

VJEŽBA 4. TEST CITOTOKSIČNOSTI (CTT)

1. Priprema niza dvostrukih razrjeđenja seruma

Za jedan niz označiti 15 epruveta. U svaku epruvetu staviti po 0,1 mL Hanksove otopine. Zatim u prvu epruvetu dodati 0,1 mL antiseruma (u našem testu koristi se štakorski serum protiv mišjih timocita, dobiven imunizacijom štakora stanicama mišjeg timusa). Napraviti seriju dvostrukih razrjeđenja seruma: iz prve epruvete prebaciti 0,1 mL sadržaja u drugu, dobro izmiješati → 0,1 mL sadržaja iz te epruvete prebaciti u slijedeću epruvetu u nizu itd. do kraja serije epruveta.

2. Priprema suspenzije stanica

Propuhivanjem u 5-10 mL Hanksove otopine pripremiti suspenziju mišjeg timusa. Suspenziju centrifugirati, odliti supernatant, a talog stanica resuspendirati u 1-2 mL Hanksove otopine. Izbrojati stanice u suspenziji i podesiti im broj na 6×10^6 stanica/mL. Po 0,1 mL suspenzije stavljati u svaku epruvetu u nizu dvostrukih razrjeđenja seruma.

- Ostaviti 30 minuta na sobnoj temperaturi.

3. Dodavanje komplementa

Komplement razrijediti pomoću Hanksove otopine 6 puta. Nakon prve inkubacije u svaku epruvetu u nizu dodati po 0,1 mL razrijeđenog komplementa.

- Epruvete inkubirati 35 minuta na 37 °C.

4. Brojanje mrtvih i živih stanica

U svaku epruvetu u nizu neposredno prije brojenja dodati po 0,1 mL tripanskog modrila. Sadržaj epruvete resuspendirati, kap suspenzije s tripanskim modrilom staviti na predmetno stakalce ili na komoricu za brojanje stanica s ugraviranom mrežicom, i poklopiti pokrovnim stakalcem.

Pod mikroskopom izbrojati mrtve i žive stanice. Izraziti postotak mrtvih stanica.

Tablica 1. Rezultati CCT

RAZRJEĐENJE SERUMA	BROJ ŽIVIH STSNICA	BROJ MRTVIH STANICA	POSTOTAK MRTVIH STANICA
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			

Najveće razrjeđenje seruma pri kojem je on potpuno učinkovit: _____