

ΑΣΚΗΣΗ 1 | ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΖΩΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ^{1,2}: ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ A549 ΑΠΟ ΛΙΠΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΗ (LPS)

Κυτταρική σειρά A549

Η κυτταρική σειρά A549 δημιουργήθηκε το 1972³. Είναι σειρά καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων που έχουν απομονωθεί από ανθρώπινο πνεύμονα Καυκάσιας φυλής, ηλικίας 58 ετών, γένους αρσενικού.

Έχει **επίπεδο βιοασφάλειας I**.

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλήρες θρεπτικό υλικό που περιέχει τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη και τη βιωσιμότητά τους. Βασικά συστατικά του θρεπτικού υλικού είναι: ορός (FBS, Fetal Bovine Serum), L-γλουταμίνη και μίγμα αντιβιοτικών/αντιμυκητιασικών για την προστασία των κυττάρων από μολύνσεις. Ανά 2-3 μέρες γίνεται αλλαγή του θρεπτικού υλικού ώστε να ανανεώνονται τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Η πρόσφυση των κυττάρων ποικίλλει ανάλογα με το είδος των κυττάρων, ενώ για τα A549 απαιτούνται περίπου 24 ώρες. Όταν σχηματισθεί πλήρες ταπήτιο (ο χρόνος ποικίλλει για κάθε κύτταρο και εξαρτάται και από εξωγενείς παράγοντες), γίνεται ανακαλλιέργεια των προσκολλημένων κυττάρων.

Συνήθως, πριν την εκτέλεση ενός πειράματος ενεργοποίησης, τα κύτταρα τίθενται σε μη πλήρες θρεπτικό υλικό, απουσία ορού, για να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός και η ανάπτυξή τους (growth arrest).

Τα πειράματα γίνονται σε κύτταρα μετά τη δεύτερη ανακαλλιέργεια και όταν σχηματισθεί πλήρες ταπήτιο, οπότε η επιφάνεια του τρυβλίου είναι κατά 80-90% καλυμμένη από προσκολλημένα κύτταρα.

1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ A549 ΑΠΟ ΛΙΠΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΗ (LPS)

Η παραλαβή των κυττάρων γίνεται με διάλυμα θρυψίνης, μιας σερινοπρωτεάσης, η οποία διασπά τους δεσμούς μεταξύ των κυττάρων και της επιφάνειας του τρυβλίουⁱ ή, αν το επιβάλλει ο τύπος του πειράματος, με ειδικό ξέστρο, μηχανικά. Σε πλήρες θρεπτικό υλικό και σε σταθερές συνθήκες ανάπτυξης (θερμοκρασία 37°C και 5% CO₂) τα κύτταρα A549 έχουν χρόνο διπλασιασμού περί τις 72 ώρες.

Καλλιέργεια κυττάρων A549

Υλικά- Συσκευές

- Αιματοκυτόμετρο Neubauer
- Ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης
- Επωαστικός θάλαμος CO₂: Θάλαμος σταθερής θερμοκρασίας (37°C), 5% CO₂
- Θάλαμος νηματοειδούς ροής, επιπέδου Βιοασφάλειας II
- Σύστημα αυτόματης αναρρόφησης υγρών
- Πλαστικά αποστειρωμένα σιφώνια
- Τρυβλία καλλιέργειας κυττάρων (Ø50 και 100 mm)
- κρυοφιαλίδια του 1.5mL

Αντιδραστήρια

- Θρεπτικό υλικό: Ham's F12K (Nutrient Mixture Kaighn's Modification 1x)
- Ορός εμβρύου βοός (Fetal bovine serum, FBS)
- L-Γλουταμίνη, 200mM
- Ανθρακικό νάτριο, 7.5% (w/v)
- Αντιβιοτικό (Antibiotic- antimycotic 10,000 U/mL πενικιλίνη, 10,000 µg/mL θειική στρεπτομυκίνη, 25 µg/mL αμφοτερικίνη B)
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS-saline, pH 7.4.
- Διάλυμα 0.4% Trypan blue
- Διάλυμα θρυψίνης-EDTA (1x) (Trypsin- EDTA 1x, 0.5g/L trypsin, 0.2g/L EDTA σε PBS 1x)

ⁱ Συγκεκριμένα, διασπά πεπτιδικούς δεσμούς καταλοίπων αργινίνης και λυσίνης στο καρβοξυτερικό άκρο, όχι όμως αν αυτά ακολουθούνται από προλίνη.

1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ A549 ΑΠΟ ΛΙΠΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΗ (LPS)

Διαλύματα εργασίας*Αδρανοποίηση FBS*

▫ Το FBS του εμπορίου απενεργοποιείται σε υδατόλουτρο στους 60°C για 30min. Στη συνέχεια, διαμοιράζεται σε αποστειρωμένα πλαστικά corning ανά 50mL σε στείρες συνθήκες, αφού πρώτα διηθηθεί από αποστειρωμένο φίλτρο. Φυλάσσεται στους -20°C.

Πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κυττάρων A549

▫ Στα 500mL θρεπτικού υλικού F12K προστίθενται 50mL αδρανοποιημένου FBS, 5mL γλουταμίνης, 10mL ανθρακικού νατρίου και 5mL αντιβιοτικού σε στείρες συνθήκες. Το πλήρες θρεπτικό υλικό φυλάσσεται στους 4°C.

Μη πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κυττάρων A549

▫ Στα 500mL θρεπτικού υλικού F12K προστίθενται 5mL γλουταμίνης, 10mL δικαρβονικού νατρίου και 5mL αντιβιοτικού σε στείρες συνθήκες. Το μη πλήρες θρεπτικό υλικό φυλάσσεται στους 4°C.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**Απόψυξη κυττάρων**

Σε τρυβλίο Ø100mm προστίθενται 8mL πλήρους θρεπτικού υλικού. Μεταφέρονται κύτταρα από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο 37°C για 1-2min μέχρι να ξεπαγώσουν. Με αποστειρωμένο σιφώνιο τα κύτταρα αναδιασπείρονται σχολαστικά και μεταφέρονται στο τρυβλίο. Συμπληρώνεται ο όγκος στο τρυβλίο στα 10mL με πλήρες θρεπτικό υλικό. Το τρυβλίο με τα κύτταρα παρατηρείται σε ανάστροφο μικροσκόπιο και ακολούθως μεταφέρεται στον επωαστικό θάλαμο 5% CO₂ στους 37°C.

Ανακαλλιέργεια κυττάρων (splitting)

Στο στάδιο αυτό γίνεται ανανέωση του θρεπτικού υλικού των κυττάρων για να αντικατασταθούν τα υλικά που έχουν καταναλωθεί:

▫ Σε οπτικό μικροσκόπιο παρατηρούμε αν τα κύτταρα έχουν κολλήσει στο τρυβλίο και αν έχουν πλήρες ταπήτιο (~80% κάλυψη του τρυβλίου).

▫ Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό, το ταπήτιο των κυττάρων εκπλένεται προσεκτικά 2 φορές με 2.5mL PBS και προστίθενται 3mL διαλύματος θρυψίνης-EDTA (2mL για 5 x 10⁶ κύτταρα/ τρυβλίο). Η θρυψίνη διασπά πεπτιδικές αλυσίδες στο καρβοξυλικό άκρο των αμινοξέων λυσίνη και αργινίνη, εκτός από τις περιπτώσεις που αυτά ακολουθούνται από προλίνη.

▫ Το τρυβλίο μεταφέρεται στον επωαστικό θάλαμο CO₂, μέχρι να ολοκληρωθεί η αποκόλληση των κυττάρων (~10min).

1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ A549 ΑΠΟ ΛΙΠΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΗ (LPS)

- Προστίθενται 3mL PBS για την απενεργοποίηση της θρυψίνης και τα κύτταρα συλλέγονται. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του εναιωρήματος των κυττάρων για 5min στα 800xg.
- Το υπερκείμενο (PBS με θρυψίνη) απορρίπτεται, προστίθεται στο ίζημα των κυττάρων κατάλληλη ποσότητα πλήρους θρεπτικού υλικού και τα κύτταρα αναδιασπείρονται σχολαστικά.
- Σε κάθε νέο τρυβλίο τοποθετούνται περίπου 1×10^6 κύτταρα. Τα τρυβλία μεταφέρονται στον επωαστικό θάλαμο για προσκόλληση.

Μέτρηση αριθμού και βιωσιμότητας κυττάρων (βλ. Τεχνικό Παράρτημα Άσκησης 1)

Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων γίνεται σε αιματοκυτόμετρο Neubauer. Για τη διάκριση των ζωντανών από τα νεκρά κύτταρα γίνεται βαφή τους με Trypan blue, με την εξής διαδικασία:

1. Σε σωλήνα erpendorf προσθέτουμε 90μL βαφής Trypan Blue 1x (από το stock 10μL βαφής και 90μL dH₂O) και 10μL εναιωρήματος κυττάρων.
 2. Αναδεύουμε επανειλημμένα με αυτόματη πιπέτα, παραλαμβάνουμε 10μL και τα τοποθετούμε στο αιματοκυτόμετρο μεταξύ πλάκας και καλυπτρίδας. Τοποθετούνται 10μL του εναιωρήματος κυττάρων - T. Blue
 3. Γίνεται μέτρηση του αριθμού των κυττάρων στο μικροσκόπιο (εστίαση με φακό 10x ή 20x, μέτρηση με 40x). Καταγράφεται ο αριθμός των ζωντανών και νεκρών κυττάρων. Τα ζωντανά κύτταρα εμφανίζονται ως "φωτεινά" ενώ τα νεκρά χρωματίζονται μπλε.
- Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων του δείγματος υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Συνολικός αριθμός κυττάρων} = (\text{αριθμός κυττάρων}) \times (\text{αραίωση}) \times 10^4$$

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

1. Η βαφή Trypan blue είναι υδρόφιλη και εισέρχεται στο κύτταρο μόνο όταν η κυτταρική μεμβράνη έχει οπές (νέκρωση κυττάρου).
 2. Η βαφή Trypan blue είναι τοξική και καρκινογόνος, γι' αυτό πρέπει να φοράμε γάντια και μάσκα κατά τη χρήση της (βλέπε σχετικό MSDS: P0935).
 3. Πηγές σφάλματος κατά τη μέτρηση δημιουργούν:
 - Η παρουσία φυσαλίδων και υπολειμμάτων
 - Η υπερπλήρωση της πλάκας
 - Η ελλειψή πλήρωση της πλάκας
 - Η ανομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων στην πλάκα
- Ο μικρός αριθμός κυττάρων για μέτρηση μπορεί να ξεπεραστεί με φυγοκέντρηση των κυττάρων

1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ A549 ΑΠΟ ΛΙΠΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΗ (LPS)

και επανεναιώρηση σε μικρότερο όγκο.

Ο μεγάλος αριθμός κυττάρων για μέτρηση μπορεί να ξεπεραστεί με τη χρήση ενός υψηλότερου συντελεστή αραιώσης σε Trypan blue, π.χ. 1:10

Ενεργοποίηση κυττάρων A549 με βακτηριακό λιποπολυσακχαρίτη (LPS)

Εισαγωγή

Ο βακτηριακός λιποπολυσακχαρίτης (LPS) χρησιμοποιείται για ενεργοποίηση των κυττάρων αντίστοιχη με αυτή των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, στο εξωτερικό περίβλημα των οποίων βρίσκεται σε αφθονία. Το μόριο του LPS αποτελείται από τρεις περιοχές:

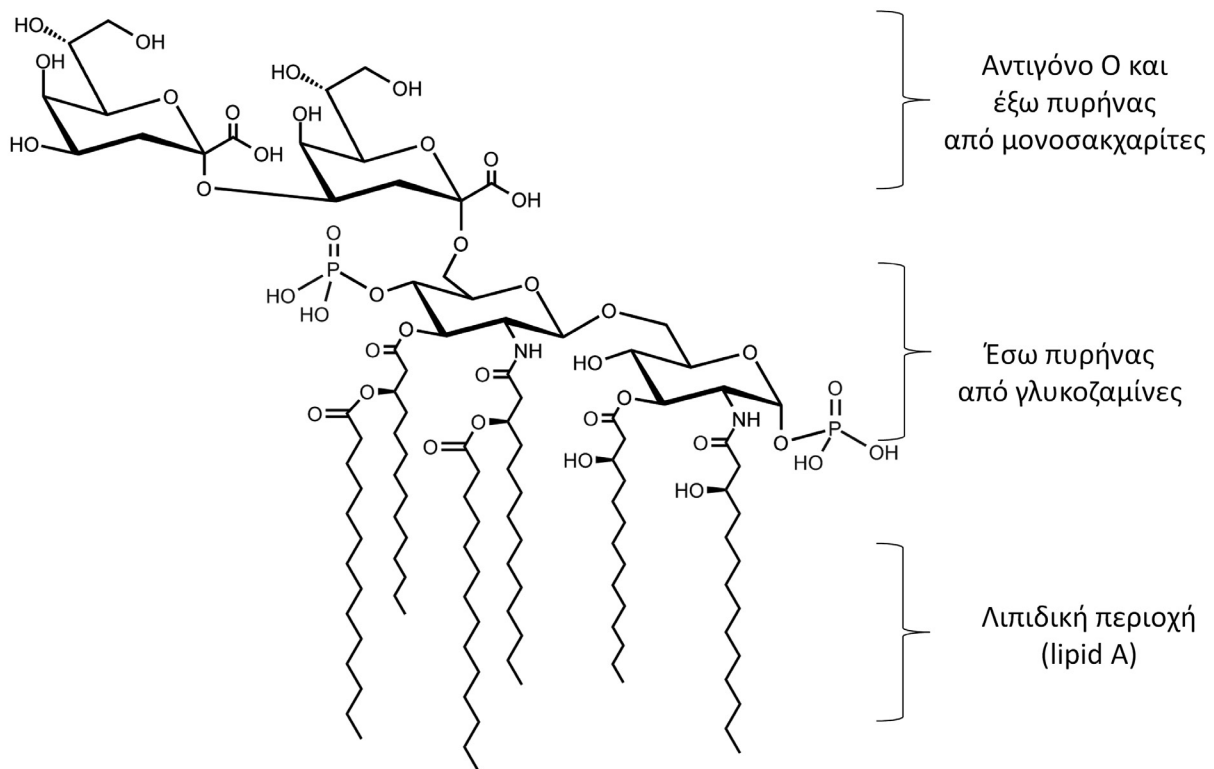
- Το λιπίδιο A, το οποίο είναι το φωσφολιπίδιο υπεύθυνο για τις ενδοτοξικές ικανότητες του LPS αφού μπορεί να επάγει παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών. Το λιπίδιο A βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη των βακτηρίων. Η δομή του μεταβάλλεται ως απόκριση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα, οδηγώντας σε διαφοροποίηση της ενδοτοξικότητας ή της αντίστασης του βακτηρίου σε αντιμικροβιακούς παράγοντες.

- Ο εσωτερικός πυρήνας ολιγοσακχαρίτη, ο οποίος συνδέεται με το λιπίδιο A και συμμετέχει επίσης στην ανάπτυξη αντίστασης σε υδρόφοβα αντιμικροβιακά πεπτίδια. Αν και το ενεργό μέρος του LPS είναι το λιπίδιο A, η φύση και ο αριθμός των προσαρτημένων καταλοίπων σακχαριτών παίζει ρόλο στη ρύθμιση της ενδοτοξικότητας του LPS.

- Η εξωτερική περιοχή Ο-πολυσακχαρίτη (αντιγόνου-O), η οποία και διαθέτει εξαιρετική ποικιλομορφία, ακόμα και στο ίδιο είδος βακτηρίων. Η περιοχή αυτή είναι η εξωτερική του μορίου LPS και συνεπώς αποτελεί την αντιγονική περιοχή-στόχο των ανοσολογικών αποκρίσεων των ξενιστών **(Σχήμα 1.1)**

Το τελικό προϊόν της ενεργοποίησης με LPS είναι η παραγωγή πληθώρας φλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών, οι οποίες και ασκούν άμεση αντι-μικροβιακή δράση, επιφέρουν απόπτωση ή επηρεάζουν το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Μεταξύ αυτών παράγεται και εκκρινόμενη φωσφολιπάση A_2 (sPLA₂), που αποτελεί δείκτη φλεγμονής. Με το ένζυμο αυτό θα ασχοληθούμε και σε επόμενη εργαστηριακή άσκηση.

1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ A549 ΑΠΟ ΛΙΠΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΗ (LPS)



Σχήμα 1.1 Δομή βακτηριακού λιποπολυσακχαρίτη (LPS).

Πειραματικό μέρος

Το πείραμα ακολουθεί το διάγραμμα ροής του Σχήματος 1.2.

Διαλύματα

- Stock διάλυμα LPS: 0.8mg LPS /mL PBS

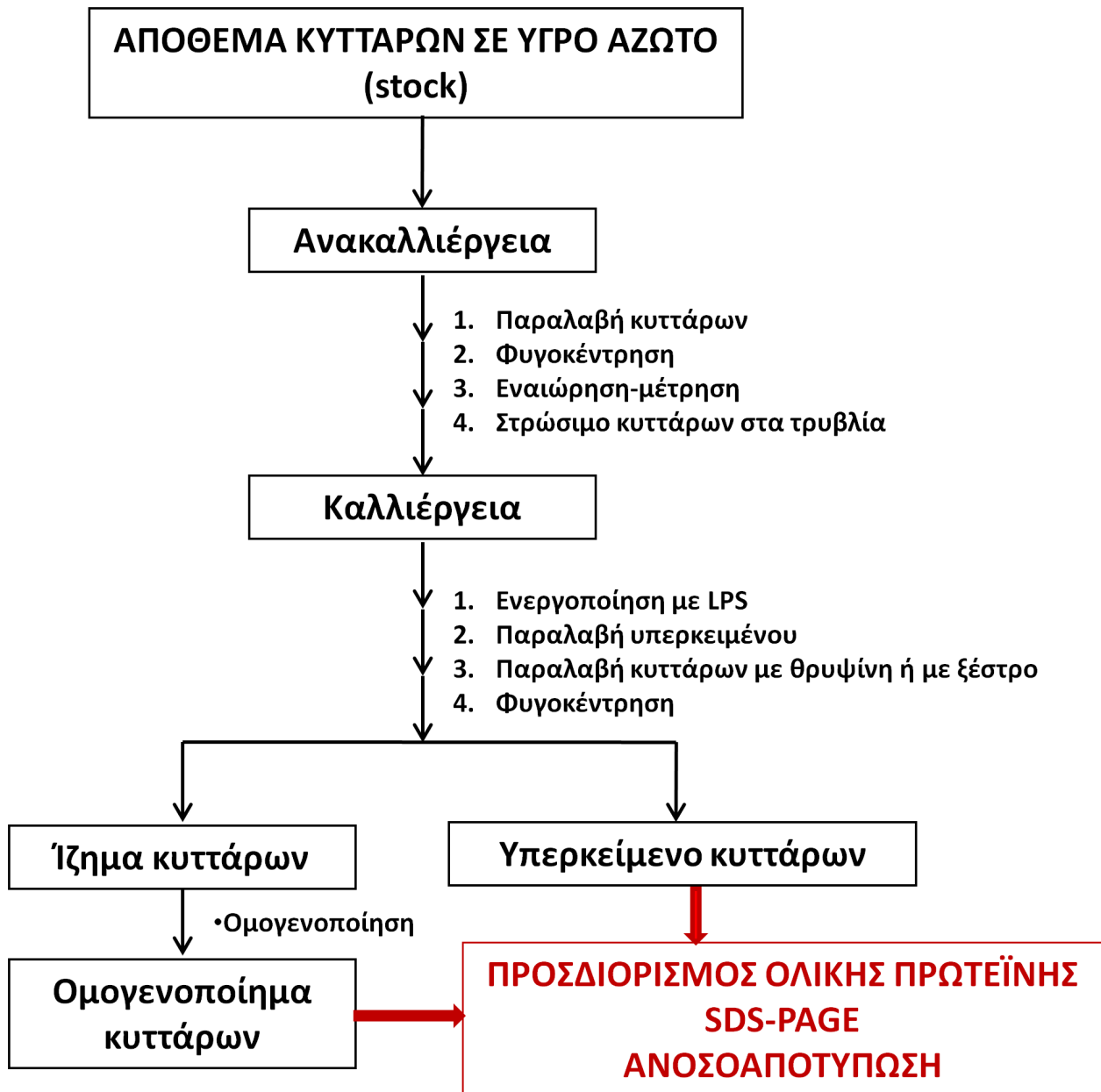
> Διαδικασία

- Μετά από περίπου 48 ώρες, οπότε έχει σχηματισθεί πλήρες ταπήτιο, το πλήρες θρεπτικό υλικό αντικαθίσταται με μη πλήρες (χωρίς ορό), για διακοπή του κυτταρικού κύκλου.
- Προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα ενεργοποιητή LPS (6.25μL από το Stock διάλυμα 0.8mg LPS /mL PBS), προκύπτει τελική συγκέντρωση 1.0μg LPS /mL PBS και τα κύτταρα επωάζονται για 24 ώρες.
- Με την ολοκλήρωση της δράσης των ενεργοποιητών συλλέγονται τα κύτταρα και το υπερκείμενο χωριστά.
- Το υπερκείμενο συλλέγεται σε erpendorf για προσδιορισμό ολικής πρωτεΐνης και άλλους προσδιορισμούς εκκριθέντων διαλυτών παραγόντων, διαμοιράζεται και φυλάσσεται στους -80°C .
- Τα κύτταρα, μετά από προσθήκη 1mL PBS, συλλέγονται και ακολουθεί ομογενοποίηση όπως

1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ A549 ΑΠΟ ΛΙΠΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΗ (LPS)

περιγράφεται παρακάτω.

- Τέλος, το ομογενοποίημα διαμοιράζεται σε errendorf και τα δείγματα φυλάσσονται στους -80°C.



Σχήμα 1.2 Διάγραμμα ροής της άσκησης.

Συλλογή και ομογενοποίηση κυττάρων. Παρασκευή εκχυλισμάτων και συλλογή υπερκείμενων

Υλικά- συσκευές

- Ψυχόμενη Φυγόκεντρος
- Ομογενοποιητής υπερήχων
- Tris-HCl
- SDS
- β-Μερκαπτοαιθανόλη
- Κυανού της βρωμοφαινόλης
- Γλυκερόλη

Διαλύματα

Διάλυμα μετουσίωσης 2x (sample buffer), 0.5 M Tris, 0.14M SDS, 20% γλυκερόλη, 2% β-μερκαπτοαιθανόλη, 0.03mM κυανού της βρωμοφαινόλης.

Αναμιγνύονται 2.5mL ρυθμιστικού διαλύματος 0.5M Tris, pH 6.8, 4mL διαλύματος 10% SDS, 2mL γλυκερόλης, 0.2mL β-μερκαπτοαιθανόλης και 0.2mg κυανού της βρωμοφαινόλης. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 10mL με dH₂O.

Το διάλυμα διαμοιράζεται σε μικρούς όγκους και φυλάσσεται στους -80°C.

Συλλογή και ομογενοποίηση κυττάρων

Μετά το πέρας του πειράματος, γίνεται συλλογή κυττάρων και υπερκείμενων χωριστά. Όλες οι διαδικασίες γίνονται στους 4 °C ως εξής:

Το υπερκείμενο των καλλιέργειών συλλέγεται προσεκτικά με πλαστικό σιφώνιο σε πλαστικό σωλήνα σε πάγο.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10min στα 1,000xg, στους 4°C. Μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο συλλέγεται και μοιράζεται σε μικρούς όγκους. Αποθηκεύεται στους - 80°C.

Το ίζημα των 1,000g, που αποτελείται συνήθως από νεκρά κύτταρα, απορρίπτεται (εκτός αν το είδος του πειράματος επιβάλλει άλλη διαδικασία).

Τα κύτταρα ξεπλένονται με ψυχρό PBS (2 φορές). Ακολουθεί παραλαβή των κυττάρων με ξέστρο ή διάλυμα θρυψίνης, ομογενοποίηση, διαμοιρασμός και φύλαξη στους - 80°C.

Παραλαβή ιζήματος κυττάρων σε PBS με ειδικό ξέστρο

Το ίζημα των κυττάρων συλλέγεται σε κατάλληλη ποσότητα ψυχρού PBS μετά από απόξεση του ταπήτιου με ειδικό ξέστρο. Ακολουθεί λύση των κυττάρων με υπερήχους (3 x 15 sec) σε πάγο. Τέλος,

1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ A549 ΑΠΟ ΛΙΠΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΗ (LPS)

το δείγμα μοιράζεται σε μικρότερους όγκους. Ακολουθεί αποθήκευση στους -80°C .

Παραλαβή των κυττάρων με θρυψίνη

Εναλλακτικά, προσθέτουμε στο τρυβλίο κατάλληλη ποσότητα (3mL) διαλύματος θρυψίνης-EDTA και αφήνουμε στον επωαστικό θάλαμο (37°C και $5\% \text{CO}_2$) μέχρι να αποκολληθούν τα κύτταρα ($\sim 10\text{min}$). Προστίθεται πλήρες θρεπτικό υλικό και το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε ειδικούς πλαστικούς σωλήνες.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση του εναιωρήματος των κυττάρων στα 500xg, 4°C για 5min. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθεται κατάλληλη ποσότητα (3mL) ψυχρού PBS. Τα κύτταρα αναδιασπείρονται και λύνονται με υπερήχους (3 x 15sec) σε πάγο. Τέλος, το δείγμα μοιράζεται σε μικρότερους όγκους. Αποθηκεύεται στους -80°C

Προκατεργασία δειγμάτων για SDS-PAGE

Σε περίπτωση κατά την οποία πρόκειται να χρησιμοποιήσουμε τα κύτταρα απευθείας για ηλεκτροφόρηση σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE, για μεγαλύτερη ακρίβεια, γίνεται παραλαβή των κυττάρων απευθείας από το τρυβλίο όπου βρίσκονται προσκολλημένα, ή μετά την απομόνωσή τους σε erpendorf, με διάλυμα μετουσίωσης, ως εξής: Στο ίζημα των κυττάρων προστίθενται κατάλληλη ποσότητα **διαλύματος μετουσίωσης** (ανάλογη με τον αριθμό των κυττάρων του ιζήματος). Στην περίπτωση προσκολλημένων κυττάρων το ίζημα συλλέγεται με απόξεση του ταπητίου με ξέστρο και συλλέγεται το κυτταρικό εναιώρημα. Αλλιώς, το διάλυμα μετουσίωσης προστίθεται στο erpendorf με το ίζημα των κυττάρων. Ακολουθεί βρασμός για 5 περίπου λεπτά. Τέλος, το δείγμα μοιράζεται σε μικρότερους όγκους και αποθηκεύεται στους -80°C .

Αναλύσεις – Προσδιορισμοί

Στα ομογενοποιημένα των κυττάρων και στα υπερκείμενα της κυτταροκαλλιέργειας:

- **Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης κατά Bradford**, για ποσοτικοποίηση του υλικού μας
- **Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών** σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου υπό μετουσιωτικές συνθήκες (**SDS-PAGE**) (διαχωρισμός των πρωτεϊνών)
- Προσδιορισμός με την τεχνική της **ανοσοαποτύπωσης**, των ισοενζύμων της sPLA₂ (ανίχνευση συγκεκριμένης πρωτεΐνης).

1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ A549 ΑΠΟ ΛΙΠΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΗ (LPS)

Βιβλιογραφία

- 1 The European Collection of Cell Cultures (ECACC) Handbook – Fundamental Techniques and Protocols for ECACC Cell Lines, 2nd Edition.
- 2 Fisher D, Francis G E, Rickwood D (1988), Cell separation, A practical approach. Oxford. Oxford University Press.
- 3 Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP (1973) *In vitro* cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*, 51(5):1417-1423.