

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie – 22.2.2012

# Studium buněk v podmínkách *in vitro*

doc. RNDr. Renata Veselská, Ph.D., M.Sc.

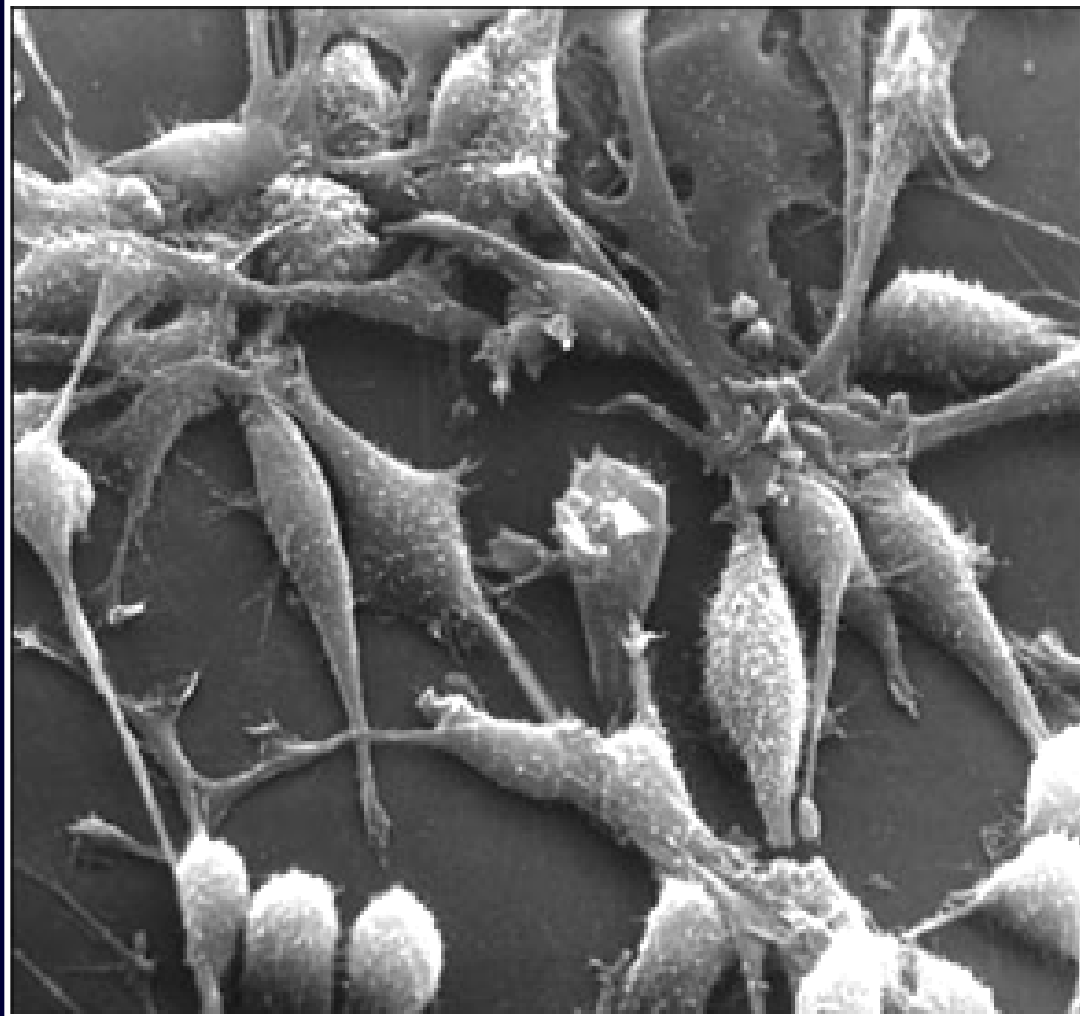
Ústav experimentální biologie

Přírodovědecká fakulta MU



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky



10  $\mu\text{m}$

fibroblasty v buněčné kultuře

## Program přednášky:

- vývoj kultivací buněk *in vitro*
- podmínky kultivace eukaryontních buněk *in vitro*
- typy kultivací (terminologie)
- vlastnosti normálních a transformovaných buněčných linií
- praktické aplikace
- archivace, sbírková pracoviště

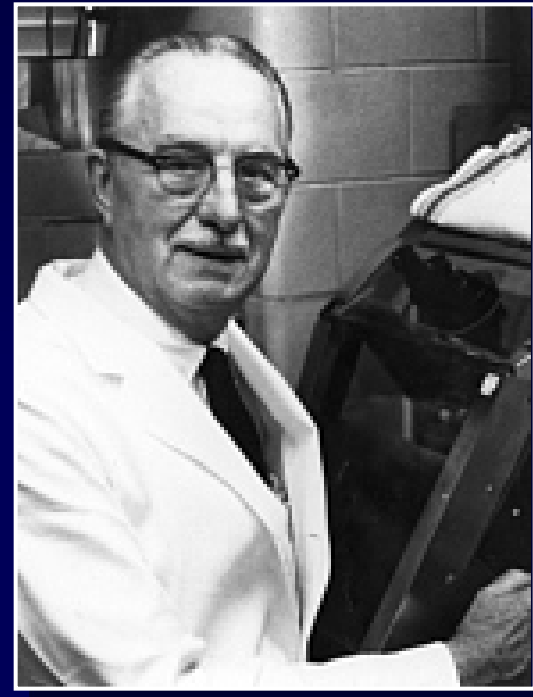
# VÝVOJ KULTIVACÍ BUNĚK *IN VITRO*

- **1907:** kultivace nervových vláken izolovaných z žabích embryí (Harrison)
- **1912:** explantáty kuřecí pojivové tkáně a srdeční svaloviny (Carrel; Burrows)
- **1916:** trypsinizace a pasážování (Rous & Jones)
- **1943:** stabilizace první buněčné linie - myší fibroblasty: L-cells (Earle et al.)
- **1948:** první buněčný klon - L929 (Sanford et al.)
- **1952:** stabilizace první lidské linie - karcinom děložního krčku: HeLa (Gey et al.)

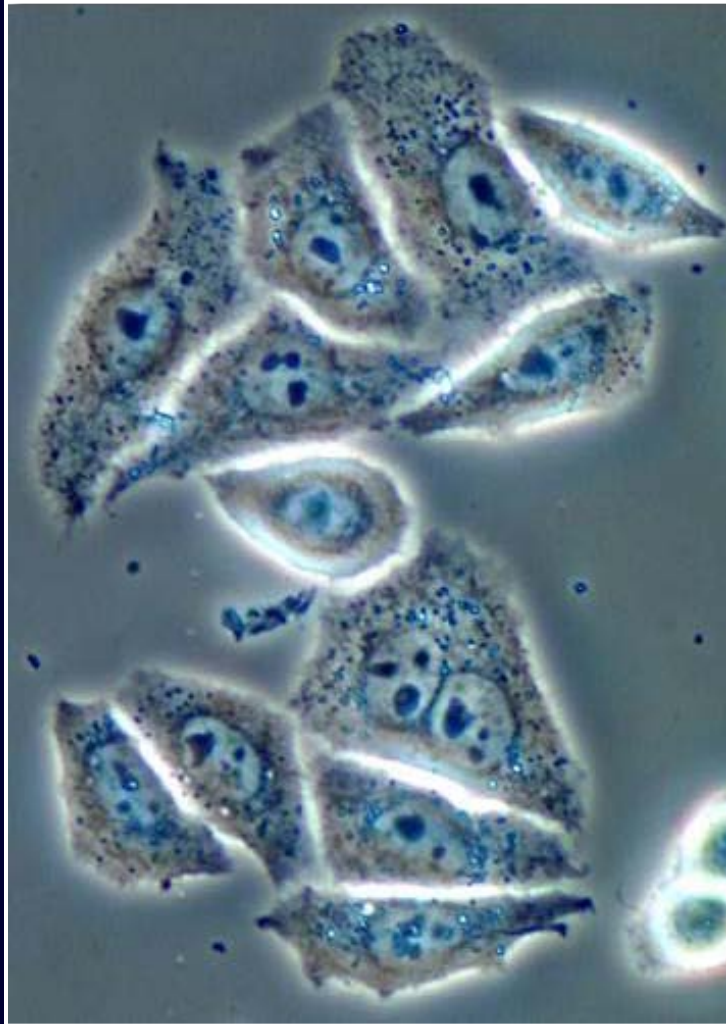


# 1952 - stabilizace první lidské linie HeLa (Gey et al.)

- karcinom děložního krčku
- Henrietta Lacks (1920-1951)
- Johns Hopkins University Hospital (Baltimore, USA)

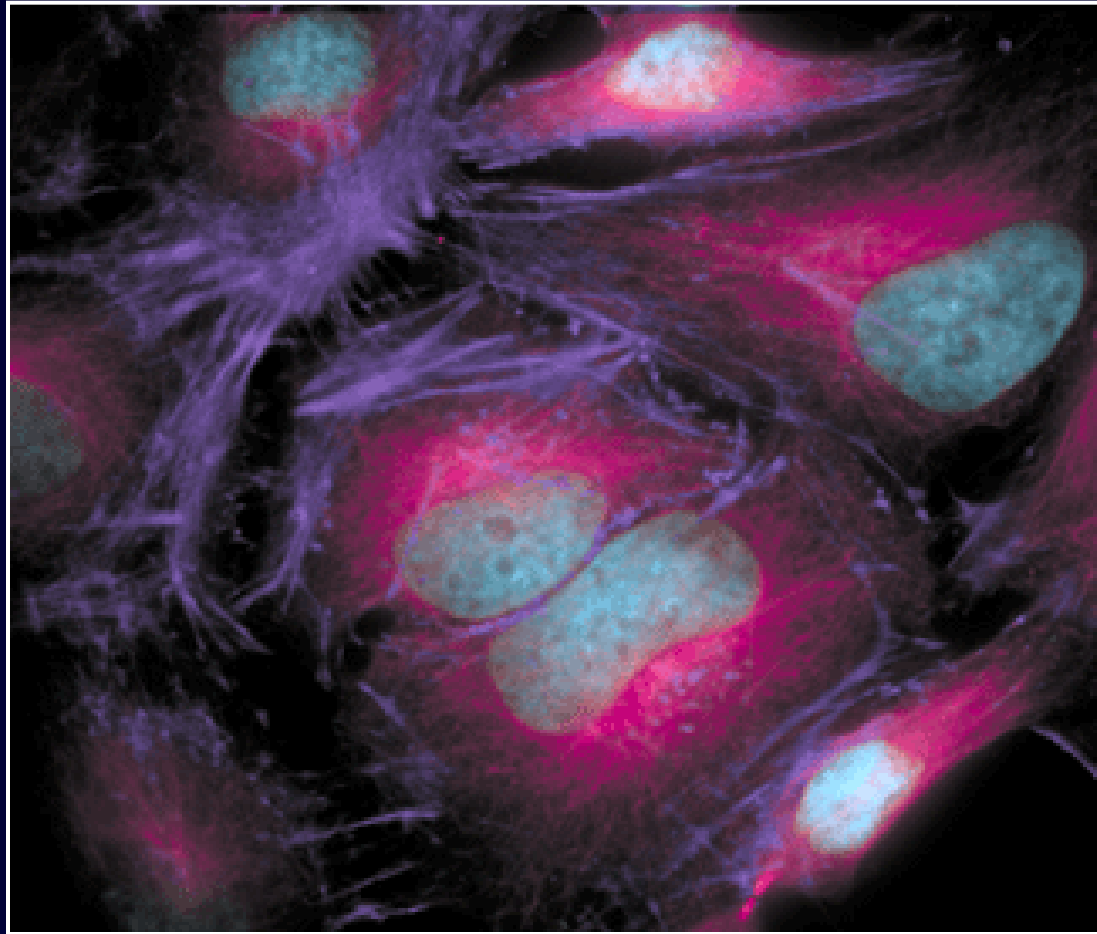


# Linie HeLa:

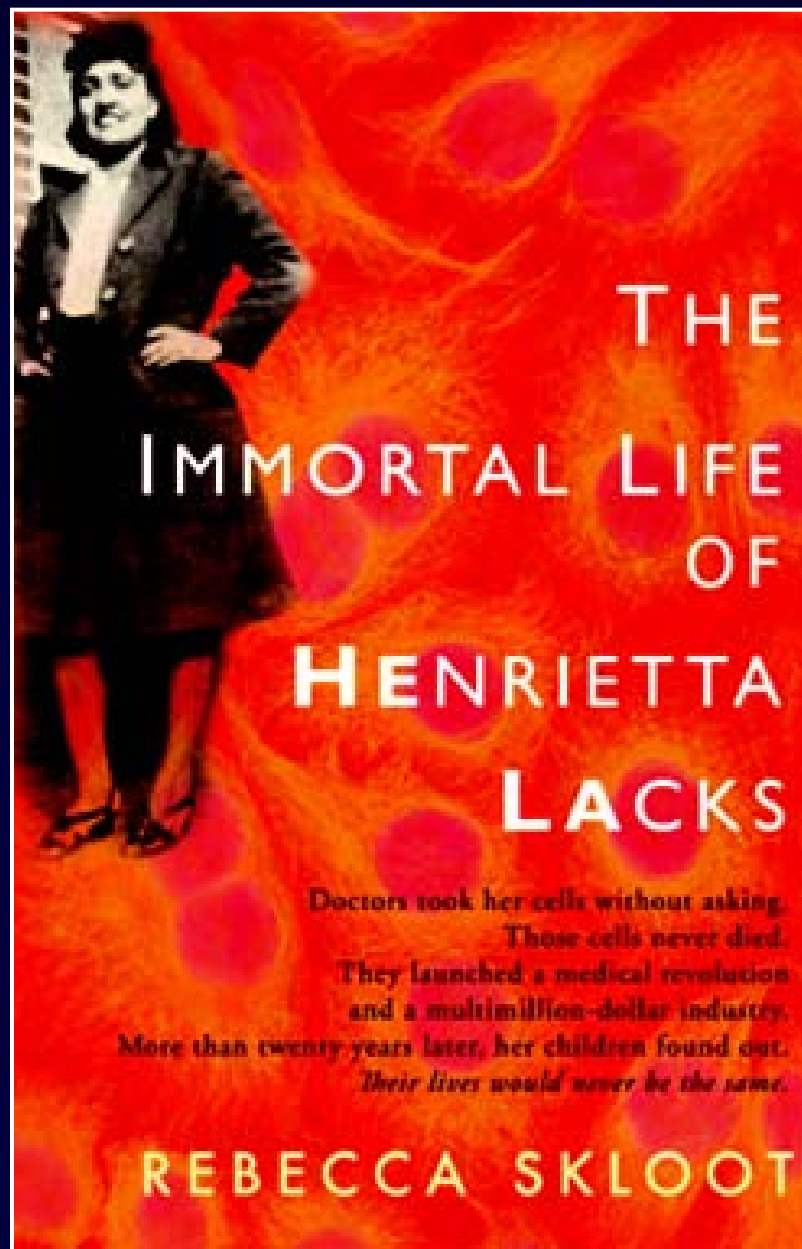




# Linie HeLa:



mikrotubuly (anti-Tu)  
mikrofilamenta (phalloidin)  
jádra (DAPI)



# KULTIVAČNÍ PODMÍNKY

# Kultivační podmínky pro savčí a lidské buňky

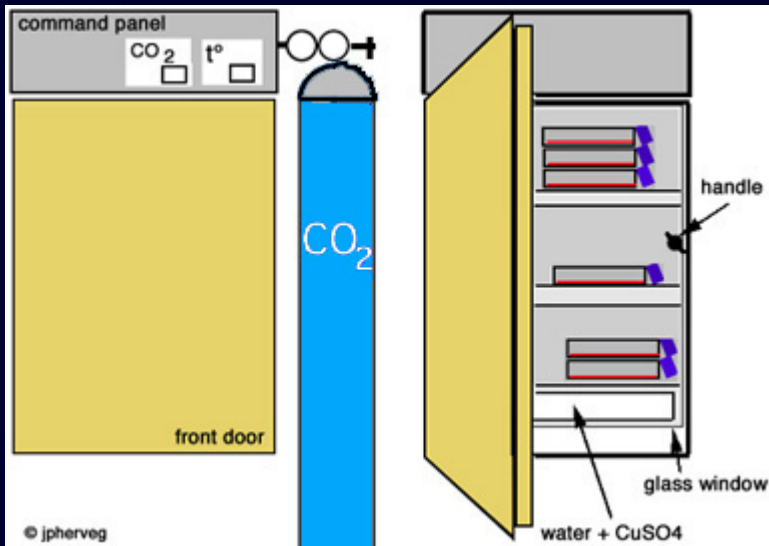
- co nejpodobnější podmínkám v původním organismu:
  - ✓ teplota 37°C,
  - ✓ maximální vlhkost vzduchu, 5% CO<sub>2</sub>
  - ✓ neutrální pH (6,8 až 7,2)
  - ✓ živiny
- sterilní prostředí



# Stabilní prostředí pro kultivace

## CO<sub>2</sub> inkubátory

- definovaná stabilní teplota (37°C)
- maximální vlhkost vzduchu
- definovaný stabilní obsah CO<sub>2</sub> (5%),  
příp. i O<sub>2</sub> (řízená hypoxie)
- vodní nebo vzduchový plášť
- vnitřní povrch: měď nebo nerez
- připojení tlakových lahví přes redukční ventily



# ŽIVNÉ MÉDIUM

## Bazální médium

- tekuté nebo práškové
- soli, aminokyseliny, vitamíny, lipidy, zdroj energie, indikátor pH

+ krevní sérum / růstové faktory

## Kompletní médium

# SLOŽENÍ BAZÁLNÍHO MÉDIA:

## Voda pro tkáňové kultury:

- ultrapure type I - resistivita  $< 18 \text{ M}\Omega/\text{cm}$
- TOC (total organic carbon)  $< 10 \text{ ppb}$   
(parts per bilion)

## Úprava vody pro tkáňové kultury:

- reverzní osmóza
- absorbce na aktivní uhlík
- iontoměniče
- elektrodeionizace
- UV záření



# SLOŽENÍ BAZÁLNÍHO MÉDIA:

## Vyvážené solné roztoky (BSS, balanced salt solutions):

- udržování pH a osmolality
- udržování membránového potenciálu buněk
- kofaktory enzymů
- tvorba fokálních adhezí (růst na pevném substrátu)
- **ionty:**  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$
- **stopové prvky:** Fe, Zn, Cu, Se ...

## Hlavní typy BSS:

**DPBS** (Dulbecco's phosphate-buffered saline)

**HBSS** (Hank's balanced salt solution)

**EBSS** (Earle's balanced salt solution)

**ESSS** (Eagle's spinner salt solution)

# SLOŽENÍ BAZÁLNÍHO MÉDIA:

## Pufrovací systém:

- $\text{NaHCO}_3$ , HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid)

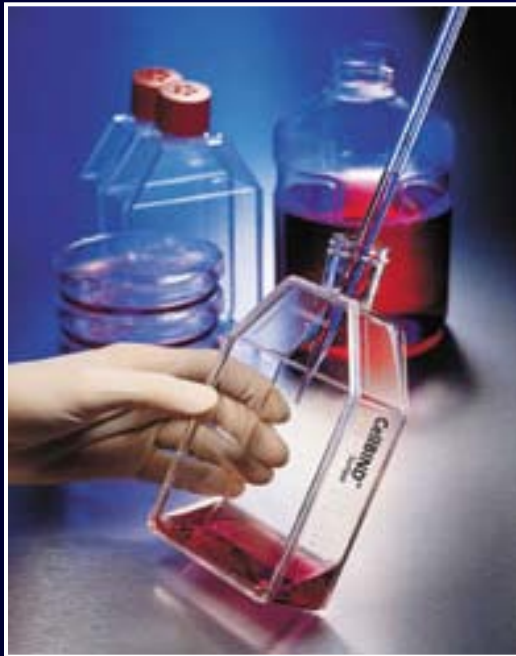
## Aminokyseliny:

- **esenciální, resp. vzácné (člověk, myš):**  
arginin, histidin, isoleucin, leucin, lysin, methionin, fenylalanin, threonin, tryptofan, valin
- ***in vivo* syntetizované ve specifických orgánech (játra, resp. ledviny):**  
cystein, glutamin, tyrosin
- lze nahradit hydrolyzátem z proteinů (krátké peptidy)

# SLOŽENÍ BAZÁLNÍHO MÉDIA:

- voda
  - anorganické sloučeniny (ionty, stopové prvky)
  - aminokyseliny
- 

- vitamíny (zejména skupina B)
- lipidy (esenciální mastné kyseliny, cholesterol...)
- hormony, růstové faktory (inzulín, hydrokortizol)
- glukóza (zdroj energie)
- fenolová červeň (indikátor pH)
- antibiotika (penicilin + streptomycin)



## Sérum:

- fetální telecí/hovězí - FCS/FBS, koňské, lidské...
- nedefinovaná směs růstových faktorů a dalších složek
- obsah v médiu 5 - 20% podle typu buněk
- bezsérová média pro speciální aplikace (definovaná směs růstových faktorů - tzv. serum replacement)

## Nejdůležitější látky obsažené v séru:

- růstové faktory
- albumin
- transferrin
- anti-proteázy (antitrypsin, macroglobulin)
- attachment factors (fibronectin, laminin, fetuin)

## Výhody použití séra:

- směs nejdůležitějších faktorů pro přežívání a proliferaci buněk
- univerzální použití pro kultivaci většiny buněčných typů
- ochrana buněčné kultury před výkyvy prostředí a toxickými vlivy (změny pH, ionty těžkých kovů, endotoxiny, proteolytické enzymy)

## Nevýhody použití séra :

- potíže s reprodukovatelností (původ zvířat, krmení, roční doba...)
- riziko kontaminace
- dostupnost a cena
- vliv na produkci proteinů do média

## Typy médií pro savčí buňky:

- Eagleovo médium (BME) a jeho modifikace (např. EMEM, AMEM, DMEM, GMEM, JMEM)
- RPMI média (např. RPMI 1629, RPMI 1630, RPMI 1640)
- další média užívaná se sérem (např. Fischerovo, Williamsovo)
- média užívaná bez séra (TC199, MCDB)

# Sterilní prostředí

- práce v tzv. laminárních boxech (HEPA filtry)
  - typ podle úrovně Biosafety Level (BSL)
- jednorázový plastik
  - (sterilizováno radiací)
- sterilní sklo, nástroje a roztoky
  - (horkovzdušná sterilizace, autoklávování)
- antibiotika
  - (běžně směs Pen/Str, případně gentamycin, amphotericin, nystatin)



# BIOSAFETY LEVELS (BSLs)



## BSL-1

- mikroorganismy, které nezpůsobují onemocnění u zdravých dospělých; standardizované lidské a živočišné buněčné linie

## BSL-2

- běžné patogeny středního rizika, mohou způsobovat různě závažná onemocnění, která lze dobře léčit (HBV, *Salmonella*, *Toxoplasma*, klinický materiál - krev, tělní tekutiny, tkáně; některé sbírkové linie - např. HeLa)

# Laminární box - biohazard třída I

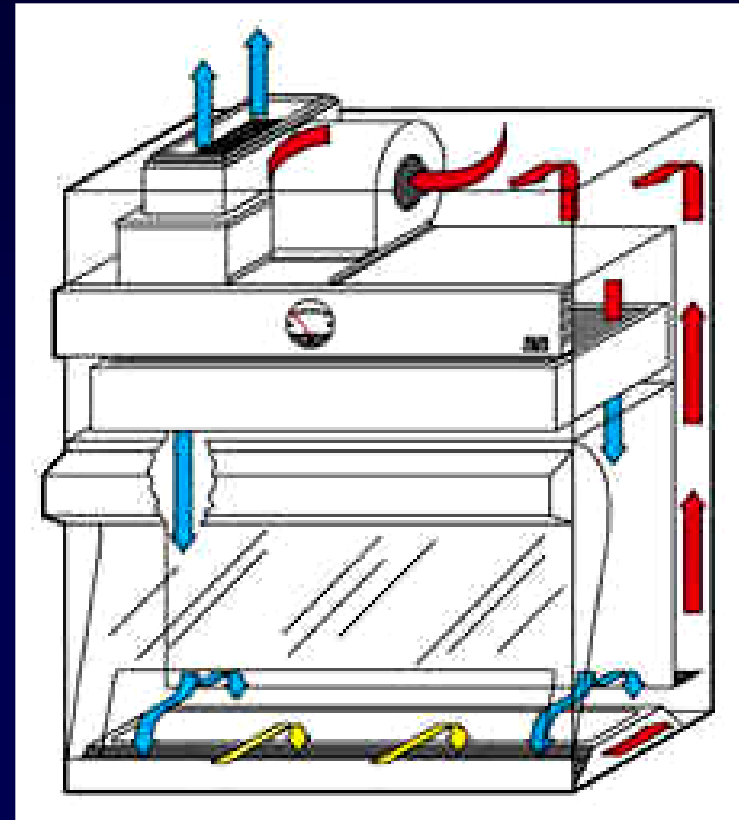


horizontální



vertikální

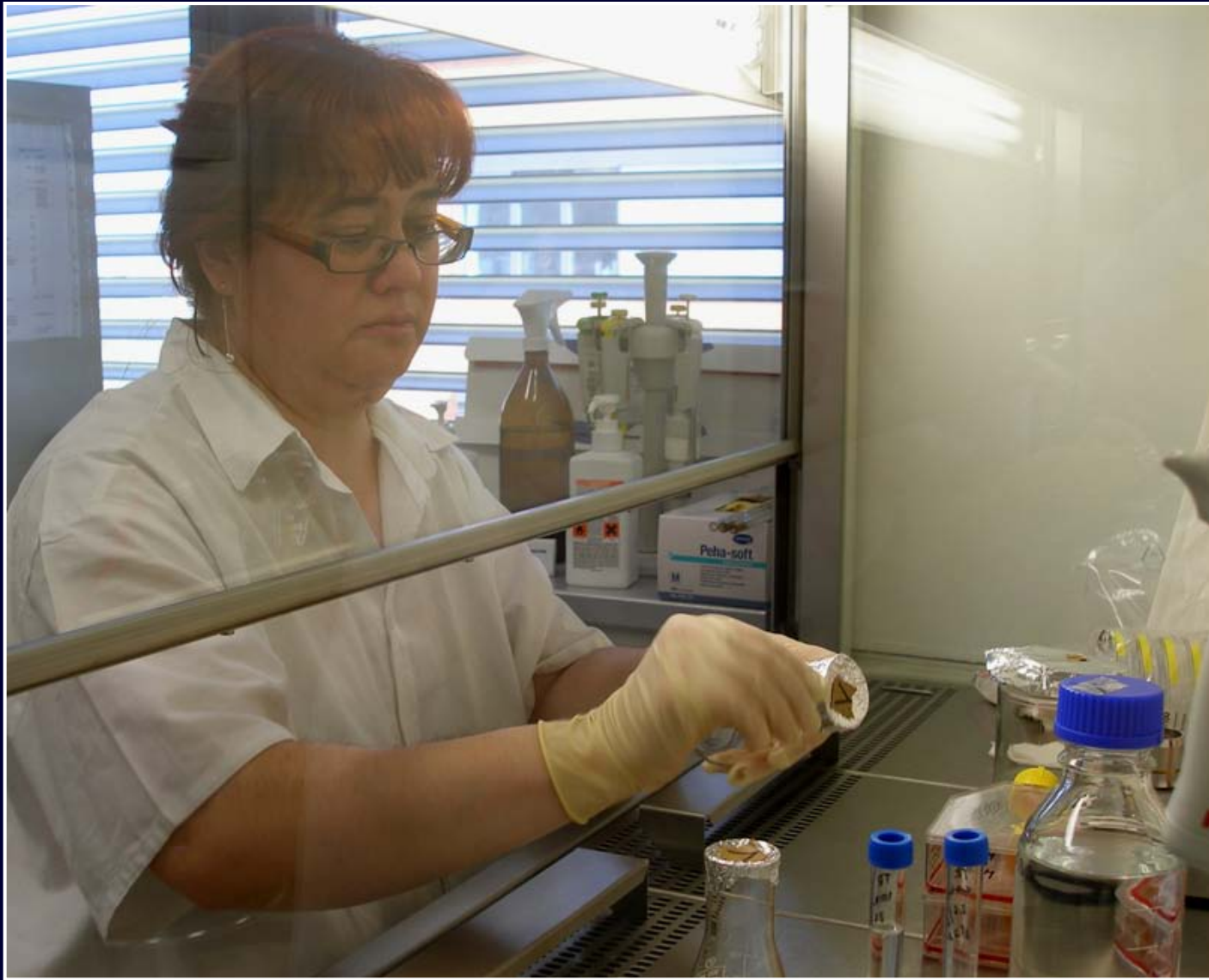
# Laminární box - biohazard třída II



HEPA filtry  
(částice > 0,3  $\mu$ m)









# BIOSAFETY LEVELS (BSLs)



## BSL-3

- lokální nebo exotické patogeny vysokého rizika, respiračně přenosné, způsobují závažná a potenciálně letální onemocnění, která jsou obtížně léčitelná
- *Mycobacterium tuberculosis*, virus encefalitidy St. Louis, antrax

## BSL-4

- extrémně rizikové patogeny, respiračně přenosné, způsobují letální onemocnění, proti nimž neexistuje léčba ani vakcinace
- hemorrhagické viry (Ebola, Marburg)

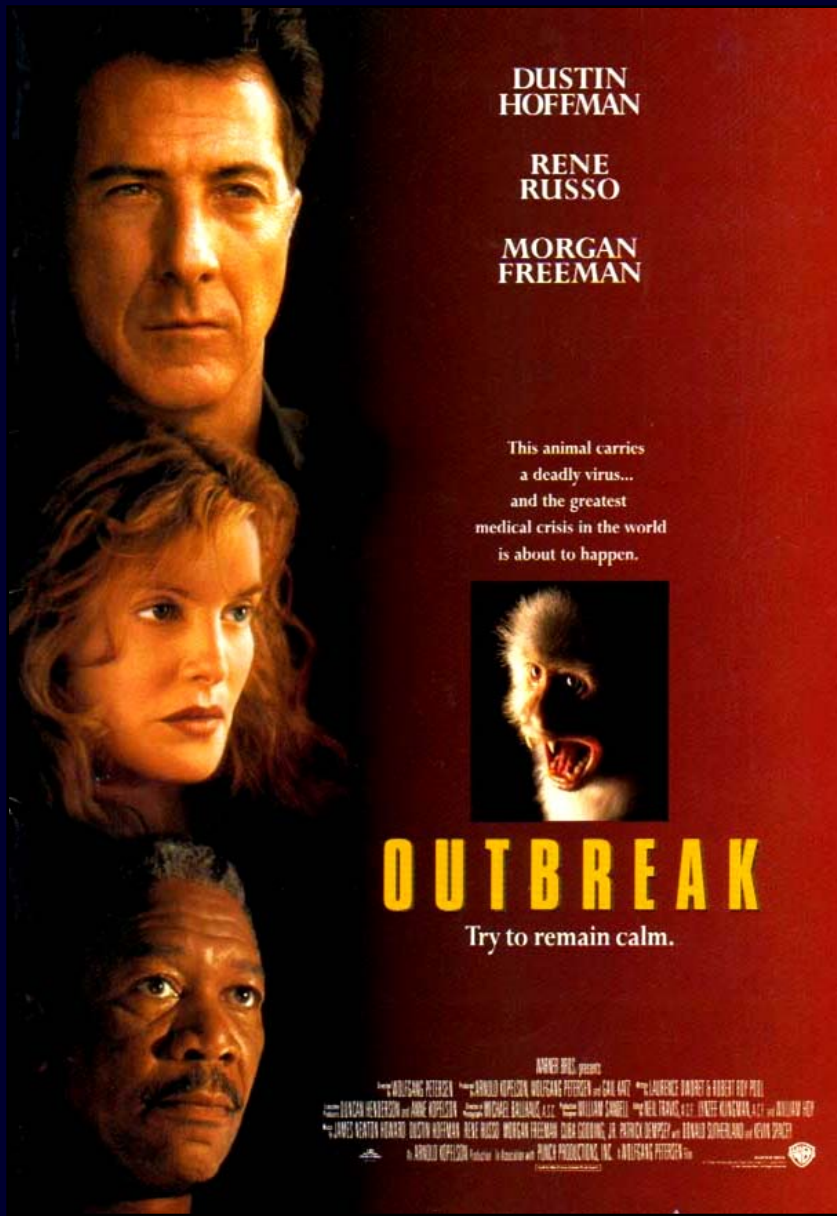


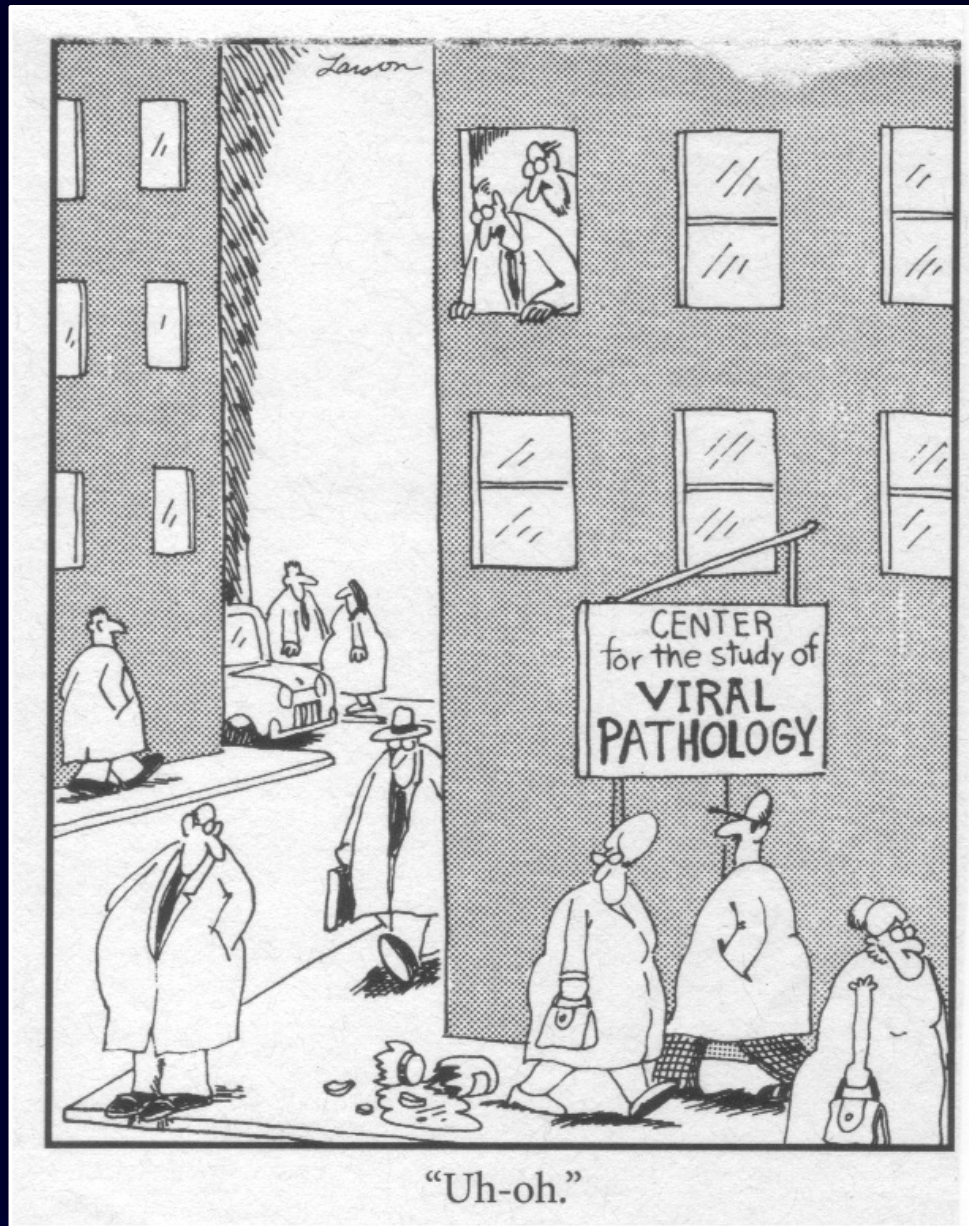
# BIOSAFETY LEVEL 3 (BSL-3)



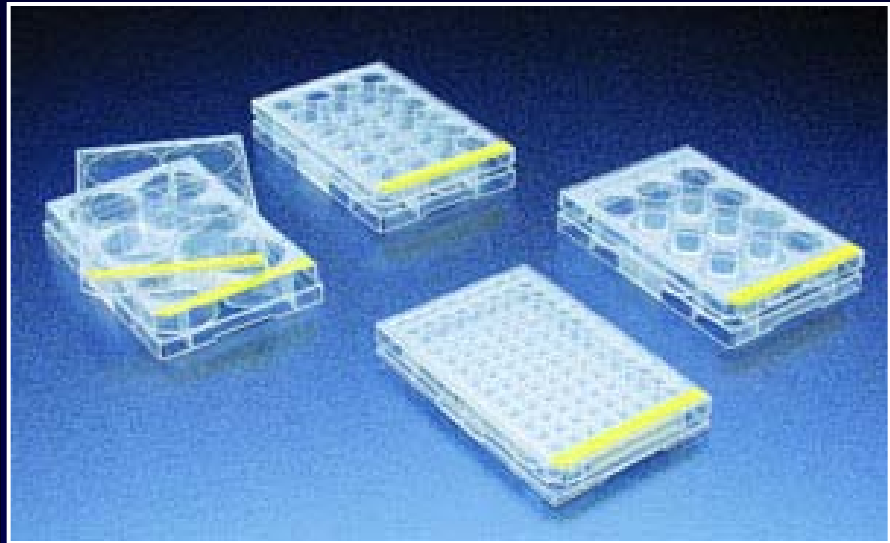
# BIOSAFETY LEVEL 4 (BSL-4)





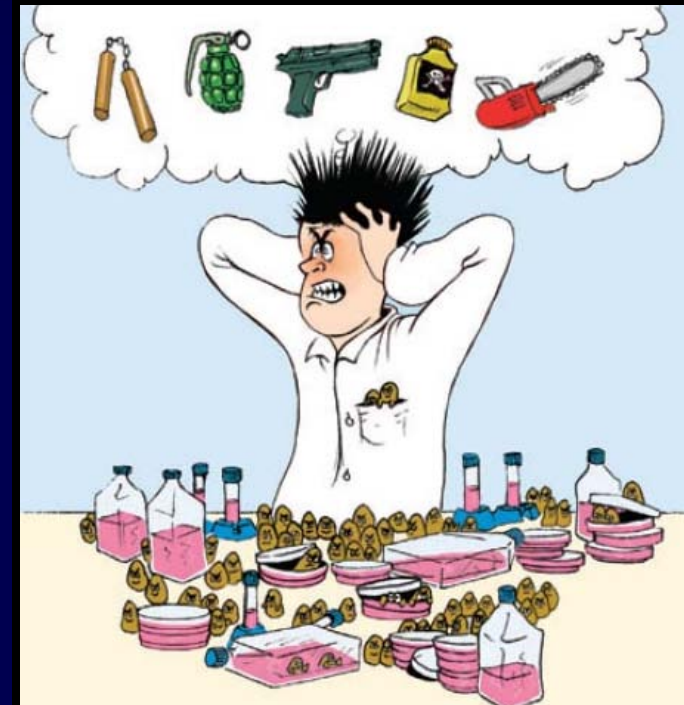
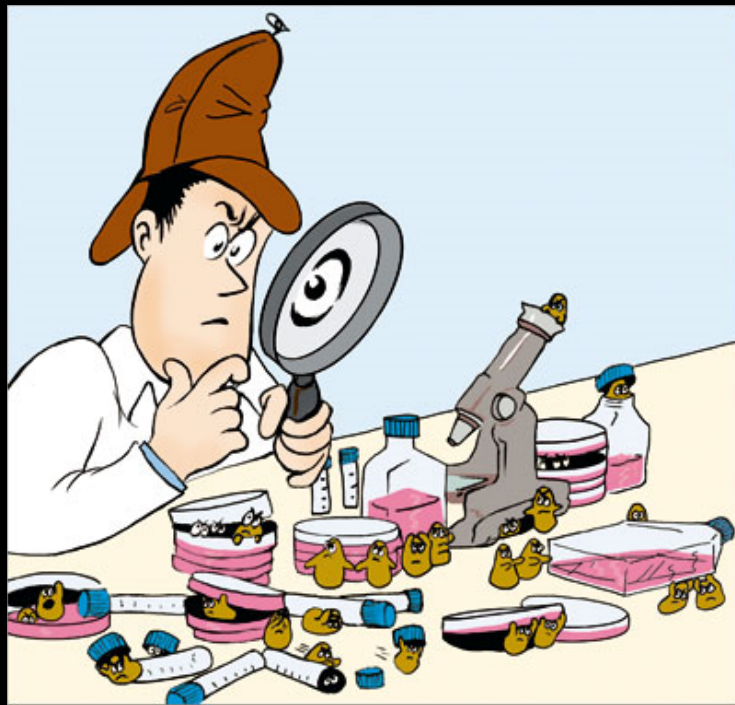


"Uh-oh."



# Typy kontaminací

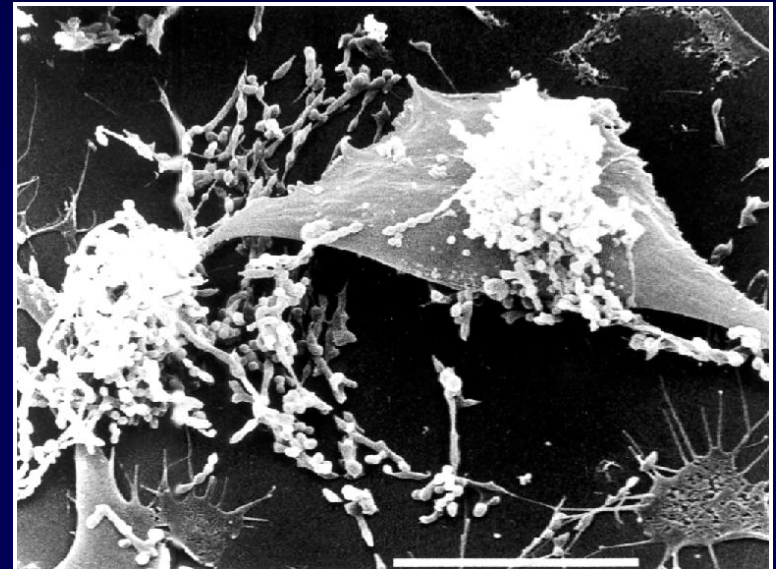
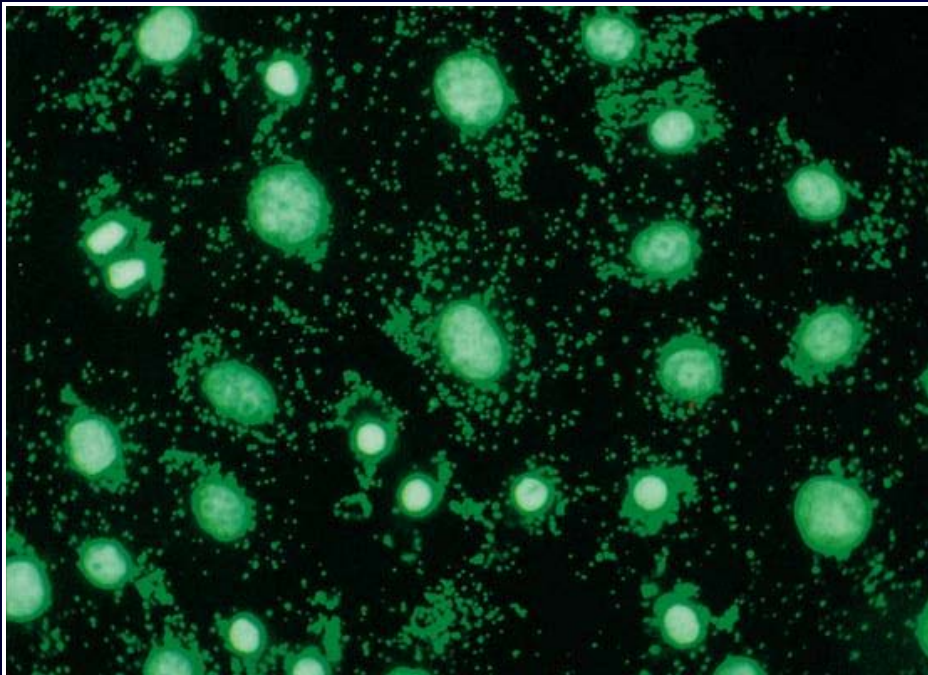
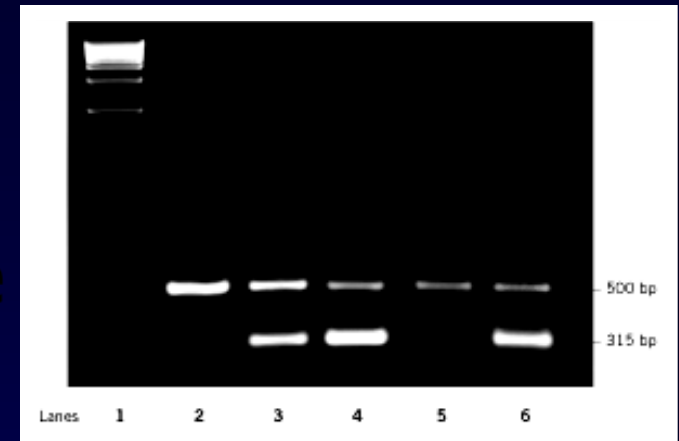
- mykoplazmata
- viry
- bakterie, plísně, kvasinky
- kontaminace jinou buněčnou linií  
(cross=contamination)



# Kontaminace – mykoplazmata

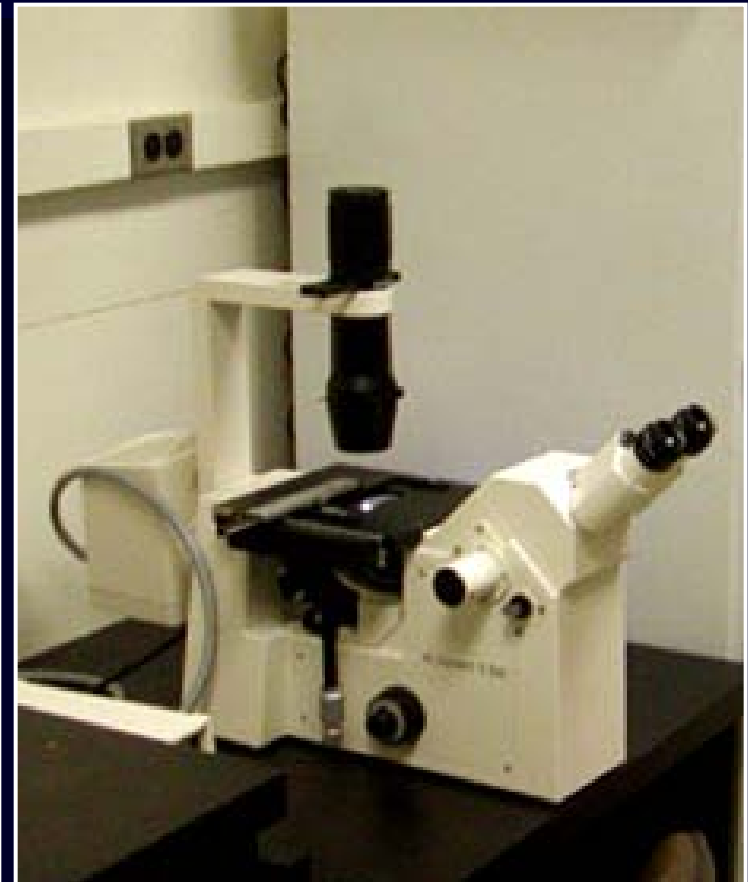
## Detekce mykoplazmat:

- a) fluorescencenční mikroskopie  
(značení DNA)
- b) PCR



# KULTIVAČNÍ POSTUPY





invertovaný mikroskop



## Typy buněčných kultur:

- adherované:  
rostou přichycené na pevném podkladu
- suspenzní:  
rostou volně v médiu

## Kultivace na živné vrstvě (feeder-layer):

- obvykle inaktivované myší buňky (fibroblasty, peritoneální makrofágy)
- hybridomy, embryonální kmenové buňky

# SUBKULTIVACE (PASÁŽOVÁNÍ)

## Suspenzní kultury

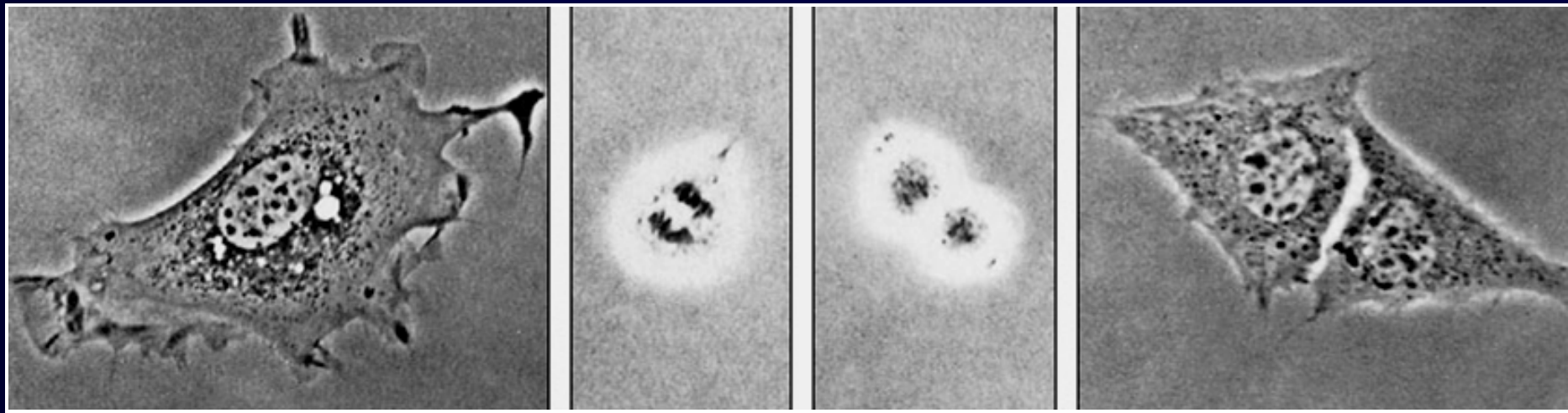
- odstranění starého média centrifugací
- naředění buněk v čerstvém médiu
- přenesení do nové kultivační lahvičky s čerstvým médiem

## Adherované buňky

- odstranění starého média, oplach v pufru
- uvolnění buněk z podkladu proteolýzou fokálních adhezí (trypsin)
- inaktivace trypsinu přidáním séra
- alternativa: mechanické uvolnění (škrabky)
- centrifugace, naředění buněk v čerstvém médiu
- přenesení do nové kultivační lahvičky s čerstvým médiem



# DĚLENÍ BUNĚK V PODMÍNKÁCH *IN VITRO*:



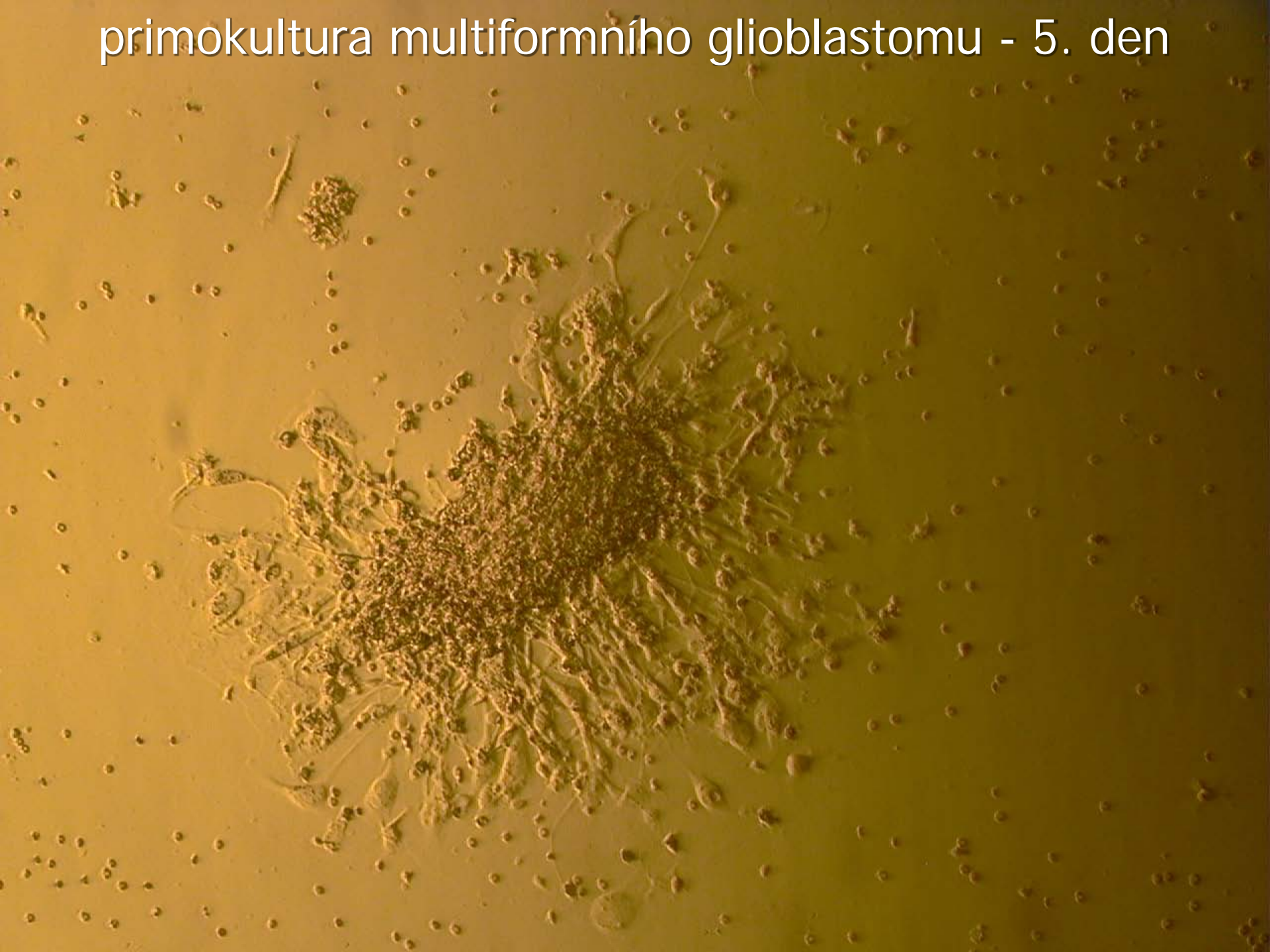
# TYPY KULTIVACÍ (TERMINOLOGIE)

# TKÁŇOVÉ KULTURY / CELL CULTURES

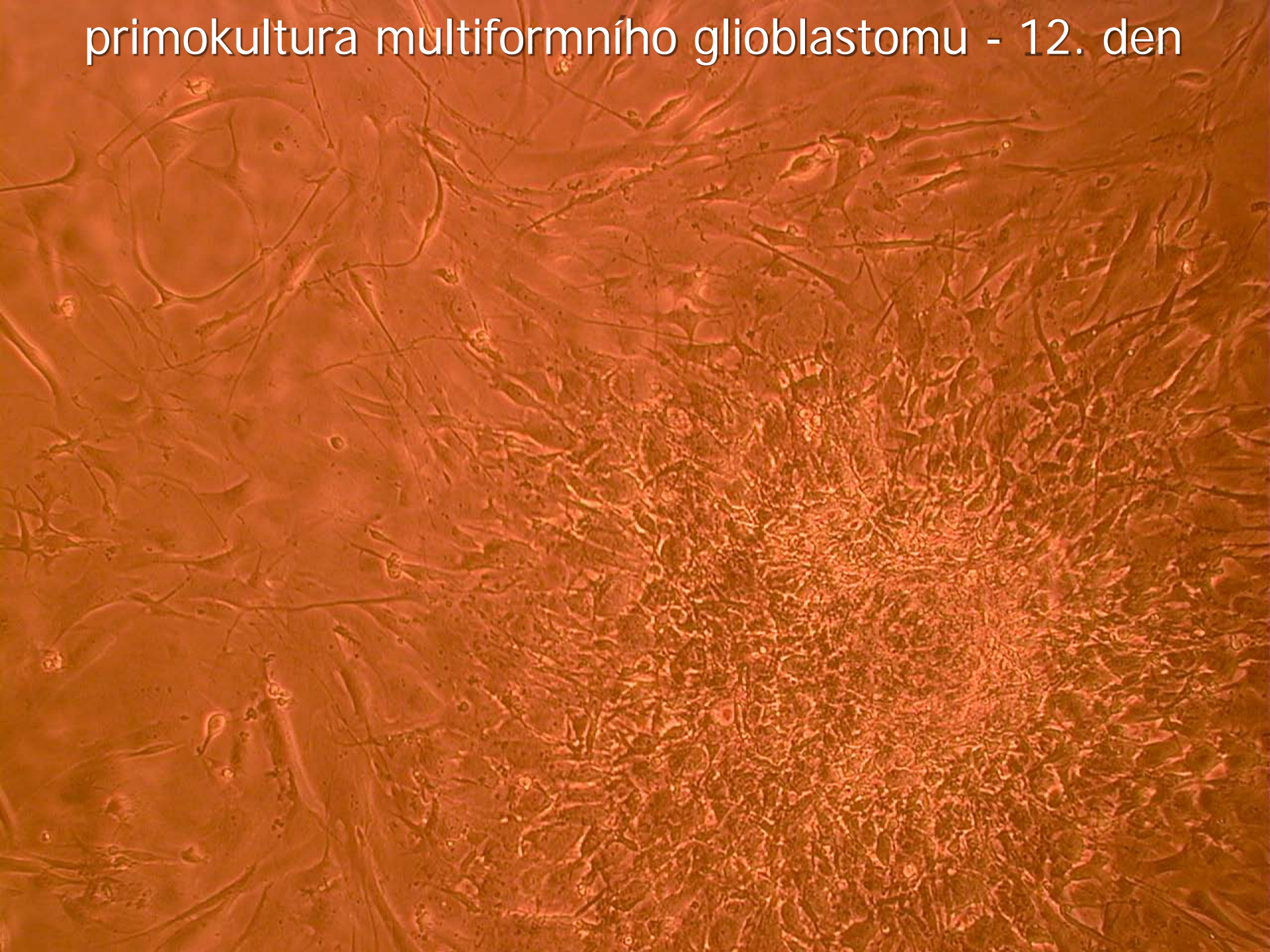
- orgánová/tkáňová kultura (organ/tissue culture)  
trojrozměrná kultura nerozvolněné tkáně, která si uchovává histologické znaky a vlastnosti původní tkáně v prostředí *in vivo*
- buněčná kultura (cell culture)  
kultura odvozená z jednotlivých buněk, které už nejsou spojeny do struktury tkáně
- primokultura / primární kultura (primary culture)  
buňky v kultuře jsou získány přímo z původní tkáně nebo fragmentu orgánu



primokultura multifornního glioblastomu - 5. den



primokultura multifornního glioblastomu - 12. den



primokultura multifornního glioblastomu - 12. den



## Buněčná linie

- populace buněk odvozená z primokultury při první pasáži a dále udržovaná v podmínkách *in vitro*

(pasáž = přenos buněk z jedné kultivační nádoby do nádoby nové)

- **diploidní** (normální nenádorové buňky)
- **stabilizovaná** (nádorově transformované buňky)
- charakterizace buněčné linie:

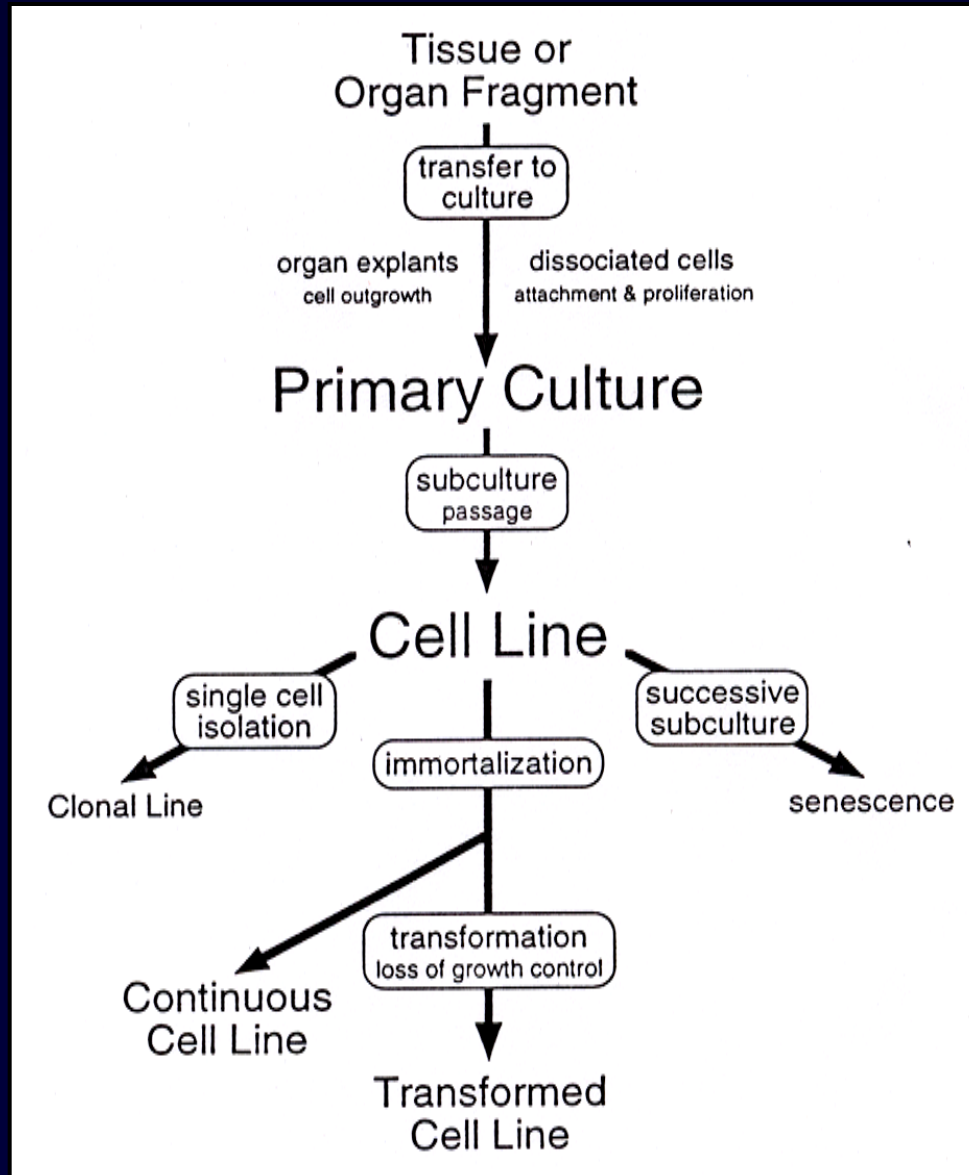
označení (název), druh organismu, pohlaví, věk, výchozí orgán, typ kultury, počet pasáží, růstové parametry, morfologie, karyotyp, markery

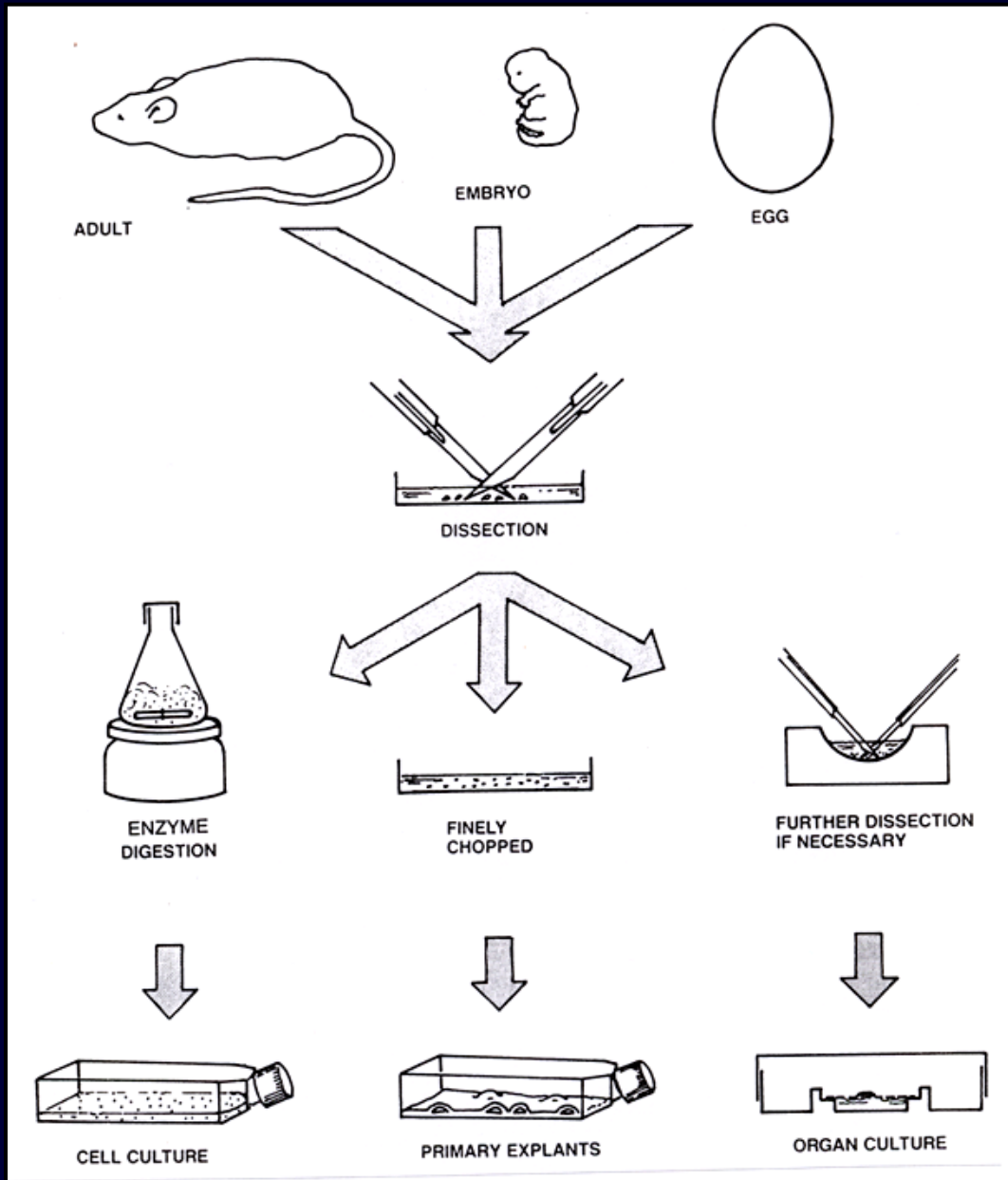
## Buněčný kmen

- buněčná populace, získaná subkultivací z původní linie - vyselektována na základě exprese určitého znaku

## Buněčný klon

- buněčná populace, vzniklá pomnožením jediné buňky, izolované z původní linie
- všechny buňky v buněčném klonu teoreticky identické, avšak v praxi určitý stupeň heterogenity





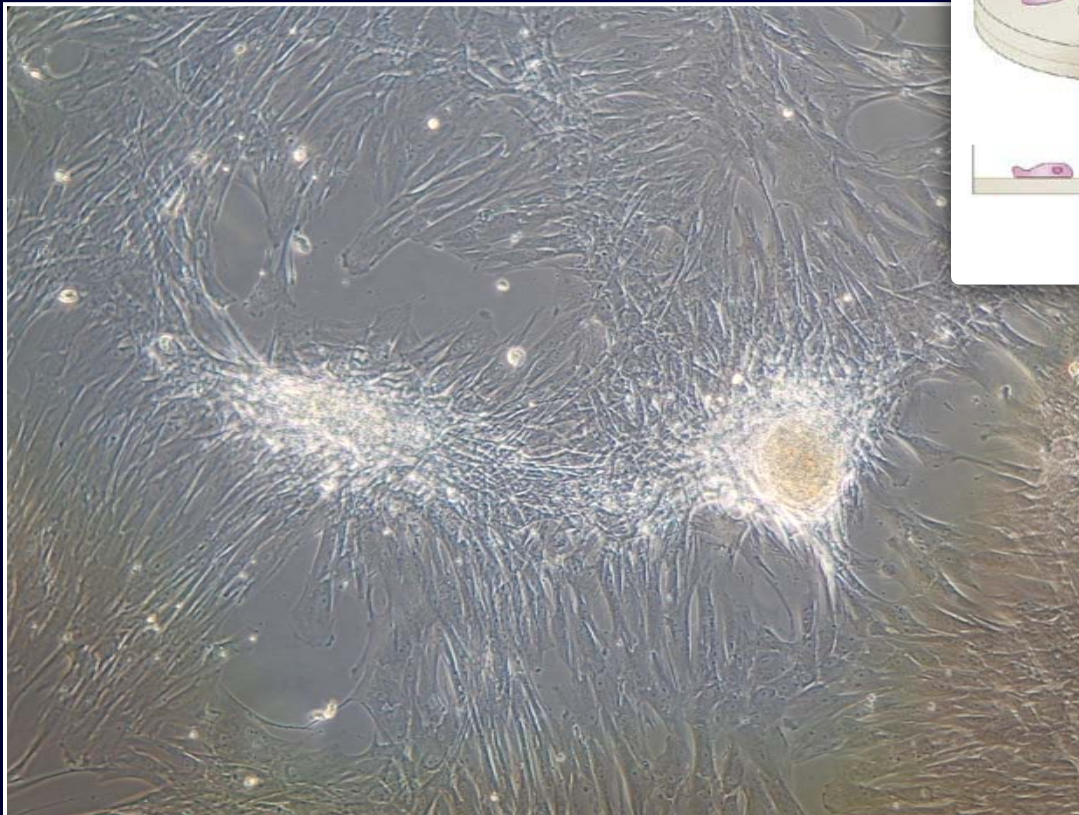
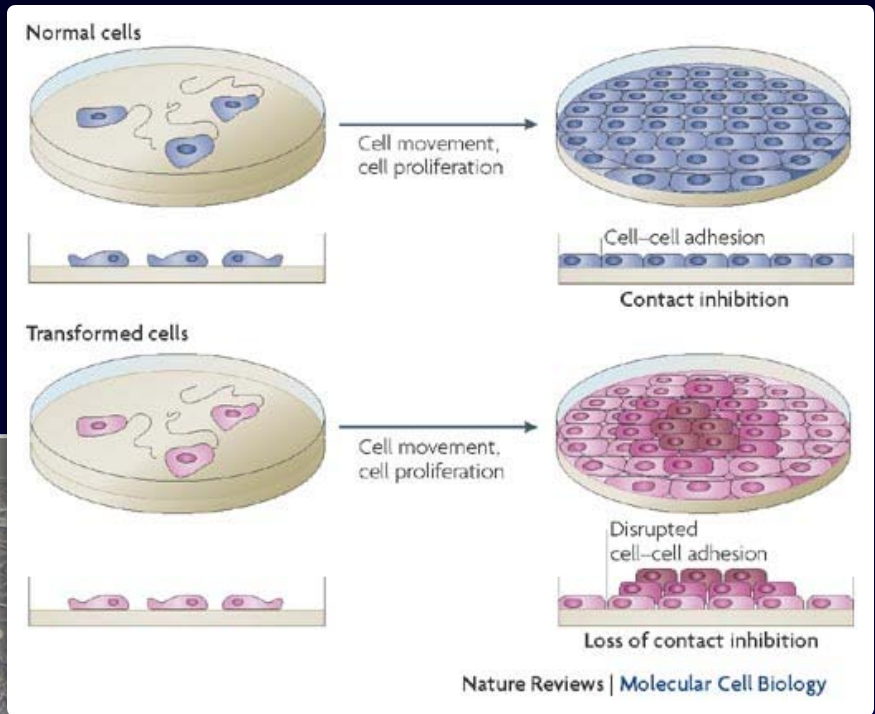
# NORMÁLNÍ A TRANSFORMOVANÉ BUNĚČNÉ LINIE

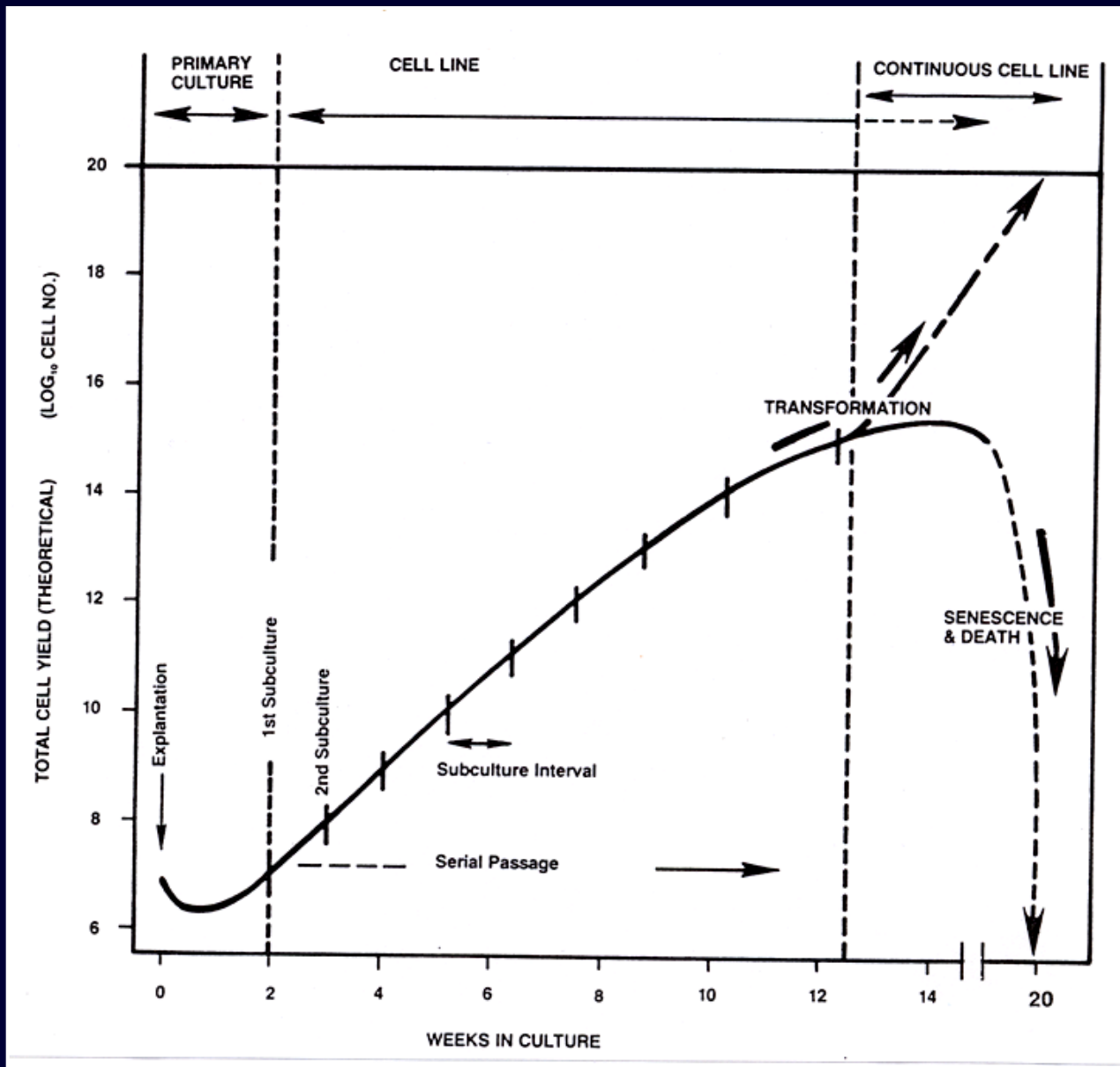


## Růstové parametry buněčných linií:

- **generační doba**  
období mezi dvěma mitózami = délka buněčného cyklu
- **population doubling time (PDT)**  
čas, potřebný ke zdvojnásobení počtu buněk v populaci
- **lifespan (délka života)**  
geneticky naprogramovaný počet dělení buňky
- **kontaktní inhibice**  
zástava proliferace po dosažení určité limitní saturační density

# Kontaktní inhibice





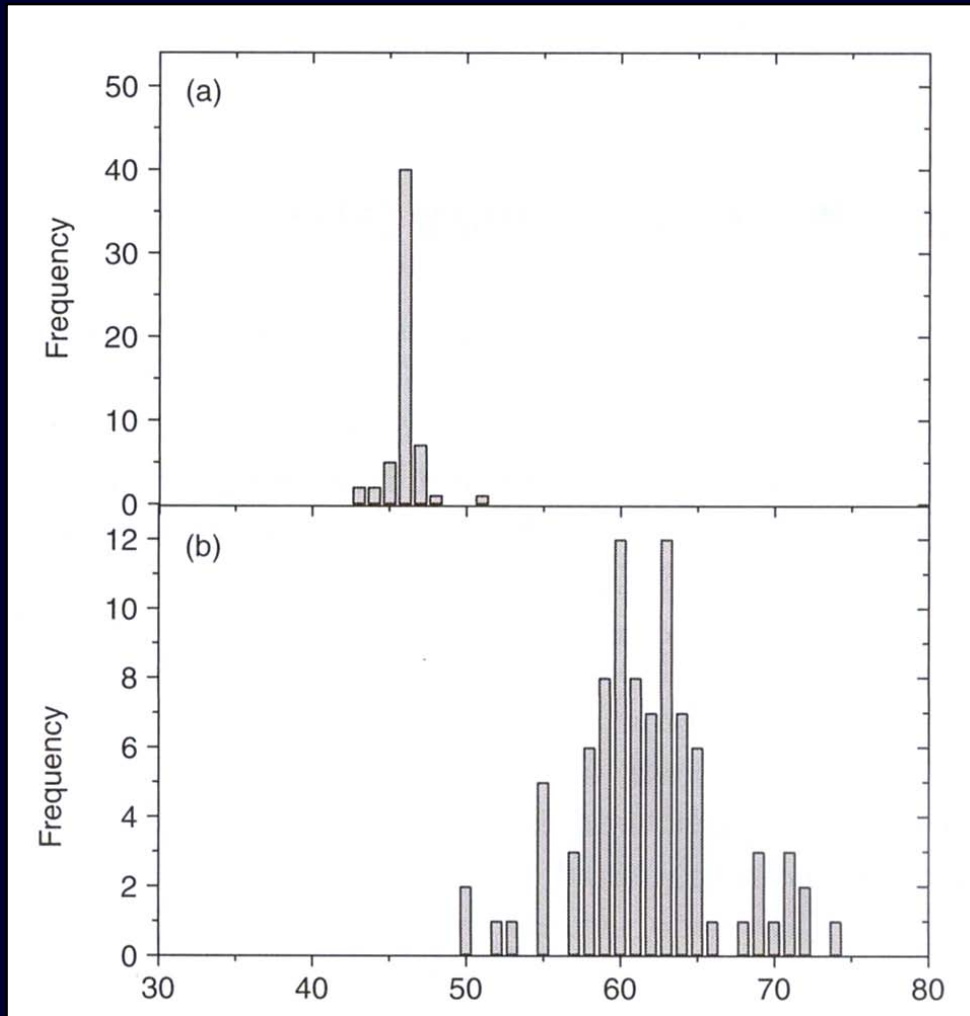
## Diploidní buněčné linie:

- normální nenádorové buňky
- omezená délka života *in vitro*
- standardní karyotyp (diploidní)
- obvykle anchorage-dependent (vyžadují substrát k přichycení)
- schopnost kontaktní inhibice
- tzv. "stárnutí kultury" = změna morfologie a růstových parametrů se vzrůstající dobou v podmínkách *in vitro*
- LEP (lidské embryonální plíce)  
HPLC (lidské lymfocyty periferní krve)

## Stabilizované buněčné linie:

- nádorově transformované buňky
- neomezený generační potenciál = nesmrtelnost v podmínkách *in vitro*
- kratší PDT, redukováná závislost na podkladu
- obvykle heteroploidní, resp. aneuploidní
- často bez schopnosti kontaktní inhibice
- lidské adherované: HeLa, A431, MCF-7...  
lidské suspenzní: HL-60, Jurkat, HeLa-S...  
L929, 3T3 (myší fibroblasty),  
CHO (chinese hamster ovary)  
MDCK (Madine-Darby canine kidney)  
VERO (African green monkey kidney)

# Rozdíl v počtu chromosomů během kultivace



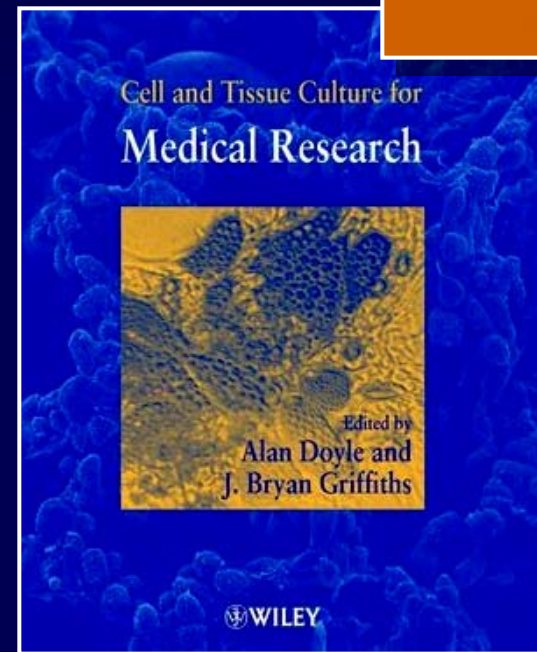
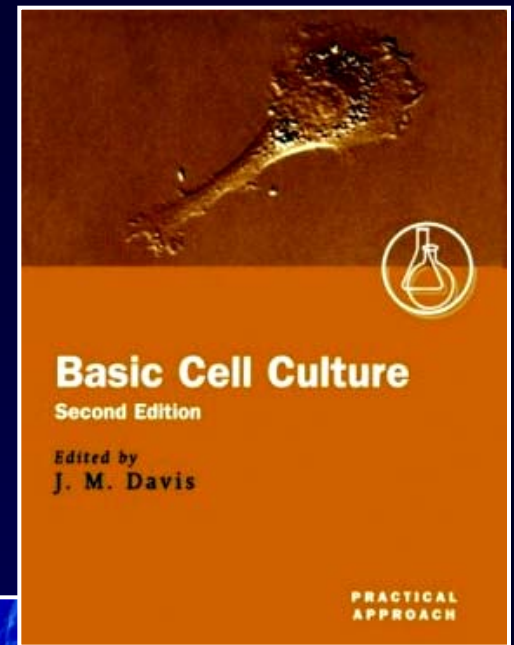
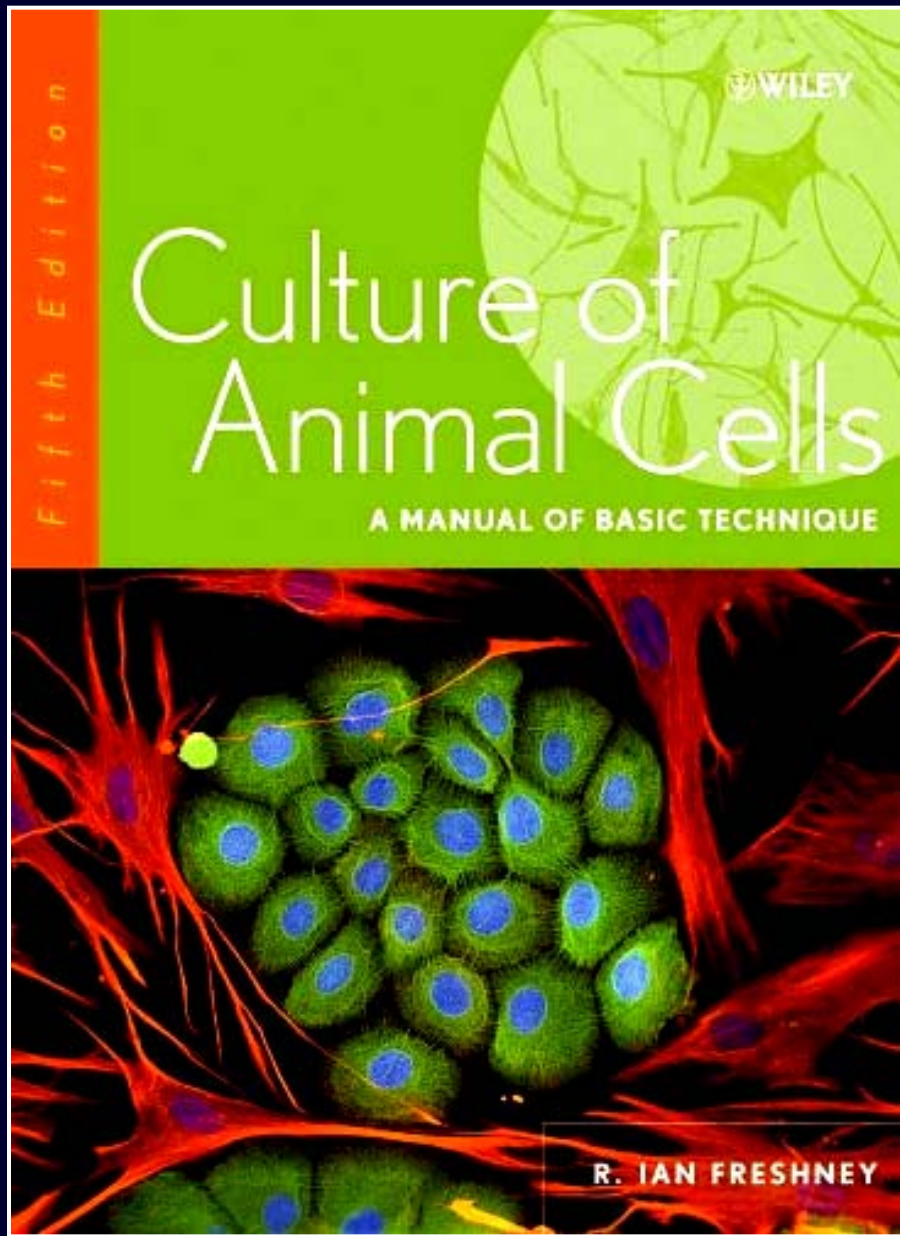
normální buňky  
(gliové buňky)

transformované buňky  
(maligní melanom)

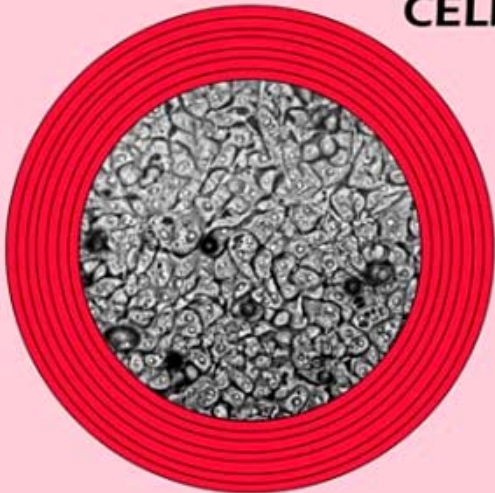
# PRAKTICKÉ APLIKACE

- **základní výzkum** (buněčná biologie, cytogenetika, onkologie, imunologie, biochemie, molekulární biologie, virologie...)
- **prenatální diagnostika**
- **toxikologie** (testy léčiv, kosmetických přípravků, implantátů)
- **reprodukční medicína** (IVF)
- **klinická onkologie** (typizace nádorů, testování multidrug resistance, hodnocení markerů)
- **výroba očkovacích látek** (virové vakcíny)
- **průmyslová výroba specifických buněčných produktů** (transgenní linie)
- **příprava buněčných a tkáňových derivátů** (např. kůže)



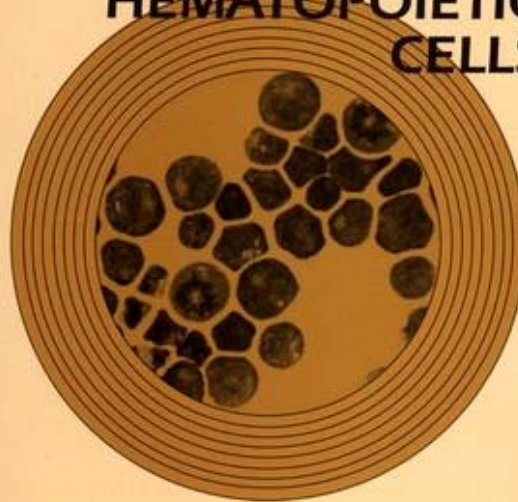


Culture of Specialized Cells  
**CULTURE OF  
HUMAN TUMOR  
CELLS**



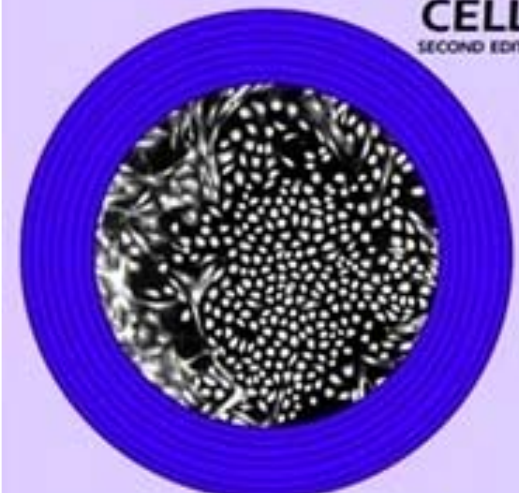
Edited by  
**Roswitha Pfragner  
R. Ian Freshney**

Culture of Specialized Cells  
**CULTURE OF  
HEMATOPOIETIC  
CELLS**



Editors  
**R. Ian Freshney  
Ian B. Pragnell  
Mary G. Freshney**

Culture of Specialized Cells  
**CULTURE OF  
EPITHELIAL  
CELLS**  
SECOND EDITION



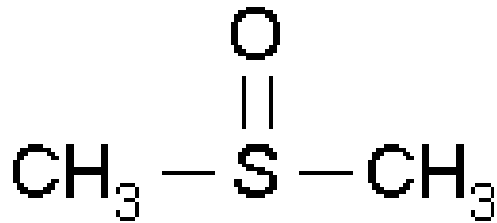
Edited by  
**R. Ian Freshney  
and Mary G. Freshney**

# KRYOKONZERVACE, ARCHIVACE, SBÍRKOVÁ PRACOVNÍŠTĚ

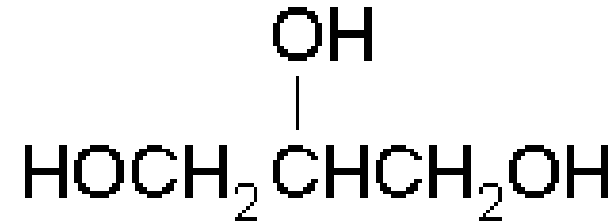
## Kryokonzervace živočišných buněk

- kultura v exponenciální fázi růstu
- po trypsinizaci resuspendování v zamrazovací směsi:  
90% sérum (FCS) + 10% kryoprotektivum (DMSO, glycerol)
- **dvoustupňové zamrazování:**
  - "pomalý krok" (optimální pokles o 1°C za minutu)
  - "rychlý krok" (přemístění kryoampulí z -80°C do -150°C (hlubokomrazící boxy) nebo do -196°C (kontejnery s tekutým dusíkem))
- **rozmrazování:**  
nejprve rychlé ohřátí (rozmražení směsi), pak pomalé přidávání vychlazeného média (cca 1ml za minutu)

# Příklady kryoprotektiv:

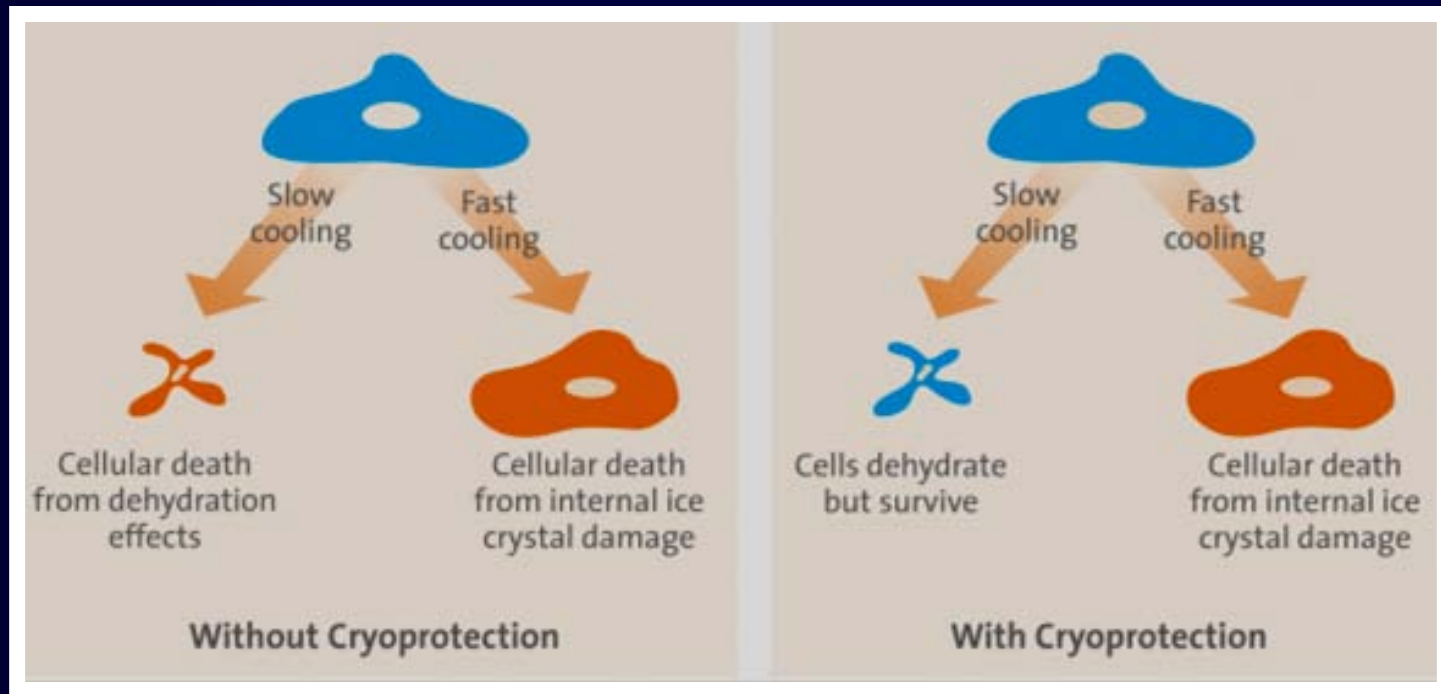


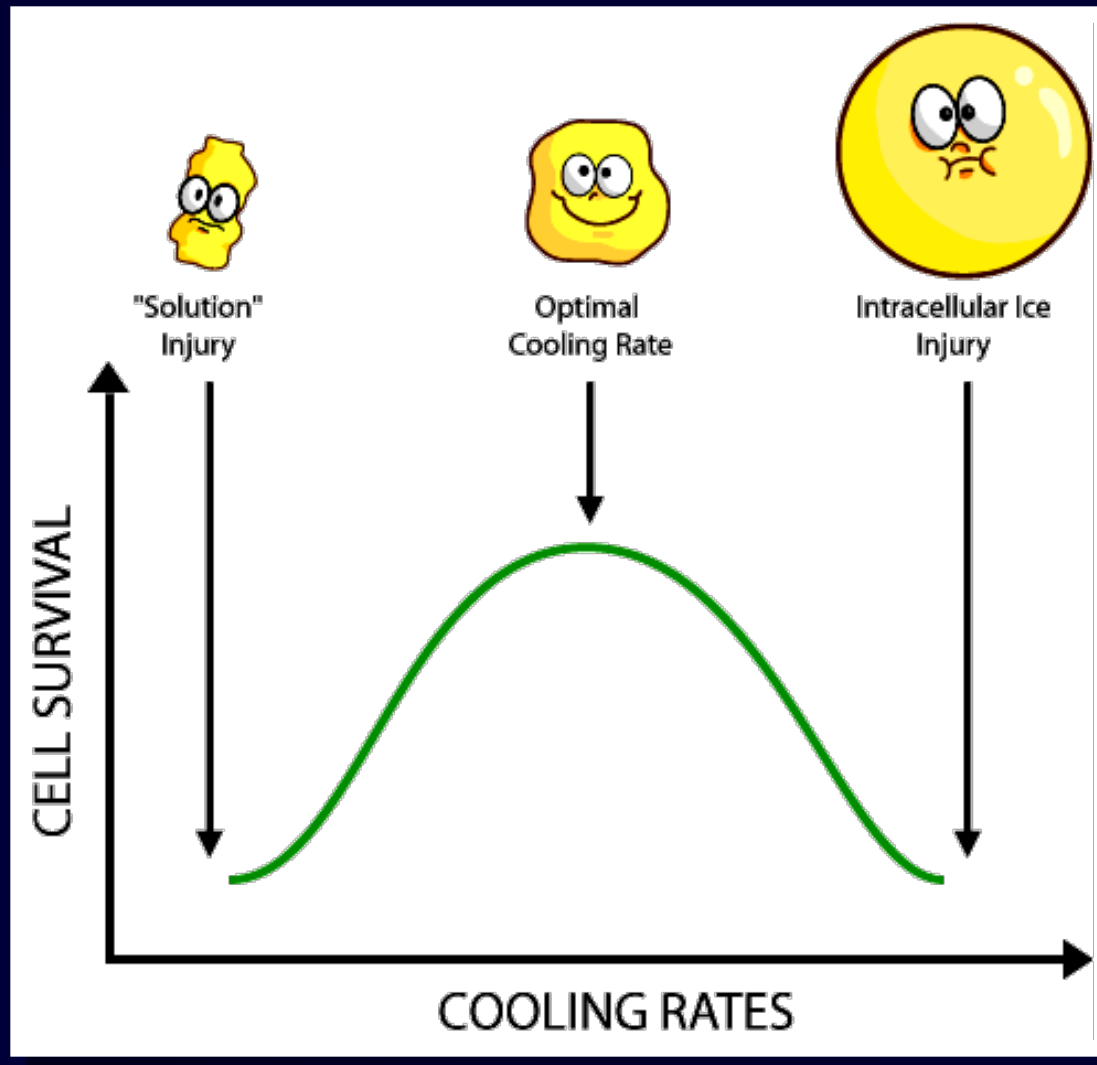
dimethylsulfoxid  
(DMSO)



glycerol

# Vliv rychlosti zamražování na přežití buněk:





# American Type Culture Collection (ATCC)

The screenshot displays the ATCC website interface. At the top left is the LGC Standards logo with the tagline "Excellence through measurement". A search bar is located at the top right, labeled "Search Catalogue:", with a dropdown menu set to "Catalogue Keyword Search" and a "Go" button. Below the search bar are navigation links: "Home", "Quick Order", "Shopping Cart", and "Contact Us".

The main content area is titled "Cell Biology" and features the sub-header "Culturing and preserving cells since 1962". A paragraph states: "ATCC was entrusted with its first cell line in 1962 and has consistently attained the highest standards and used the most reliable procedures to verify every cell line since." Below this, a table lists various products and services:

<b>ATCC Cultures and Products</b>	Cell Biology	Cell Lines and Hybridomas
	Microbiology	Media, Sera and Reagents
<b>ATCC Science</b>	Molecular Biology	Kits/ Panels
<b>ATCC Standards</b>	Tissue Biology	DNA and RNA
<b>ATCC Deposit Services</b>	Special Collections	STR Profile Database
<b>ATCC Services</b>		hTERT Immortalized Cell Lines
<b>ATCC Product Use Policy</b>		Stem Cell Products and Services

Additional text on the page includes: "that cell line integrity is critical for maintaining standardized cell culture quality, including (on), as a condition for receipt of grant funds well as for publication of research using standards are costly, time-consuming and require a high level of expertise. For years, scientists worldwide have relied on ATCC to provide fully authenticated and contamination-free biological reagents as a cost-effective and reliable option."

At the bottom left, there is a "Site Search" input field with a "Go" button. To its right, a text block reads: "Discover why comprehensive testing at ATCC is important to your work."



# European Collection of Cell Cultures (ECACC)



The screenshot shows the ECACC website homepage. At the top left is the Health Protection Agency logo with the tagline "Protecting people Preventing harm Preparing for threats". To the right are icons for Register, View Cart, Log on, and Help. A navigation menu includes Home, Products, Services, Technical, Ordering, About Us, Contact Us, and HPA website. The main banner features a micrograph of cell cultures and the text "Health Protection Agency Culture Collections". A search bar and a "You are not logged on." message are also present. Below the banner is a breadcrumb trail: "You are here: Home Collections".

**Menu**

- ▶ About Us - HPA Culture Collections
- ▶ Products
- ▶ Services
- ▶ How to Order
- ▶ Technical Support
- ▶ Glossary
- ▶ Forms

**Products**

- ▶ Bacteria, Plasmids, Mycoplasmas
- ▶ Cell Lines and Hybridomas
- ▶ Primary Cells & Media
- ▶ SCREENflex™ GPCR Cell Lines

**European Collection of Cell Cultures (ECACC)**

Welcome to the European Collection of Cell Cultures (ECACC), a Health Protection Agency Culture Collection. Supplier of authenticated and quality controlled cell lines and nucleic acids.

[About ECACC](#)

**The fastest way to order from us is online**

We offer the following range of products and services:

**To Search Our Products** - Click on the links below:

- [General Cell Collection](#)
- [Hybridoma Collection](#)
- [Primary Cells](#)
- [Cytofect Transfection Kits](#)
- [Neuron Culture Kits](#)
- [GPCR Cell Lines](#)
- [HLA-Typed Collection](#)
- [Human Random Control Collection](#)
- [Human Genetic Collection](#)

**Services**

- [Assay Ready Cells](#)
- [Cell Culture Management Services](#)
- [Contract Cell Culture](#)
- [Cell Line Identity Verification](#)
- [Genetic Support Services](#)
- [DNA Extraction](#)
- [RNA Extraction](#)
- [Mycoplasma Testing & Eradication](#)
- [Patent Deposits](#)

**ECACC**  
European Collection of Cell Cultures  
A Health Protection Agency Culture Collection

