

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie – 16.2.2015

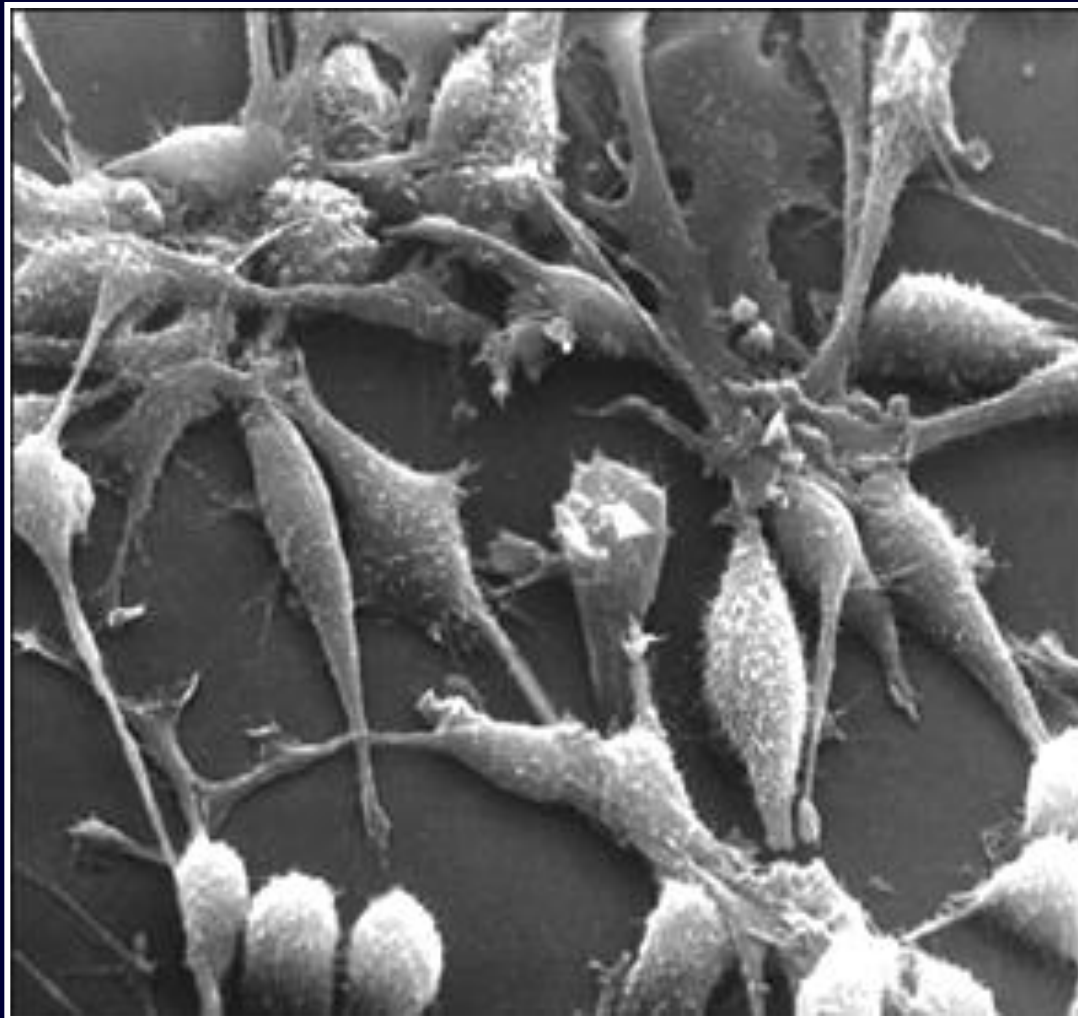
# Studium buněk v podmínkách *in vitro*

prof. 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 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.)

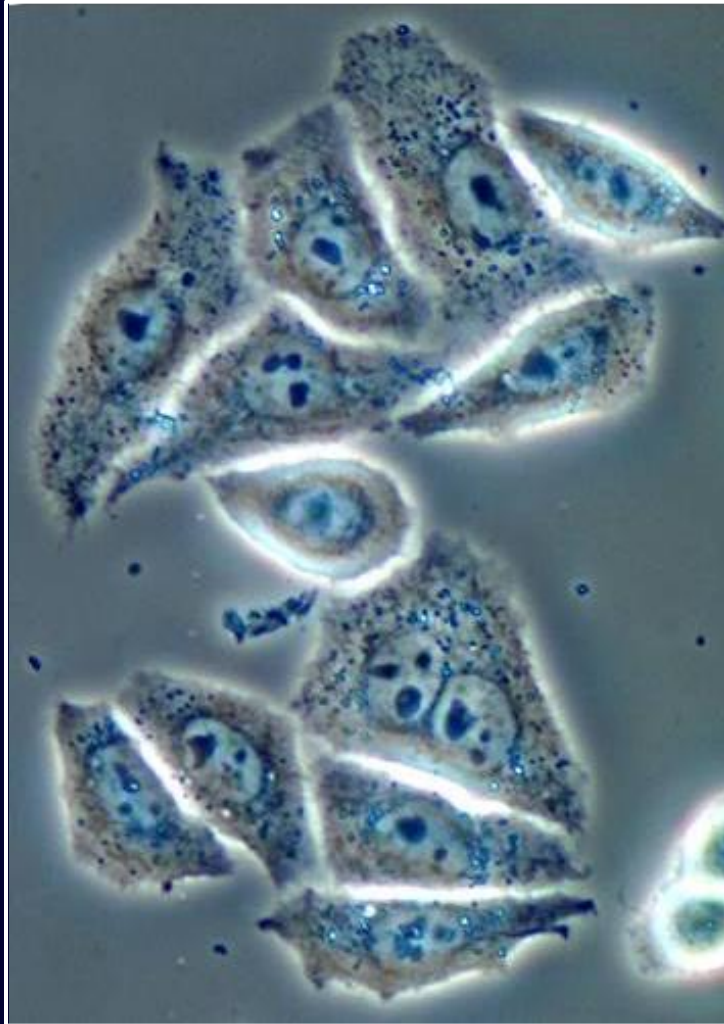


## 1952 - stabilizace první lidské linie HeLa (Gey et al.)

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

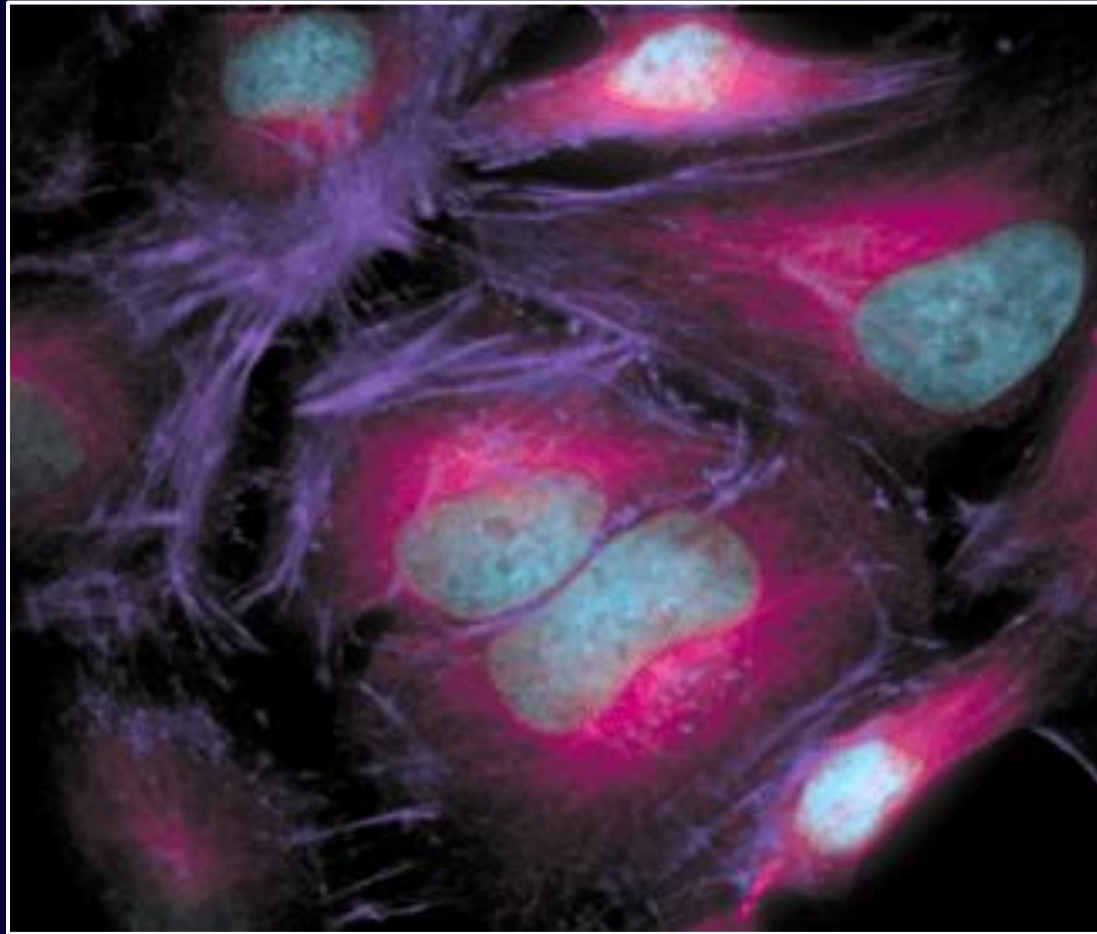


# Linie HeLa:

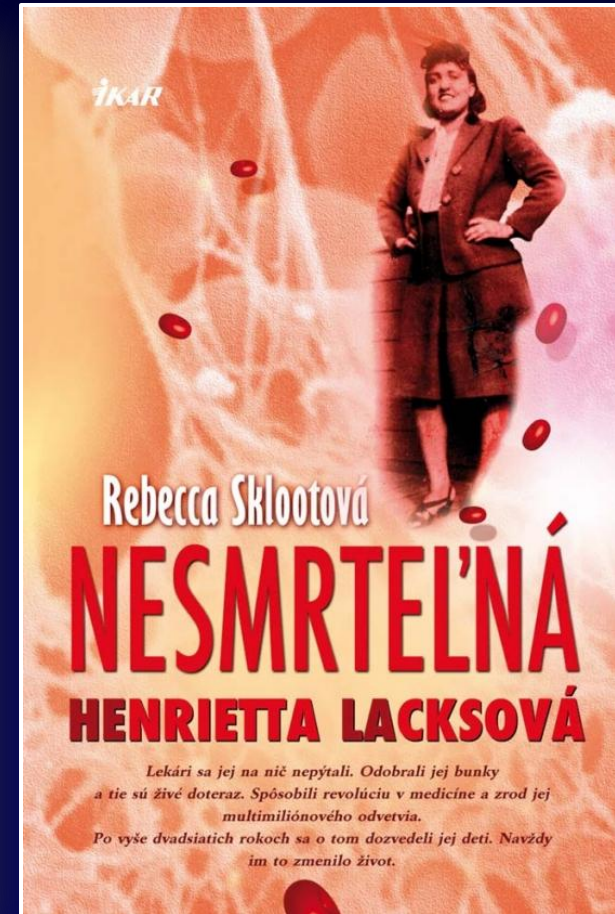
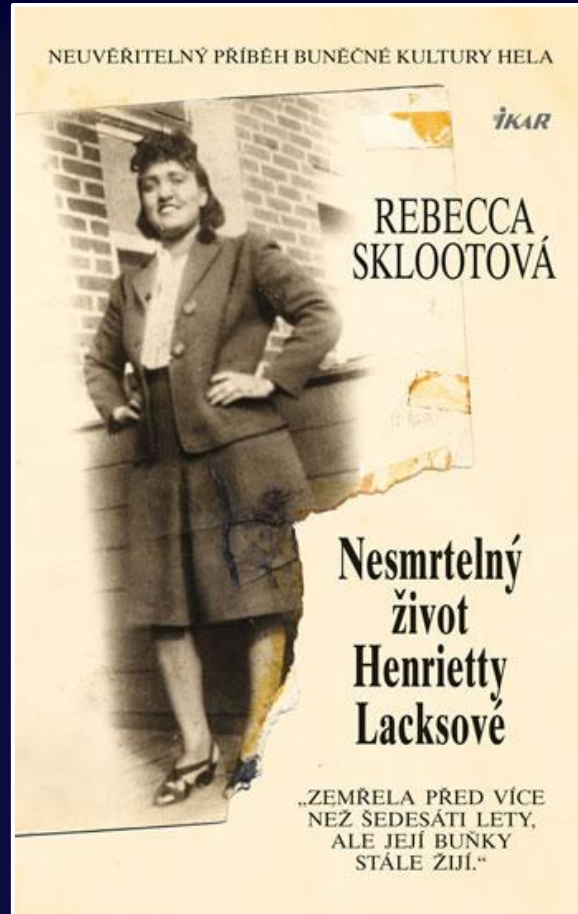
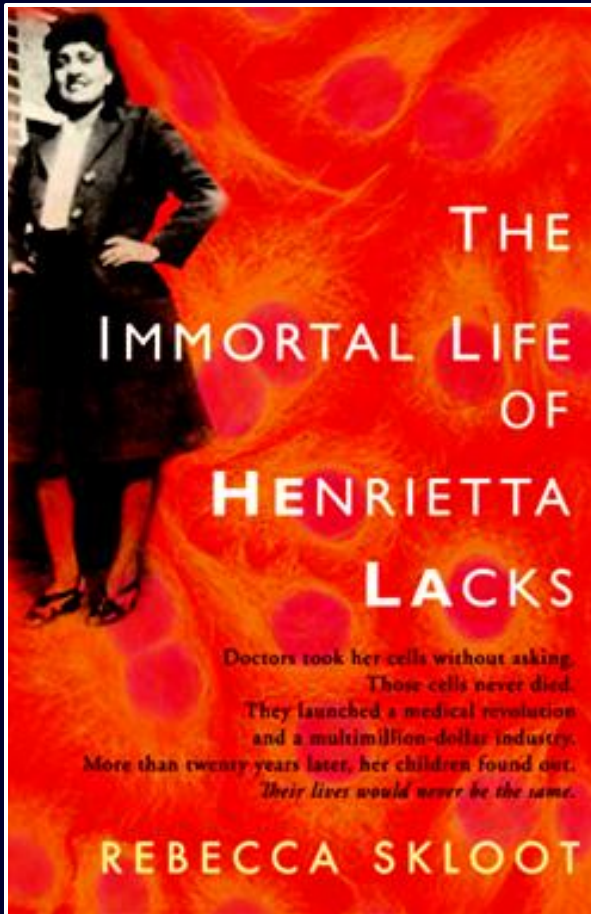




# Linie HeLa:



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



# KULTIVAČNÍ PODMÍNKY

## Kultivační podmínky pro savčí a lidské buňky

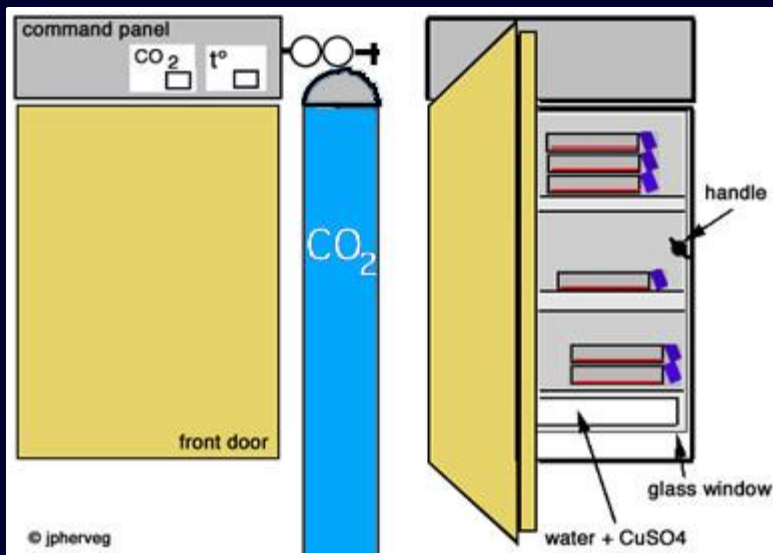
- co nejpodobnější podmínkám v původním organismu:
  - ✓ **teplota** 37°C,
  - ✓ maximální **vlhkost** vzduchu, 5% CO<sub>2</sub>
  - ✓ neutrální **pH** (6,8 až 7,2)
  - ✓ **živiny**
- sterilní prostředí



# 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 billion)

## 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 (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

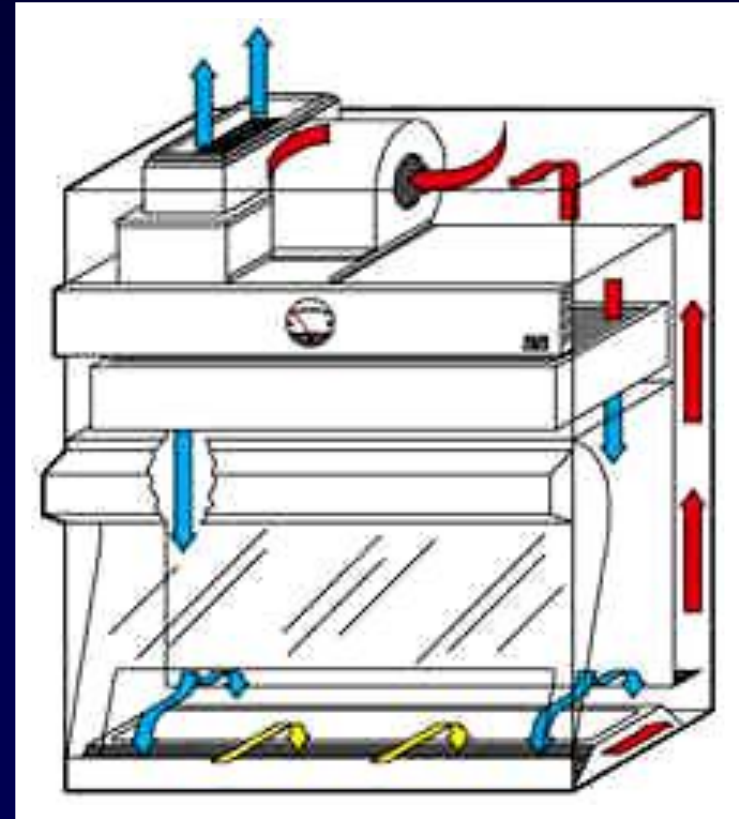


horizontální

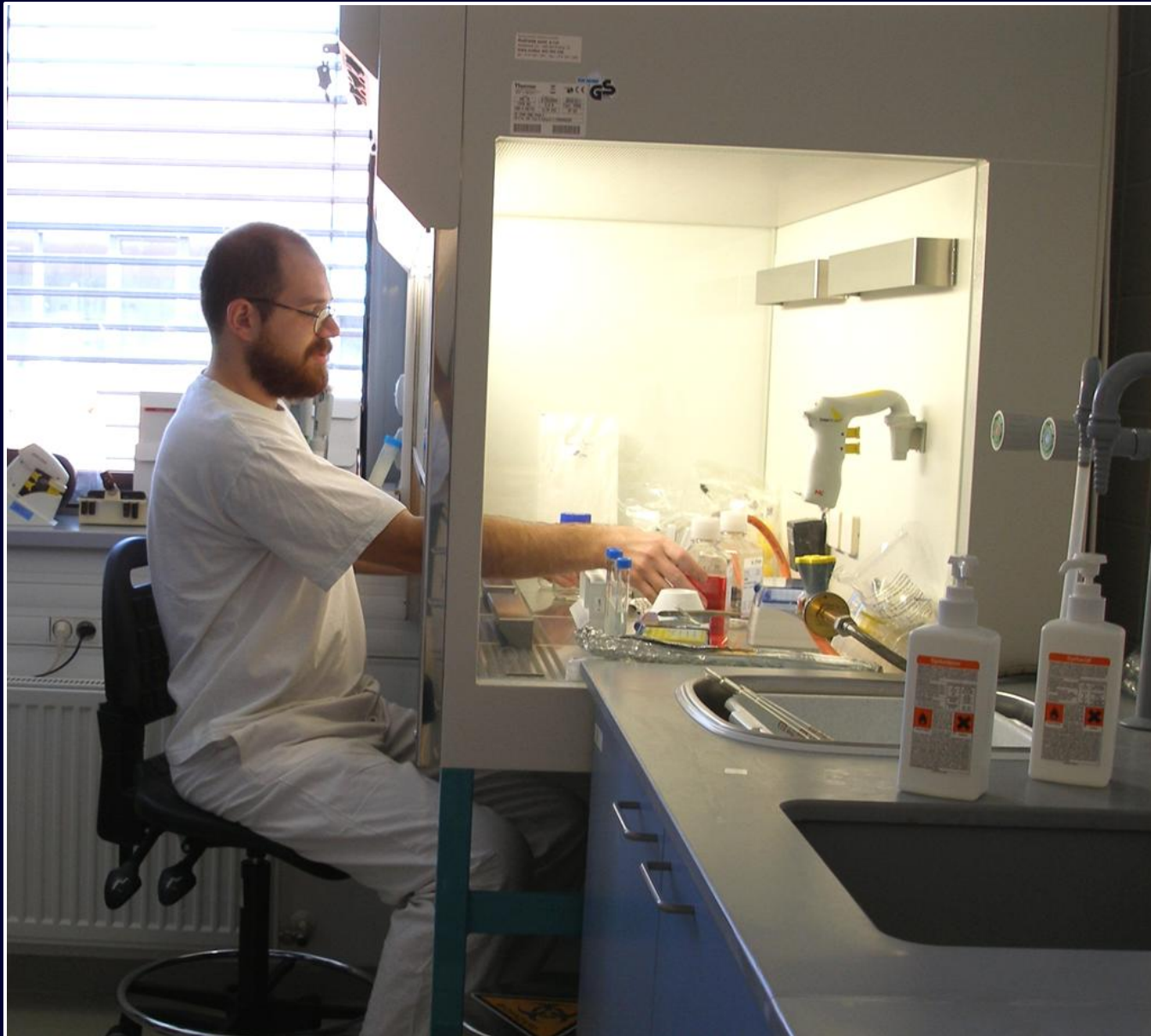


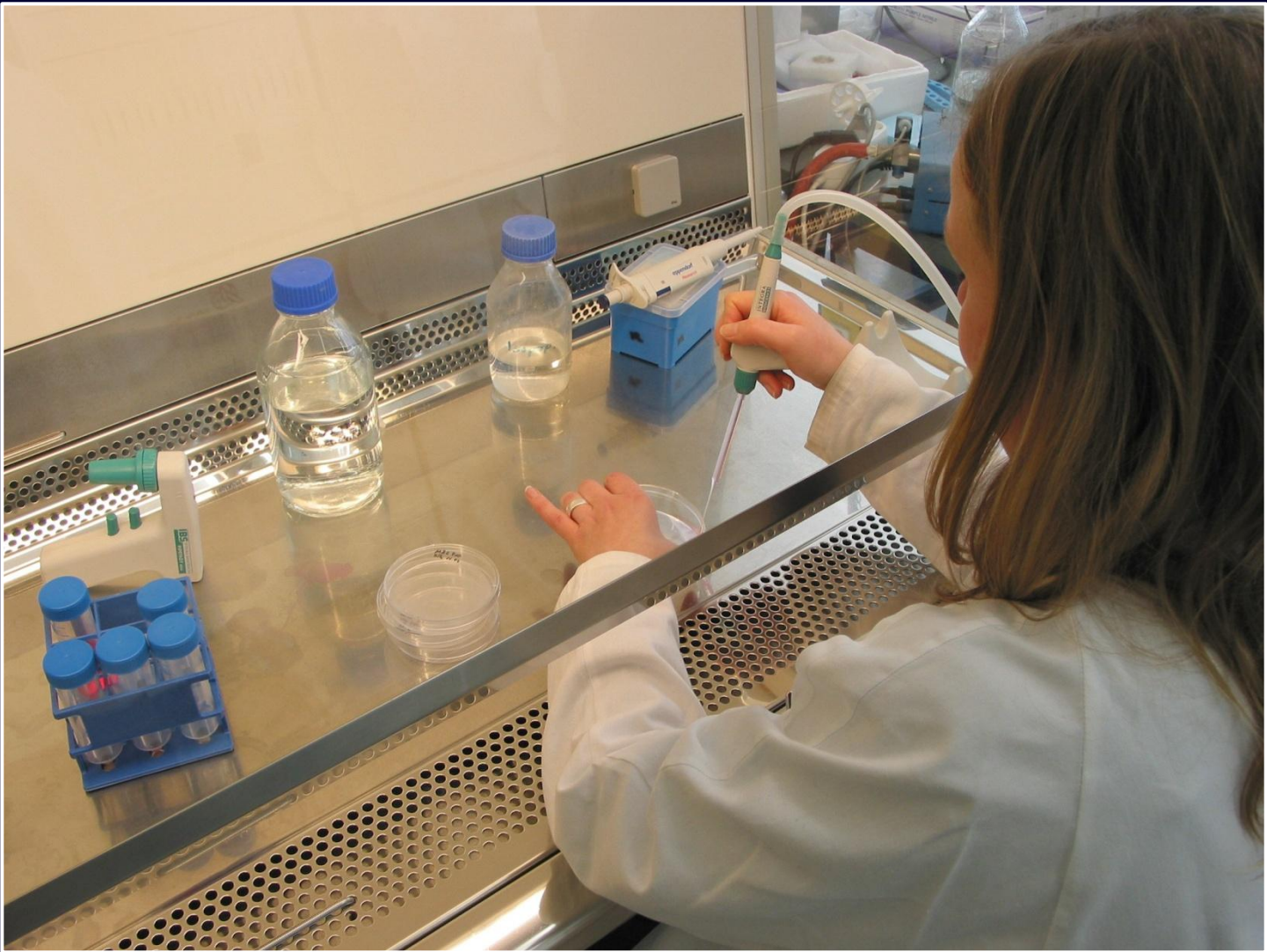
vertikální

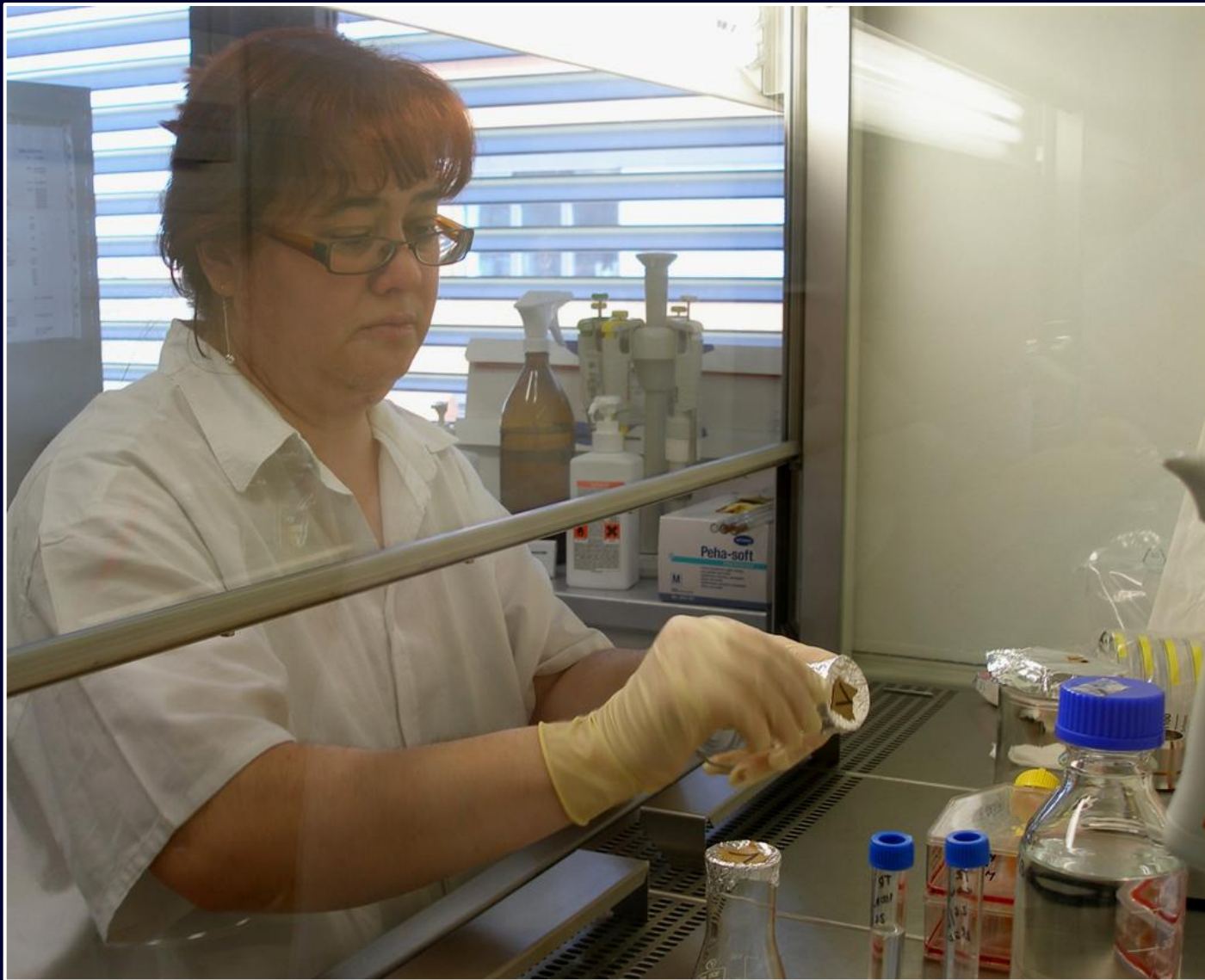
## Laminární box - biohazard třída II



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









# 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)



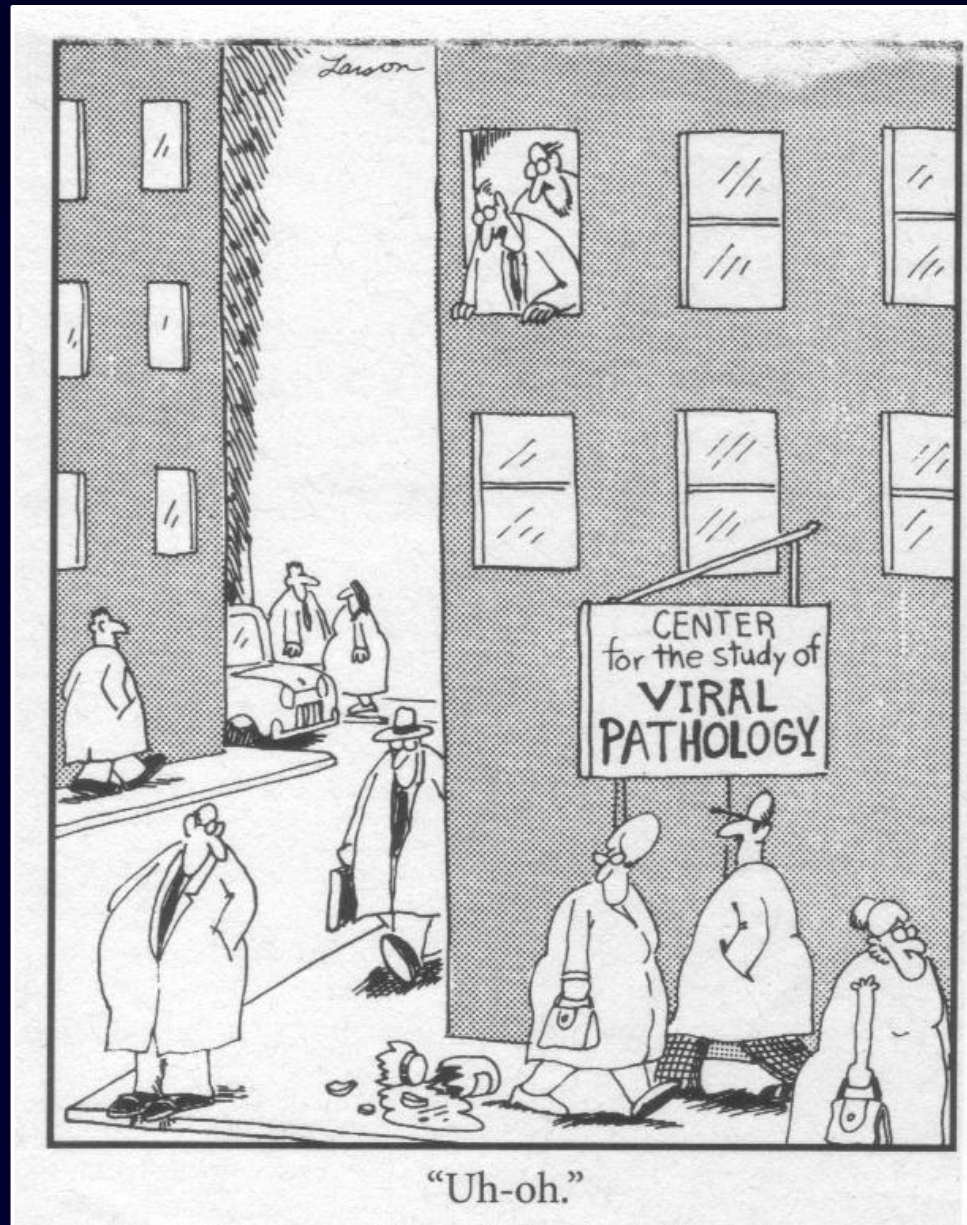
# BIOSAFETY LEVEL 3 (BSL-3)

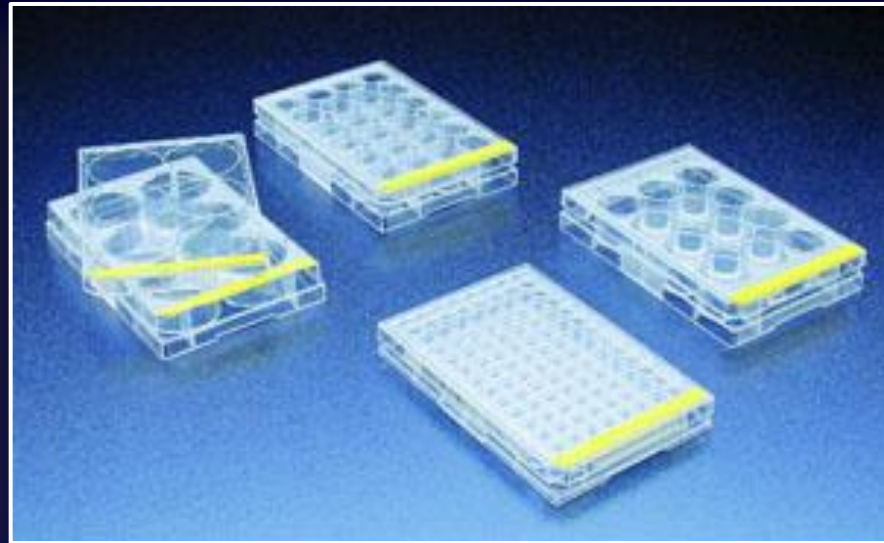


# BIOSAFETY LEVEL 4 (BSL-4)



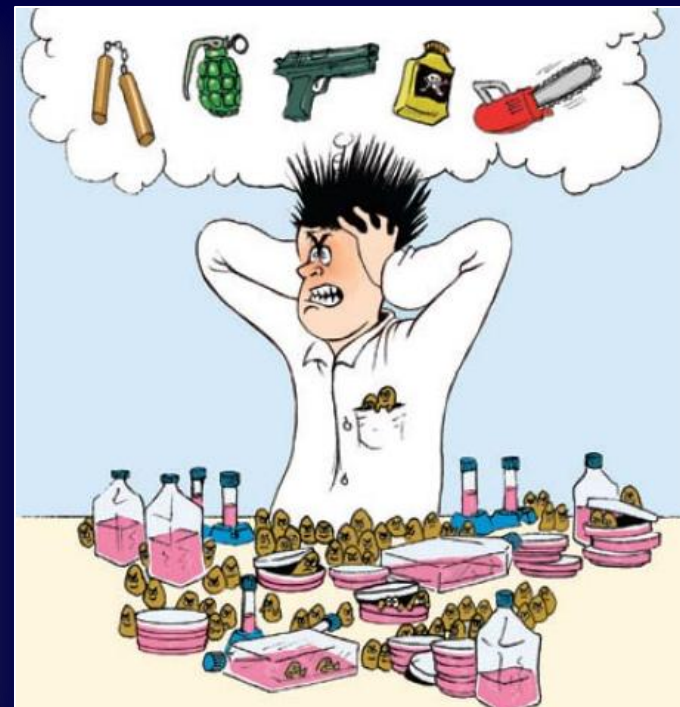
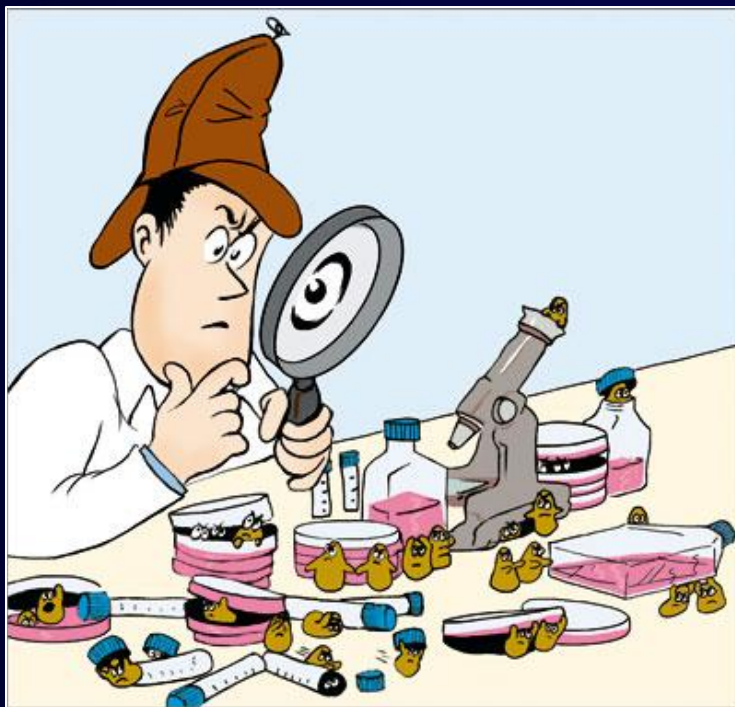






## Typy kontaminací

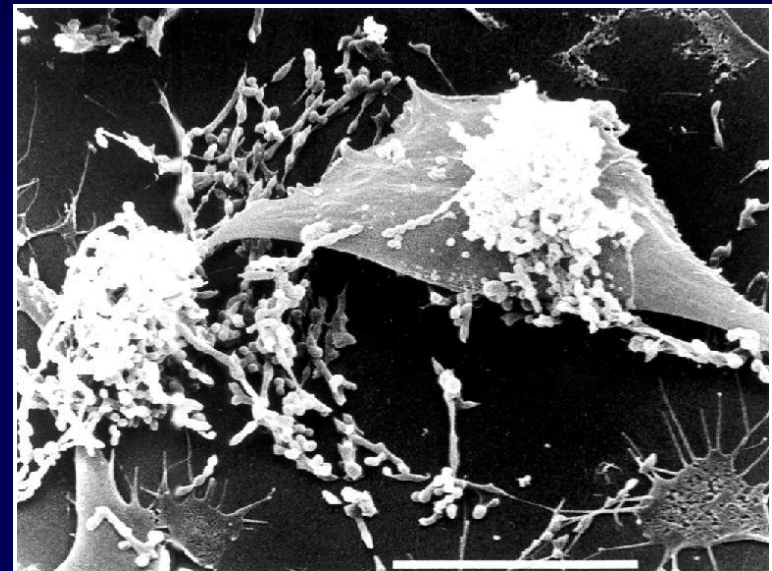
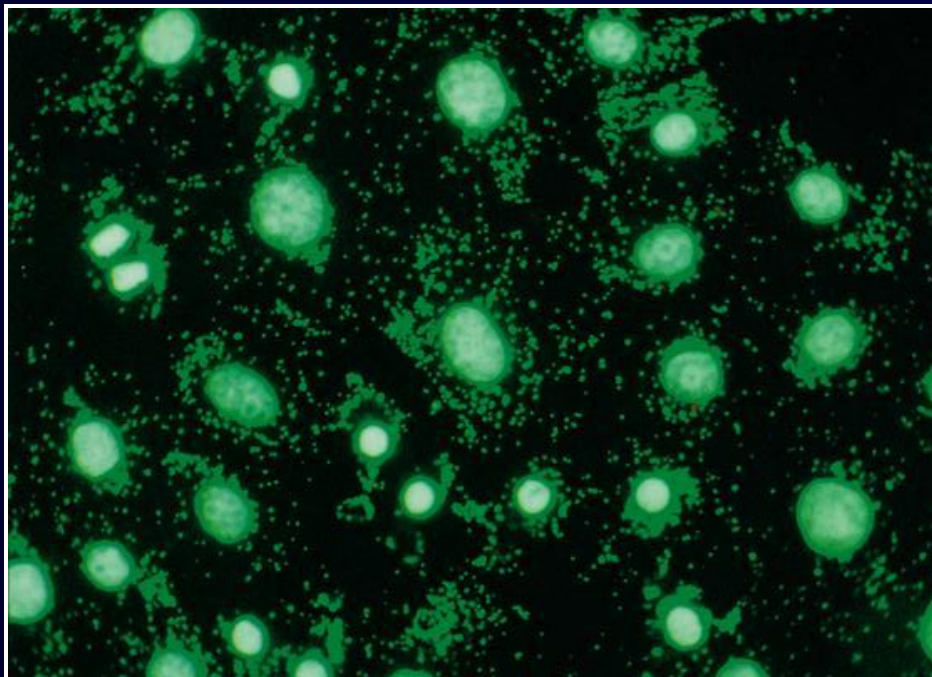
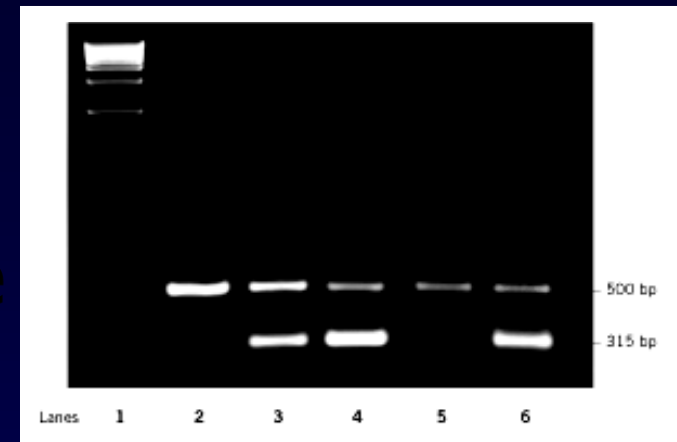
- mykoplazmata
- viry
- bakterie, plísně, kvasinky
- kontaminace jinou buněčnou linií (cross-contamination)



## Kontaminace – mykoplazmata

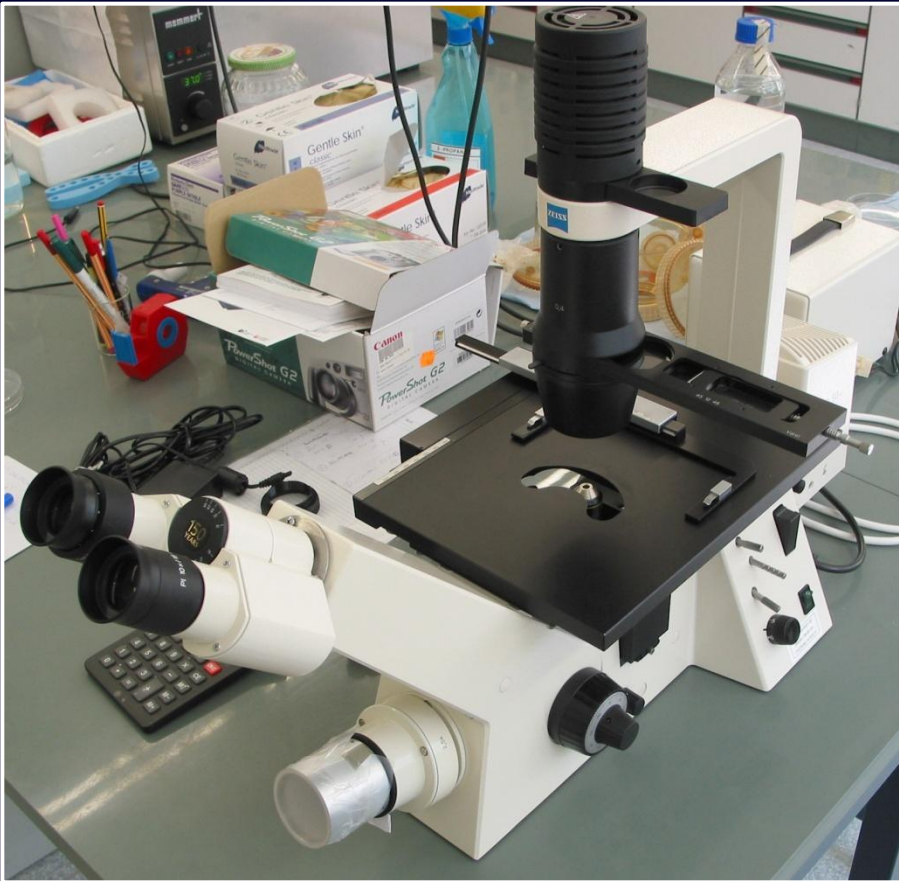
### Detekce mykoplazmat:

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



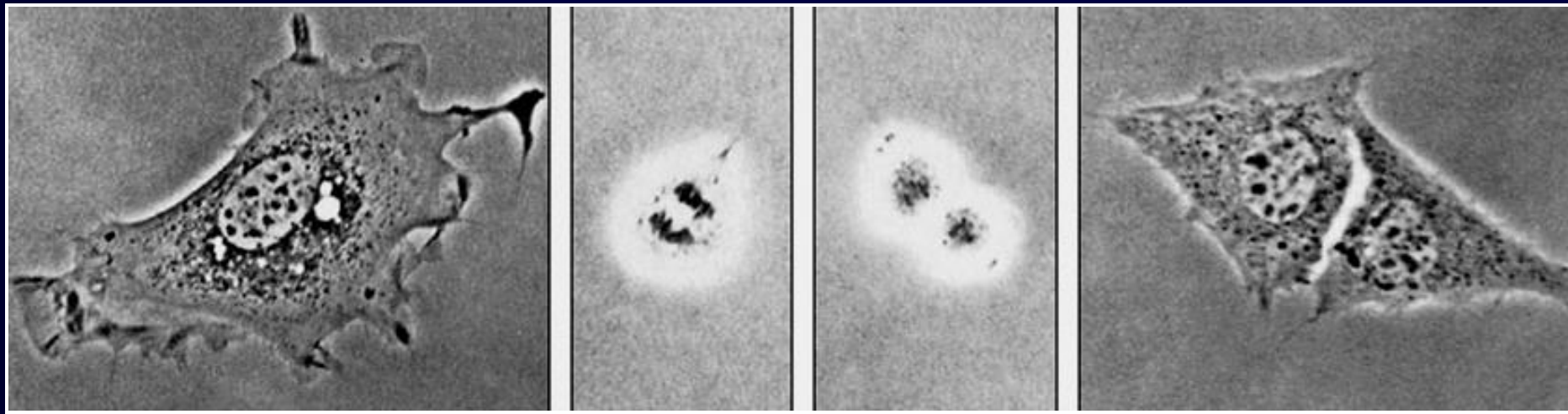
# KULTIVAČNÍ POSTUPY

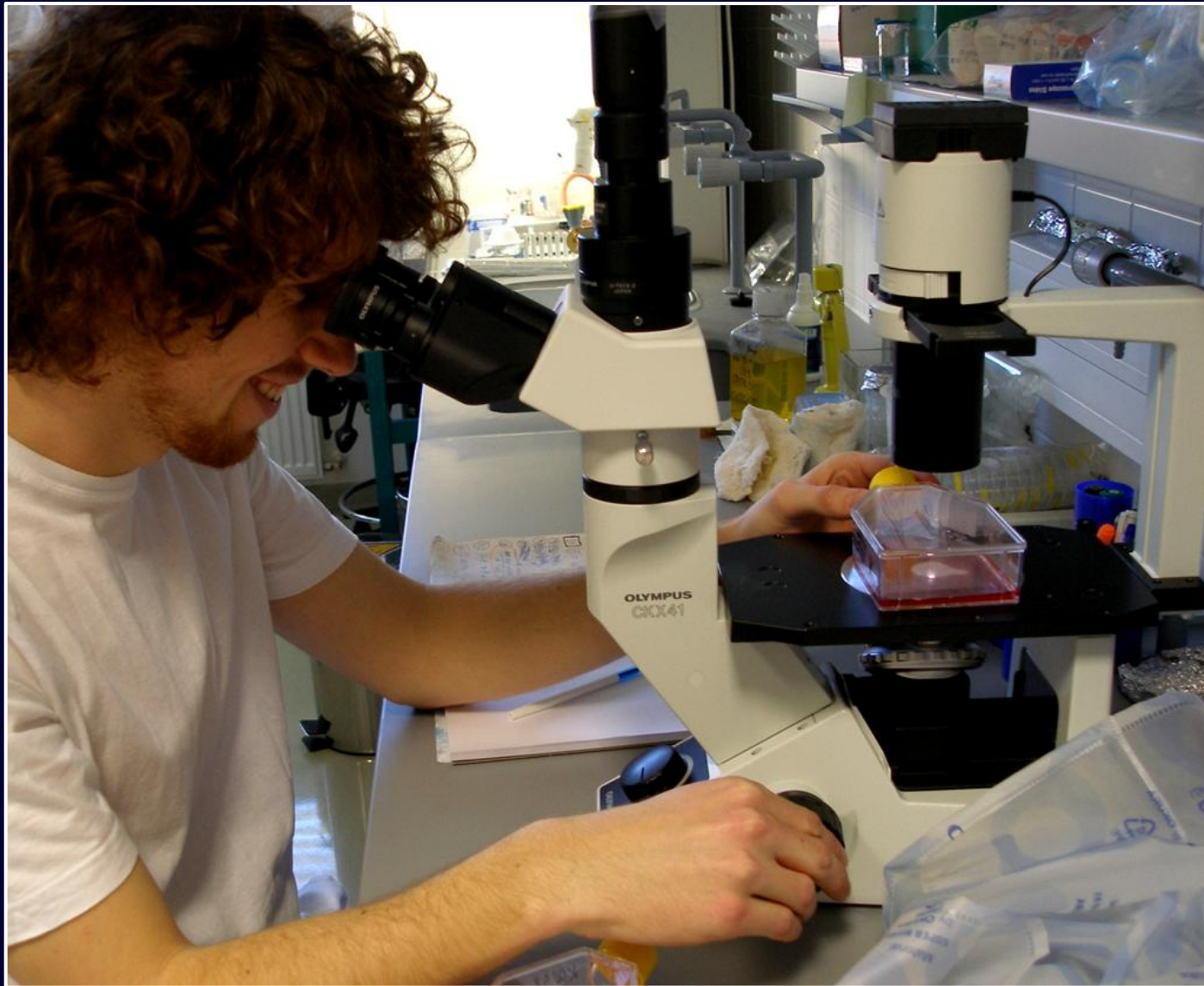




invertovaný mikroskop

## Dělení buněk v podmínkách *in vitro*:





## Typy buněčných kultur:

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

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

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

# SUBKULTIVACE (PASÁŽOVÁNÍ)

## Suspensní 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

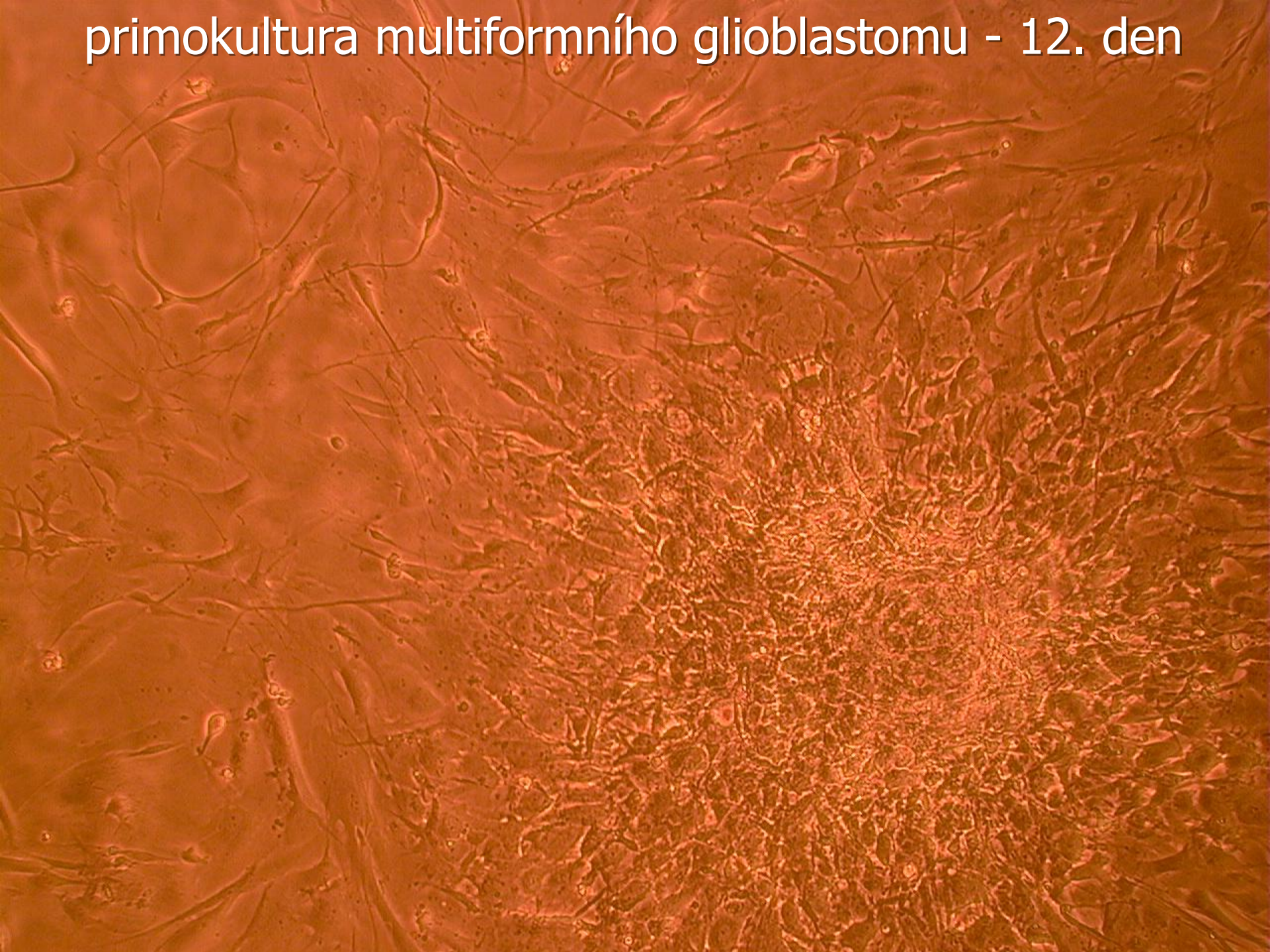
- orgánová/tkáňová kultura (organ/tissue culture)  
trojrozměrná kultura nerozvolněné tkáně, která si uchovává histologické znaky a vlastnosti původní tkáně v prostředí *in vivo*
- buněčná kultura (cell culture)  
kultura odvozená z jednotlivých buněk, které už nejsou spojeny do struktury tkáně
- primokultura / 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 nádoby do nádoby nové)

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

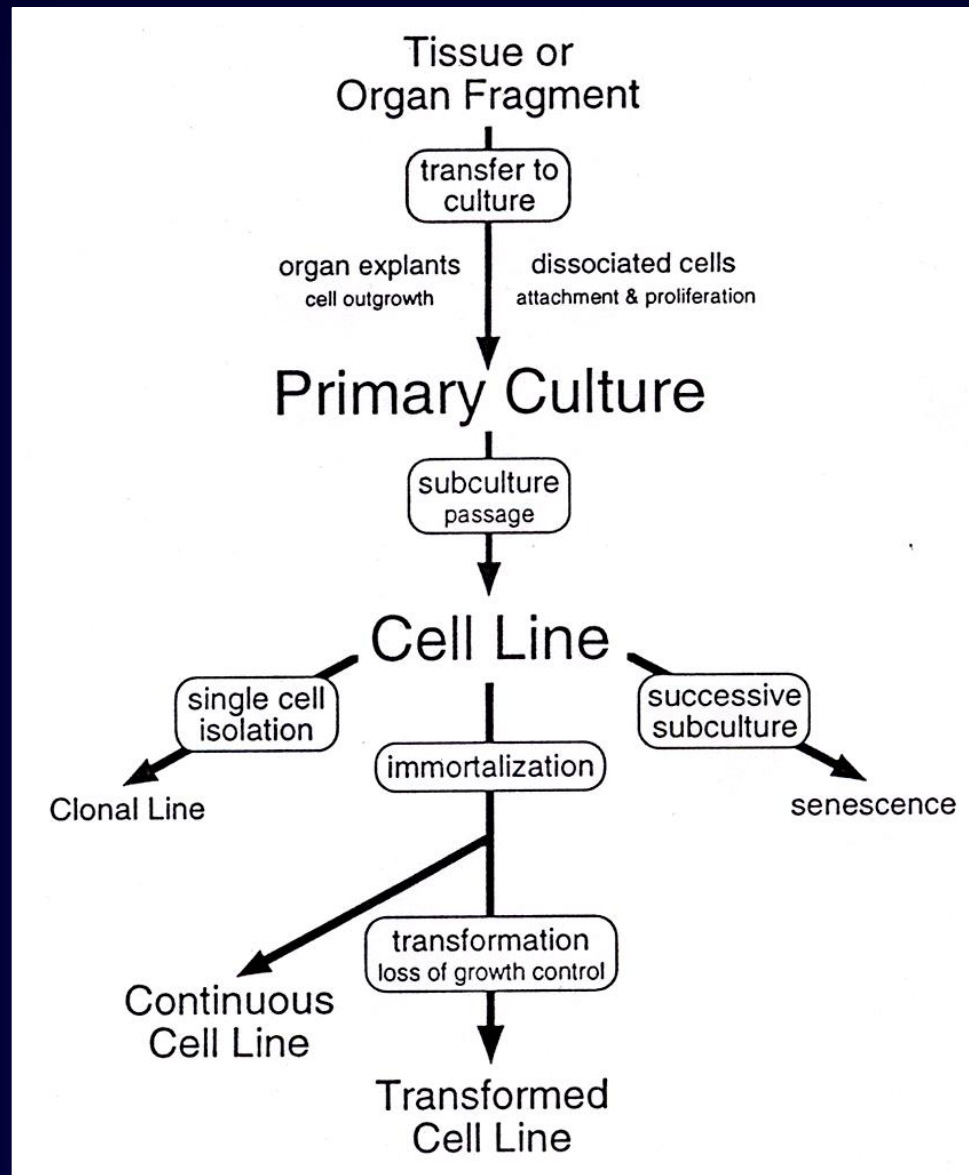
označení (název), druh organismu, pohlaví, věk, výchozí orgán, typ kultury, počet pasáží, růstové parametry, morfologie, karyotyp, markery

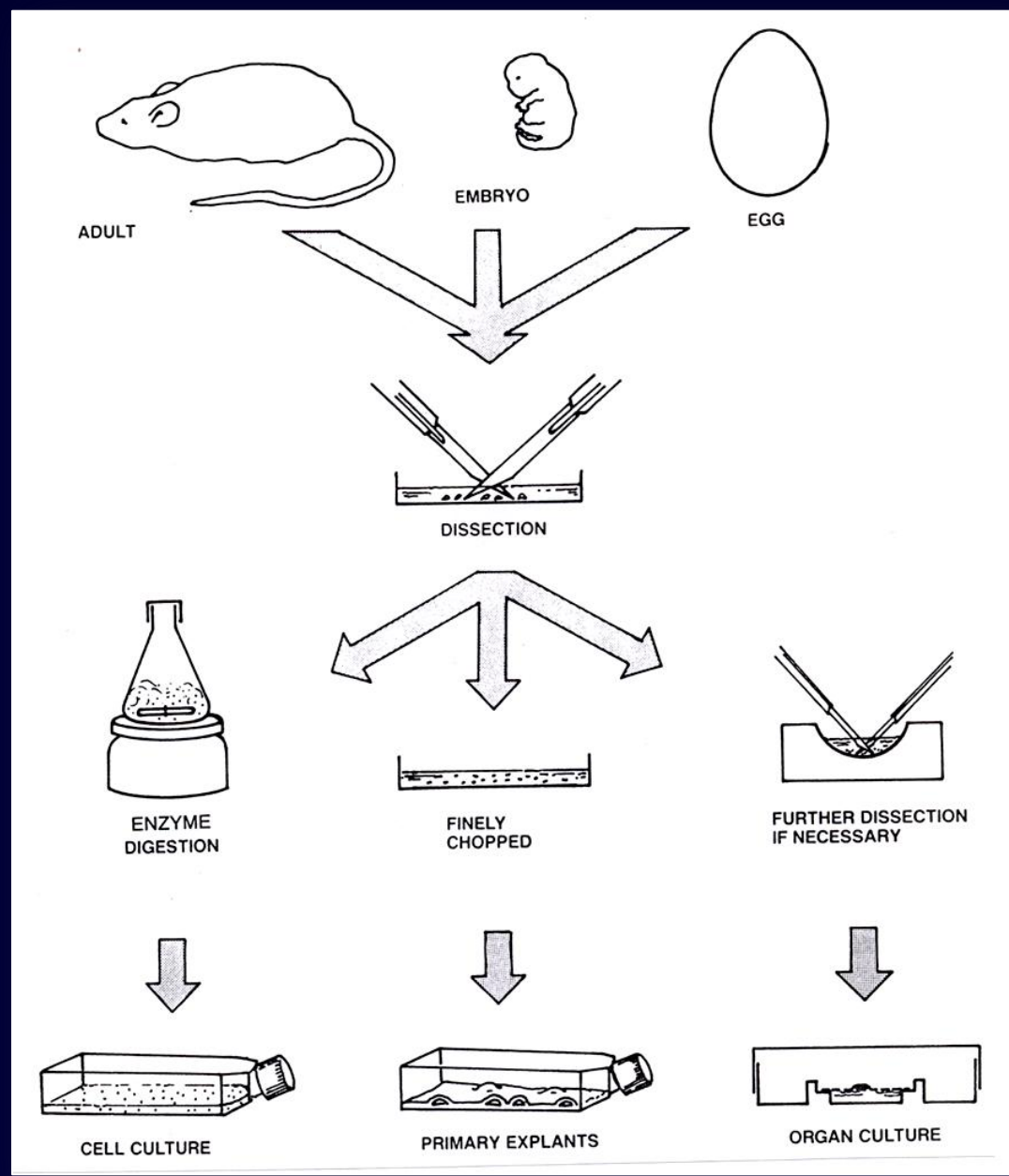
## Buněčný kmen

- 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





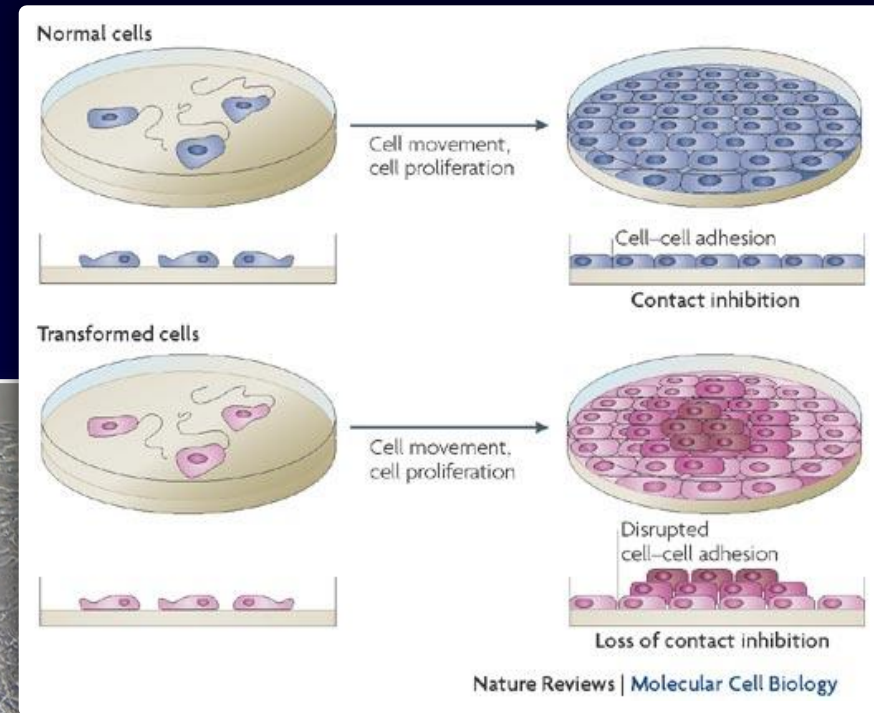
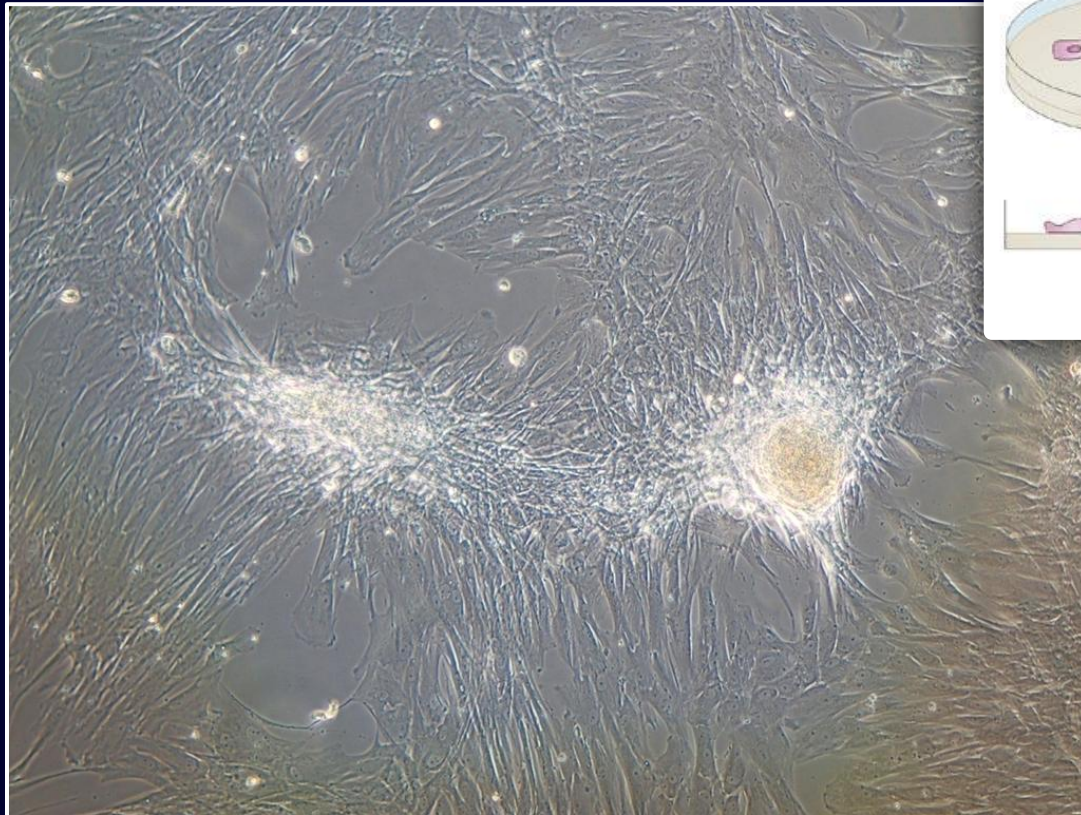
# NORMÁLNÍ A TRANSFORMOVANÉ BUNĚČNÉ LINIE

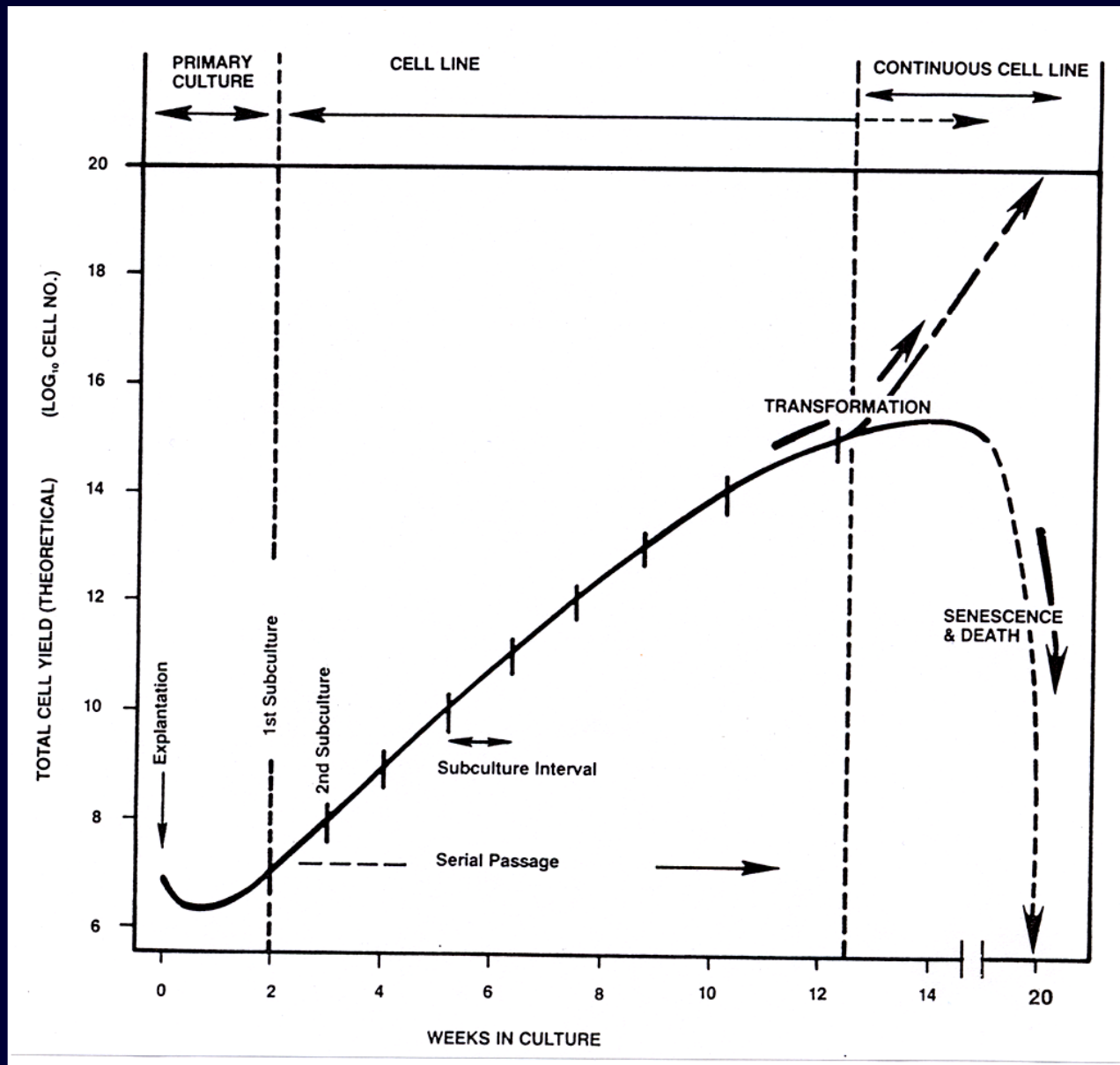


## Růstové parametry buněčných linií:

- **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





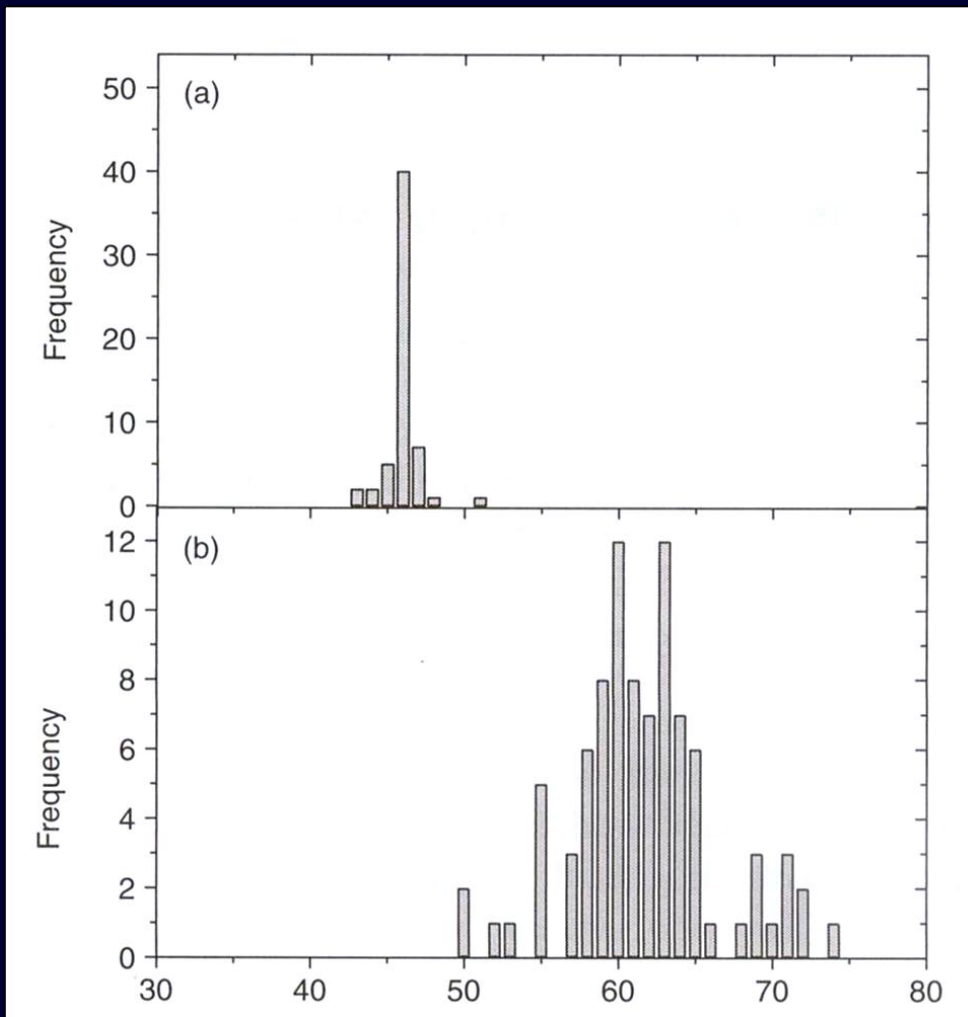
## Diploidní buněčné linie:

- 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, 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



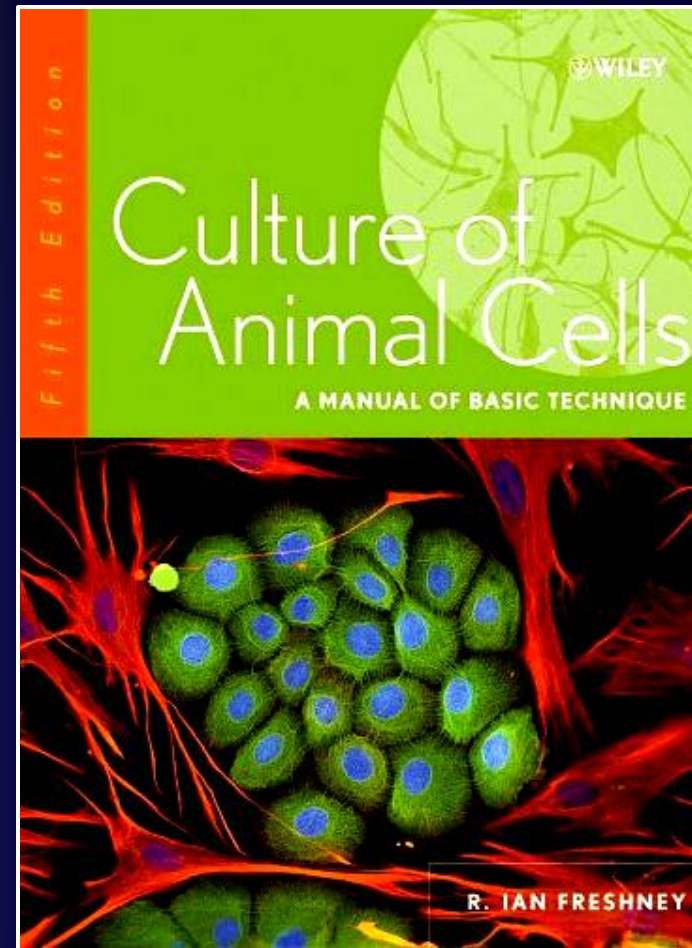
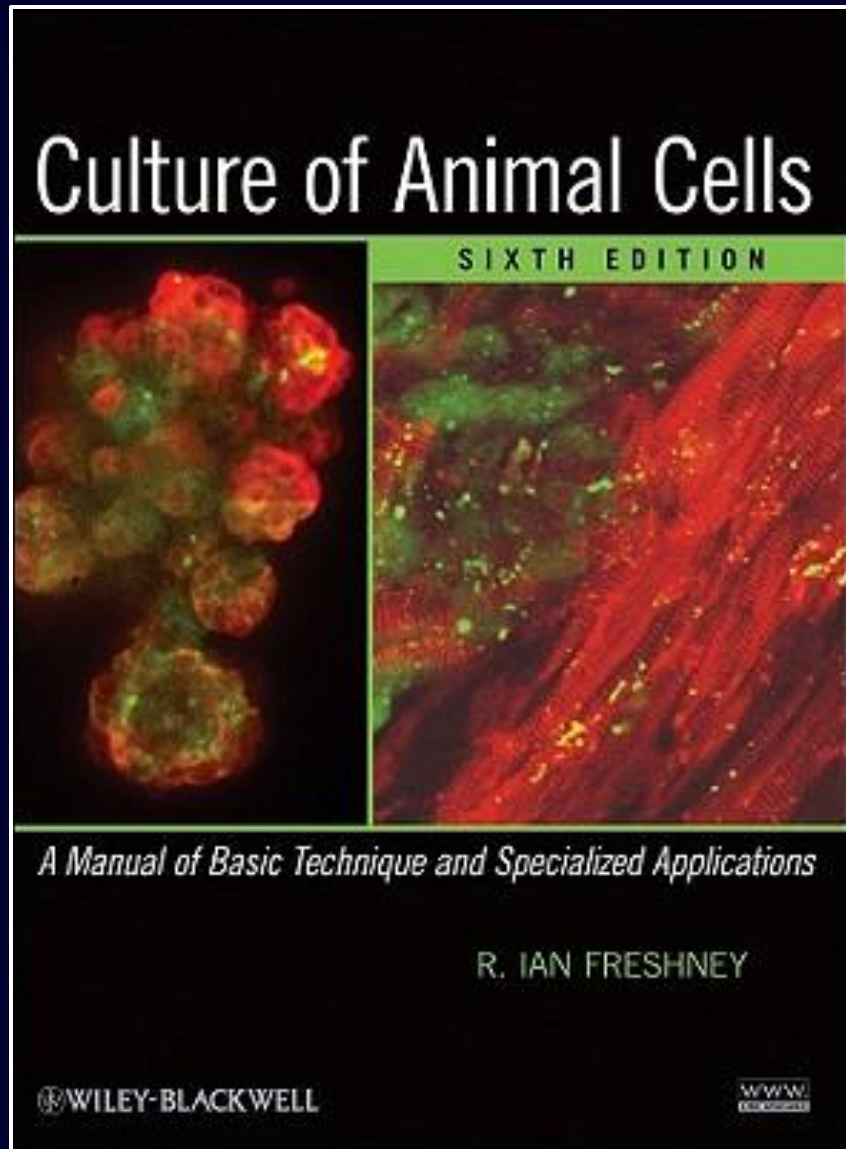
normální buňky  
(gliové buňky)

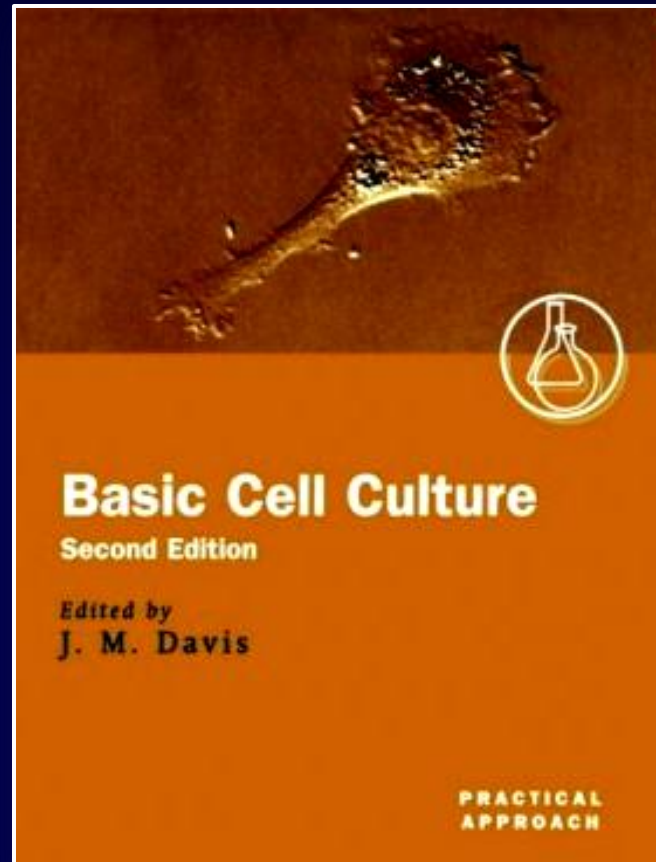
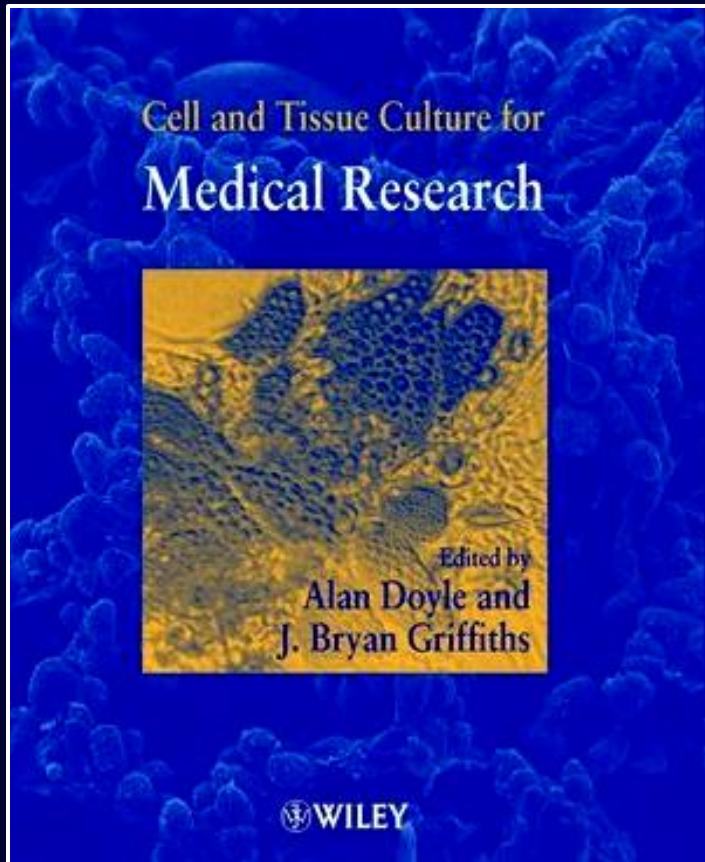
transformované buňky  
(maligní melanom)

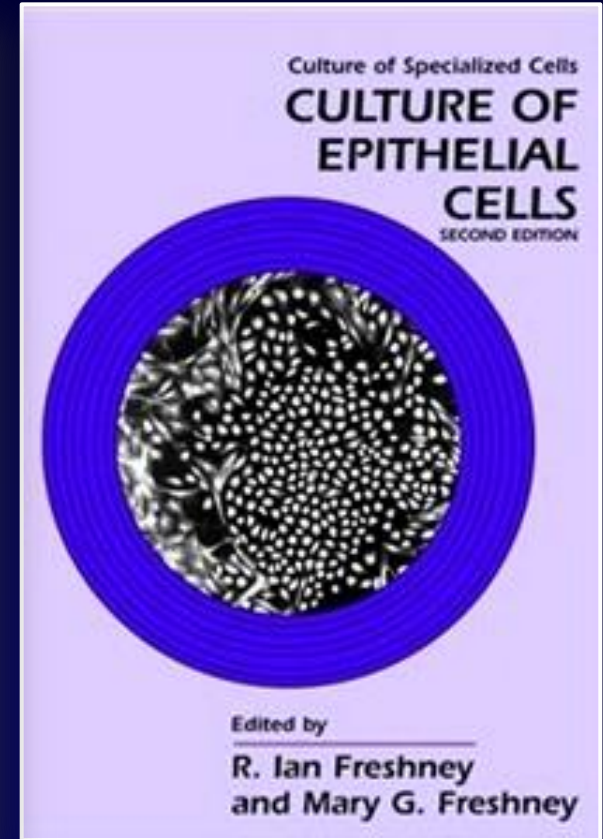
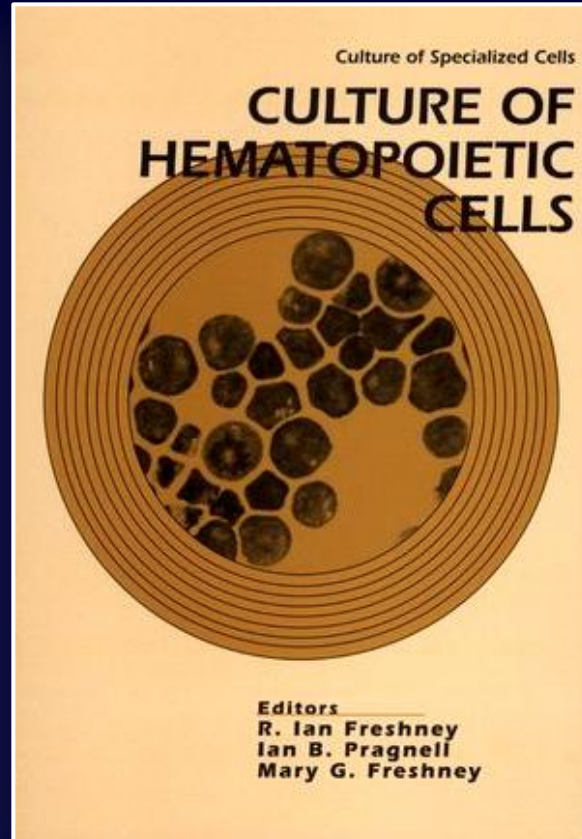
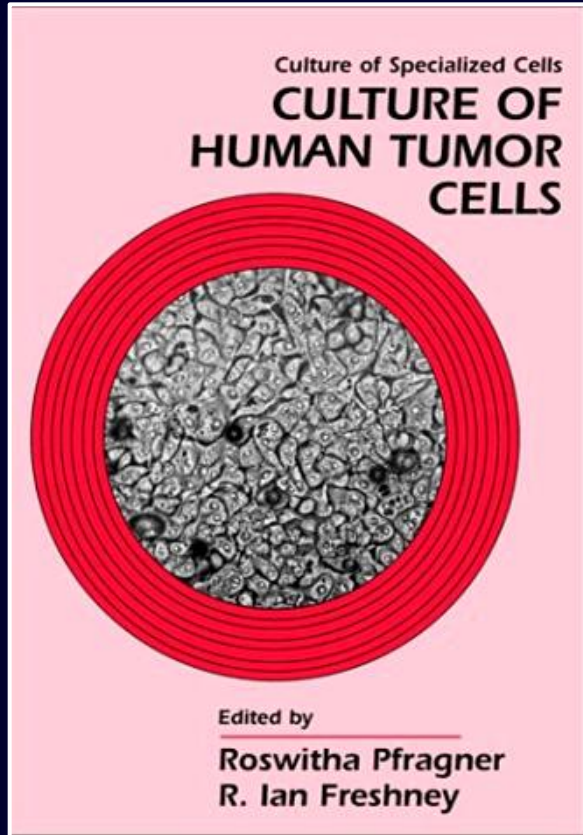
# PRAKTICKÉ APLIKACE

- **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)







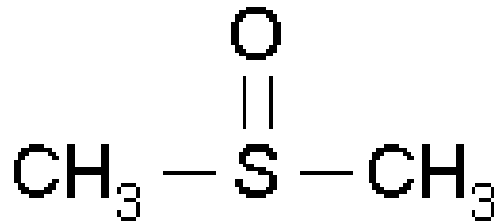


# KRYOKONZERVACE, ARCHIVACE, SBÍRKOVÁ PRACOVNÍŠTĚ

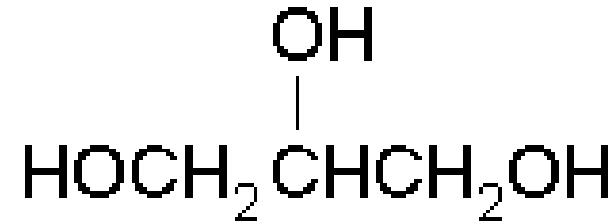
## Kryokonzervace živočišných buněk

- 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:

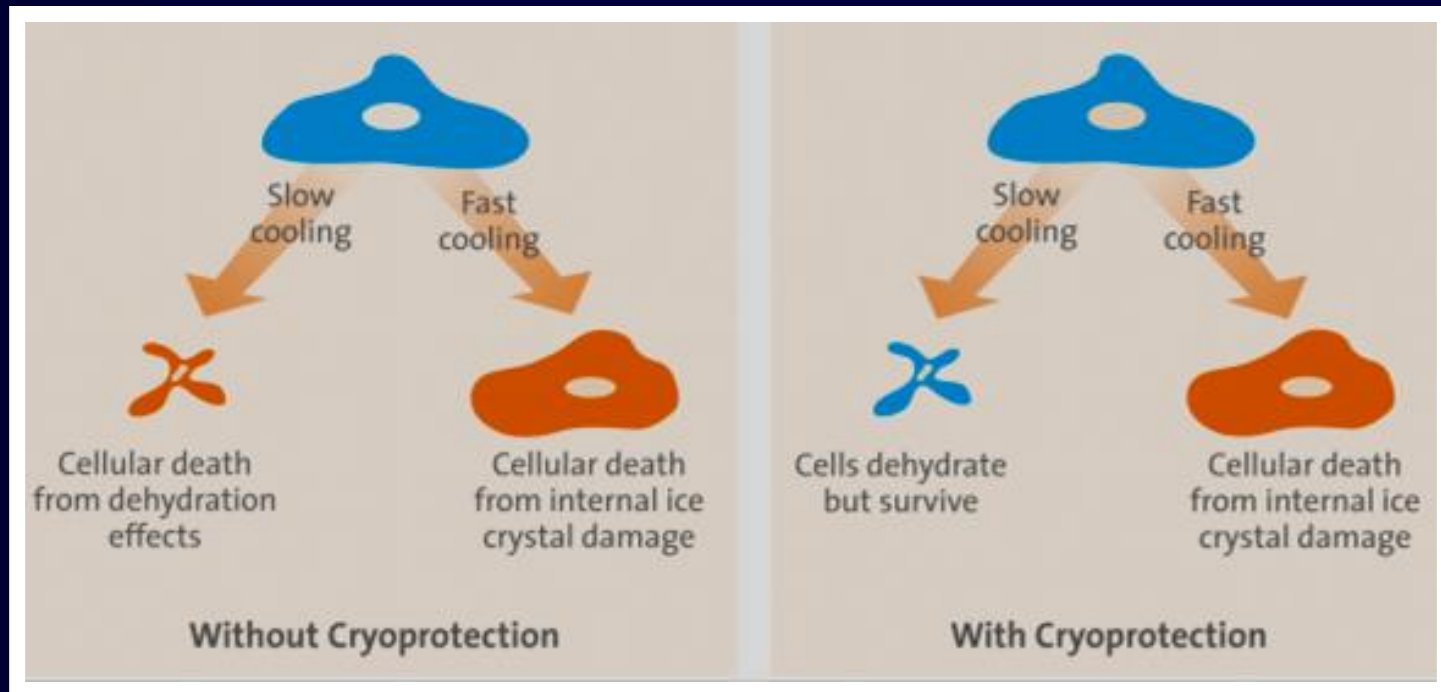


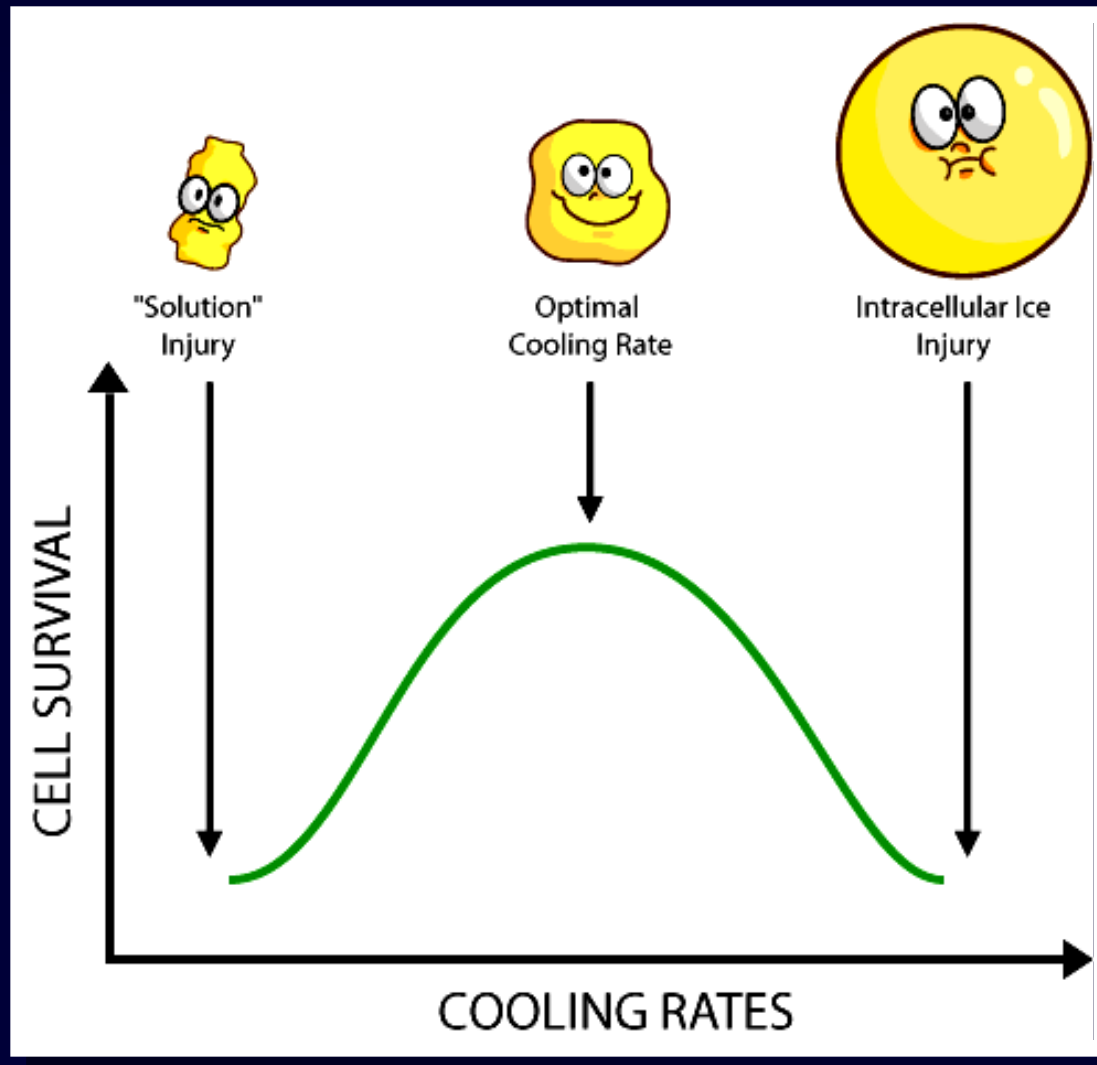
dimethylsulfoxid  
(DMSO)



glycerol

# Vliv rychlosti zamrazování 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

**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...](#)

**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](#)

# European Collection of Cell Cultures (ECACC)

Accessibility | Contact Us | Site Map | Help Sign In | Register

Public Health England Your Cart 0 Items

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:

<ul style="list-style-type: none"> <li>General Cell Collection</li> <li>Hybridoma Collection</li> <li>Primary Cells</li> <li>Cytofect Transfection Kits</li> <li>Neuron Culture Kits</li> <li>GPCR Cell Lines</li> </ul>	<p><b>Services</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Assay Ready Cells</li> <li>Catalogue Deposits</li> <li>Cell Culture Management Services</li> <li>Contract Cell Culture</li> <li>Cell Line Identity Verification</li> </ul>
--	--

**Related Links**

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

