

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie – 17.2.2014

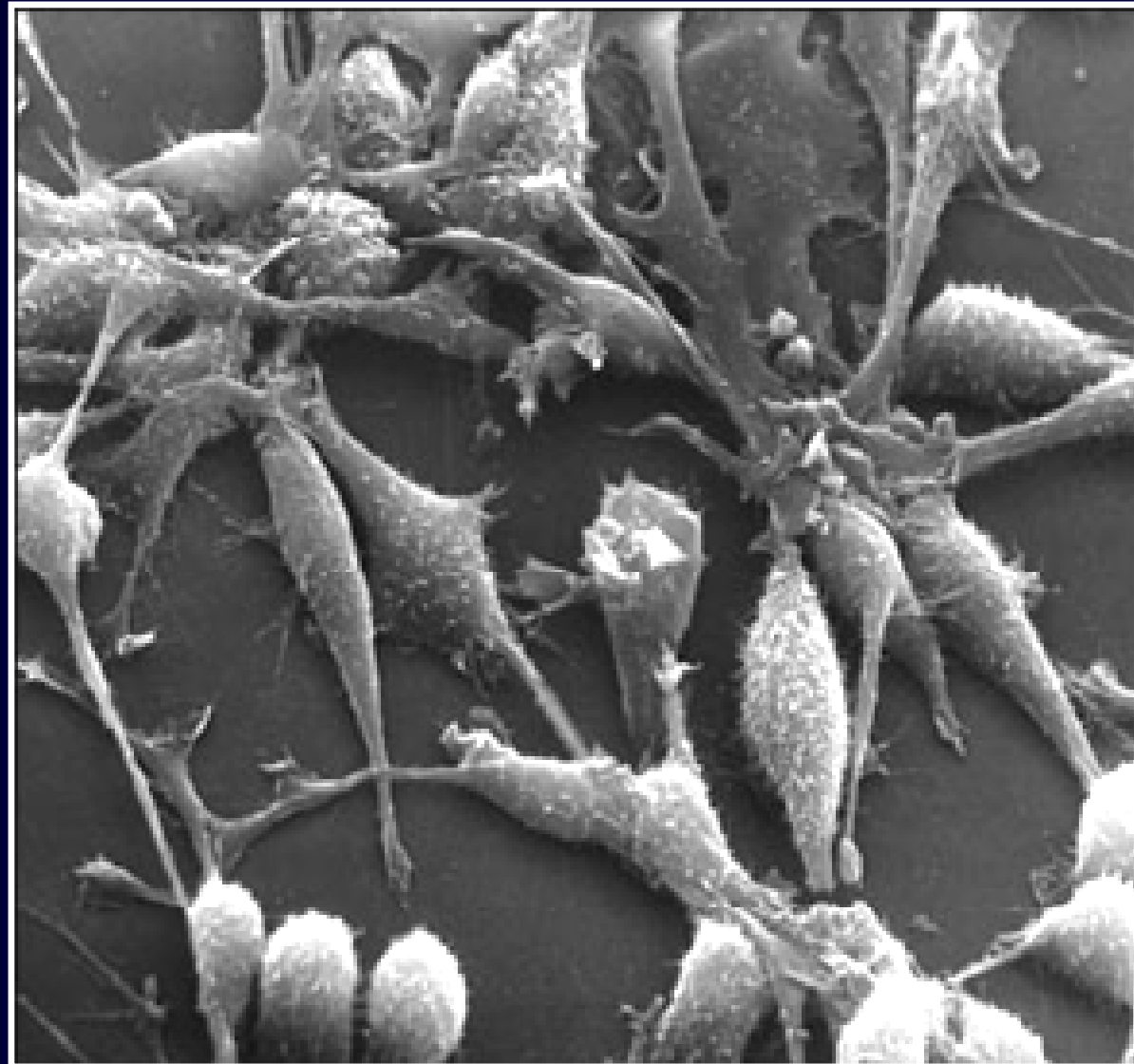
Studium buněk v podmínkách *in vitro*

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

Program přednášky:

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

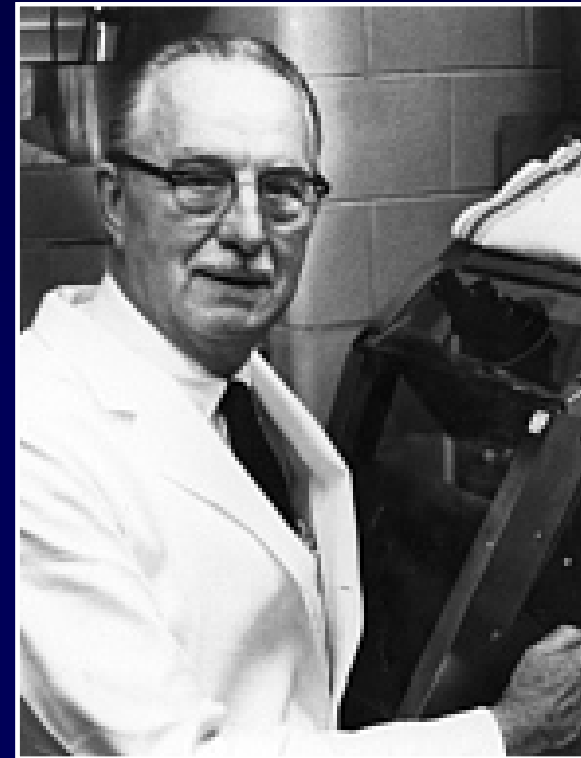
VÝVOJ KULTIVACÍ BUNĚK *IN VITRO*

- **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.)

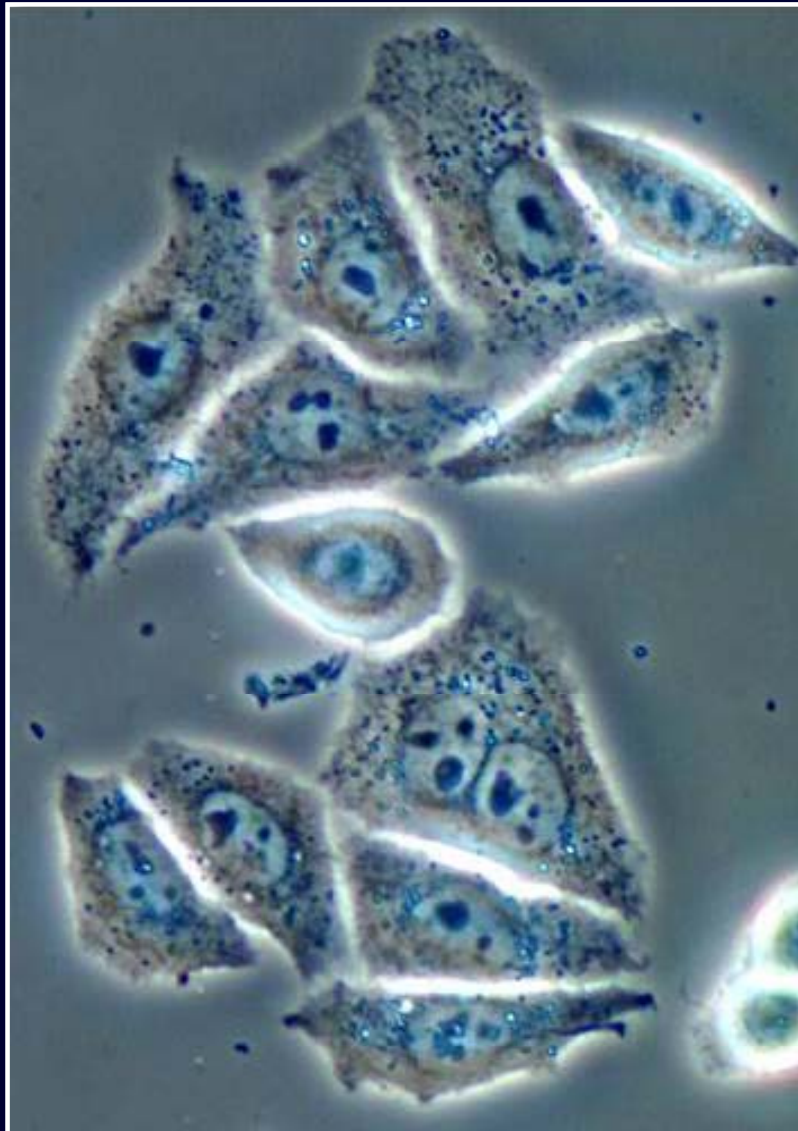


1952 - stabilizace první lidské linie HeLa (Gey et al.)

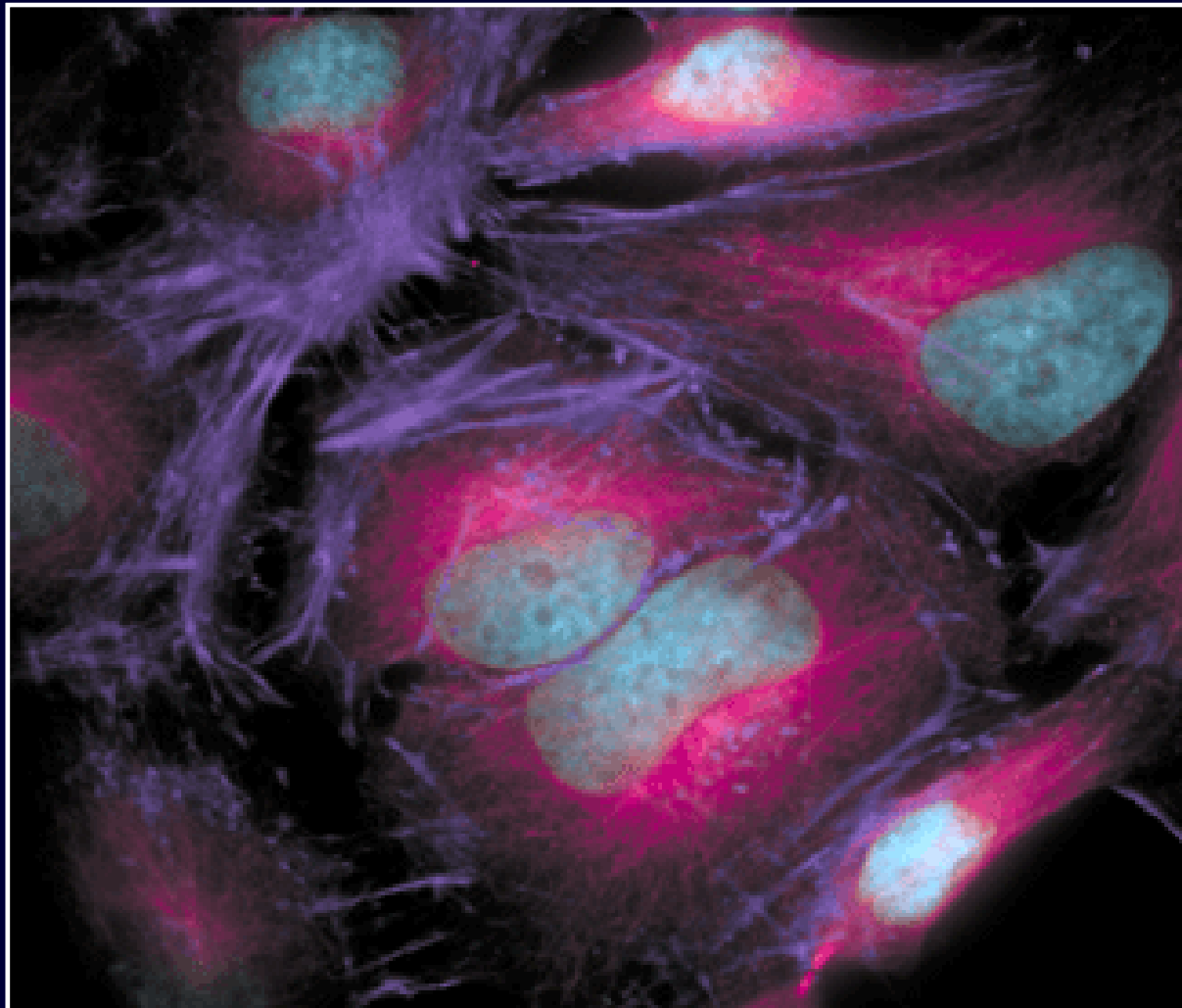
- karcinom děložního krčku
- Henrietta Lacks (1920-1951)
- Johns Hopkins University Hospital (Baltimore, USA)



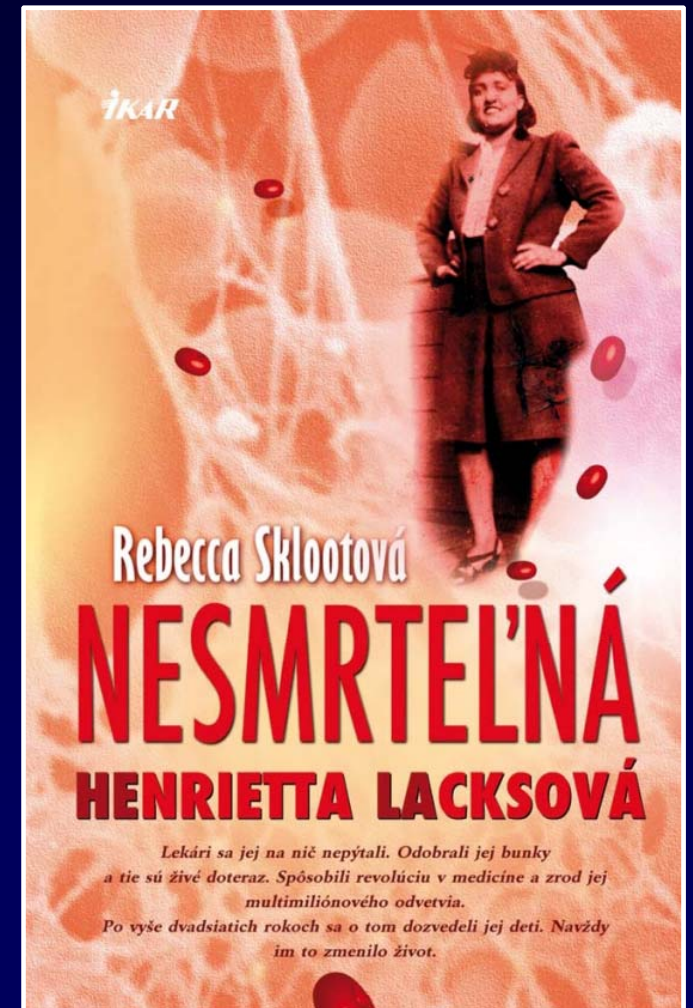
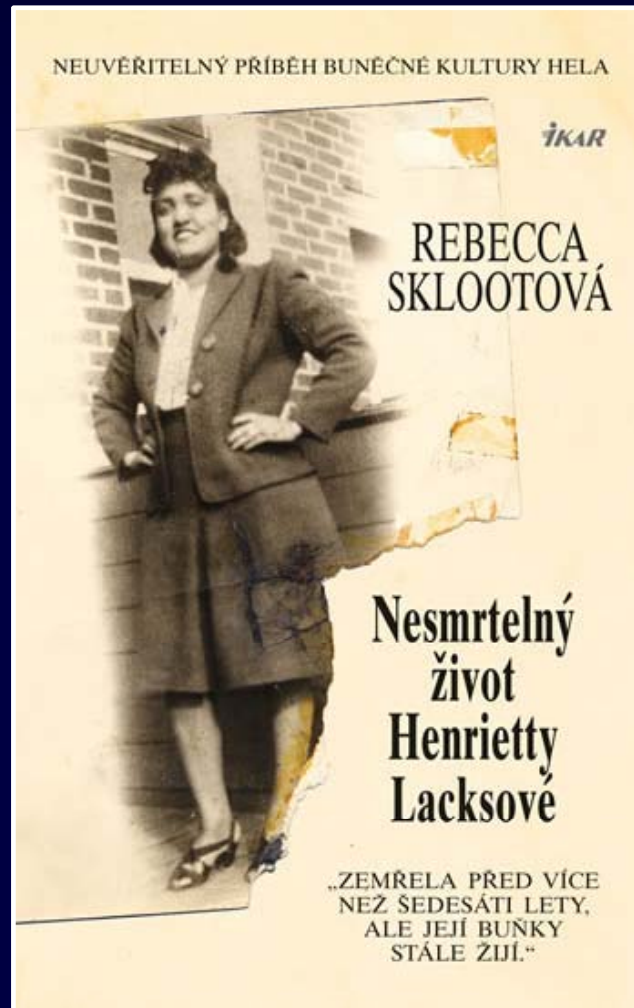
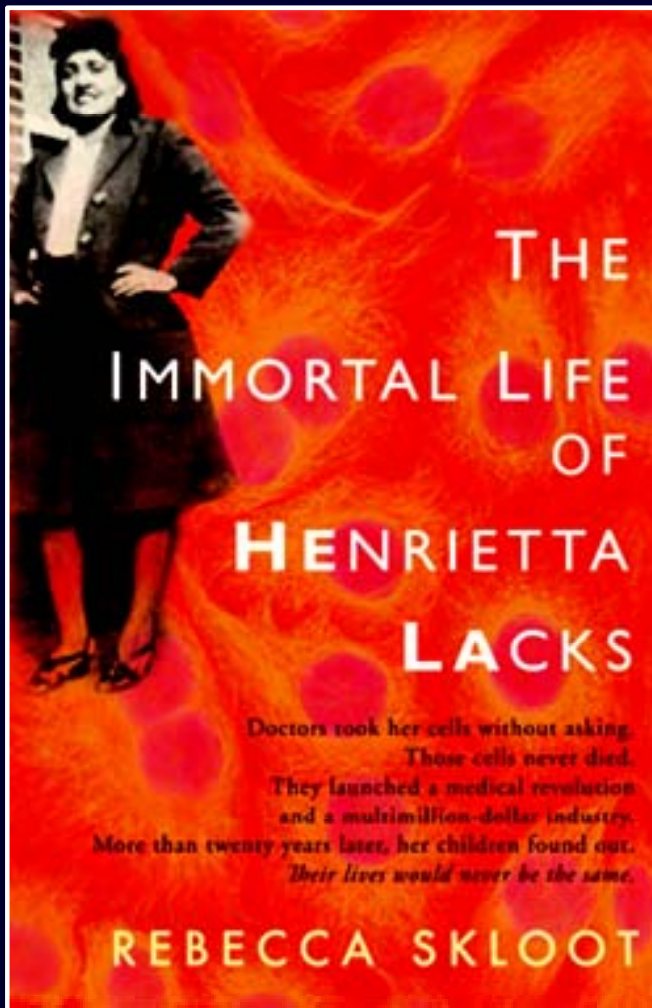
Linie HeLa:



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% **CO₂**
 - ✓ neutrální **pH** (6,8 až 7,2)
 - ✓ **živiny**
- sterilní prostředí

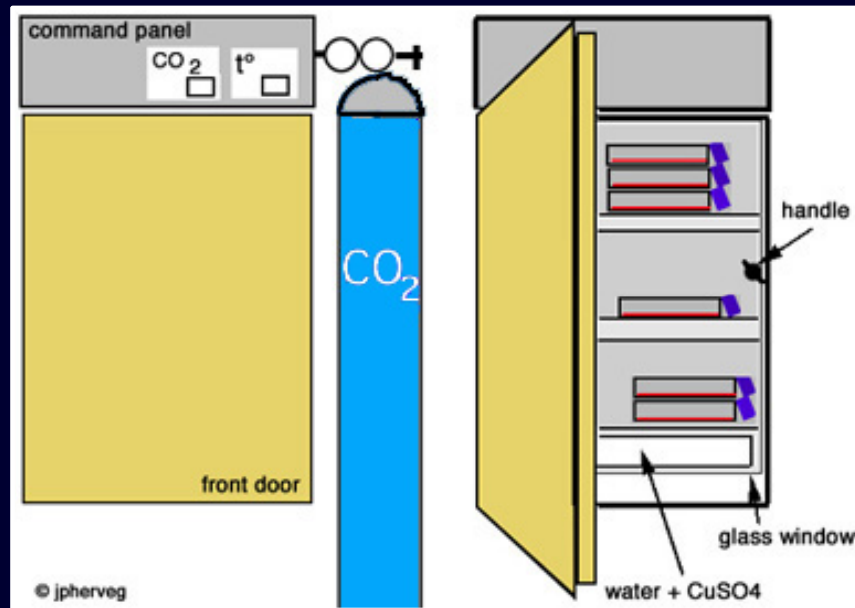


Stabilní prostředí pro kultivace

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



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)

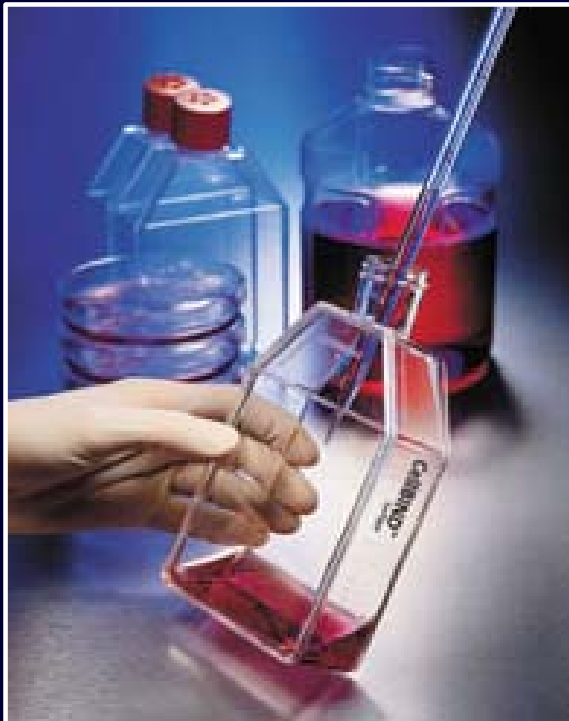
Aminokyseliny:

- **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)



Krevní 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)

ÚROVNĚ BIOLOGICKÉHO RIZIKA = 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

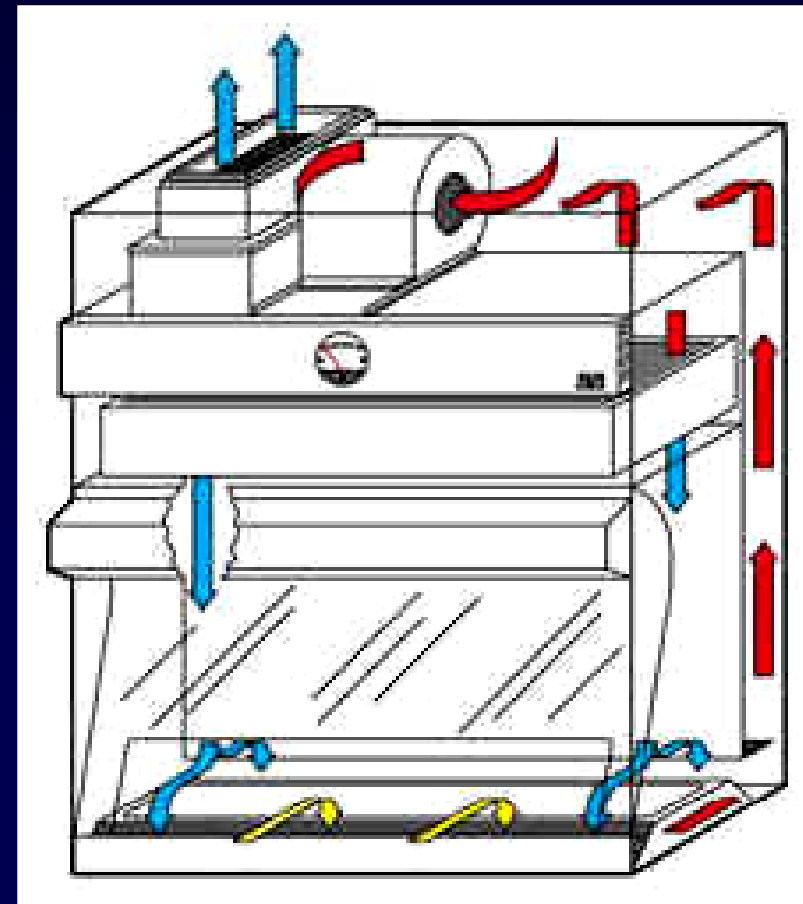


horizontální

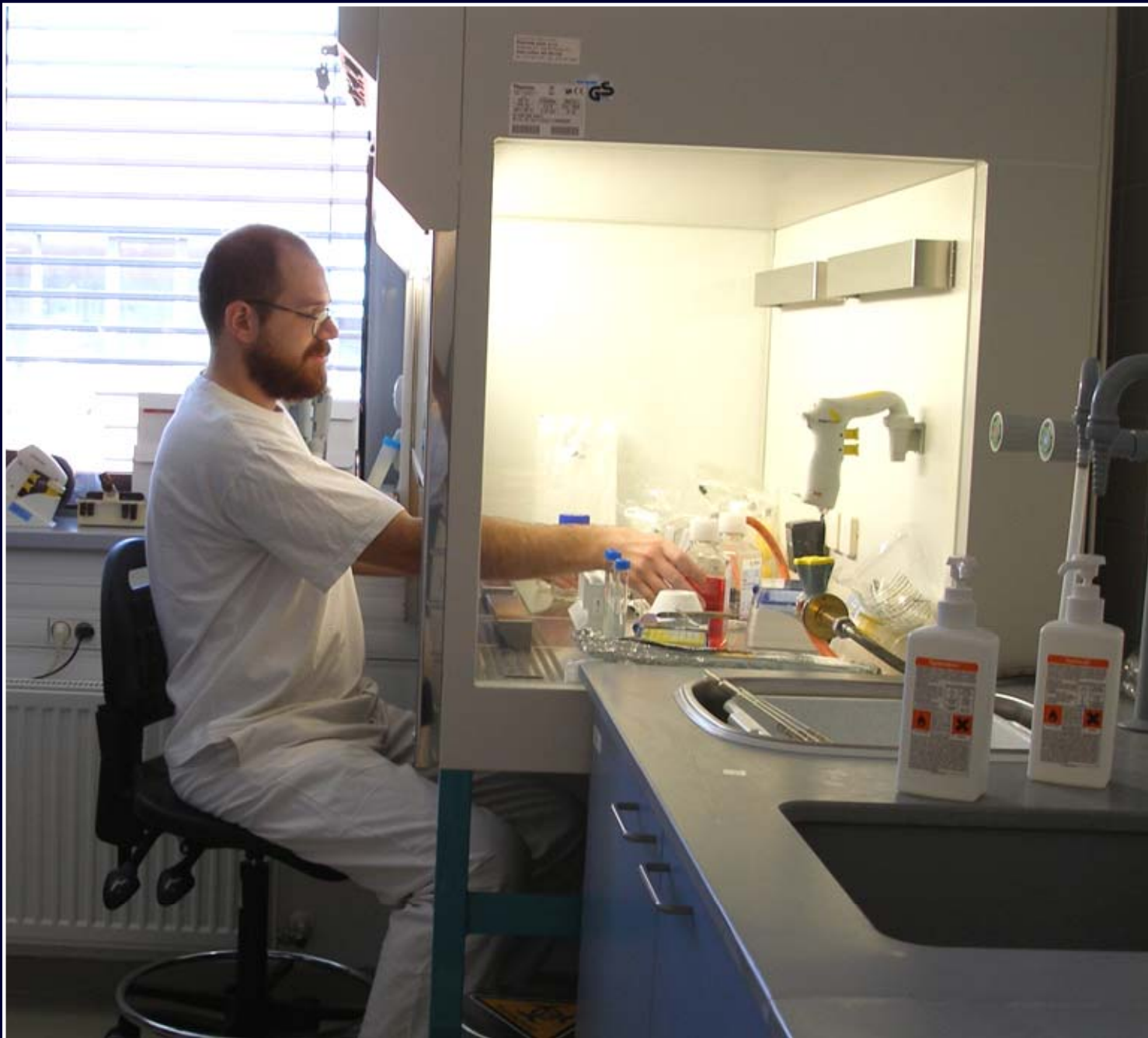


vertikální

Laminární box - biohazard třída II



HEPA filtry
(částice $> 0,3 \text{ mm}$)









ÚROVNĚ BIOLOGICKÉHO RIZIKA = 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

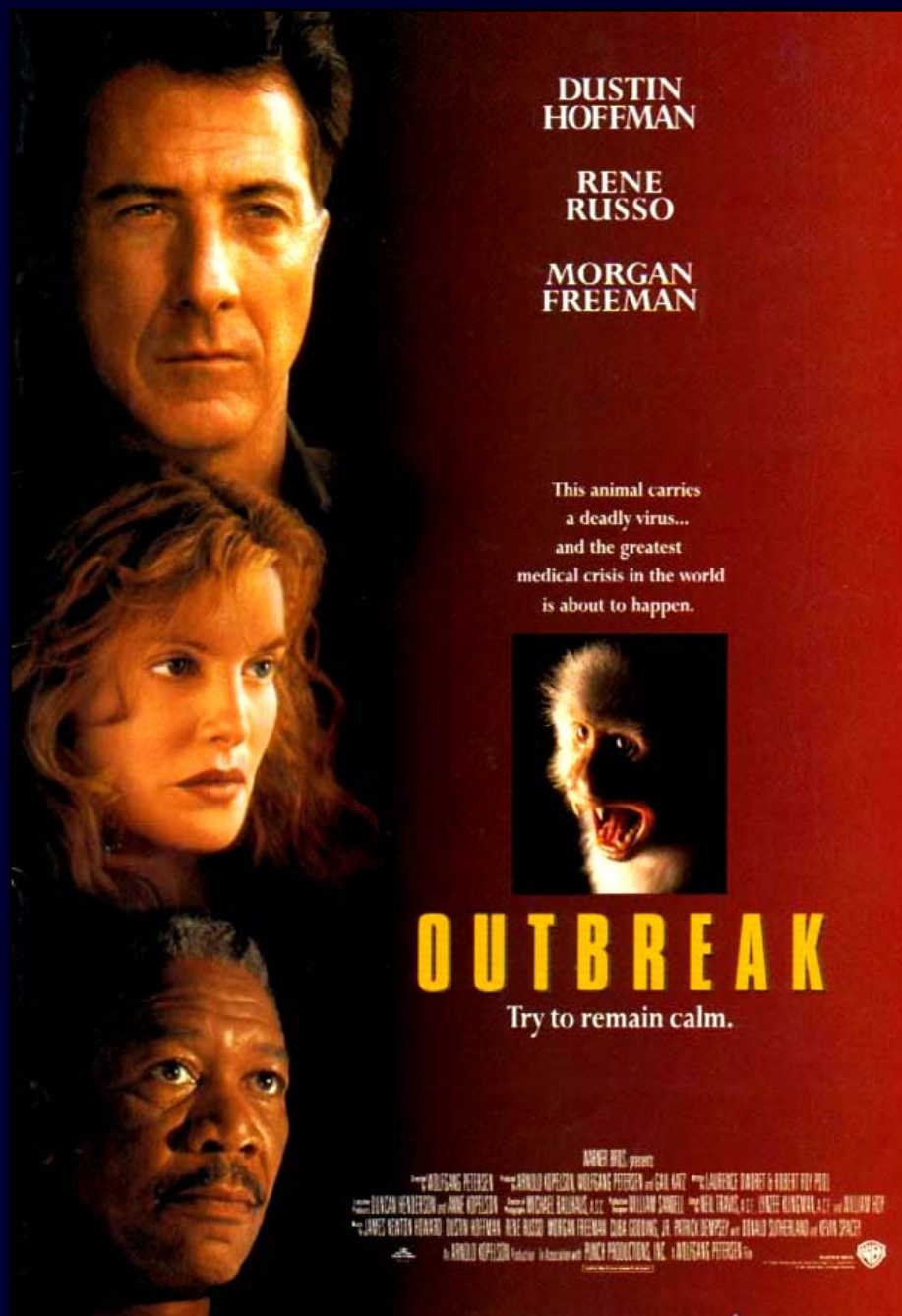
- extrémně rizikové patogeny, respiračně přenosné, způsobují letální onemocnění, proti nimž neexistuje léčba ani vakcinace
- hemorrhagické viry (Ebola, Marburg)

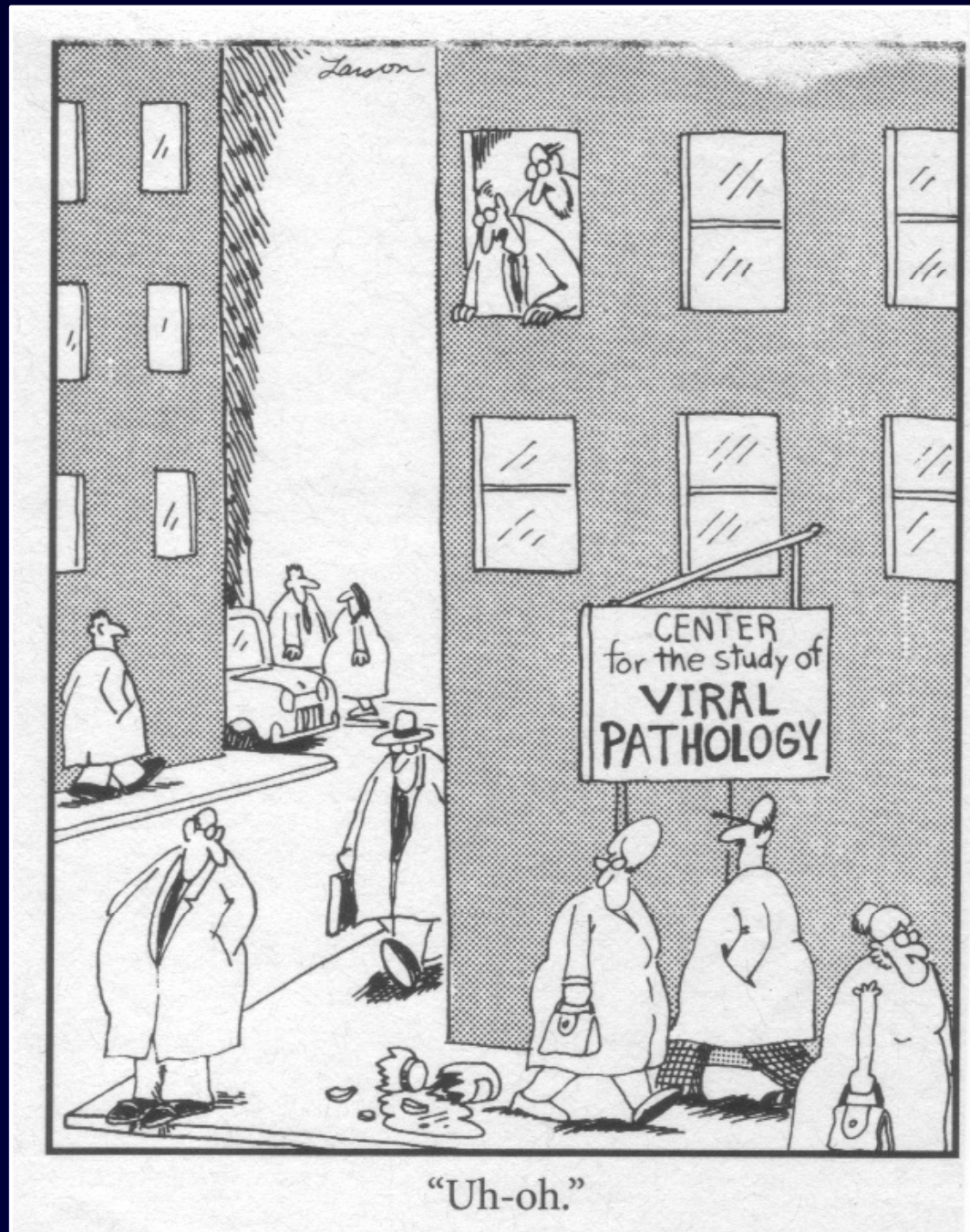
BIOSAFETY LEVEL 3 (BSL-3)

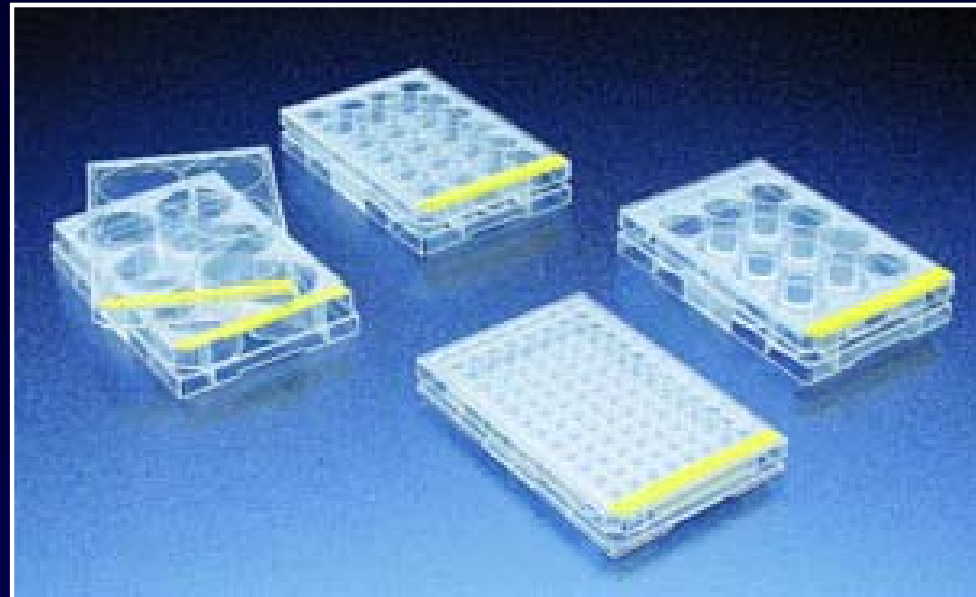


BIOSAFETY LEVEL 4 (BSL-4)



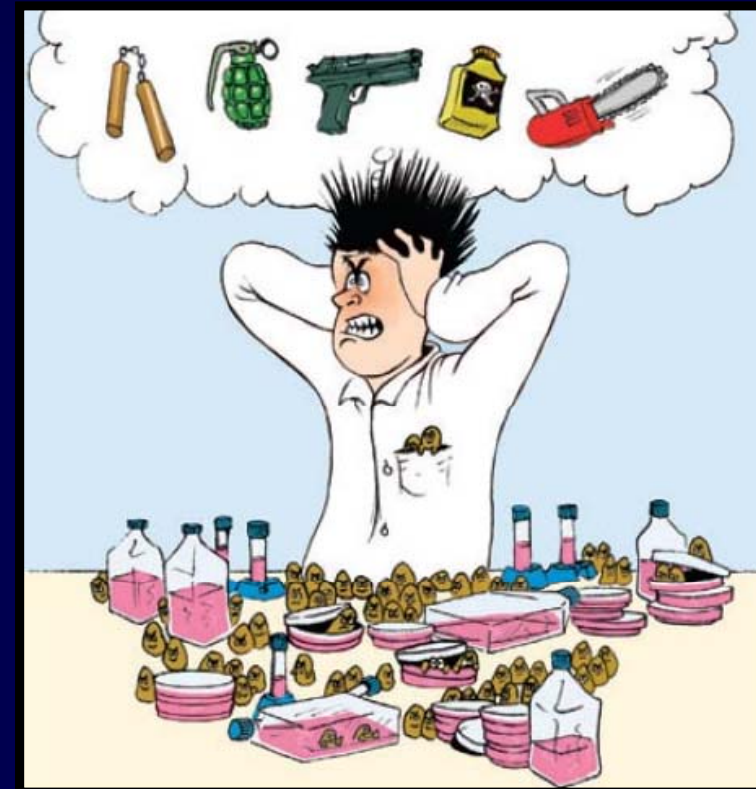
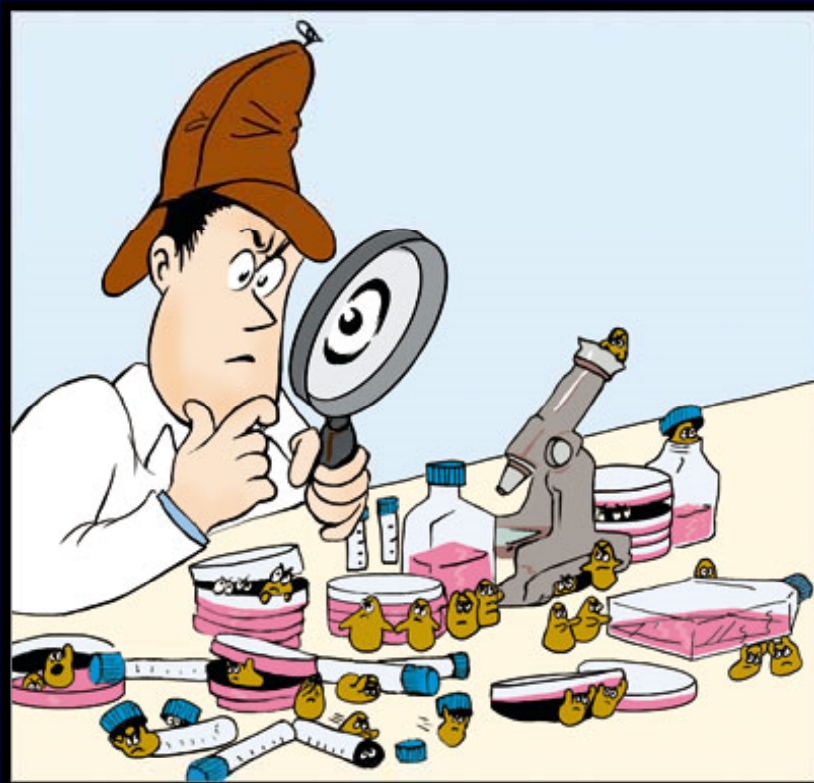






Typy kontaminací

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

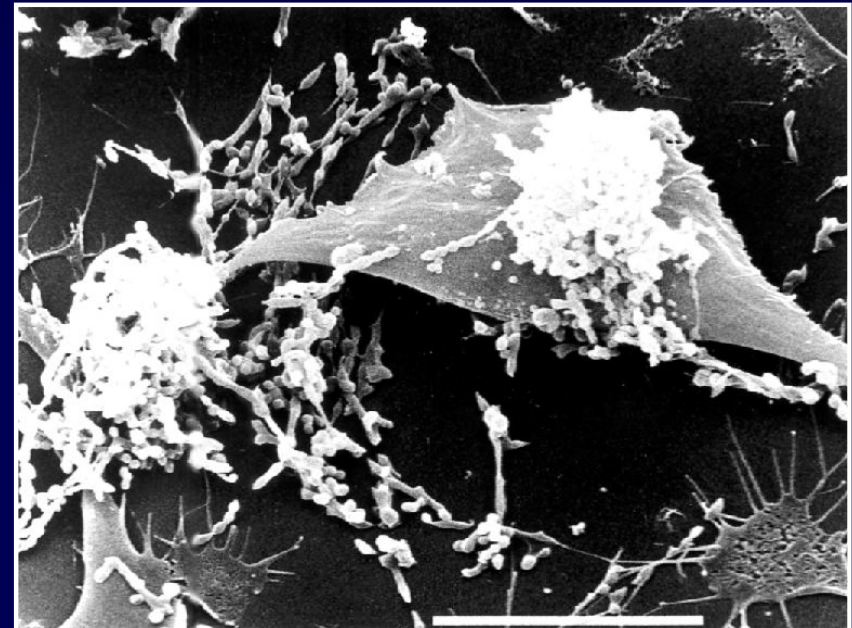
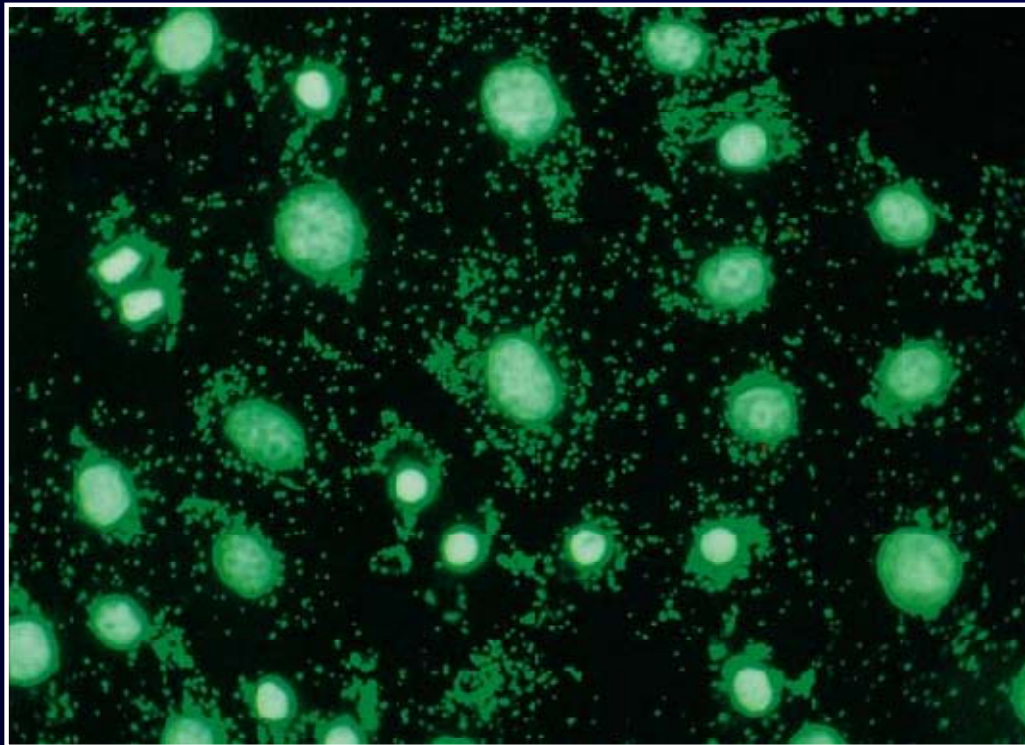
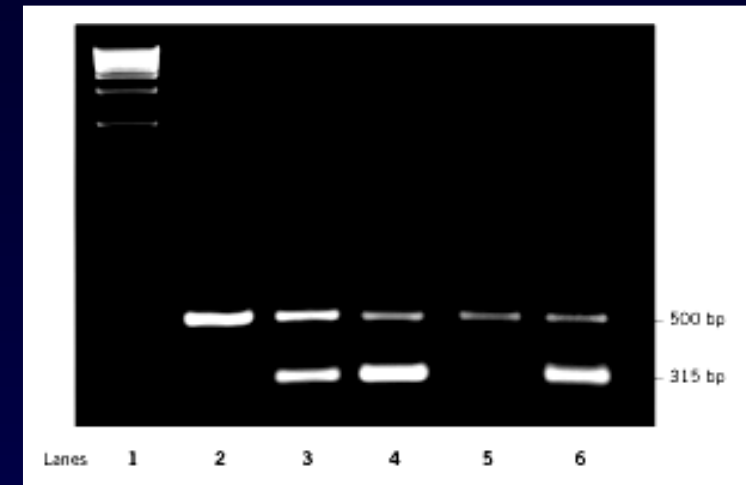


Kontaminace – mykoplazmata

Detekce mykoplazmat:

a) fluorescencenční mikroskopie
(značení DNA)

b) PCR

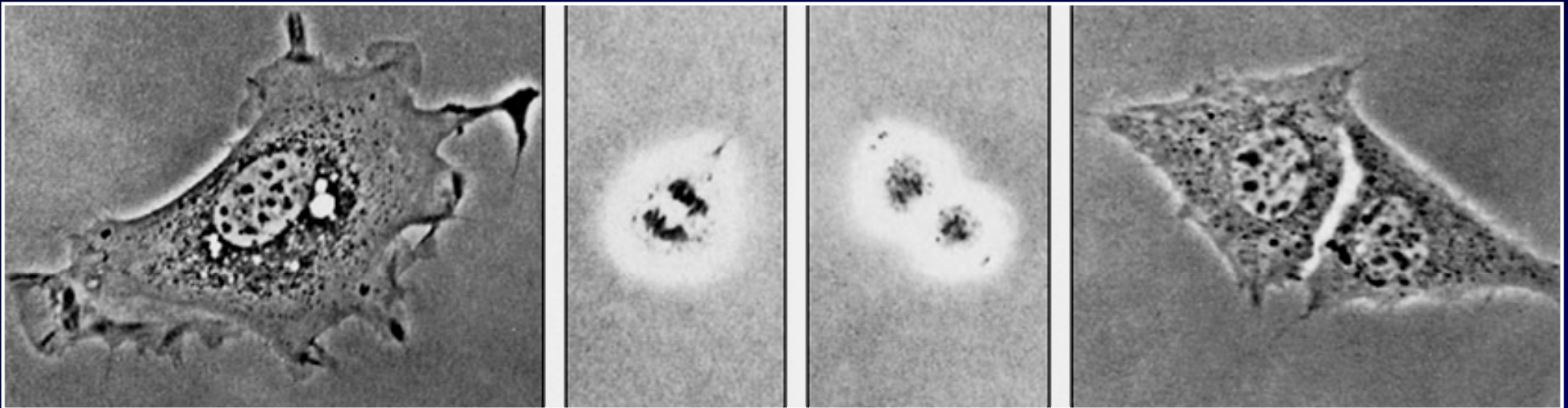


KULTIVAČNÍ POSTUPY



invertovaný mikroskop

DĚLENÍ BUNĚK V PODMÍNKÁCH *IN VITRO*:





Typy buněčných kultur:

- adherované:
rostou přichycené na pevném podkladu
- suspensní:
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/misky 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/misky s čerstvým médiem



TYPY KULTIVACÍ (TERMINOLOGIE)

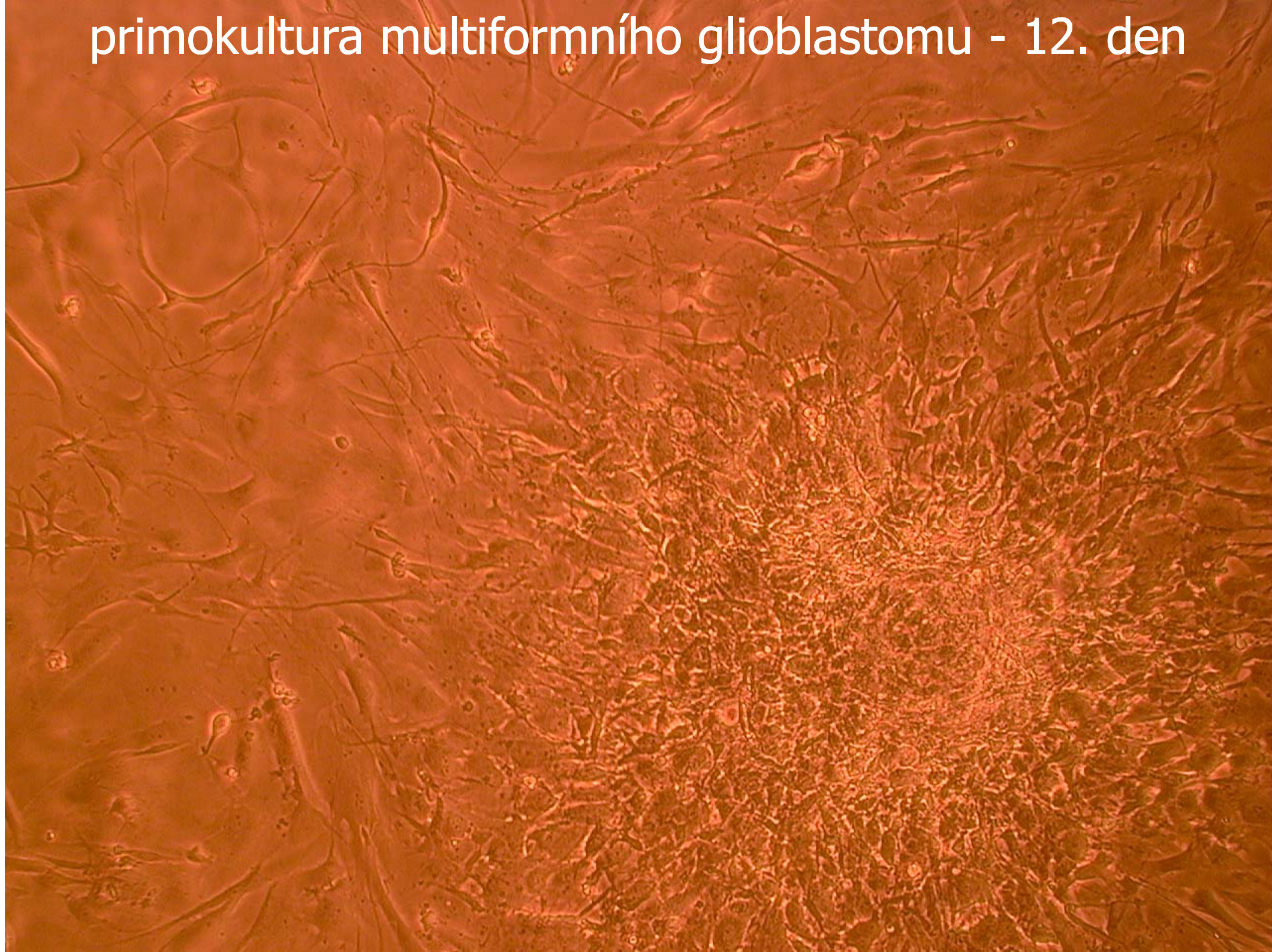
TKÁŇOVÉ KULTURY / CELL CULTURES

- 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 nádobky do nádobky nové)

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

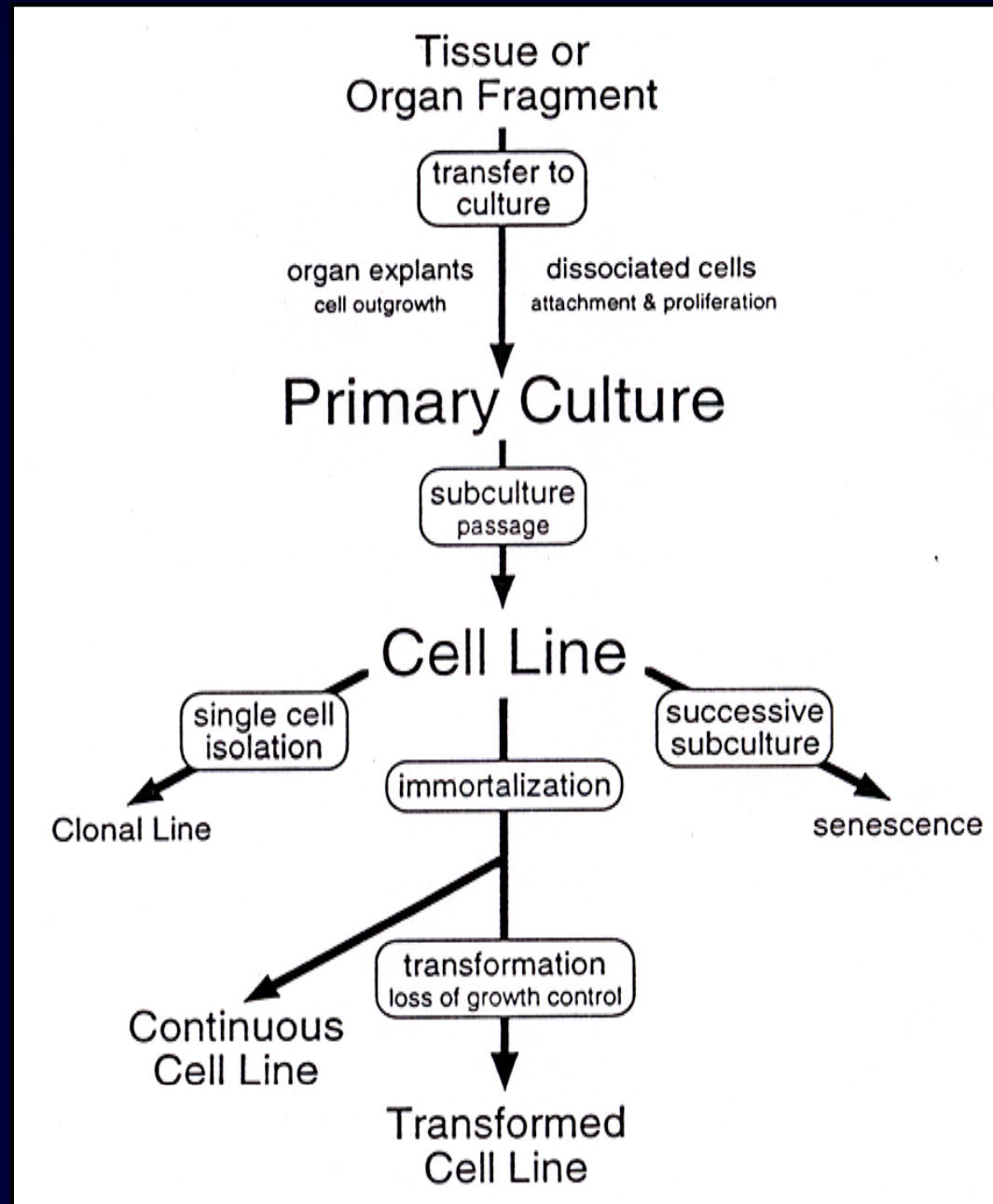
označení (název), druh organismu, pohlaví, věk, výchozí orgán, typ kultury, počet pasáží, růstové parametry, morfologie, karyotyp, markery

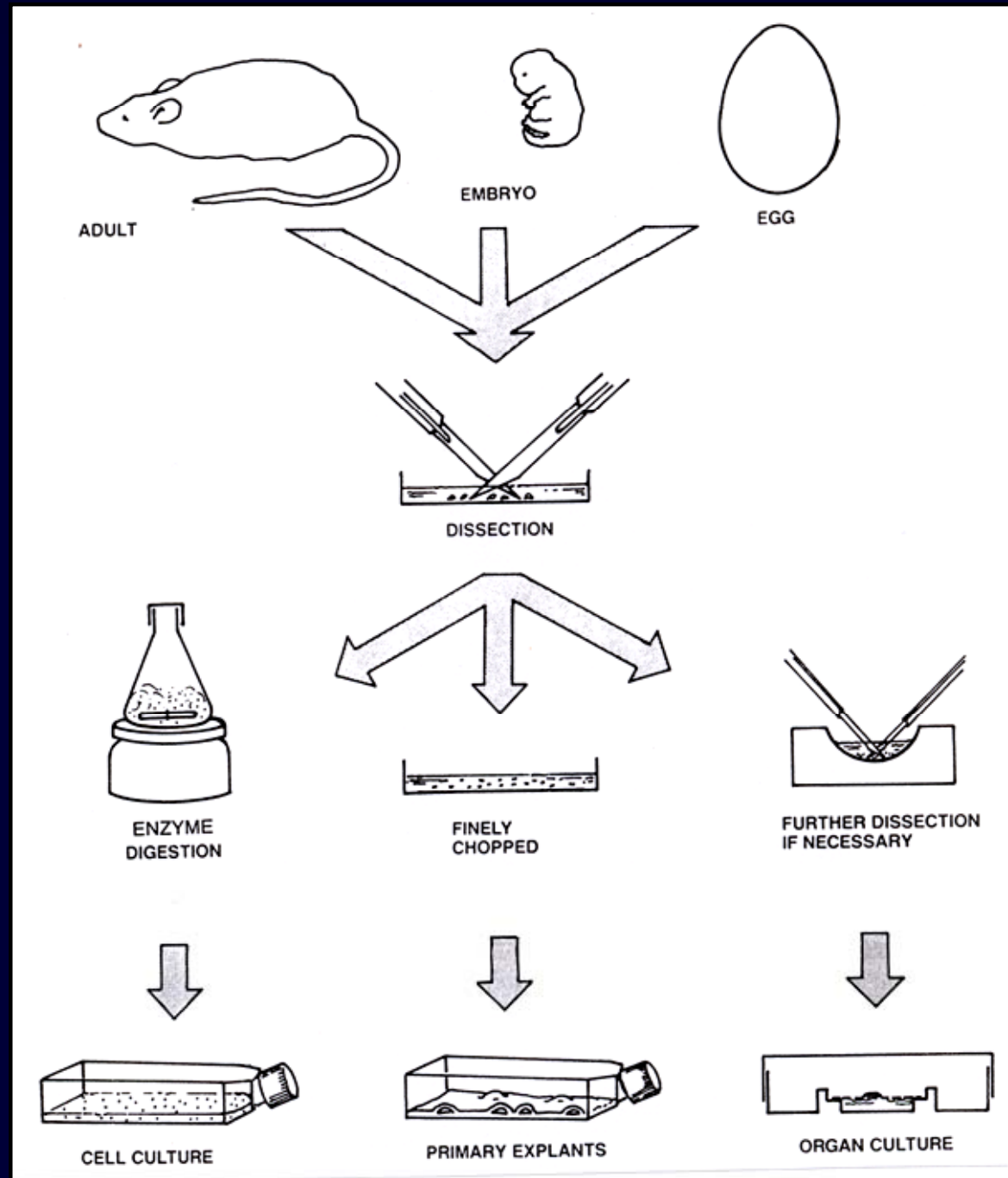
Buněčný kmen

- 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



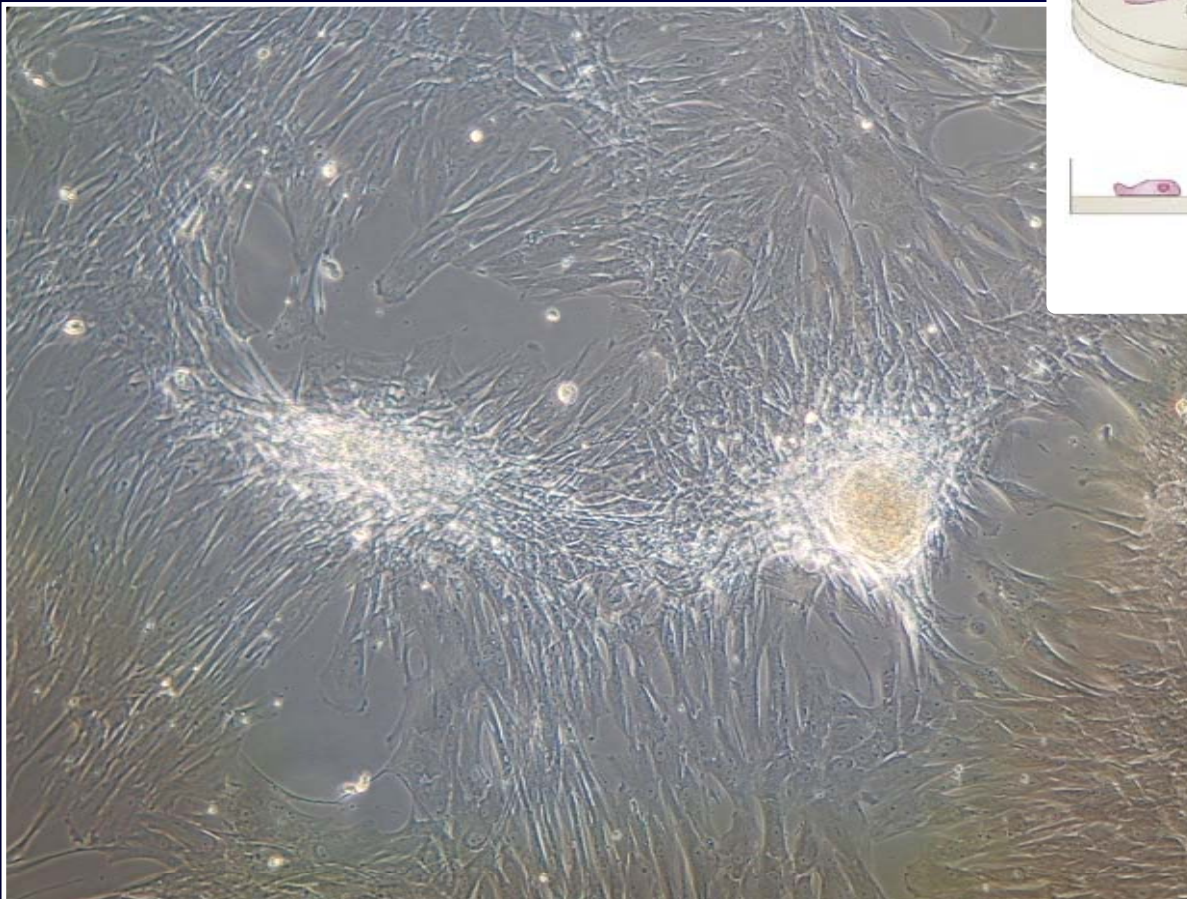
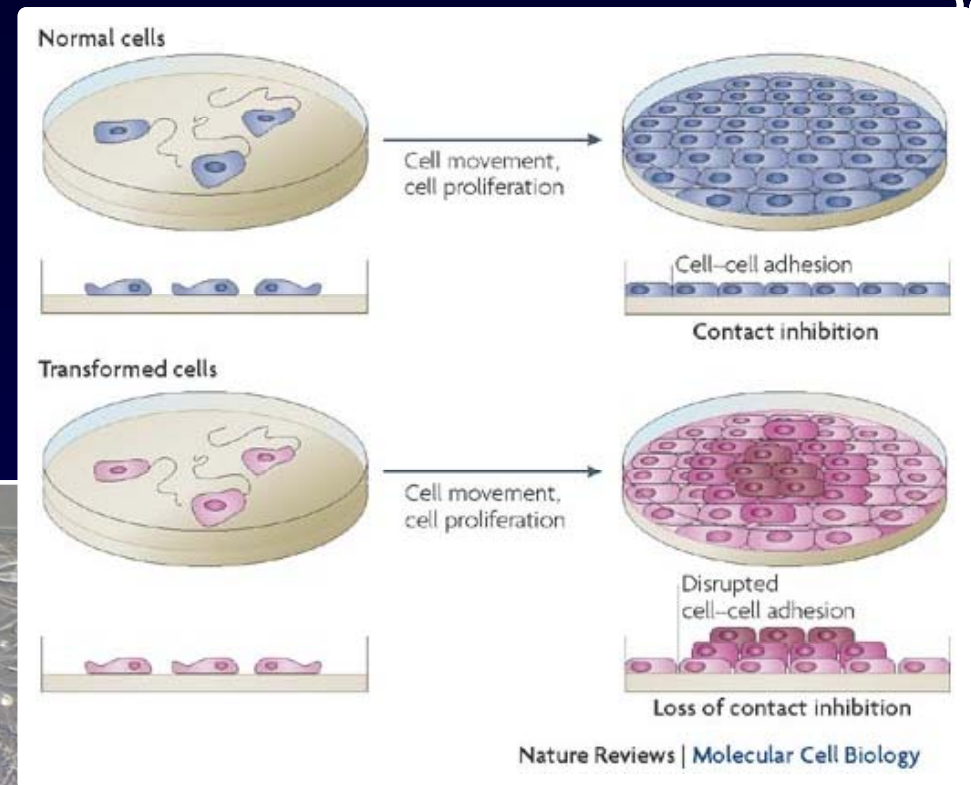


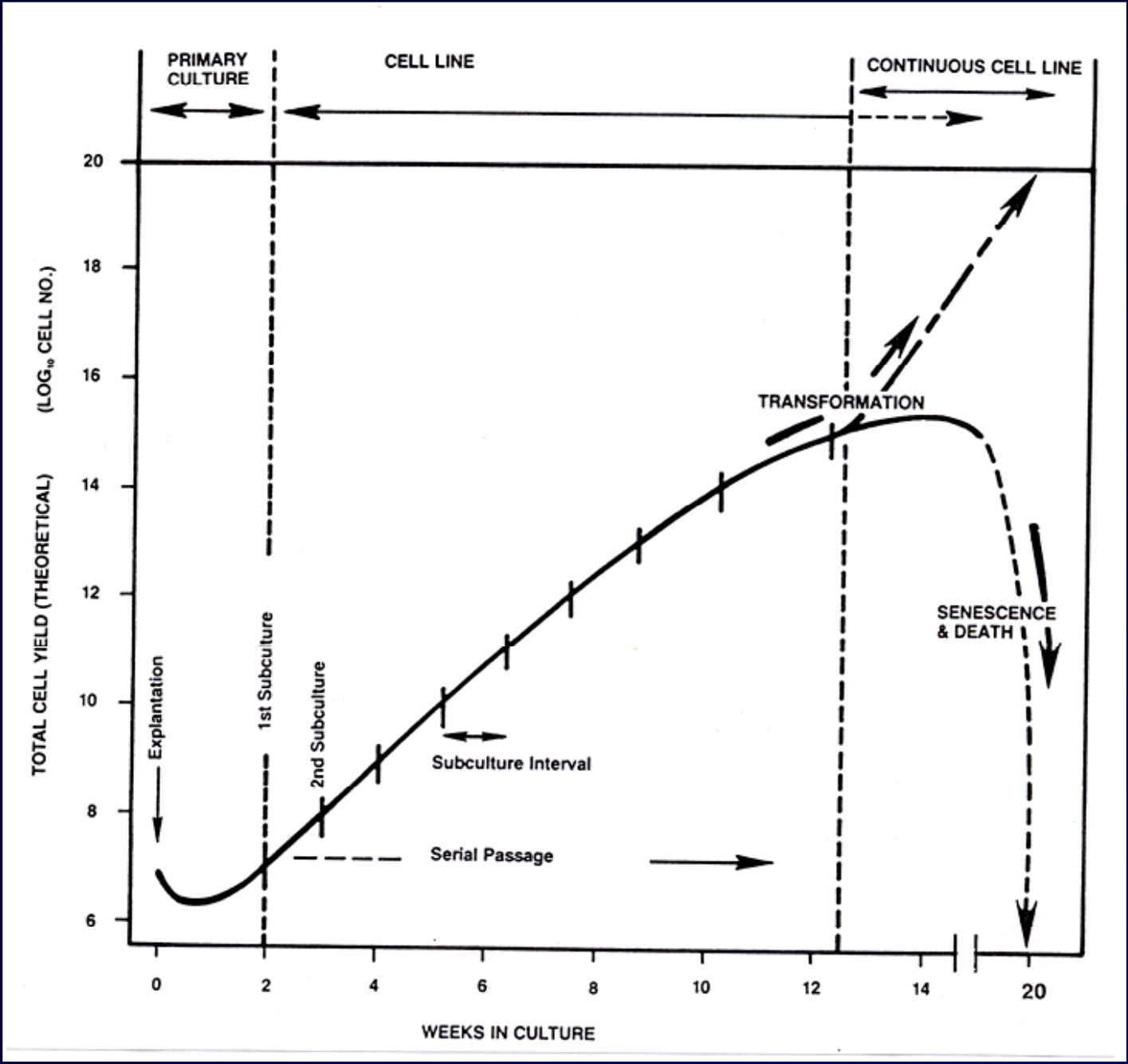
NORMÁLNÍ A TRANSFORMOVANÉ BUNĚČNÉ LINIE

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





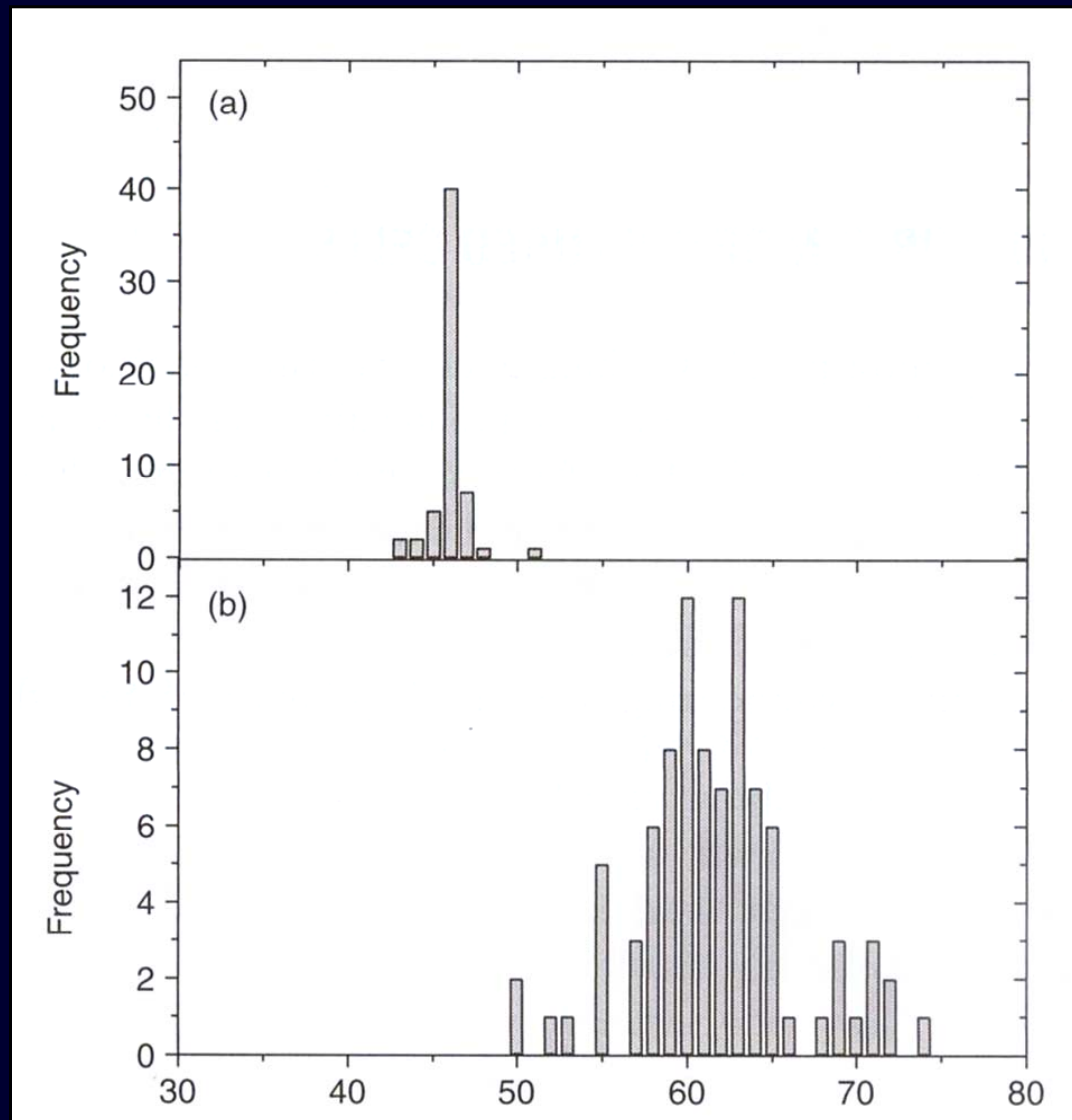
Diploidní buněčné linie:

- 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, Saos-2...
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

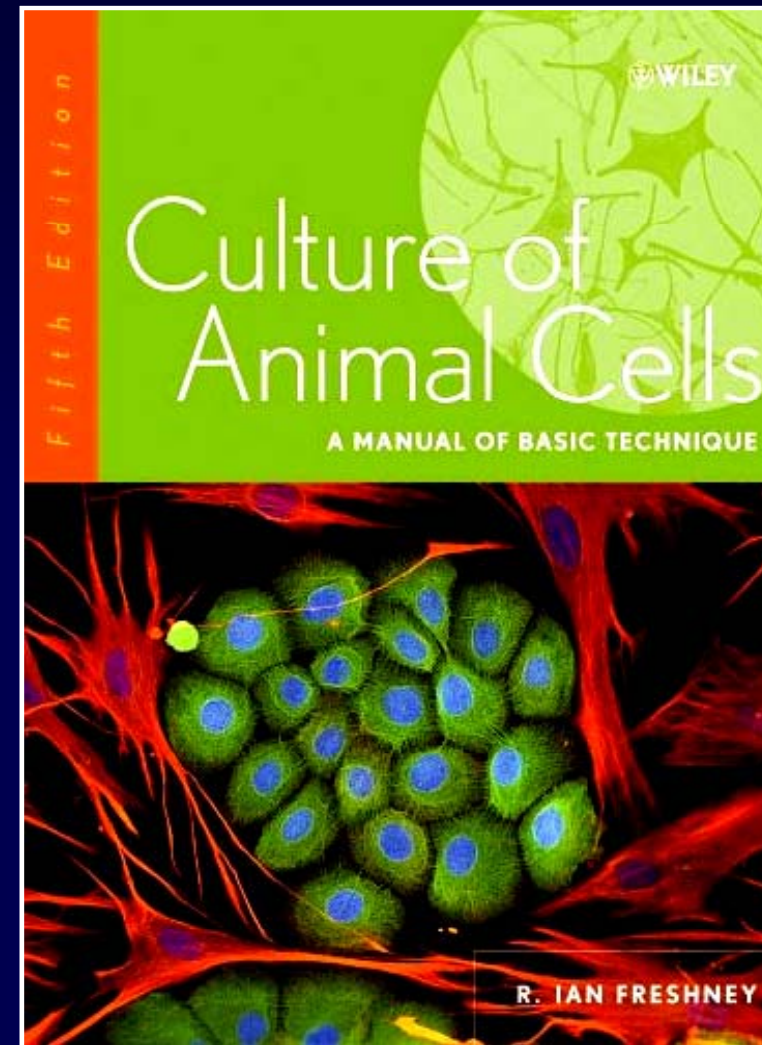
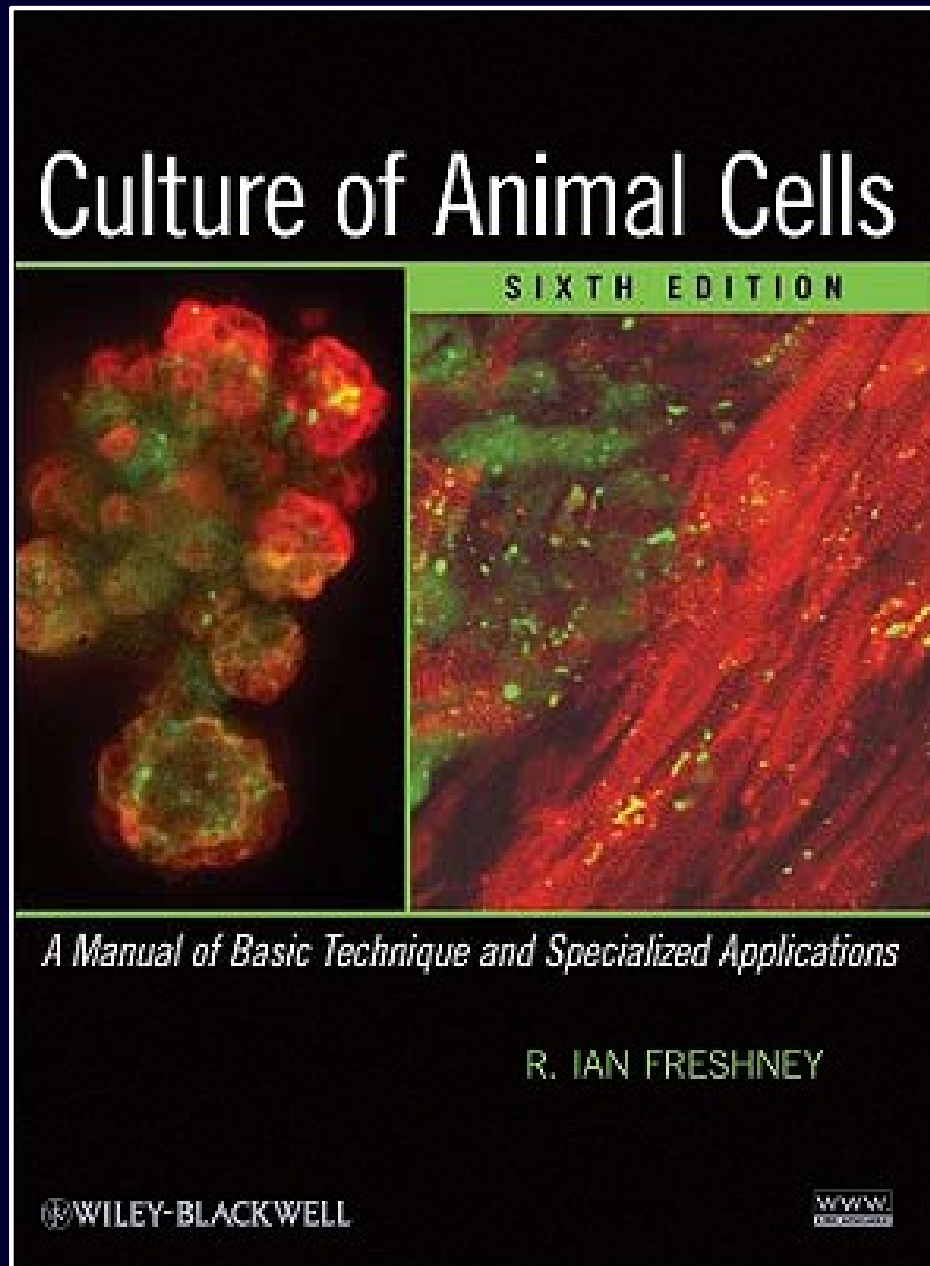


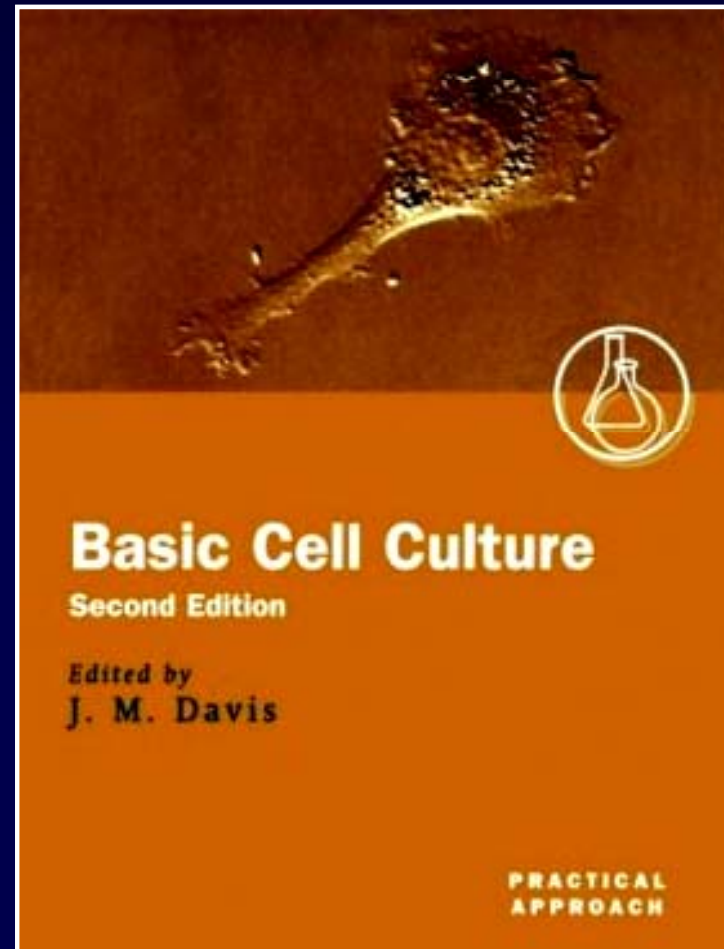
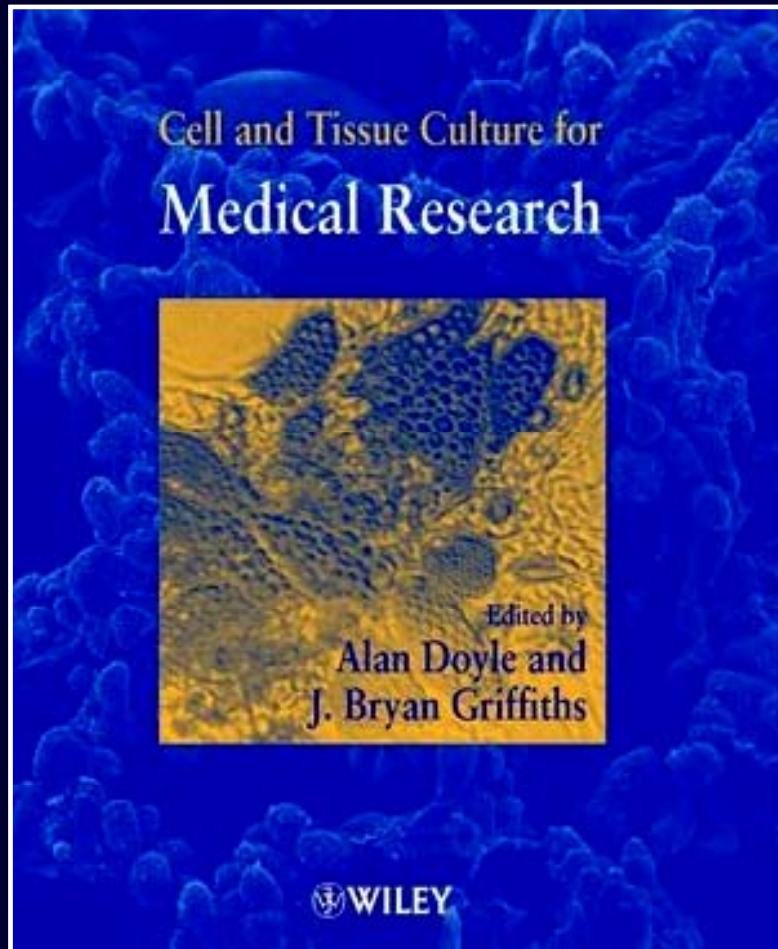
normální buňky
(gliové buňky)

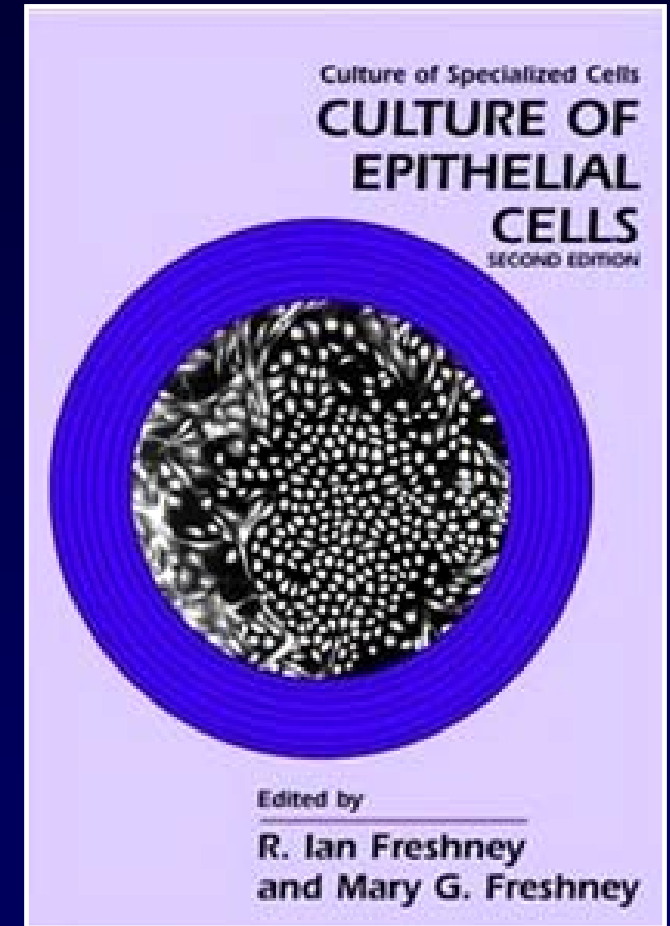
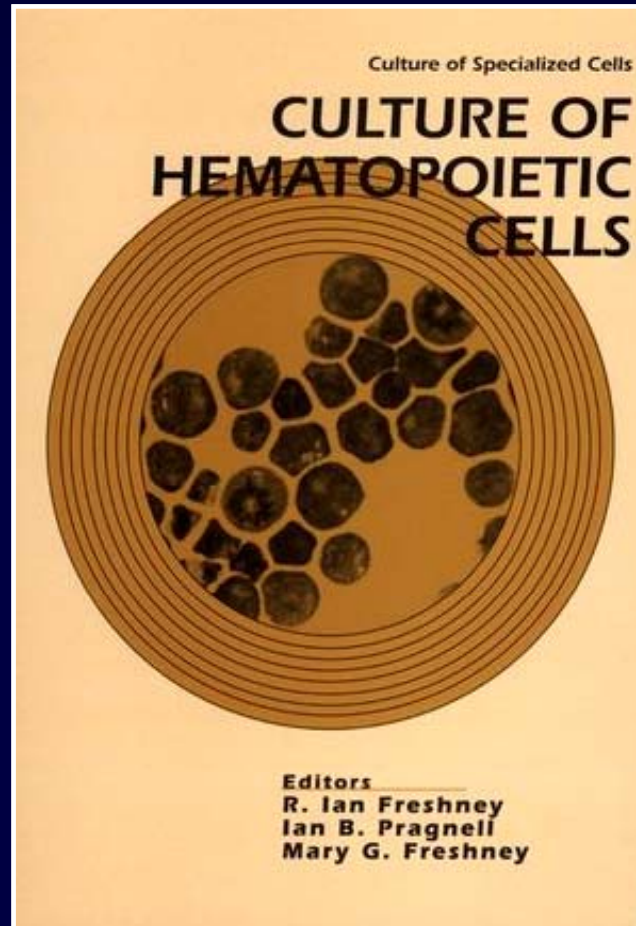
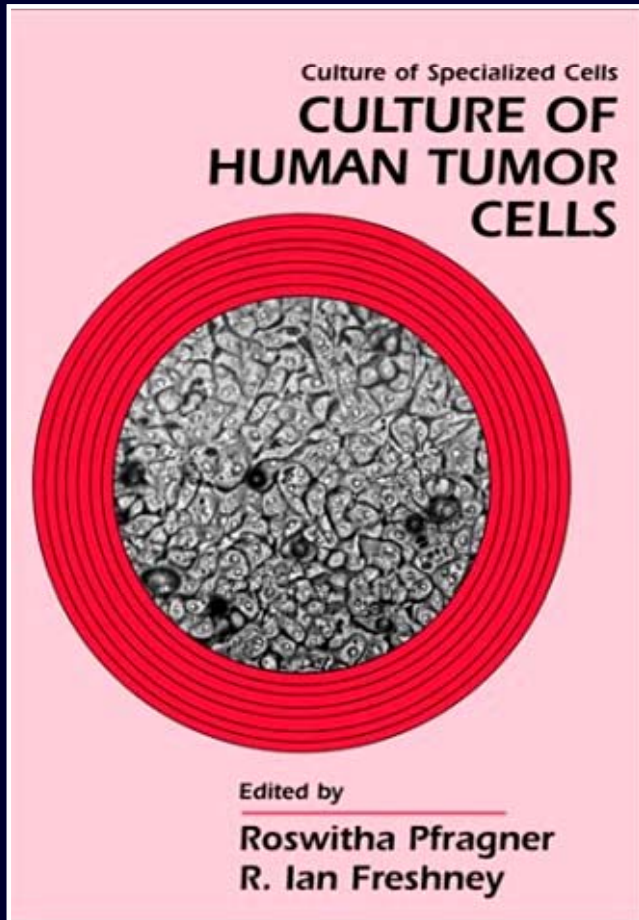
transformované buňky
(maligní melanom)

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)





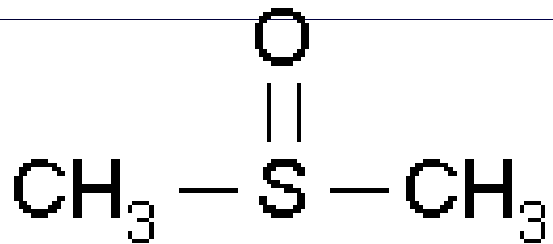


KRYOKONZERVACE, ARCHIVACE, SBÍRKOVÁ PRACOVISTĚ

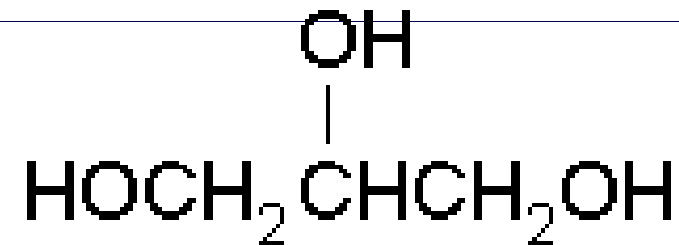
Kryokonzervace živočišných buněk

- 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 (hlubokomrazicí 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:

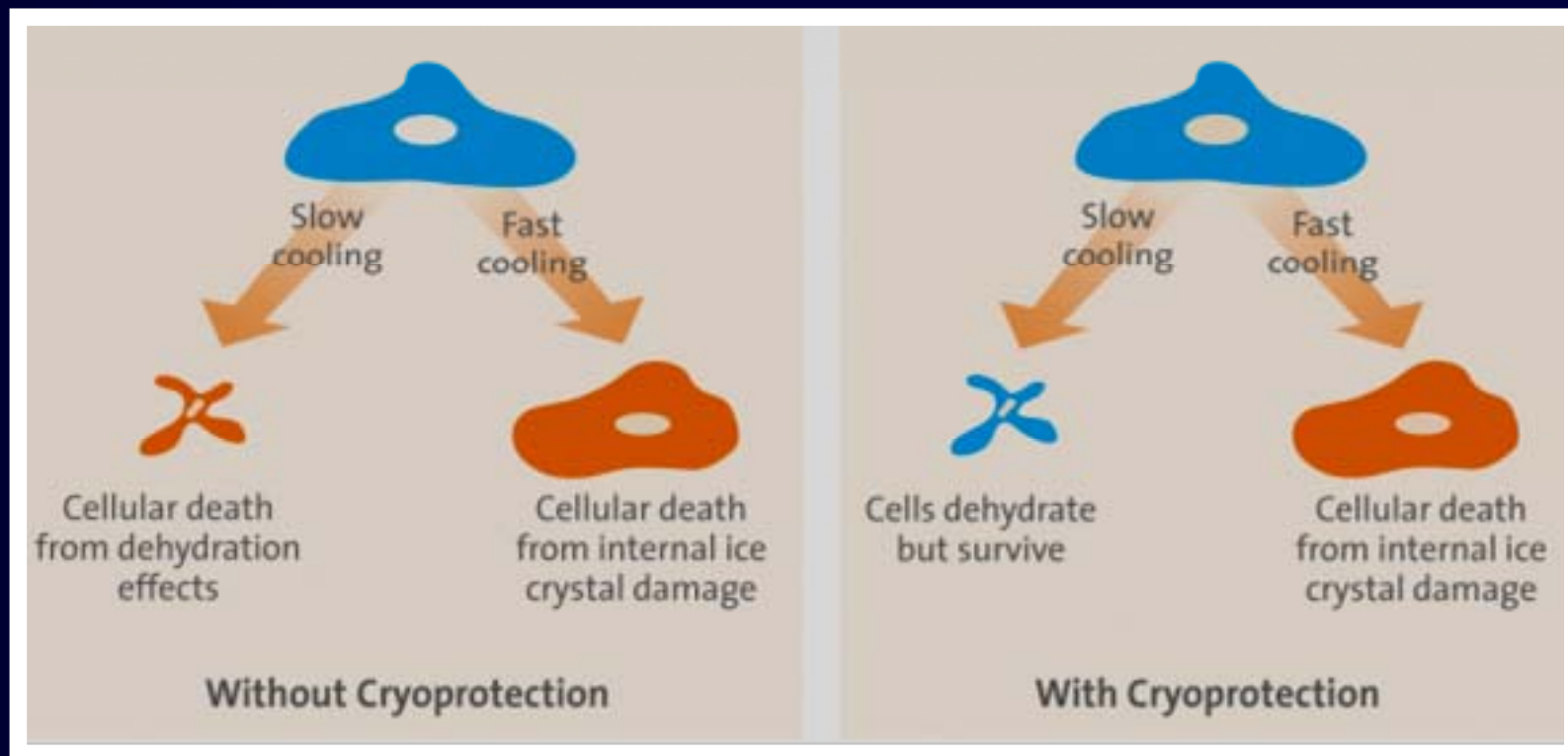


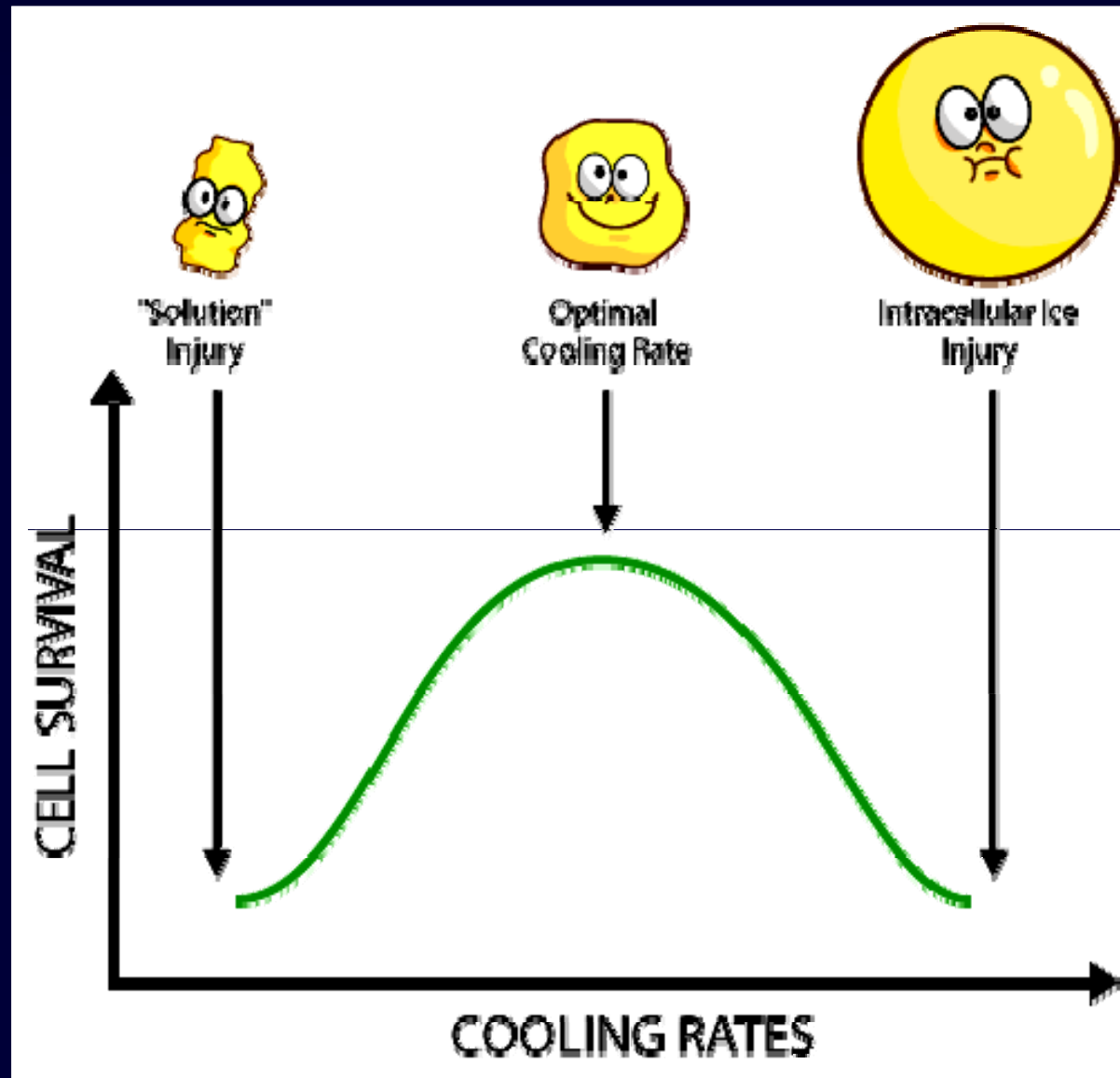
dimethylsulfoxid
(DMSO)



glycerol

Vliv rychlosti zamražování na přežití buněk:





American Type Culture Collection (ATCC)

Sign In | Create a Profile | Quick Order | Shopping Cart (0 items) | Czech Republic

ATCC® | IN PARTNERSHIP WITH LGC STANDARDS

Search by Keyword or Catalog No.

PRODUCTS SERVICES STANDARDS DOCUMENTS AND LITERATURE CUSTOMER SUPPORT ABOUT

Tumor Cell Panels

[Learn more >](#)

1 2 3 4 5

LGC Standards
Excellence through measurement

NEW PRODUCTS [See All](#)

Breast Cancer Biomarkers Cell Line Panel
The analysis of biomarkers in cell lines... [Learn More >](#)

The "Big Six"
ATCC now offers non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli*
Get your investigations moving faster with... [Learn More >](#)

ATCC-DYP0530 Human Induced Pluripotent Stem Cells
New from ATCC, adult dermal fibroblasts,... [Learn More >](#)

p53 "hot-spot" Mutation Lymphoma Panel
ATCC has sequenced the TP53 gene in our... [Learn More >](#)

QUICK LINKS

[New Features](#)

[How to Order](#)

CELL BIOLOGY COLLECTION
High performance cells and culture systems to support your research.
[Learn more...](#)

MICROBIOLOGY COLLECTIONS
High quality microbial research & validation start with ATCC.
[Learn more...](#)

LEARNING CENTER
Technical literature and presentations.
[Learn more...](#)

European Collection of Cell Cultures (ECACC)

Accessibility | Contact Us | Site Map | Help

Sign In | Register

Your Cart 0 Items

Public Health England

Search

Home Products Services Technical Support Ordering Contact Us Quality News About Us Careers PHE Website

Culture Collections

You are here: Home > European Collection of Cell Cultures (ECACC) > European Collection of Cell Cultures (ECACC)

Menu

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

European Collection of Cell Cultures (ECACC)

Welcome to the European Collection of Cell Cultures (ECACC), a Public Health England Culture Collection.

Supplier of authenticated and quality controlled cell lines and nucleic acids.

About ECACC

International Cell Line Authentication Committee (ICLAC)

ECACC News

Free Cell Culture Laboratory Handbook

Free Cell Culture DVD

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
- Cytosfect Transfection Kits
- Neuron Culture Kits
- CRISPR Cell Lines

Services

- Assay Ready Cells
- Catalogue Deposits
- Cell Culture Management Services
- Contract Cell Culture
- Cell Line Identity Verification

Related Links

- Culture Collections News
- ECACC Home
- About ECACC
- Search Cell Lines
- Browse Cell Lines
- New Cell Lines
- ECACC Services

