кислота	1,0
3	холин хлорид	1,0
4	пантотенат кальция	1,8
5	пиридоксин	1,0
6	пиридоксаль	1,0
7	тиамин	10,0
8	никотинамид	1,0
9	никотиновая кислота	1,0
10	рибофлавин	0,4
в) соли и другие вещества (г/л)		
1	NaCl	8,0
2	KCl	0,4
3	KH ₂ PO ₄	0,06
4	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	0,153
5	CaCl ₂ x 6 H ₂ O	0,276
6	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,20
7	Fe(NO ₃) ₃ (безводный)	6 x 10 ⁵
8	фенолрот	0,02
9	глюкоза	1,0
10	CH ₃ COONa x 3 H ₂ O	0,05
11	D-рибоза	0,005
12	D-дезоксирибоза	0,005
13	L-глутамин	0,15

ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Растворение компонентов питательной среды

Процесс приготовления питательной среды заключается в приготовлении солевой основы для культур клеток – раствора Эрла или Хенкса и растворении в нем аминокислот, витаминов и термолабильного комплекса, содержащего глутамин, бикарбонат натрия, сыворотку и антибиотики. Растворение навесок ведут в деионизированной воде, имеющей температуру 35-40⁰С при непрерывном перемешивании. Вначале растворяют навески солей, поочередно до полного растворения предыдущей навески и вносят навеску глюкозы. Перемешивание осуществляют путем барботирования сжатым воздухом 6-10 минут. После растворения берут пробу для определения рН и удельного веса солевого раствора (рН должно быть в пределах 5,0 уд.вес -1,004-1,005 г/см, куб)



Рисунок 16 - Аналитические весы для взвешивания компонентов

При значении рН выше 5,0 его снижают добавлением янтарной кислоты до значений 4,0-4,5.

В глюкозо-солевой раствор осторожно при перемешивании вносят хлористый кальций (CaCl_2) в виде 40% раствора и вновь барботируют.

Все витамины, кроме рибофлавина и фолиевой кислоты, последовательно растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, подогретой до 60⁰С. Рибофлавин и фолиевую кислоту растворяют отдельно в небольшом количестве деминерализованной воды с добавлением по каплям 20%-ного раствора NaOH до полного растворения навесок. Сначала растворяют рибофлавин, затем фолиевую кислоту, при растворении которой необходимо вновь по каплям вносить 20% раствор NaOH до полного просветления раствора.

Растворение навесок готовой синтетической среды MEM и 199 ведут в деионизированной воде, имеющей температуру 15–20⁰С, при непрерывном перемешивании.

Приготовление 0,1% (маточного) раствора фенолового красного

Водонерастворимый феноловый красный растворяют в 0,1 N едком натре (0,1 г/2,82 мл) на водяной бане в течение 20 минут и оставляют на двое суток

при комнатной температуре для созревания. Затем переливают в мерную колбу, доводят объем до 100 мл бидистиллированной водой и пропускают через бумажный фильтр. Колбу закрывают ватно-марлевой пробкой и стерилизуют при 1, 5 атм. в течение 30-40 минут.

В питательные среды добавляют растворимый феноловый красный (маточный раствор 0,1%) до концентрации 0,02% (в нестерильные среды можно добавлять сразу, а затем стерилизовать со средой), такая доза фенолового красного не изменяет качества среды и не влияет на клетку.

Приготовление раствора натрия двууглекислого

Для приготовления 7,5% раствора натрия двууглекислого Na_2CO_3 берут навеску для необходимого объема и растворяют при постоянном перемешивании в теплой дистиллированной воде при 25-30° С.

Готовый раствор фильтруют через пластины ЕКС-2 или СФ - 3, расход пластин - 4-8 штук на 100 литров, мембранный фильтр "Миллипор" или "Палл" с диаметром пор 0,22 мкм. Давление постепенно повышают до 1,0-1,2 кг/см².

Первые порции фильтрата из расчета 1 л на пластину отбрасывают. Профильтрованный раствор фасуют во флаконы, маркируют и хранят при 4°С в течение месяца.

Приготовление буферных растворов

Фосфатно-буферный раствор с рН 7,4-7,5 готовят из 9 частей 1/15 М раствора двузамещенного фосфорнокислого натрия (изготовленного из расчета 11,876 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ в 1 дм³ дистиллированной воды) и 1 части 1/15 М раствора однозамещенного фосфорнокислого калия (из расчета содержания 9,078 г KH_2PO_4 в 1 дм³ воды для инъекций).

Раствор стерилизуют в автоклаве или реакторе при избыточном давлении 0,11 МПа (1,1 кг/см²) и температуре 121°С в течение 60 минут.

Примечание: Натрий фосфорнокислый двузамещенный может иметь 12 молекул кристаллизационной воды. Поэтому для приготовления буферного раствора фосфорнокислый натрий предварительно высушивают до получения $\text{NaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, для чего его в термостате сушат при 37°С в течение 48 часов.

Приготовление физиологического раствора

В 1 дм³ воды для инъекций растворяют 9 г натрия хлорида (NaCl) (ФС 42-2572-95) или в зависимости от потребности готовят соответствующее количество раствора в реакторе, бутылках или флаконах. рН раствора устанавливают в пределах 5,0-7,0.

Раствор стерилизуют в автоклаве при температуре 120°С в течение 15-20 минут.

Приготовление раствора спирта этилового (70%)

Для дезинфекции рук, оборудования и др. следует использовать спирт этиловый (объемная доля 70%).

При использовании 96% спирта этилового для приготовления 70% спирта этилового необходимо взять 793 см³ спирта (96%) и добавить воду для инъекций до 1 дм³.

Приготовленный раствор можно хранить в герметично закрытом стеклянном сосуде в течение 1 месяца.

Приготовление раствора едкого натрия

Для приготовления 20% раствора едкого натрия (NaOH, ГОСТ 4328,) берут 200 г химически чистого препарата, взвешивают на технических весах, добавляют к 800 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивают до полного растворения.

Приготовление раствора хлористого кальция

Для приготовления 1 л 40%-ного раствора берут хлористого кальция (CaCl_2) 790,0 г и растворяют в 200 мл подогретой до 40-50⁰С воды. Если используют $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, то берут 1558,0 г, а при использовании $\text{CaCl}_2 \times 10\text{H}_2\text{O}$ - 2070,6 г. Воду добавляют небольшими порциями, контролируя плотность раствора, которую доводят до 1,396 (20⁰С), что соответствует содержанию 40г CaCl_2 в перерасчете на безводную соль.

Раствор фильтруют через 2-слойный фильтр на воронке Бюхнера, расфасовывают во флаконы и хранят при 18-22⁰С до одного месяца.

Приготовление раствора соляной кислоты

Для приготовления 0,1М раствора соляной кислоты HCl ареометром определяют плотность концентрированной соляной кислоты квалификации ХЧ (химически чистая) и по таблице находят соответствующее содержание HCl [Таблицы приведены в «Справочнике химика», т. 3, Изд. «Химик», 1965 г, стр.521-525; Лурье Ю.Ю. «Справочник по аналитической химии», Изд. «Химия», 1971, стр. 149-153].

При 20⁰С плотность = 1,19 г/см³. По таблице находим, что соляная кислота, с такой плотностью содержит 55,8 г/л HCl. Молекулярный вес HCl равен 36,461. На 1 л 0,1 N раствора HCl требуется 3,6461 г HCl. В 1000 мл исходной кислоты содержится 455,8 г HCl, в X мл содержится 3,6461 г HCl.

$$X = 3,6461 \times 1000 : 455,8 = 7,99 \text{ мл} = 8 \text{ мл}$$

Следовательно, для того чтобы приготовить 1 л 0,1М раствора HCl, нужно взять 8 мл HCl с плотностью 1,19 г/см³ и разбавить ее до 1 л водой; тщательно перемешать раствор.

Подготовка антибиотиков

Применяют гентамицин, канамицин, тилозин в растворах. Остальные антибиотики в виде порошков растворяют в растворах Хенкса или Эрла в концентрации, не превышающей 10% веса антибиотика.

Приготовление 0,25%-ного раствора трипсина

Раствор трипсина применяется для получения клеточной взвеси органов и тканей и снятия клеток с поверхности стекла. Для этой цели используют концентрат трипсина (производства «Sigma», США), который готовят согласно ТНПА изготовителя.

Срок годности трипсина при хранении + 4-6⁰С до 2 месяцев, при -20⁰С - до 6 месяцев. При длительном хранении диспергирующая активность трипсина снижается, что отрицательно влияет на качество получаемых клеток.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Все растворенные компоненты вносят в основной раствор, тщательно перемешивают. Колбы, в которых проводилось растворение отдельных компонентов, ополаскивают деминерализованной водой, которую добавляют к раствору.

В последнюю очередь в раствор вносят навеску растворенного отдельно L-глутамина, антибиотики, 10% сыворотки крови крупного рогатого скота и раствор двууглекислого натрия.

Перед использованием сыворотка крови крупного рогатого скота должна быть проверена на токсичность и ростовые свойства.

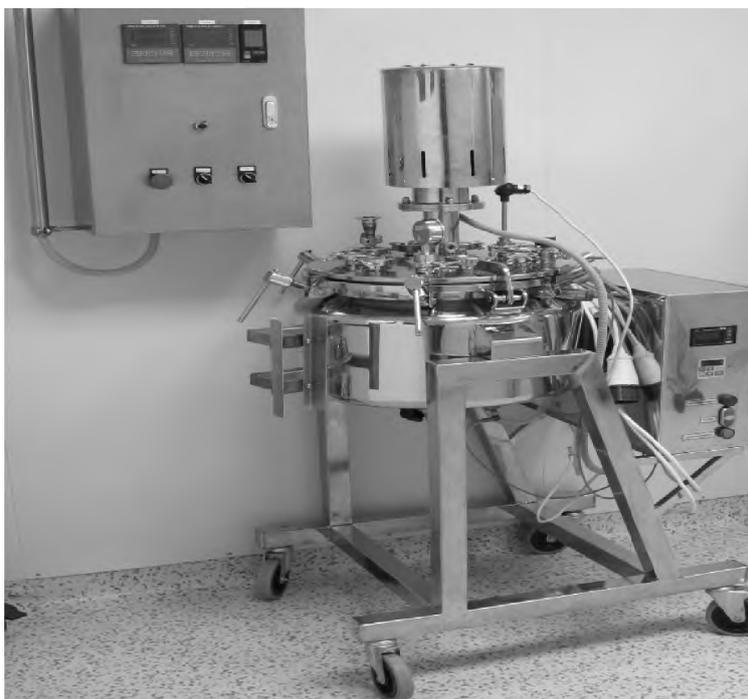


Рисунок 17 - Реакторы для растворения питательных сред

Стерилизация среды

Готовую питательную среду стерилизуют путем фильтрации через патронные или мембранные фильтры. Используются фильтры производителей «Палл», «Ватмэн» или «Миллипор».

В зависимости от поставленной задачи, объема питательной среды и других параметров подбирают необходимые комбинации фильтров по диаметру пор, материалу фильтр-элемента и рабочей площади фильтрации.



Рисунок 18 - Фильтры для стерилизации питательных сред и сывороток крови



Рисунок 19 - Реакторы для фильтрации питательных сред

Фильтрацию проводят под давлением 0,3-0,7 атм. Первую порцию среды из расчета 0,65–0,75 мл/см выбрасывают.

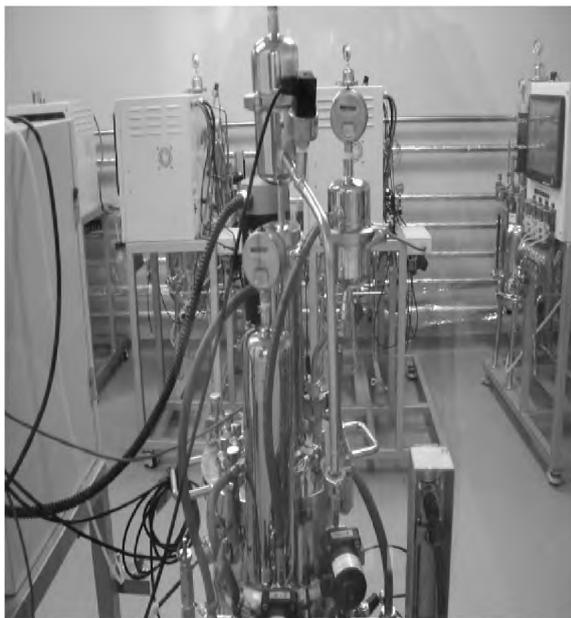


Рисунок 20 - Участок фильтрации



Рисунок 21 - Линия разлива стерильных питательных сред

Стерильную питательную среду для монослойного культивирования разливают по флаконам, закрывают стерильными резиновыми пробками и закатывают алюминиевыми колпачками. Для суспензионного выращивания клеток среду фильтруют непосредственно в реакторы для культивирования клеток.

В процессе фильтрации (начале, середине и конце) отбирают во флаконы по две пробы для контроля стерильности. Часть флаконов со средой помещают в термостат на 37°C, вторую часть оставляют при температуре 22°C. Контроль проводят в течение 10–14 дней.

По окончании фильтрации емкости с соблюдением правил асептики отсоединяют от фильтра и на них укрепляют этикетки с указанием номера партии среды, даты изготовления. Профильтрованную питательную среду проверяют на стерильность путем посева на питательные среды для микроорганизмов. Срок годности питательной среды при хранении + 4-6⁰С - год, при + 18-20⁰С- 6 месяцев.



Рисунок 22 - Холодильник для питательных сред



Рисунок 23 - Стеллажи для питательных сред



Рисунок 24 - Холодильная камера для хранения сывороток крови и питательных сред



Рисунок 25 - Морозильная камера

ПРОВЕРКА КАЧЕСТВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Определение стерильности препаратов

Бактериологический контроль на стерильность сред Игла MEM, Игла ДМЕМ, ФГМС и среды 199 или сыворотки осуществляют путем посева на питательные среды: тиогликолевую среду и агар Сабуро.

Исследуемый материал вносят в пробирки по 0,5 мл с питательной средой для микроорганизмов не менее чем в 4 повторениях. Пробирки с тиогликолевой средой инкубируют при +37⁰С, а с агаром Сабуро - при +20-22⁰С в течение 10 суток. Учет результатов проводят ежедневным просмотром посевов.

Оценка ростовых свойств и цитотоксичности

Перед использованием новых серий сред Игла MEM, Игла ДМЕМ, ФГМС и среды 199 или сыворотки проводят контроль на ростовые качества и отсутствие токсичности для культуры клеток.

Для оценки качества среды и сыворотку крупного рогатого скота подвергают тестированию по основным параметрам:

1. *Ростовые свойства.* Каждую серию сыворотки тестируют в диапазоне концентрации от 2% до 20%. Данный подход позволит нам выявить, какая из сывороток будет проявлять равную активность в более низких концентрациях, и это даст возможность использовать партию сыворотки в течение более длительного времени. Кроме того, если сыворотка окажется токсичной, то при высокой концентрации она проявится. Сыворотка крови не должна вызывать дегенеративные изменения в монослое перевиваемой тест-культуры клеток MDBK.

2. *Оценка роста.* Строится график кривой роста клеток при их выращивании на каждой серии сыворотки и определяются lag-период, время удвоения и плотность насыщения (плотность клеток при выходе кривой на плато). Сыворотка должна обеспечивать жизнеспособность клеток не менее 95%.

3. *Сохранение свойств культуры клеток.* Клетки с новой партией сыворотки должны иметь типичную для данной линии морфологию, обладать высокой чувствительностью к заражению к специфическим агентам (вирусам), сохранять стабильность всех биологических свойств в течение всего срока культивирования (количество пассажей).

4. *Стерильность.* Сыворотка не должна быть контаминирована микроорганизмами.

Охарактеризованная по вышеуказанным параметрам партия сыворотки хранится при минус 20⁰С в течение года и используется для выращивания культур клеток.

Оценку цитотоксических свойств сред и сыворотки определяют по методу, описанному А.Я. Самуйленко, В.И. Еремцом, Э.Ф. Токариком и др. (2006). Для работы используется культура клеток MDBK.

Клетки MDBK характеризуются высокой пролиферативной активностью (индекс пролиферации 5,0), а также чувствительностью к вирусам инфекционного ринотрахеита, диареи и коронавирусам. Популяция клеток обладает устойчивостью к криоконсервированию (жизнеспособность 95-99% при – 196⁰С в

течение 10 лет); при 4⁰С хранится до 10 суток (жизнеспособность 90-95%). Клетки адаптированы к монослойному культивированию на матрасах или в роллерных флаконах, выдерживают колебания рН в пределах 6,6-7,4 в пассажах и до 6,8-7,3.

Для работы используют клетки MDBK из банка клеток РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» или ОАО «БелВитунифарм», которые хранятся в виде кратных частей в криопробирках при -196⁰С (в жидком азоте) объемом 1,8-4,5 мл или в сверхнизкотемпературных холодильных установках при температуре -85⁰С± 1⁰С.

Ампулы с суспензией клеток извлекают из банка, помещают в водяную баню с температурой 37-40⁰С и выдерживают до полного оттаивания. Суспензию клеток центрифугируют, осадок клеток ресуспендируют в питательной среде и переносят в культуральные флаконы с ростовой средой, добавляя ее небольшими порциями для предотвращения осмотического шока клеток в 4 приема с интервалом в 1 минуту. Отбирают пробу для контроля стерильности и подсчета клеток. Полученную пробу окрашивают трипановым синим и другими общеизвестными красителями для определения % жизнеспособности клеток.

Концентрацию клеток подсчитывают в камере Горяева под малым увеличением микроскопа. После реконсервации суспензию клеток доводят питательной средой для монослойного выращивания до концентрации 200-300 тыс/мл жизнеспособных клеток, после чего высевают в культуральный флакон. Клетки выращивают 72-120 ч при рН-7,0-7,4 и температуре 37⁰С. Через 24 часа проводят смену питательной среды. Сформировавшийся клеточный монослой для проведения последующих пассажей снимают раствором версена с добавлением трипсина. Отслоившиеся от стекла клетки ресуспендируют в небольшом количестве ростовой питательной среды путем энергичного встряхивания, затем определяют количество клеток в вышеописанной последовательности, после чего производят посев в культуральные флаконы согласно паспортным данным. В дальнейшем для исследований используют выращенные клетки в 2-3 последующих пассажах.

Оценку цитотоксичности сред или сыворотки крови проводят путем их внесения на сформированный клеточный монослой.

В работе используют культуральные флаконы с клеточным монослоем объемом 25 см³, 75см³, 175 см³. Из культуральных флаконов с 48-часовой культурой клеток сливают ростовую среду и заменяют ее равным объемом (10 -100 мл) поддерживающей среды (среда Игла – 100%). В культуральные флаконы с контрольными культурами клеток добавляют исследуемую серию среды. Для оценки цитотоксичности сыворотки на образованный монослой клеток вносят тестируемую неразведенную сыворотку так, чтобы она полностью покрыла монослой. Продолжают инкубацию клеточных культур в термостате в течение 6 суток, проводят ежедневно под микроскопом визуальный контроль состояния клеточных культур. Контролем служат среды и сыворотка, заранее проверенные на цитотоксичность, с которой проводят те же манипуляции, что и с испытуемой.

Оценку токсичности исследуемых образцов проводят с помощью микроскопа «Nikon TS100» с фотокамерой. По отсутствию в клетках дегенеративных изменений: общего вида (рисунка культуры) отслойки микрокопа, вакуолизации, округление клеток и наличие в цитоплазме грубой зернистости.

На рисунке 26 приведена микрофотография культуры клеток MDBK с использованием нецитотоксичной сыворотки до внесения испытываемой серии сыворотки крови крупного рогатого скота.

Из рисунка 26 видно, что на поверхности матраса на 5-е сутки сформирован сплошной 100% монослой. Клетки имеют типичную для данной линии морфологию, тип роста – эпителиоподобный. Не содержит посторонних агентов (бактерий, грибов и т.д.)

На рисунках 27, 28, 29 приведена динамика изменений культуры клеток MDBK под воздействием токсичной серии сыворотки крови крупного рогатого скота.

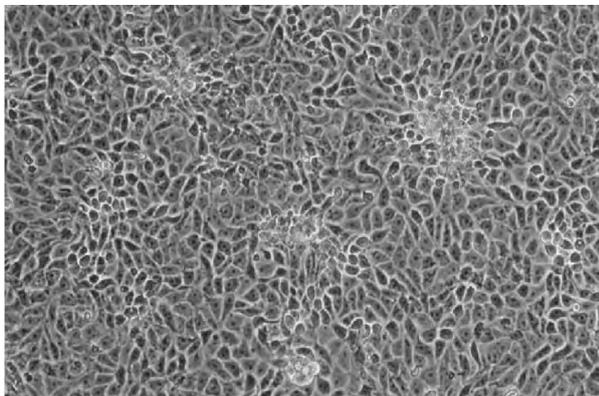


Рисунок 26. Монослой культуры клеток MDBK (5 суток) с использованием нецитотоксичной сыворотки – контроль. Фазовый контраст. Объектив 10x

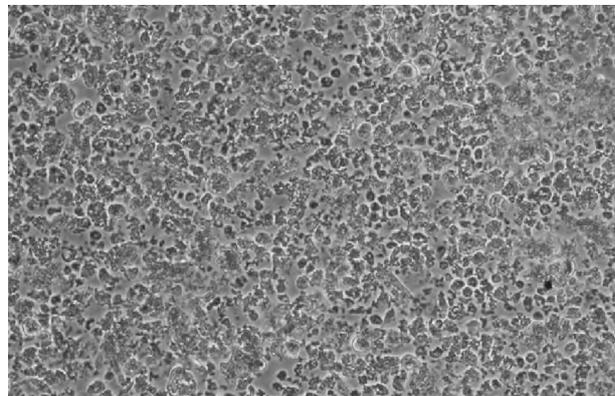


Рисунок 27. Дегенеративные изменения в монослое культуры клеток MDBK на 2 сутки под влиянием токсичной сыворотки крови крупного рогатого скота. Начальный период дегенерации монослоя. Фазовый контраст. Объектив 10x

Через 2 суток после внесения цитотоксической сыворотки (рисунок 27) на культуре клеток отмечается начальный период дегенерации монослоя, округление клеток, их частичное отслоение от поверхности стекла.

На 3 сутки культивирования перевиваемых клеток MDBK с токсичной сывороткой (см. рисунок 28) в монослое отмечены существенные дегенеративные изменения. Монослой клеток разрушен, видны скопления округлившейся клетки.

На 6 сутки (см. рисунок 29) монослой практически отслоился от стекла, отмечена гибель клеток. Клетки взвешены в среде в виде конгломератов.

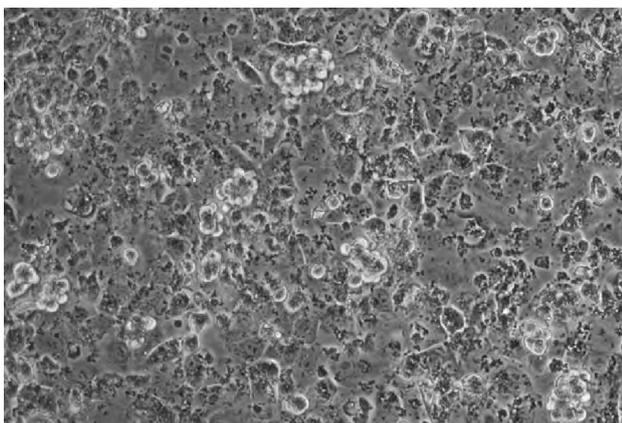


Рисунок 28 - Дегенеративные изменения в монослое культуры клеток MDBK на 3 сутки под влиянием токсичной сыворотки крови крупного рогатого скота. Монослой клеток разрушен, видны скопления округлившейся клетки. Фазовый контраст. Объектив 10х

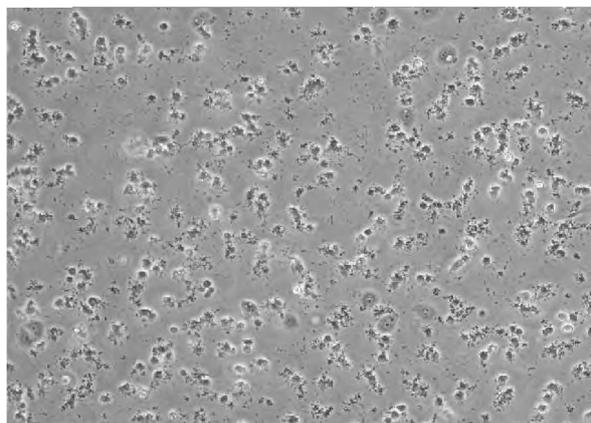


Рисунок 29 - Дегенеративные изменения в культуре клеток MDBK на 6 сутки под влиянием токсичной сыворотки крови крупного рогатого скота. Полное разрушение монослоя культур клеток. Фазовый контраст. Объектив 10х

СРЕДЫ ДЛЯ ЗАМОРАЖИВАНИЯ

Клеточную суспензию замораживают в присутствии криопротекторов, таких как глицерин или диметилсульфоксид (DMSO) (см. рисунок 30 и 31). Показано, что из двух этих криопротекторов более эффективным является DMSO, возможно потому, что он проникает в клетки лучше, чем глицерин. Обычно используются концентрации между 5% и 15%, чаще всего - 7,5% или 10%. Бывают ситуации, при которых DMSO может являться токсичным или индуцировать дифференцировку клеток, например в случае гематопоэтических клеточных линий L5178Y или HL60. В этих случаях предпочтительно использовать глицерин или центрифугировать клетки после размораживания для удаления криопротектора.

Клетки должны храниться при + 4⁰С после добавления DMSO в среду для замораживания, однако эксперименты позволяют предположить, что эта процедура не повышает выживание клеток после размораживания и может даже снизить ее в результате проникновения среды внутрь клеток.

DMSO должен быть бесцветным, и его следует хранить в стеклянном или пропиленовом флаконе, поскольку он является сильным растворителем и выщелачивает примеси из резины и некоторых пластмасс. Важно соблюдать сроки годности, т.к. при продолжительном хранении криопротектор может стать токсичным для клеток.



Рисунок 30 – Диметилсульфоксид (ДМСО)



Рисунок 31- Глицерин

Возможно использование также других криопротекторов, таких как поливинилпирролидон (PVP), полиэтиленгликоль (PEG) и гидроксилэтиловый крахмал (HES), но общего признания эти криопротекторы не получили, хотя показано некоторое повышение выживания при использовании трегалозы. Многие лаборатории также повышают концентрацию сыворотки в среде для замораживания от 40% - 50% или даже до 100%.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биологические препараты для профилактики вирусных заболеваний животных: разработка и производство в Беларуси / П. А. Красочко [и др.]; под ред. Н. А. Ковалева. – Минск : Беларуская навука, 2016. – 492 с.
2. Ветеринарная вирусология. Практикум : учебное пособие / Р. Б. Корочкин [и др.]; под ред. Р. Б. Корочкина. – Минск : ИВЦ Минфина, 2020. – 348 с.
3. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) / под. общ. ред. проф. Л. П. Дьяконова. – М.: Спутник+, 2009. – 656 с.
4. Исследование обмена белков и биоэлементов в ростовых питательных средах после культивирования на них культур клеток / П. А. Красочко [и др.] : материалы XIII Международной научной конференции молодых ученых «Молодежь в науке - 2016», г. Минск, 22–25 ноября 2016 г. – Минск, 2016. – С.14.
5. Культивирование клеток. Курс лекций / О. В. Блажевич. – Минск: БГУ, 2004. – 78с.
6. Культура клеток, тканей и органов растений: методические рекомендации для занятий студентов / Т. И. Дитченко. – Минск : БГУ, 2007. – 46 с.
7. Культура животных клеток: практическое руководство : пер. с англ. / Р. Я. Фрешни. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. – 691 с.
8. Новые и возвращающиеся болезни животных : монография / А.И. Ятусевич [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2016. – 400 с.
9. Применение культур клеток для оценки цитотоксичности сыворотки крови крупного рогатого скота / П. А. Красочко [и др.] // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск, 2017. –Т. 53, вып. 2. – С. 65–68.
10. Средства специфической профилактики инфекционных болезней крупного рогатого скота и свиней : практическое пособие / П. А. Красочко [и др.]. – Минск : ИВЦ Минфина, 2018. – 368 с.
11. Фрешни, Р.Я. Культура животных клеток : практическое руководство : пер. с англ. / Р. Я. Фрешни. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. – 691 с.
12. Эпизоотология и и инфекционные болезни : учебник / В.В. Максимович [и др.]; под ред. В.В. Максимовича. – 2-изд., перераб. и доп. – Минск : ИВЦ Минфина, 2017. – 824 с.

КАФЕДРА ЭПИЗОТОЛОГИИ И ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ

Кафедра эпизоотологии с организацией и экономикой ветеринарного дела – одна из старейших клинических кафедр академии. Она организована в 1927 году в условиях сложной эпизоотической ситуации в Беларуси.

В настоящее время на кафедре плодотворно трудятся 20 преподавателей: 2 профессора, 14 доцентов, старший преподаватель и 3 ассистента.

Заведующим кафедрой является доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор Красочко П.А.

На кафедре выполнено и успешно защищено 6 докторских и 23 кандидатские диссертаций.

Тематика научных исследований кафедры направлена на разработку новых и совершенствование имеющихся биопрепаратов, средств и методов лечения, диагностики, иммунокоррекции, общей и специфической профилактики при инфекционных болезнях животных.

Сотрудники кафедры участвуют в разработке нормативно-правовых актов в области ветеринарной деятельности и обеспечении биологической защиты животноводческих ферм и комплексов Республики Беларусь и ЕАЭС. Ими изданы все необходимые для организации учебного процесса отечественные учебники по эпизоотологии, организации и экономике ветеринарного дела, учебно-методические пособия, монографии и другая специальная литература. В учебном процессе используются различные активные формы обучения, технические и другие дидактические средства.

Коллектив кафедры оказывает большую методическую, консультативную и практическую помощь ветеринарной службе Республики Беларусь по вопросам диагностики и ликвидации инфекционных болезней животных.

Эпизоотическая ситуация в Республике Беларусь за последние годы улучшилась: ликвидирован ряд инфекционных болезней сельскохозяйственных животных; снизилась заболеваемость животных многими инфекционными болезнями. В эту успешную работу ветеринарной службы страны сотрудники кафедры вносят значительный вклад. Связь с производством позволяет кафедре вести учебную и научно-исследовательскую работу в соответствии с современными требованиями.

По вопросам сотрудничества обращаться по адресу:

210026 РБ, г. Витебск, ул. 1-я Доватора, 7/3

кафедра эпизоотологии, тел. 8 0212 33-16-31

E-mail: epizootology1927@gmail.com

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ «ВИТЕБСКАЯ ОРДЕНА «ЗНАК ПОЧЕТА» ГОСУДАРСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ»

Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины является старейшим учебным заведением в Республике Беларусь, ведущим подготовку врачей ветеринарной медицины, ветеринарно-санитарных врачей, провизоров ветеринарной медицины и зооинженеров.

Вуз представляет собой академический городок, расположенный в центре города на 17 гектарах земли, включающий в себя единый архитектурный комплекс учебных корпусов, клиник, научных лабораторий, библиотеки, студенческих общежитий, спортивного комплекса, Дома культуры, столовой и кафе, профилактория для оздоровления студентов. В составе академии 4 факультета: ветеринарной медицины, биотехнологический; повышения квалификации и переподготовки кадров агропромышленного комплекса; международных связей, профориентации и довузовской подготовки. В ее структуру также входят Аграрный колледж УО ВГАВМ (п. Лужесно, Витебский район), филиалы в г. Речице Гомельской области и в г. Пинске Брестской области, первый в системе аграрного образования НИИ прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии (НИИ ПВМ и Б).

В настоящее время в академии обучается более 4 тысяч студентов, как из Республики Беларусь, так и из стран ближнего и дальнего зарубежья. Учебный процесс обеспечивают 324 преподавателя. Среди них 180 кандидатов, 30 докторов наук и 21 профессор.

Помимо того, академия ведет подготовку научно-педагогических кадров высшей квалификации (кандидатов и докторов наук), переподготовку и повышение квалификации руководящих кадров и специалистов агропромышленного комплекса, преподавателей средних специальных сельскохозяйственных учебных заведений.

Научные изыскания и разработки выполняются учеными академии на базе Научно-исследовательского института прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии. В его состав входит 2 отдела: научно-исследовательских экспертиз (с лабораторией биотехнологии и лабораторией контроля качества кормов); научно-консультативный.

Располагая современной исследовательской базой, научно-исследовательский институт выполняет широкий спектр фундаментальных и прикладных исследований, осуществляет анализ всех видов биологического материала и ветеринарных препаратов, кормов и кормовых добавок, что позволяет с помощью самых современных методов выполнять государственные тематики и заказы, а также на более высоком качественном уровне оказывать услуги предприятиям агропромышленного комплекса. Активное выполнение научных исследований позволило получить сертификат об аккредитации академии Национальной академией наук Беларуси и Государственным комитетом по науке и технологиям Республики Беларусь в качестве научной организации. Для проведения данных исследований отдел научно-исследовательских экспертиз аккредитован в Национальной системе аккредитации в соответствии с требованиями стандарта СТБ ИСО/МЭК 17025.

Обладая большим интеллектуальным потенциалом, уникальной учебной и лабораторной базой, вуз готовит специалистов в соответствии с европейскими стандартами, является ведущим высшим учебным заведением в отрасли и имеет сертифицированную систему менеджмента качества, соответствующую требованиям ISO 9001 в национальной системе (СТБ ISO 9001 – 2015).

www.vsavm.by

210026, Республика Беларусь, г. Витебск, ул. 1-я Доватора, 7/11, факс (0212) 48-17-65, тел. 33-16-29 (факультет международных связей, профориентации и довузовской подготовки); 33-16-17 (НИИ ПВМ и Б); E-mail: vsavmpriem@mail.ru.

Учебное издание

Красочко Петр Альбинович
Красочко Ирина Александровна
Костюк Наталья Ивановна и др.

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КУЛЬТУР КЛЕТОК

Учебно-методическое пособие

Ответственный за выпуск П. А. Красочко
Технический редактор О. В. Луговая
Компьютерный набор П. А. Красочко
Компьютерная верстка Т. А. Никитенко
Корректор Т. А. Никитенко

Подписано в печать 03.06.2021. Формат 60×84 1/16.
Бумага офсетная. Ризография.
Усл. печ. л. 2,50. Уч.-изд. л. 1,81. Тираж 100 экз. Заказ 2146.

Издатель и полиграфическое исполнение:
учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета»
государственная академия ветеринарной медицины».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/ 362 от 13.06.2014.
ЛП №: 02330/470 от 01.10.2014 г.
Ул. 1-я Доватора, 7/11, 210026, г. Витебск.
Тел.: (0212) 48-17-82.
E-mail: rio_vsavm@tut.by
<http://www.vsavm.by>