

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie – 22.2.2012

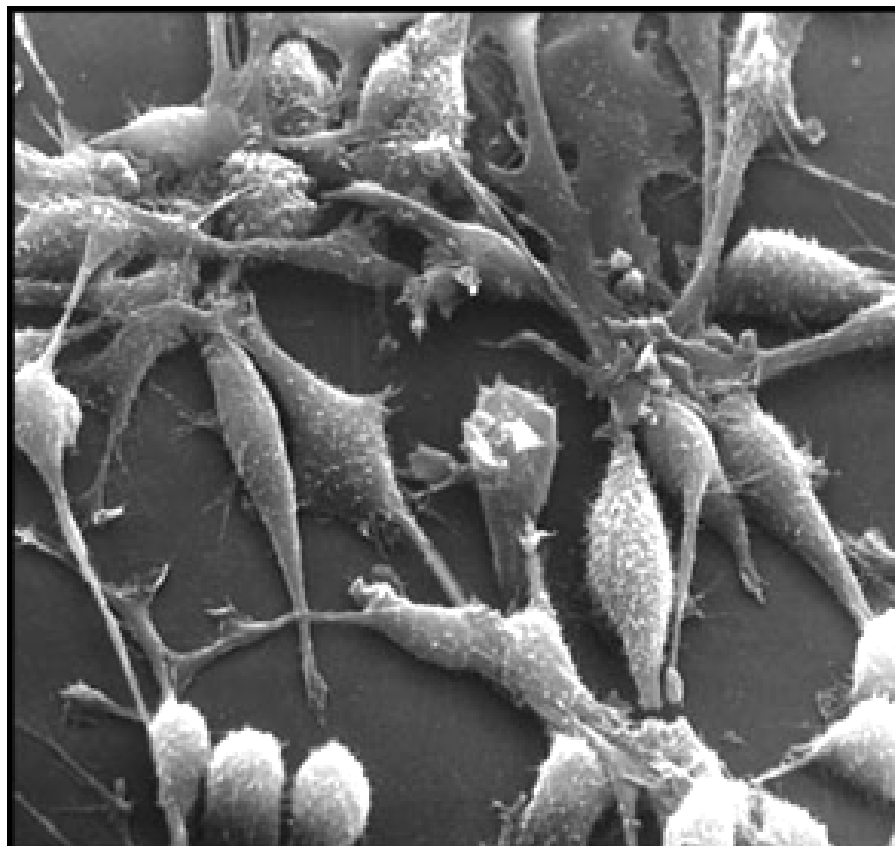
Studium buněk v podmínkách *in vitro*

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 μm

fibroblasty v buněčné kultuře

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012

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*

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012

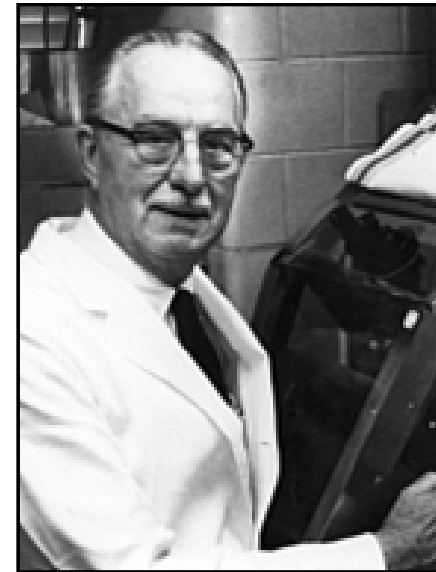
- 1907: kultivace nervových vláken izolovaných z žabích embryí (Harrison)
- 1912: explantáty kuřecí pojivové tkáně a srdeční svaloviny (Carrel; Burrows)
- 1916: trypsinizace a pasážování (Rous & Jones)
- 1943: stabilizace první buněčné linie - myší fibroblasty: L-cells (Earle et al.)
- 1948: první buněčný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



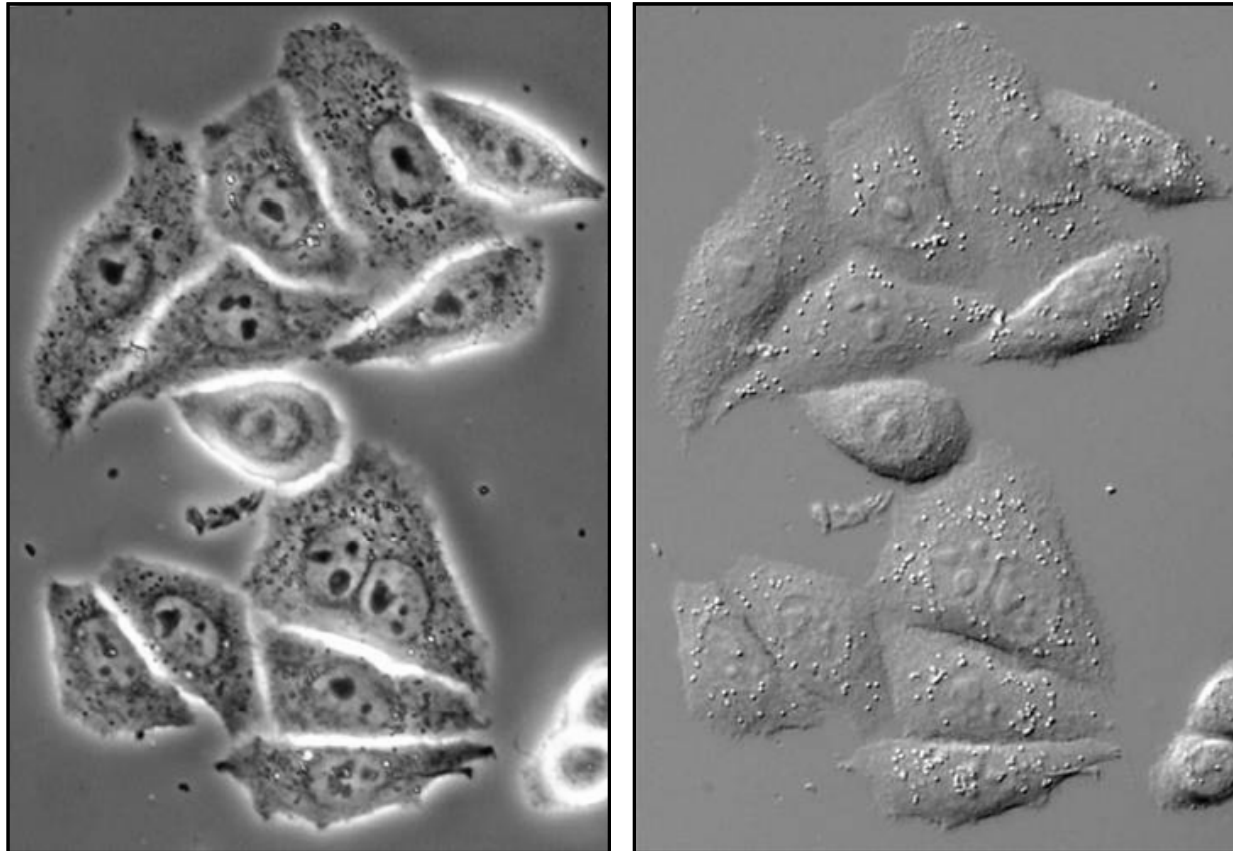
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012

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

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

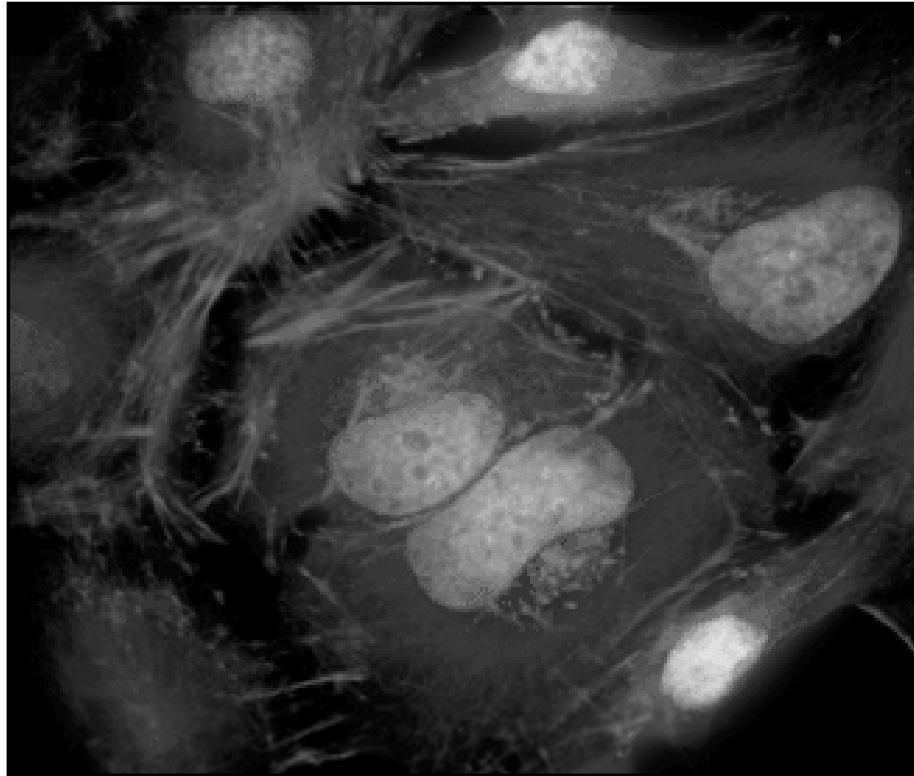


Linie HeLa:



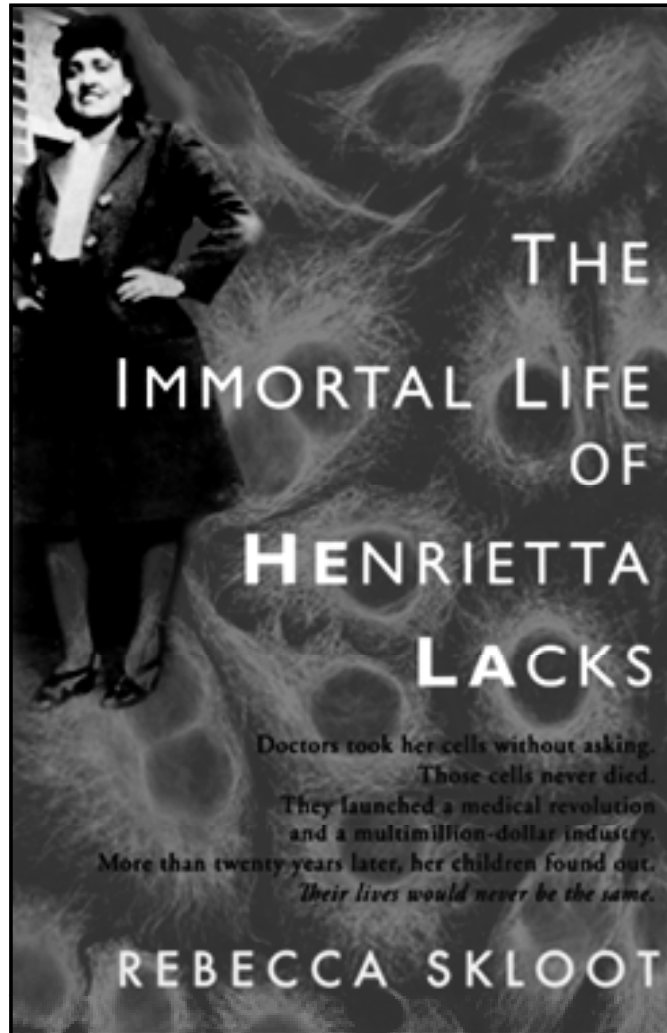
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012

Linie HeLa:



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

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012

KULTIVAČNÍ PODMÍNKY

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012

Kultivační podmínky pro savčí a lidské buňky

- co nejpodobnější podmínkám v původním organismu:
 - ✓ teplota 37°C,
 - ✓ maximální vlhkost vzduchu, 5% CO₂
 - ✓ neutrální pH (6,8 až 7,2)
 - ✓ živiny
- sterilní prostředí

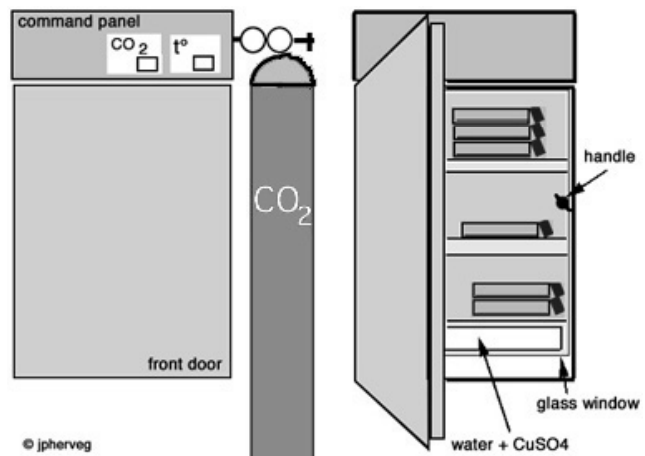


Stabilní prostředí pro kultivace

CO₂ inkubátory

- definovaná stabilní teplota (37°C)
- maximální vlhkost vzduchu
- definovaný stabilní obsah CO₂ (5%),
příp. i O₂ (řízená hypoxie)

- vodní nebo vzduchový plášť
- vnitřní povrch: měď nebo nerez
- připojení tlakových lahví přes redukční ventily



© jpherveg



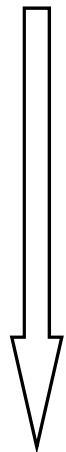
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012

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: Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , 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:

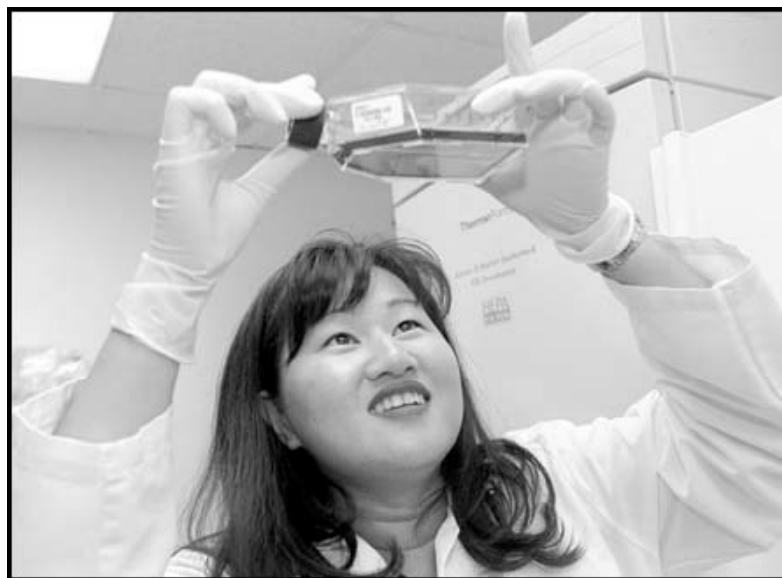
- NaHCO_3 , HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid)

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)



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012

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



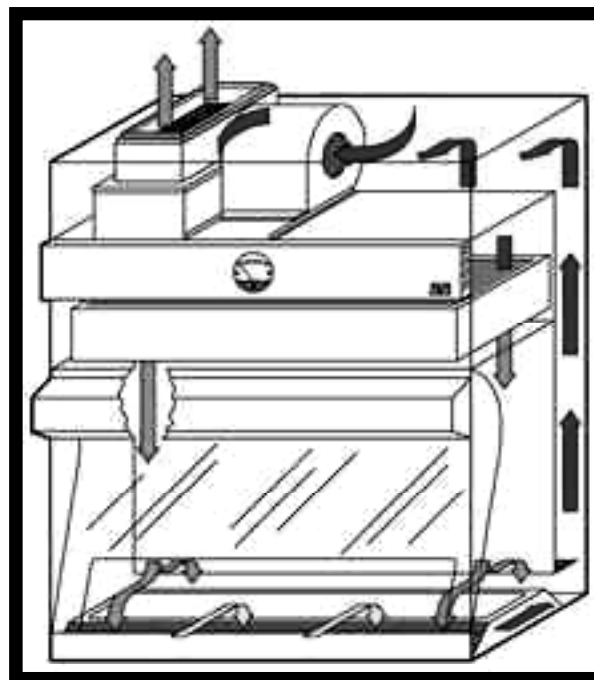
horizontální



vertikální

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012

Laminární box - biohazard třída II



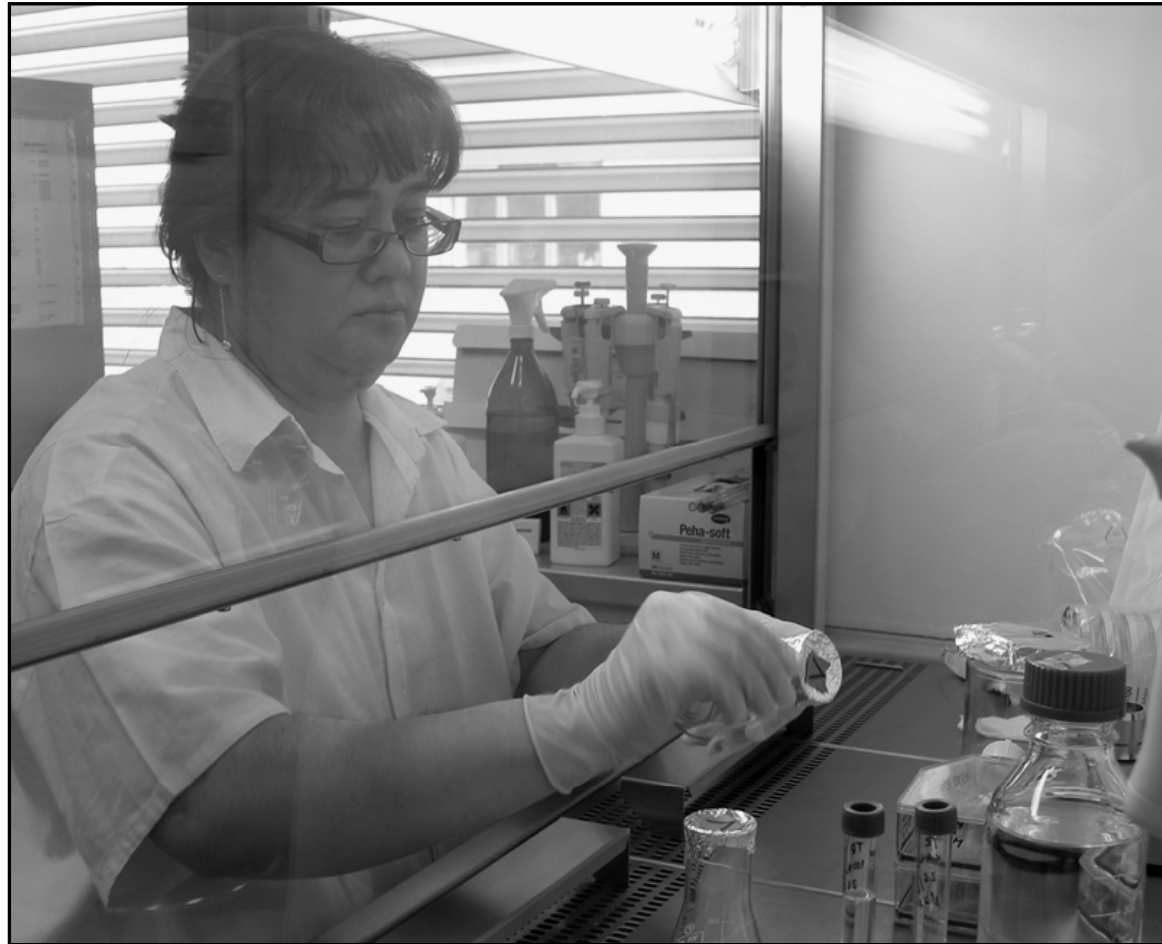
HEPA filtry
(částice > 0,3 μ m)



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012

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)

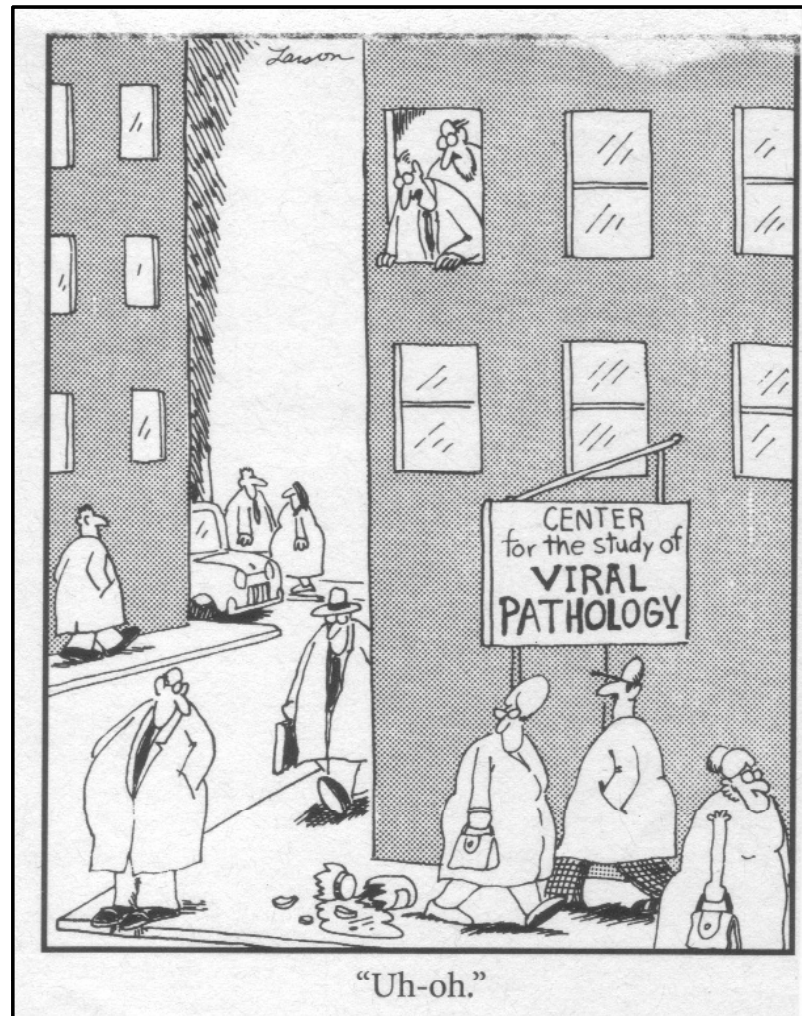


Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012

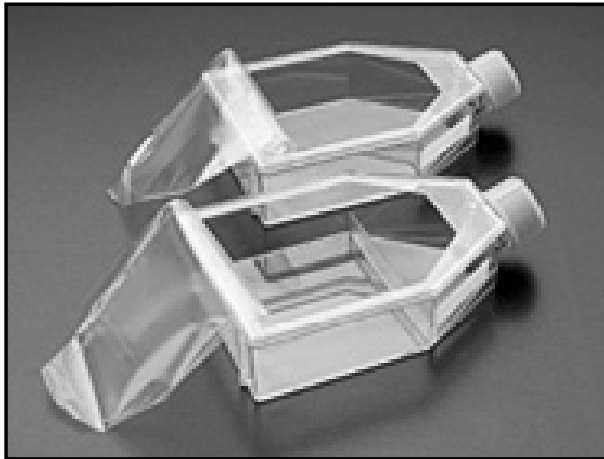
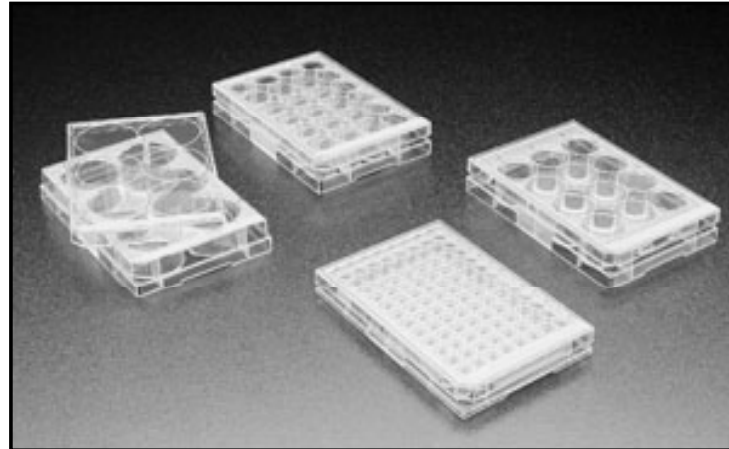
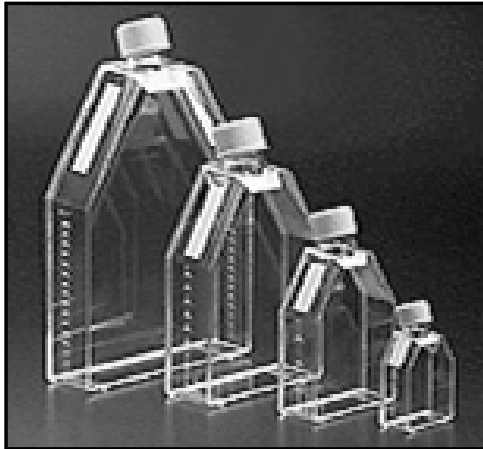
BIOSAFETY LEVEL 4 (BSL-4)



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012



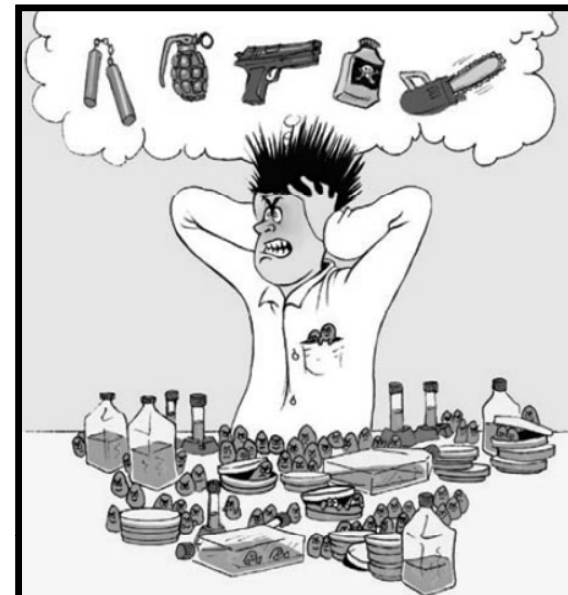
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012

Typy kontaminací

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

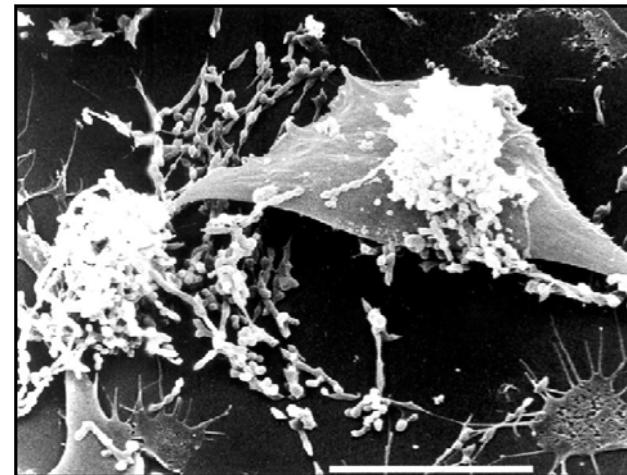
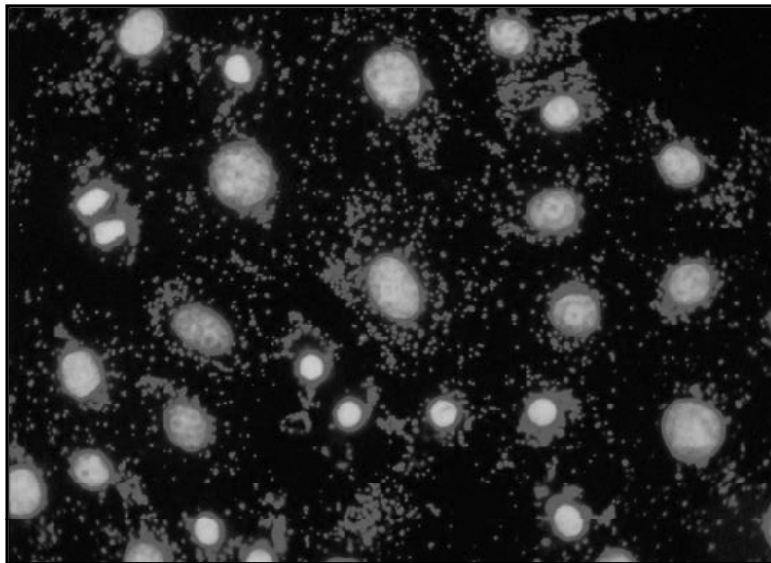
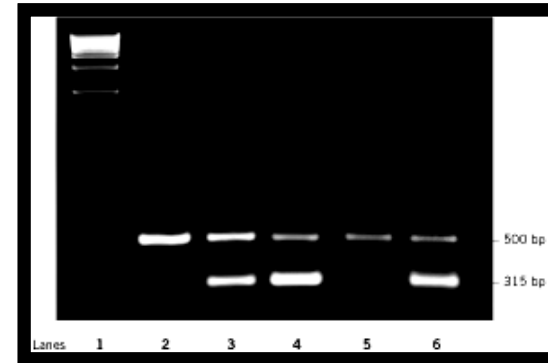


Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012

Kontaminace – mykoplazmata

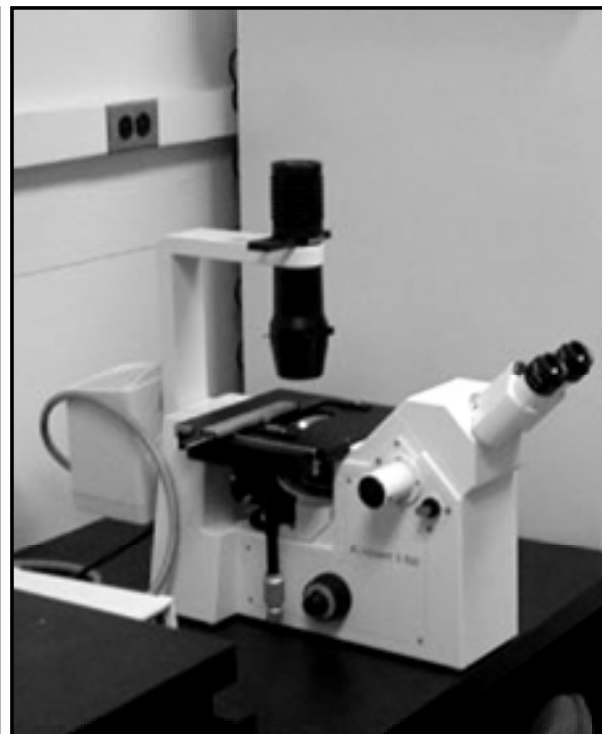
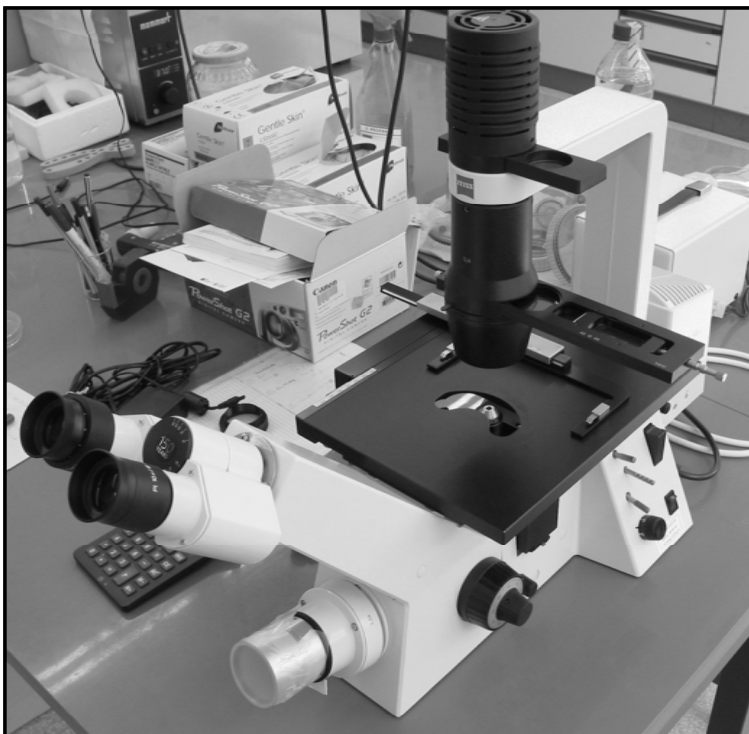
Detekce mykoplazmat:

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



KULTIVAČNÍ POSTUPY

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012



invertovaný mikroskop

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012

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

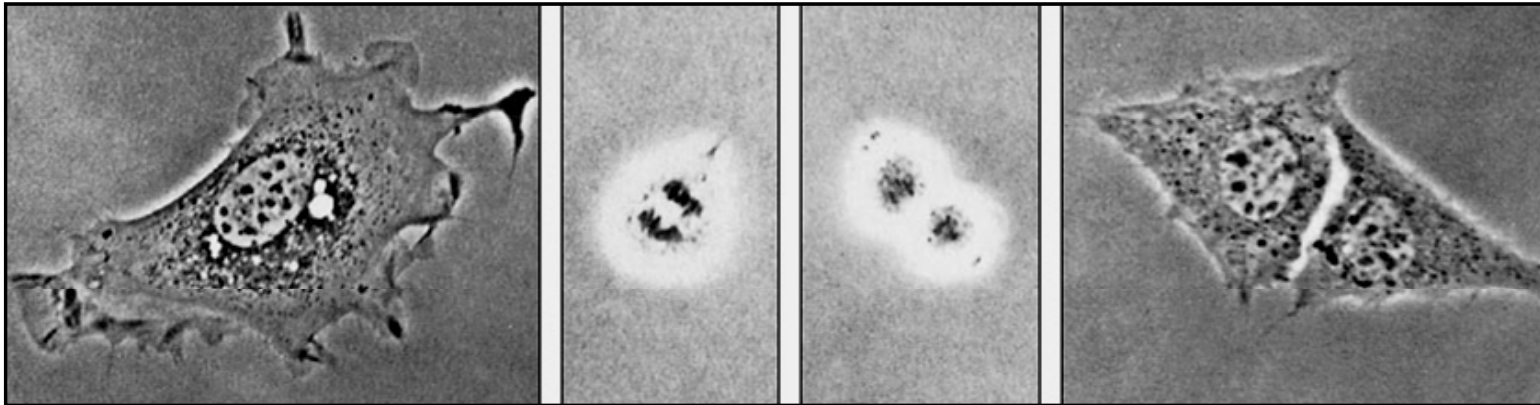
Adherované buňky

- 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



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012

DĚLENÍ BUNĚK V PODMÍNKÁCH *IN VITRO*:



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012

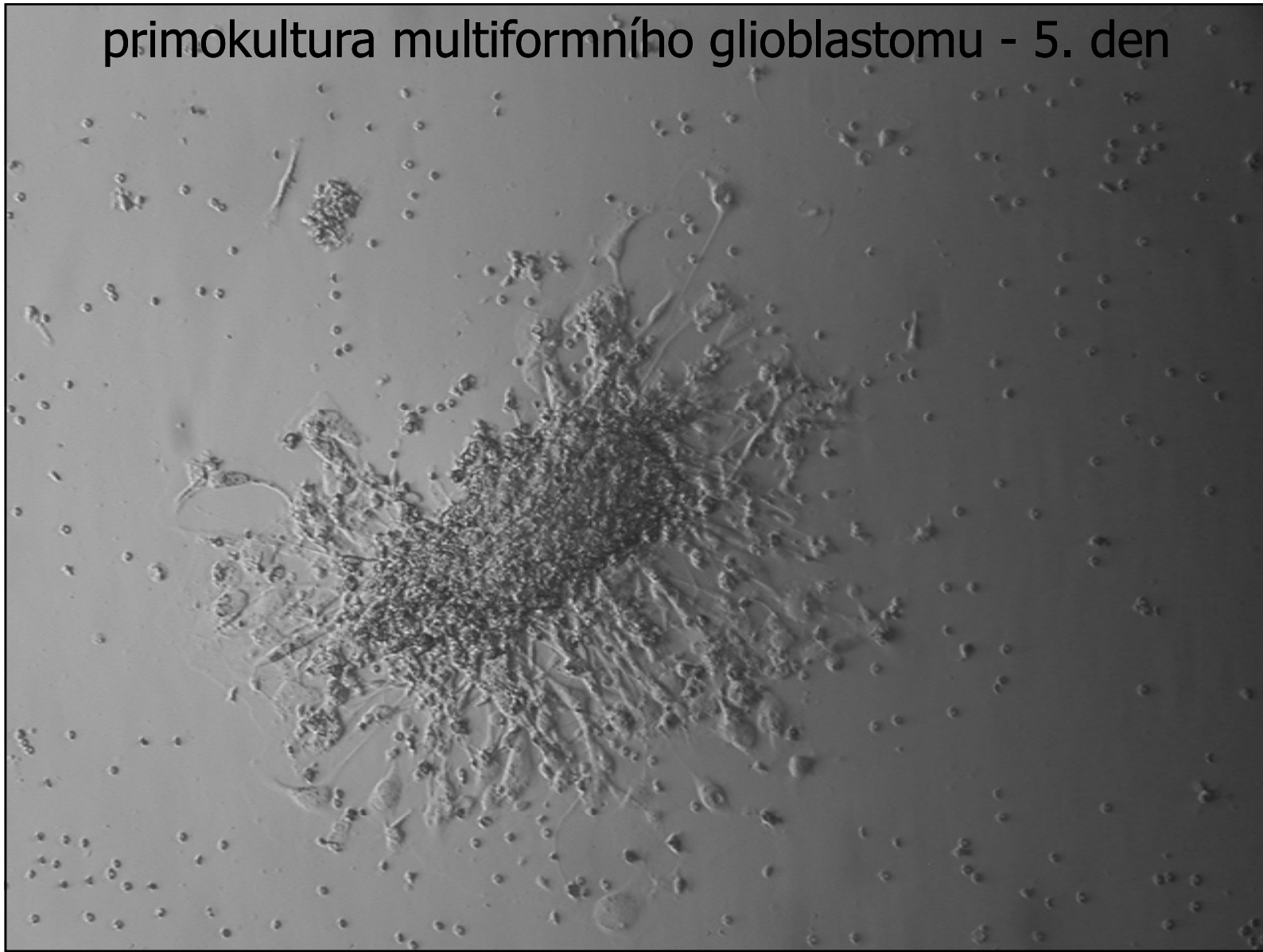
TYPY KULTIVACÍ (TERMINOLOGIE)

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012

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 multiformního 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:

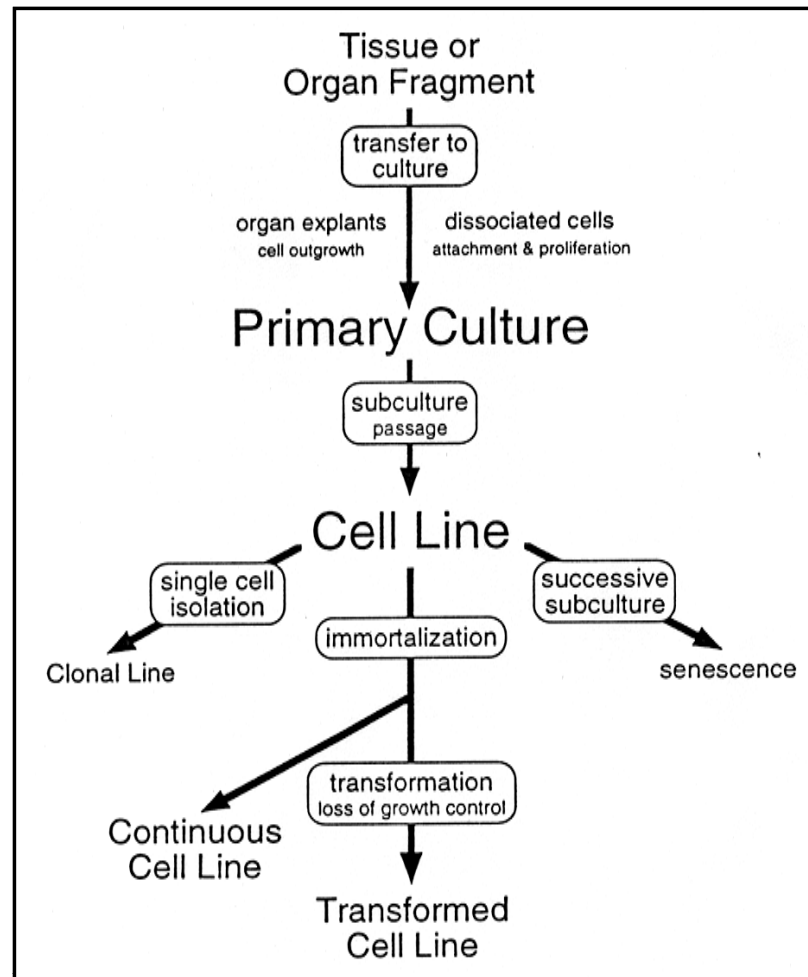
označení (název), druh organismu, pohlaví, věk, výchozí orgán, typ kultury, počet pasáží, růstové parametry, morfologie, karyotyp, markery

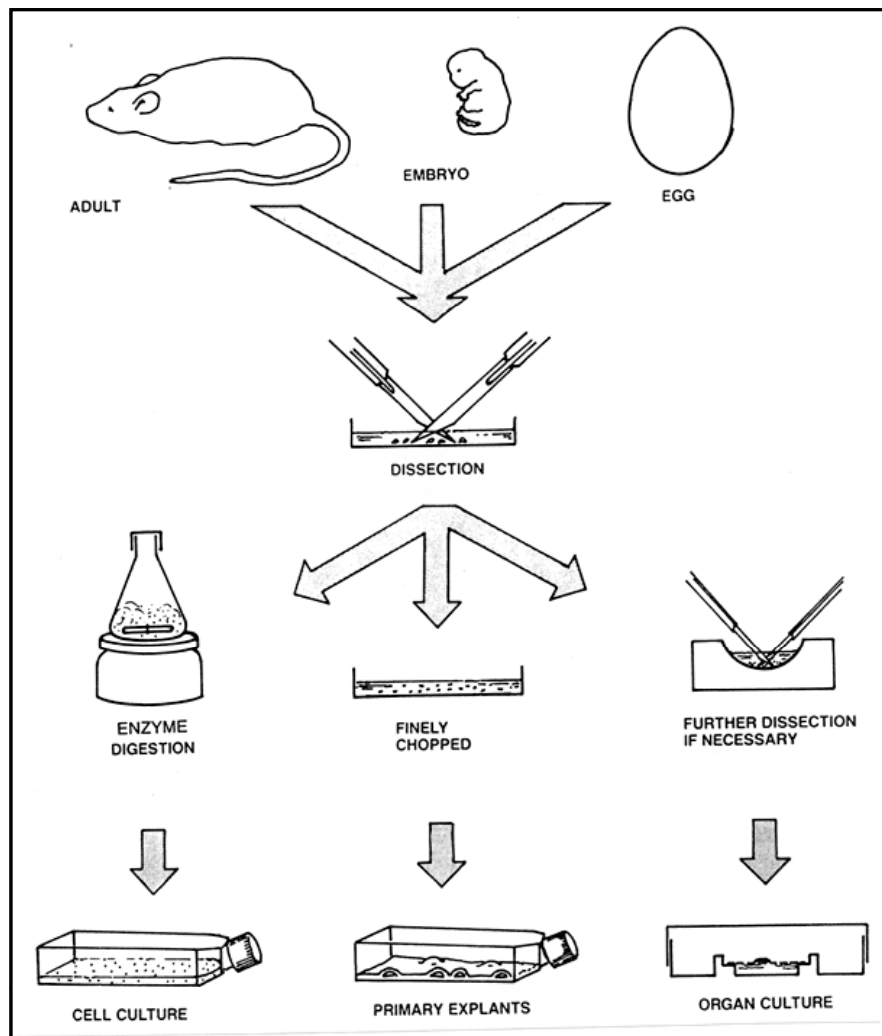
Buněčný kmen

- 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





Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012

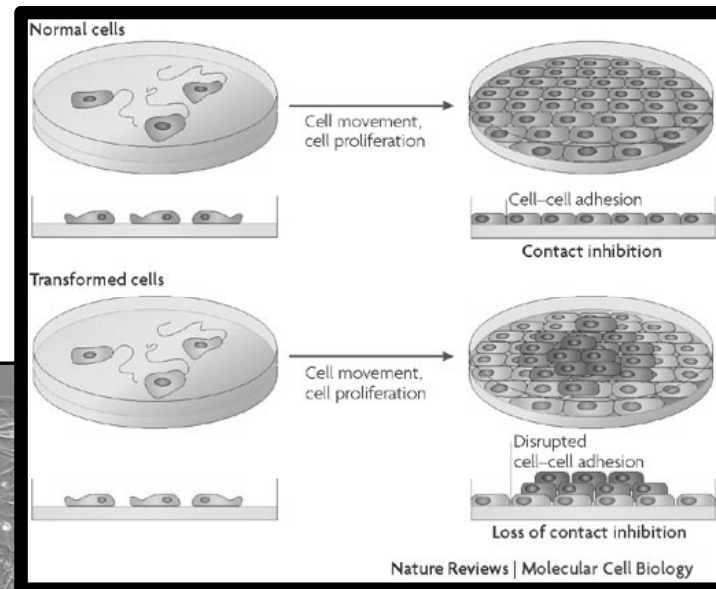
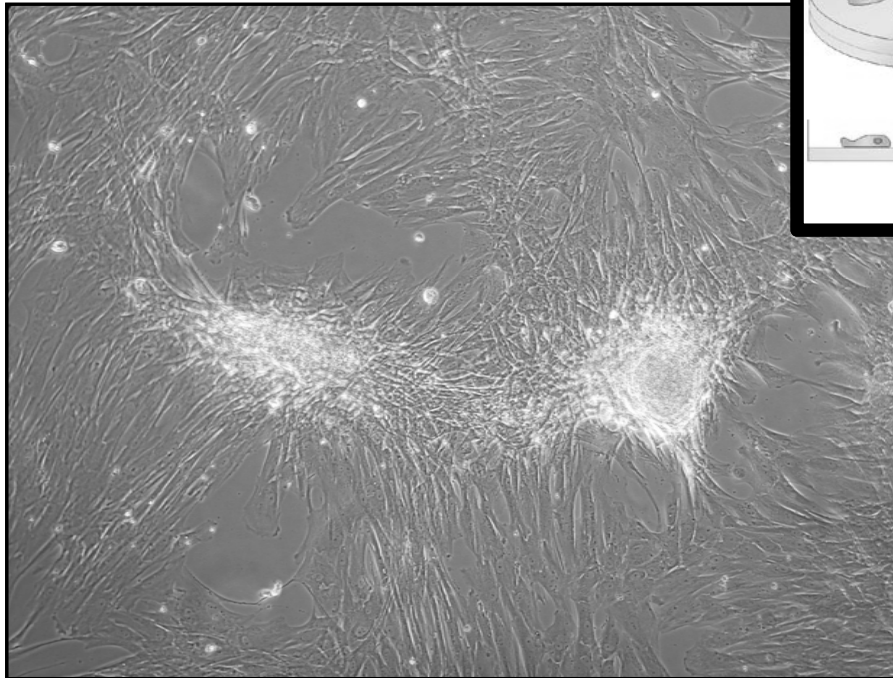
NORMÁLNÍ A TRANSFORMOVANÉ BUNĚČNÉ LINIE

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012

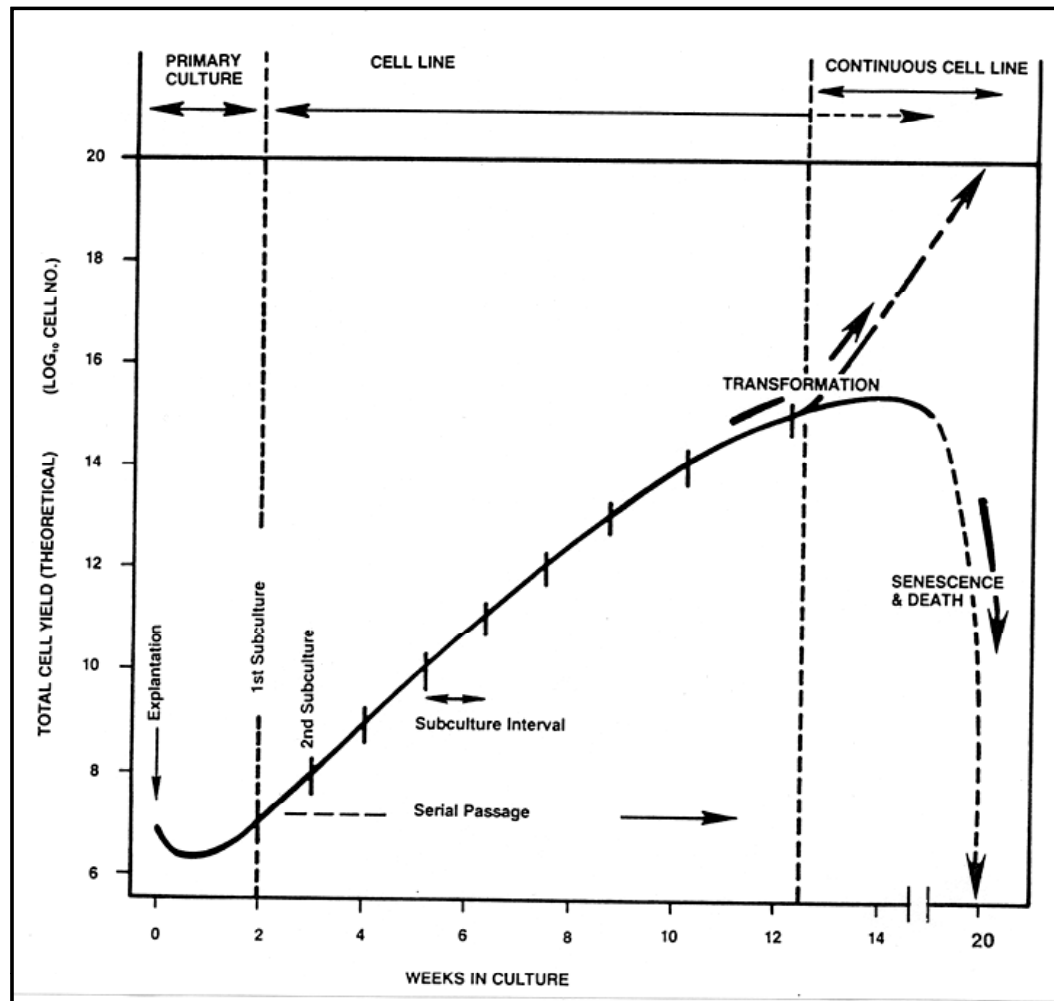
Růstové parametry buněčných linií:

- 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



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012

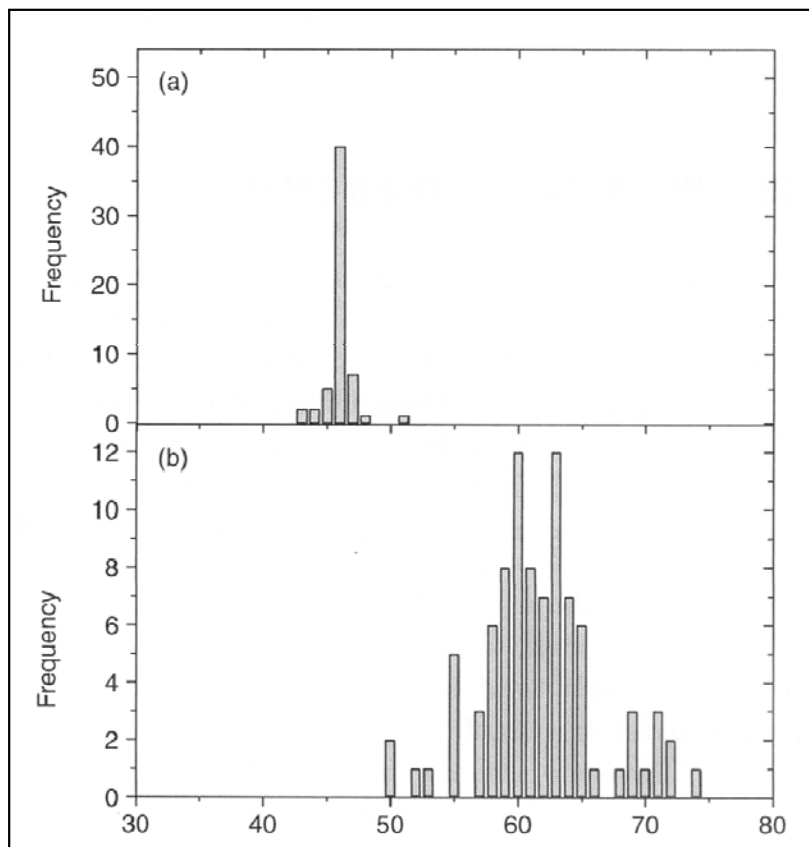
Diploidní buněčné linie:

- 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 morfolgie 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, redukovaná 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



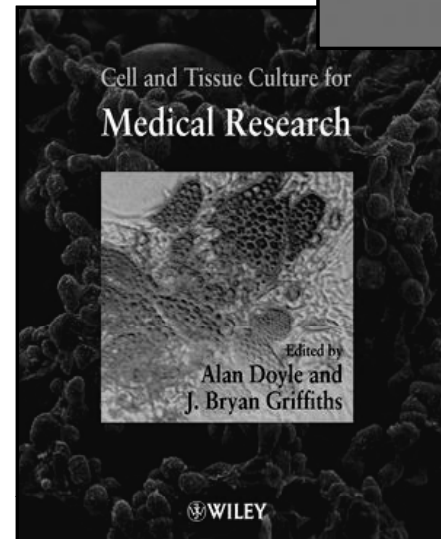
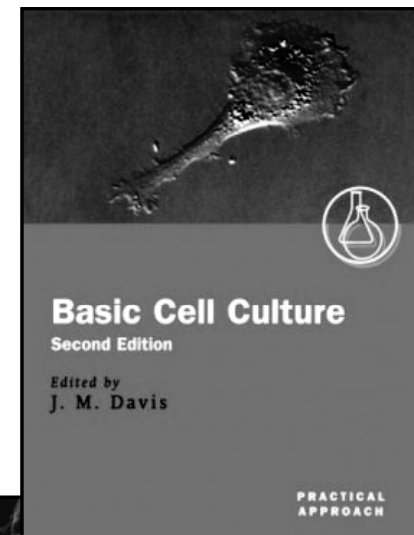
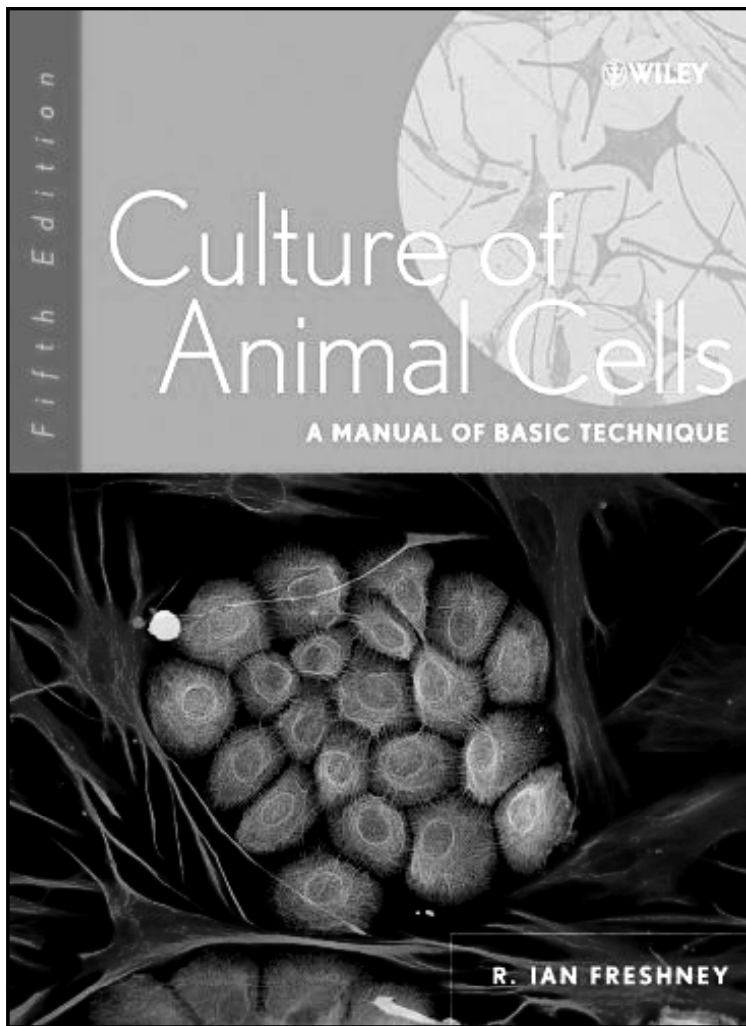
normální buňky
(gliové buňky)

transformované buňky
(maligní melanom)

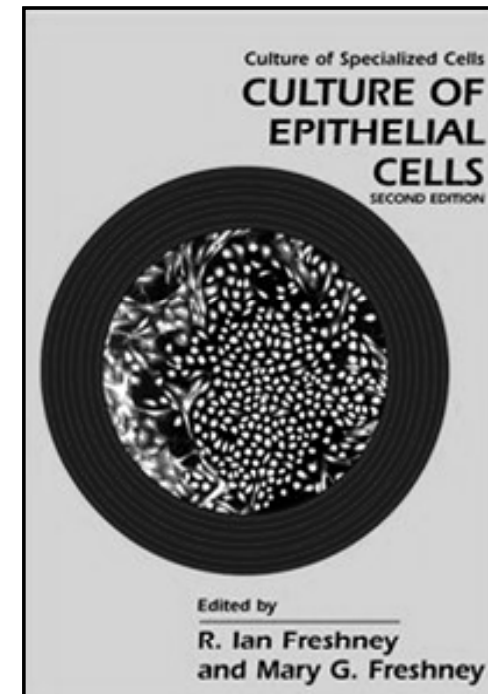
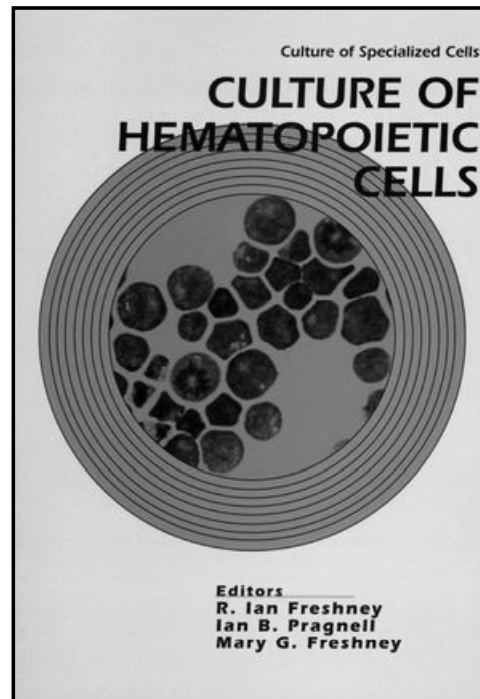
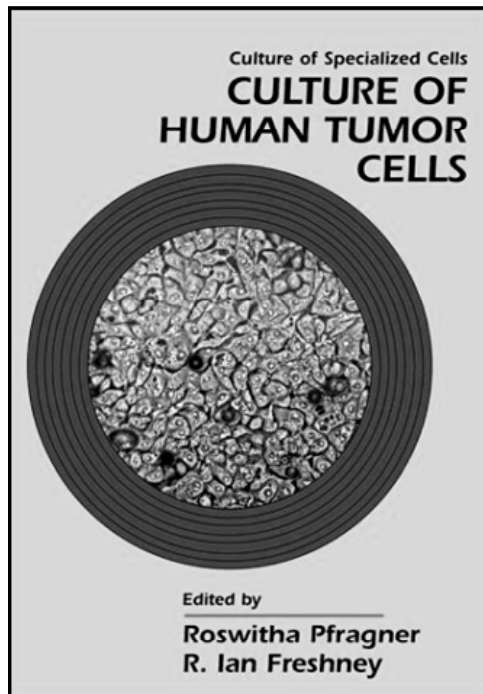
PRAKTICKÉ APLIKACE

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012

- 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)



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012

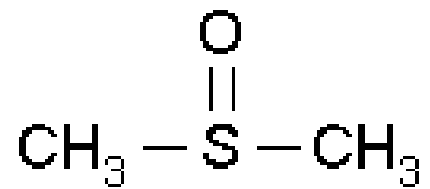
KRYOKONZERVACE, ARCHIVACE, SBÍRKOVÁ PRACOVNÍŠTĚ

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012

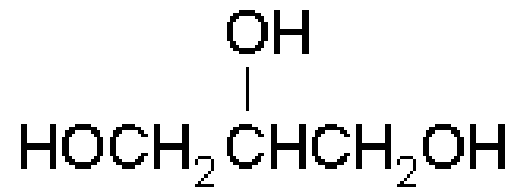
Kryokonzervace živočišných buněk

- 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:

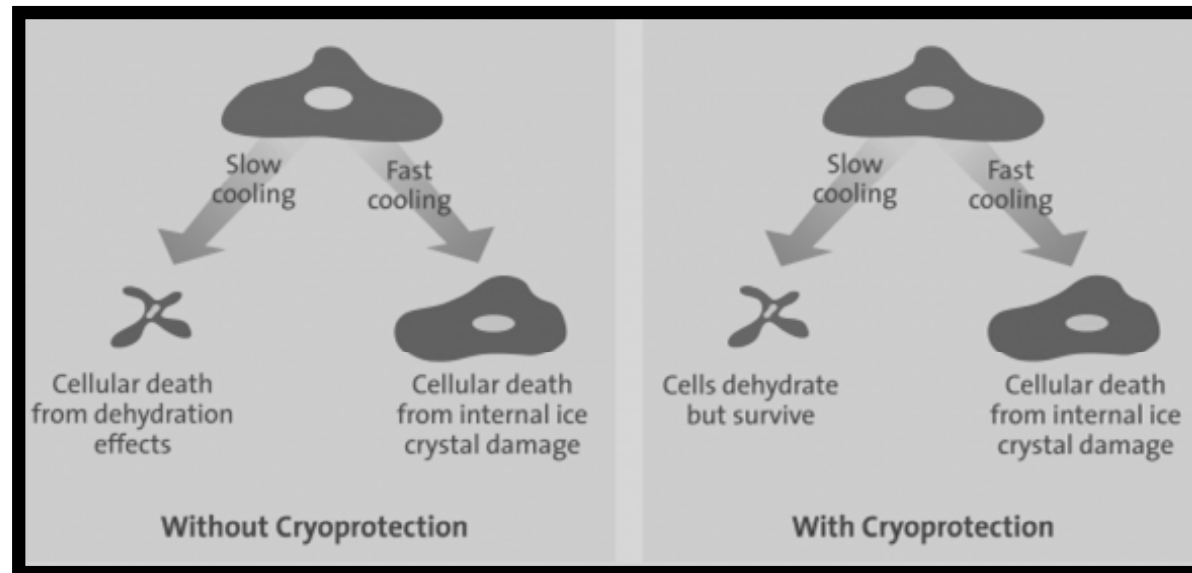


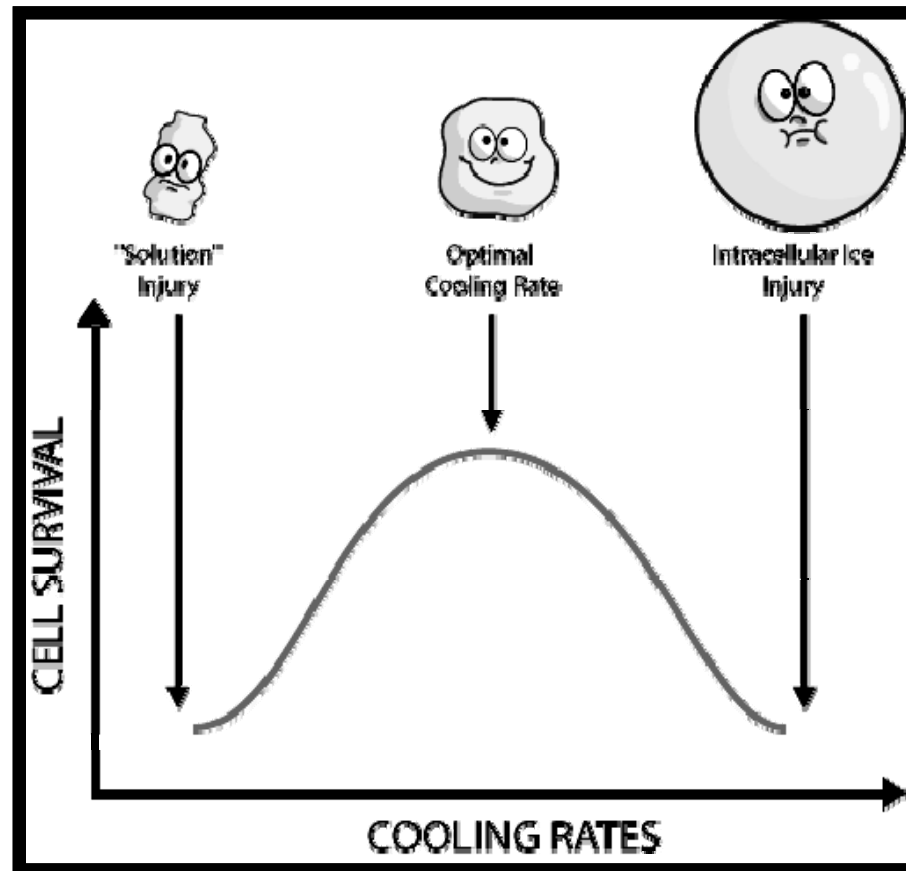
**dimethylsulfoxid
(DMSO)**



glycerol

Vliv rychlosti zamražování na přežití buněk:





Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012

American Type Culture Collection (ATCC)

The screenshot shows the ATCC website interface. At the top left is the LGC Standards logo with the tagline 'Excellence through measurement'. To the right is a search bar labeled 'Search Catalogue:' with a dropdown menu set to 'Catalogue Keyword Search' and a 'Go' button. Below the search bar are links for 'Search Options', 'Home', 'Quick Order', 'Shopping Cart', and 'Contact Us'. On the left side, there is a vertical navigation menu with links: 'About the ATCC-LGC Standards Partnership', 'LGC Standards Offices', 'How to Order', 'Special Forms', 'ATCC Cultures and Products', 'ATCC Science', 'ATCC Standards', 'ATCC Deposit Services', 'ATCC Services', 'ATCC Product Use Policy', and 'Technical Support'. The 'ATCC Cultures and Products' link is expanded into a dropdown menu with the following items: 'Cell Biology', 'Microbiology', 'Molecular Biology', 'Tissue Biology', 'Special Collections', 'hTERT Immortalized Cell Lines', and 'Stem Cell Products and Services'. The 'Cell Biology' item is further expanded to show sub-items: 'Cell Lines and Hybridomas', 'Media, Sera and Reagents', 'Kits/ Panels', 'DNA and RNA', 'STR Profile Database', and 'hTERT Immortalized Cell Lines'. The 'Stem Cell Products and Services' item is also expanded to show 'hTERT Immortalized Cell Lines' and 'Stem Cell Products and Services'. The main content area features the heading 'Cell Biology' and the sub-heading 'Culturing and preserving cells since 1962'. Below this is a paragraph: '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.' To the right of this paragraph is a partially visible paragraph: '...at 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'. Below the paragraph is another partially visible paragraph: '...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 is a 'Site Search' input field with a 'Go' button. To the right of the input field is the text: 'Discover why comprehensive testing at ATCC is important to your work.'

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012

European Collection of Cell Cultures (ECACC)



Protecting people
Preventing harm
Preparing for threats



Home Products Services Technical Ordering About Us Contact Us HPA website

Health Protection Agency Culture Collections

Quick Search

You are not logged on.

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
Cytfect 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



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 01 / 22.2.2012