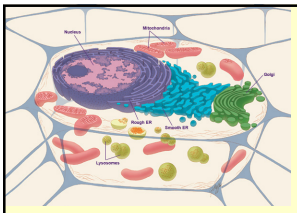
Štúdium buniek v *in vitro* podmienkach I.

Obsah cvičení bude preskúšaný na písomnej skúške



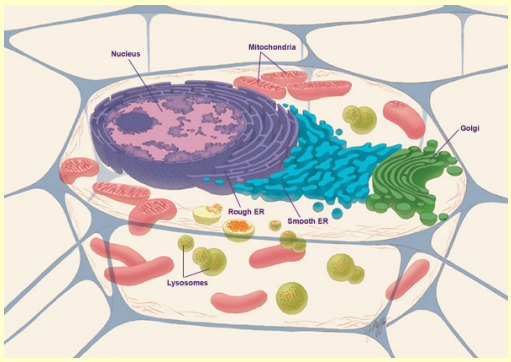
rastlinná a živočíšna bunka
- majú viac podobností alebo odlišností?

- 1665 – **Robert Hooke** informoval kráľovskú spoločnosť v Londýne, že korok je zložený z malých komôrok, ktoré nazval **bunka**

- ku vzniku bunkovej teórie prispelo mnoho jednotlivcov, ale za jej oficiálne zrodenie sa považujú dve publikácie
  - botanik **Matthias Schleiden** v roku 1838
  - zoológ **Theodor Schwann** v roku 1839

- autori ukázali, že bunky sú univerzálne stavebné jednotky všetkých živých tkanív
- že bunky vznikajú delením sa existujúcich buniek

- využite bunkových kultúr predstavuje *in vitro* prístup k štúdiu fyziologických procesov



Definícia

- pojem bunkové alebo tkanivové kultúry sa používa na popísanie procesu kultivovania buniek alebo tkanív umelo v laboratóriu
- bunkové alebo tkanivové kultúry môžu byť vytvorené z rastlinných aj živočíšnych buniek
- bunkové kultúry produkujú klony, v ktorých majú všetky bunky rovnaký genotyp

In vivo alebo in vitro pokus?

in vivo - pokusy, ktoré sa vykonávajú na celom organizme

in vitro - pokusy, ktoré sa vykonávajú na časti živočíšneho organizmu. Tieto sa niekedy nazývajú aj *ex vivo*.

Hlavnou výhodou prístupu *in vivo* je, že umožňuje pozorovať fyziologické procesy, keď sú zapojené všetky regulačné mechanizmy.

Výhody *in vitro* preparátu.

1) je jednoduchšie ovplyvniť cieľovú funkciu

2) je jednoduchšie kontrolovať stimul a merať odpoveď

3) je možné použiť bunkové kultúry namnožené z jednej bunkovej línie (t.j. všetky bunky sú identické), hoci v tomto prípade je potrebné zvažovať otázku dediferenciácie...

(čo majú tieto bunky spoločné s primárnou kultúrou?)

Nevýhody *in vitro* preparátov

- preparát, keď sa umiestni do absolútne odlišných podmienok, než aké sú v organizme, zmení svoje vlastnosti
- deaktivujú sa fyziologické mechanizmy, ktorými biologický materiál kontroluje svoje prostredie, deaktivované.

Rezy tkaniva budú dostávať oveľa viacej výživy a odstraňovať oveľa viacej odpadu metabolických splodín v *in vitro* preparáte, ako by to bolo pri normálnom prekrvení.

- strata kontroly nad procesmi

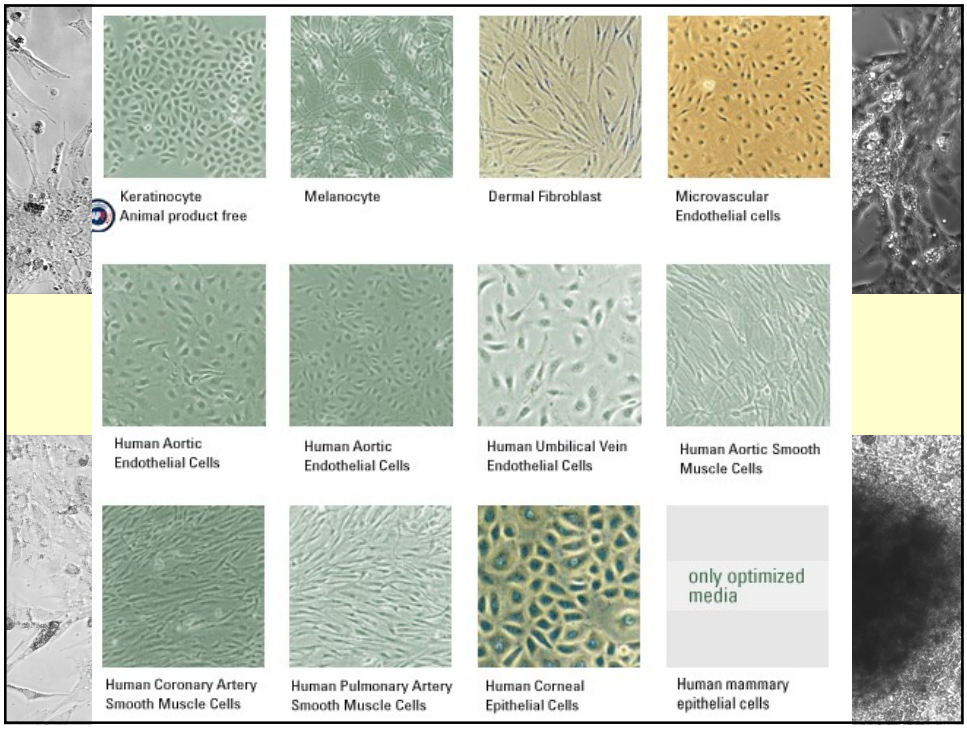
História

Haberlandt

Carrel

- História tkanivových kultúr začína na začiatku 20. storočia prácou Gottleib Haberlandt (rastliny) and Alexis Carrel (živočíchy)

link



sterilná
práca

pipetovanie

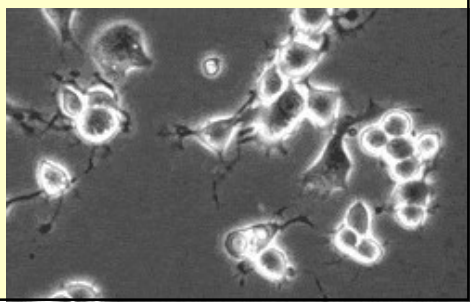
11 in vitro

čo potrebujeme?

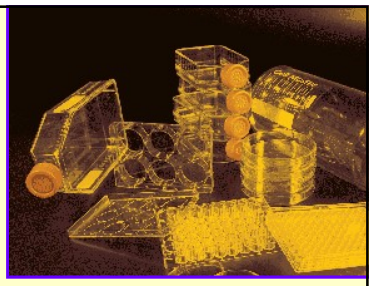
bunky, ktoré budeme kultivovať

ak ich izolujeme z tkaniva, nástroje na ich disociáciu
- mechanické (skalpel, pipeta)
- enzymatické (trypsín, kolagenáza)
  - optimálna teplota
  - optimálny čas

sterilné plasty
médium
antibiotiká
sérum
rastové faktory



Kultivačné podmienky



- Používame sklenené alebo umelohmotné nádobky, ktoré plníme médiom s rozptýlenými bunkami.
- Inkubujeme v termostate s kontrolovanými podmienkami tepla, svetla a zloženia vzduchu. Bunky v priebehu hodín prisadnú k stenám nádobky a začnú sa deliť.

Tissue culture products for adherent cells

PE ventilation cap

Non-wettable 0.2 µm hydrophobic filter membrane for reproducible gaseous exchange

Cell⁺ growth surface for sensitive cell cultures

Cell⁺ TC products for the growth of primary cultures and other fastidious cell lines are gamma-sterilised and made from high-quality polystyrene.

Cell⁺ TC products particularly support the growth of various fastidious cell lines:

- Primary cultures
- Continuous cell lines
- Cells that normally require a coating of colagen, gelatin or polylysine for growth
- Cell lines that grow poorly on standard surfaces

Cell⁺ TC flasks with quick-release cap

- Yellow cap with and without ventilation - Plug Seal Cap
- Two-position screw cap with locking mechanism
- Anti-tip skirt at canted neck

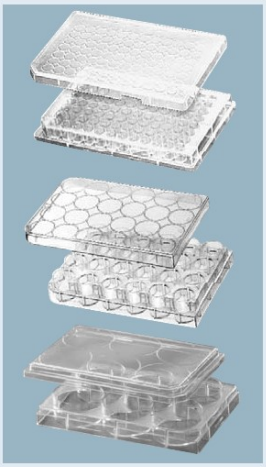
Order Number	Growth Area cm²	Volume ml	Screw Cap	Neck Shape	Packaging Bag/Case
83.1810.300 83.1810.302 w. ventilation	25 25	50 50	PE PE	*	20/500 20/500
83.1813.300 83.1813.302 w. ventilation	75 75	250 250	PE PE	*	5/100 5/100
83.1812.300 83.1812.302 w. ventilation	175 175	650 650	PE PE	*	5/40 5/40

* with pouring channel · Replacement caps for TC flasks on p. 86.

NEW

Cell⁺ TC dishes in *SURE*Grip Design

Order Number	Growth Area cm²	∅/Height mm	Packaging Bag/Case
83.1800.003*	8	35/10	20/500
83.1801.003*	21	60/15	20/500
83.1802.003*	58	100/20	20/500

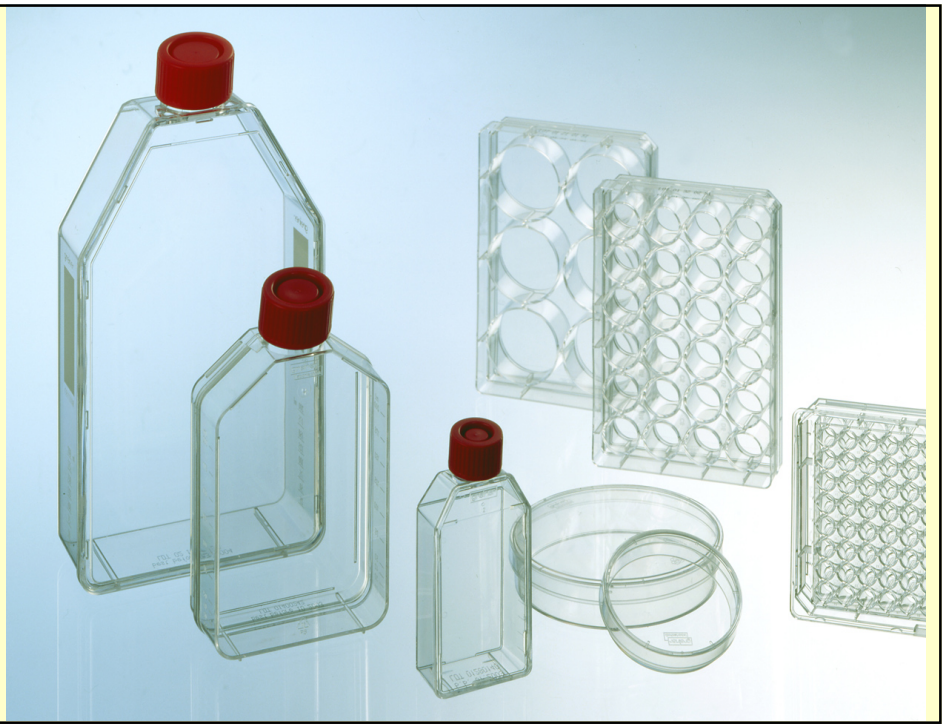


Cell⁺ TC plates

Order Number	Growth Area cm²	Max. Volume per Well	Number of Wells	Base Shape	Packaging Bag/Case
83.1835.300	0.35	0.38 ml	96		1/100
83.1836.300	2.0	3.6 ml	24		1/100
83.1839.300	9.5	17.2 ml	6		1/100

* *SURE*Grip Design

- Convenient handling due to a raised ring around the circumference of the dish, enabling an easy and secure grip of both the dish and lid, also from a whole stack.



Zloženie média

- základné anorganické živiny
- stopové prvky
- stabilizátory pH (CO_3^{2-}/HCO_3^-, $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$)
  - pH = 7,2 – 7,4
- glukóza
- aminokyseliny
- vitamíny a iné zložky rôznych enzýmov
- mastné kyseliny a lipidy
- špecifické proteíny a peptidy podporujúce bunkové delenie
- sérum (často je to fetálne bovinné sérum)
- antibiotika (na zníženie rizika kontaminácie baktériami)

Media formulations	DMEM	DMEM with stable glutamine
	130-091-437	130-091-438
Components	g/L	g/L
Inorganic salts		
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.264	0.264
$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$	0.001	0.001
KCl	0.4	0.4
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	0.2
NaCl	6.4	6.4
$NaHCO_3$	3.7	3.7
$NaH_2PO_4H_2O$	0.125	0.125
Other components		
Glucose	4.5	4.5
Phenol red Na	0.0159	0.0159
Sodium Pyruvate	0.11	0.11
Amino acids		
L-Arginine.HCl	0.084	0.084
L-Cystine	0.048	0.048
L-Alanyl-L-Glutamine	--	0.868
Glycine	0.03	0.03
L-Histidine.HCl.H_2O	0.042	0.042
L-Isoleucine	0.105	0.105
L-Leucine	0.105	0.105
L-Lysine.HCL	0.146	0.146
L-Methionine	0.030	0.030
L-Phenylalanine	0.066	0.066
L-Serine	0.042	0.042
L-Threonine	0.095	0.095
L-Tryptophan	0.016	0.016
L-Tyrosine	0.072	0.072
L-Valine	0.094	0.094
Vitamins		
D-Ca Pantothenate	0.004	0.004
Choline Chloride	0.004	0.004
Folic acid	0.004	0.004
myo-Inositol	0.0072	0.0072
Nicotinamide	0.004	0.004
Pyridoxine.HCl	0.004	0.004
Riboflavin	0.0004	0.0004
Thiamine.HCl	0.004	0.004

Invitrogen offers several versions of DMEM including powder or liquid, with or without L-glutamine, High or Low Glucose, etc. The comparison table is a quick reference to help identify the catalog number that best suites your requirements:

Base Catalog Number	Glucose level	Liquid or Powder	With 4mM Glutamine	With GlutaMAX	With 1mM Sodium Pyruvate	With 25mM HEPES	Without Phenol Red	Without Glucose	Without Phosphate	Without Methionine and Cystine	Without Calcium
11965	4.5 g/L	Liquid	●								
11995	4.5 g/L	Liquid	●		●						
12430	4.5 g/L	Liquid	●			●					
21063	4.5 g/L	Liquid	●			●	●				
11971	4.5 g/L	Liquid	●						●		
12100	4.5 g/L	Powder	●								
12800	4.5 g/L	Powder	●		●						
11960	4.5 g/L	Liquid									
10313	4.5 g/L	Liquid			●						
31053	4.5 g/L	Liquid					●				
21013	4.5 g/L	Liquid								●	
21068	4.5 g/L	Liquid									●
10569	4.5 g/L	Liquid		●	●						
10564	4.5 g/L	Liquid		●		●	●				
10566	4.5 g/L	Liquid		●							
11885	1.0 g/L	Liquid	●		●						
11966	0.0 g/L	Liquid	●					●			
12320	1.0	Liquid	●		●	●					
31600	1.0	Powder	●		●						
11054	1.0	Liquid			●						
10567	1.0	Liquid			●						

link

ĎALEJ potrebujeme
nástroje na pipetovanie
pipety, pipetátory
mikropipety, špičky v sterilných boxoch

Serological pipettes from clear polystyrene

- Non-pyrogenic, individually wrapped, sterile
- Easy identification by international colour code
- Larger pipetting volume due to negative graduation
- Variable mode of handling due to reverse graduation
- Optimised mouthpieces for universal fit in most common pipettors
- Easy opening, static-free packaging

Serological Pipettes 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml

Order Number	Total Volume/ Graduation	Description/ Colour Code	Packaging Pcs./Case
86.1251.001*	1 ml/ 1/100 ml	plugged, ind. wrapped, sterile, yellow	1,000
86.1251.025	1 ml/ 1/100 ml	plugged, sterile, 25 pcs., yellow	1,000
86.1252.001*	2 ml/ 1/100 ml	plugged, ind. wrapped, sterile, green	1,000
86.1252.025	2 ml/ 1/100 ml	plugged, sterile, 25 pcs., green	1,000
86.1253.001*	5 ml/ 1/10 ml	plugged, ind. wrapped, sterile, blue	500
86.1253.025	5 ml/ 1/10 ml	plugged, sterile, 25 pcs., blue	500
86.1254.001*	10 ml/ 1/10 ml	plugged, ind. wrapped, sterile, orange	500
86.1254.025	10 ml/ 1/10 ml	plugged, sterile, 25 pcs., orange	500
86.1685.001*	25 ml/ 2/10 ml	plugged, ind. wrapped, sterile, red	200
86.1685.020	25 ml/ 2/10 ml	plugged, sterile, 20 pcs., red	200
86.1689.001*	50 ml/ 1/2 ml	plugged, ind. wrapped, sterile, violet	100

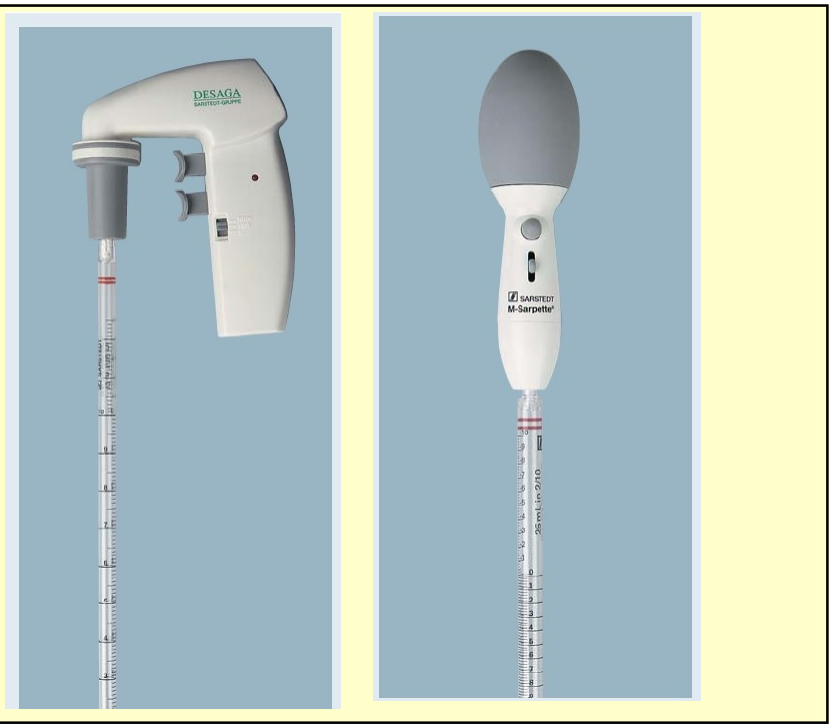
*non-pyrogenic

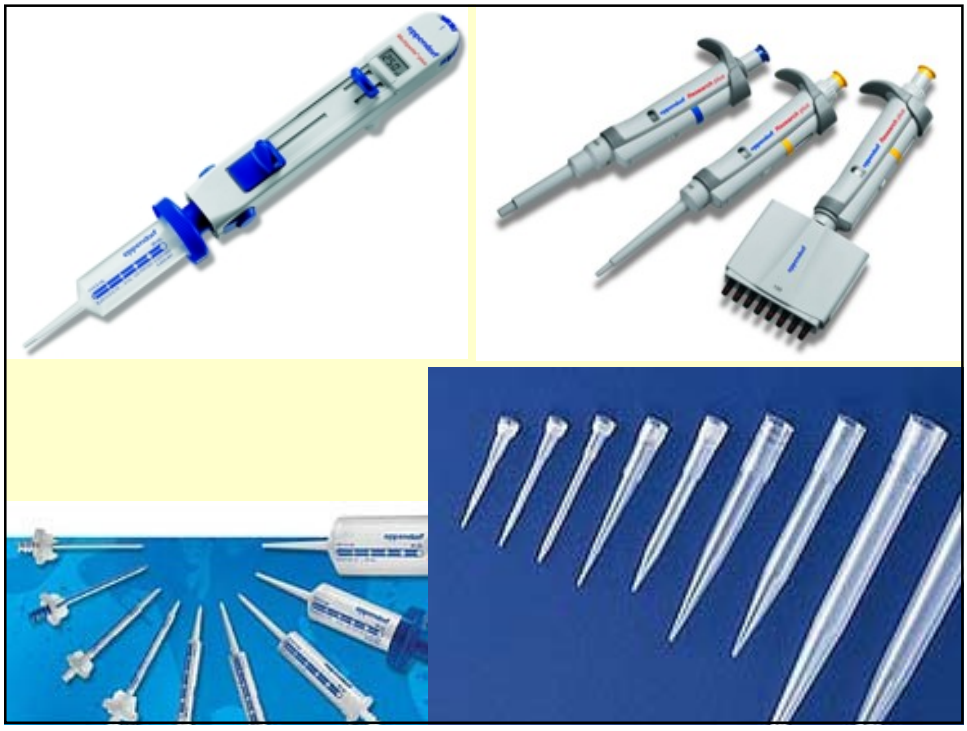
Aspiration Pipette, polystyrene

- For aspirating media with a vacuum pump
- Individually wrapped in paper/plastic peel packaging
- Certified non-pyrogenic
- Without graduation, without cotton plug

Order Number	Total Volume Graduation	Description	Packaging Pcs./Case
86.1252.011	2 ml/without graduation	without plug, without print, ind. wrapped, sterile	1,000

Dilution pipette with and without tip


DESAGA
SARSTEDT
M-Sarpette



Link

ĎALEJ potrebujeme nástroje na prácu s bunkami a ich ovplyvňovanie

Filtropur Filter Systems

Syringe filter Filtropur S for filtration of aqueous solutions up to 100 ml

- Bio-compatible prefilter is free from binding agents, and membrane is free from wetting agents
- Low protein binding membranes
- Individually wrapped and sterile
- Non-pyrogenic

Filtropur S 0.45 yellow housing for sterilisation and particle removal from solutions

Order Number	Inlet/Outlet Connection	Filtration Surface	Pore Size	Packaging Bag/Case
83.1826	inlet luer-lock female outlet luer-lock male	5.3 cm^2	0.45 µm	1/50

Filtropur S 0.2 dark blue/neutral housing for sterile filtration

Order Number	Inlet/Outlet Connection	Filtration Surface	Pore Size	Packaging Bag/Case
83.1826.001	inlet luer-lock female outlet luer-lock male	5.3 cm^2	0.2 µm	1/50

Filtropur S plus 0.2, blue/opaque housing with integral glass prefilter, for sterile filtration of viscous solutions

Order Number	Inlet/Outlet Connection	Filtration Surface	Pore Size	Packaging Bag/Case
83.1826.102	inlet luer-lock female	5.3 cm^2	0.2 µm	1/50

Filtropur V vacuum filtration unit / Filtropur BT bottle top filter

- Improved performance for sterile filtration
- Low protein and nucleic acid binding
- Time and cost saving by higher throughput

Filtration units

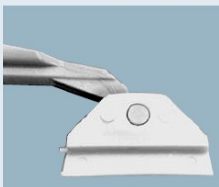
Order Number	Description	Filtration Volume	∅ Membrane	Pore Size	Packaging Bag/Case
83.1822	Filtropur V 25	250 ml	60 mm	0.45 µm	1/12
83.1822.001	Filtropur V 25	250 ml	60 mm	0.20 µm	1/12
83.1823	Filtropur V 50	500 ml	90 mm	0.45 µm	1/12
83.1823.001	Filtropur V 50	500 ml	90 mm	0.20 µm	1/12

A sterile screw cap for the collection vessel is included with each filtration unit.

Bottle top filter for storage vessel with an outer diameter of 45 mm* max.

Order Number	Description	Filtration Volume	∅ Membrane	Pore Size	Packaging Bag/Case
83.1822.100	Filtropur BT 25	250 ml	60 mm	0.45 µm	1/12
83.1822.101	Filtropur BT 25	250 ml	60 mm	0.20 µm	1/12
83.1823.100	Filtropur BT 50	500 ml	90 mm	0.45 µm	1/12
83.1823.101	Filtropur BT 50	500 ml	90 mm	0.20 µm	1/12

* Storage vessels with a thread diameter below 45 mm cannot be screwed onto the filter. However, a vacuum is nevertheless formed due to the special construction of the filter seal.



Pos. 1

Cell scraper with soft, flexible blade

- An alternative to enzymatic detachment of monolayer cultures to avoid cell alterations
- Easy and more complete separation of monolayer due to extra thin and flexible blade
- When downward pressure is applied to the handle, the flexible blade can remove all cells in its path with one smear
- Sterilised by gamma radiation, individually wrapped

Cell scraper with 2-Position Blade

Order Number	Cell Scraper Length cm	Blade mm	Packaging Bag/Case
83.1830	25	17	1/100
83.1832	16	13	1/100

Cell scraper for use in larger TC flasks (T-175)

Order Number	Cell Scraper Length cm	Blade mm	Packaging Bag/Case
83.1831	39	31	1/100

ĎALEJ potrebujeme prístroje:

autokláv
inkubátor
sterilný box

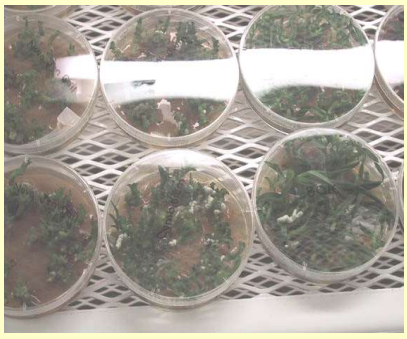
link

How to Change Cell Culture Media.mp4

ciele, pre ktoré boli vyvinuté techniky bunkových a tkanivových kultúr

História

- prvé komerčné využite súviselo s rastlinnou mikropropagáciu na umelom médiu, orchidey, 1920te roky
- V 50 a 60tych rokoch prebiehal v tejto oblasti extenzívny výskum, ale až vytvorenie vhodných umelých médií (Murashige & Skoog, 1962) umožnilo prevádzkovať rastlinnú mikropropagáciu komerčne



kultivované orchidey

História

- novú etapu vo vývine bunkových kultúr predstavuje genetické inžinierstvo a možnosti genetických modifikácií buniek formou vektorov a iných nástrojov

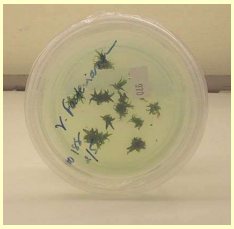
- Rastové regulátory – u rastlín, auxíny & cytokiníny. U živočíchov je veľké množstvo substancií v sérach, sú snahy o ich identifikáciu a nahradenie

- Obnovovania podmienok médium a hustota buniek sa musia nastavovať tak, aby v kultúre nebolo priveľa metabolitov a stále dosť živín

Mikropropagácia rastlín

Mikropropagácia rastlín

- Vysadenie explantátu do kultúry do vhodného média. Médium obsahuje látky podporujúce bunkové delenie, môže byť tekuté alebo pevné
- Každý rastlinný druh má svoje vlastné požiadavky na médium a rastové faktory, ktoré sa musia otestovať metódou pokusu a omylu.



Mikropropagácia rastlín

- Kultiváciou vo vhodnom médiu vzniká kalus
- Kalus sa môže ešte mnoho krát multiplikovať

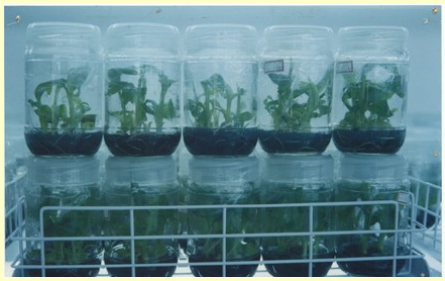
Nastavenie správnej teploty a osvetlenia pri kultivácii je kritické

Kalus

- Kalus je zhluk nediferencovaných buniek rastliny. Nediferencované bunky majú všetky steny buniek rovnakej veľkosti, majú veľké jadro a sú bez vakuoly, alebo majú len veľmi malú vakuolu. Bunky nemajú špecializovanú štruktúru alebo funkciu.
- V prírode sa kalus tvorí na rane rastliny.
- V kultúre *in vitro* je diferenciácia buniek potlačená prídavkami rastových regulátorov do kultivačného média.

Mikropropagácia rastlín

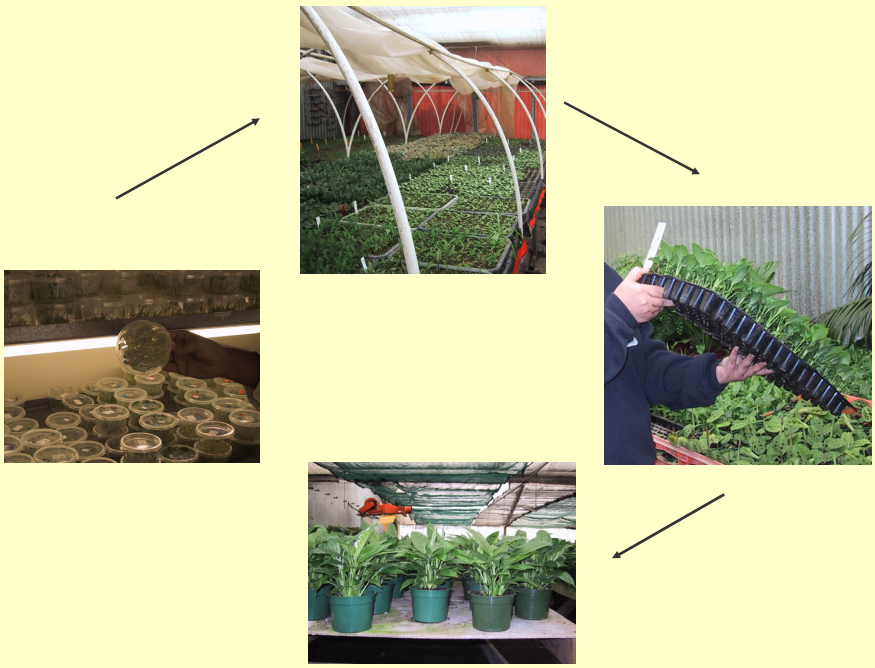
- Vytvorenie koreňov - médium vyšší auxin: cytokinin pomer



mladé banánovníky

Mikropropagácia rastlín

- vysadenie rastliniek, postupné znižovanie vlhkosti



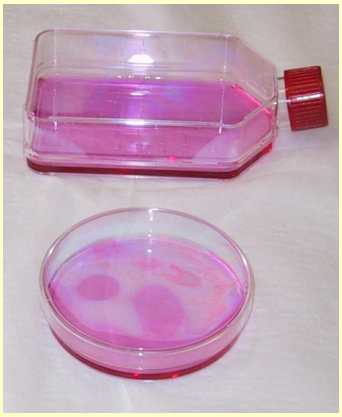
Prečo je to výhodné?

- Jedna rastlinka môže byť rozmnožená mnoho krát
- Nemusí sa pri tom zničiť materská rastlina
- Kontinuálny prísun rastliniek po celý rok

link

živočíšne kultúry

- z tkaniva, tkanivovej banky alebo stabilnej línie
- médium, aseptické podmienky



kultivačná nádoba s médiom a bunkami

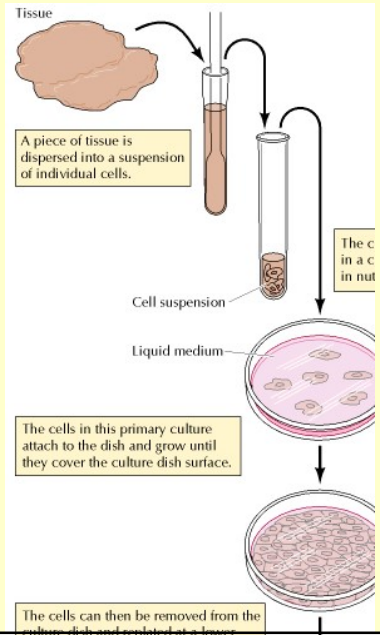
živočíšne bunkové kultúry

- optimálna teplota, výmena média
- špecifické, ľudské bunky napr. potrebujú 37°C a 95% O_2, 5% CO_2

Pasážovanie buniek

- Po určitom čase sa živiny z média vyčerpajú a počet buniek stúpne na neúnosnou mieru.
- Preto je nutné časť buniek odobrať, zmiešať s novým médiom a túto suspenziu preniesť do ďalšej kultivačnej nádoby.

živočíšne kultúry



Z hľadiska životnosti delíme bunkové kultúry do 3 skupín:

- **Primárne kultúry**
  - obsahujú bunky čerstvo izolované z organizmu
  - v kultivačnom médiu prežívajú len tie bunky, ktoré sú lepšie prispôsobené daným podmienkam.
  - existujú spravidla len niekoľko dní, potom je nutné bunky, ktoré sa rozmnožili, dať do nového média.

Z hľadiska životnosti delíme bunkové kultúry do 3 skupín:

- **Bunkové kmene**
  - vychádzajú z primárnych kultúr
  - kultúry normálnych diploidných buniek, ktoré boli už aspoň raz pasážované
  - vznikajú z buniek, ktoré sa v podmienkach *in vitro* začali rozmnožovať
  - zhruba po 40-50 deleniach zanikajú.

Z hľadiska životnosti delíme bunkové kultúry do 3 skupín:

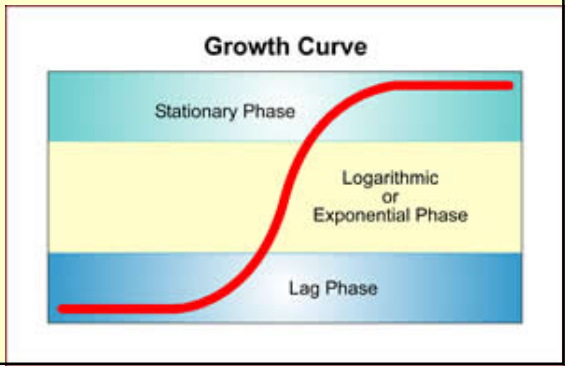
- **Bunkové línie** (permanentní bunkové línie)
  - majú charakter nádorových buniek
  - sú plne adaptované na podmienky *in vitro*
  - neobmedzene sa delia a je možné udržiavať ich ľubovoľne dlho
  - vznikajú transformáciou bunkových kmeňov alebo to sú bunky pôvodne izolované z nádorov

Rastová krivka bunkovej kultúry

- vyjadruje zmeny početnosti buniek v závislosti na čase
- Rast bunkovej kultúry má fázy:

Lag-fáza – počiatočná fáza, počet buniek najprv mierne klesne a potom pomerne rýchlo narastá. Bunky sa adaptujú na kultivačné prostredie a pripravujú sa na bunkové delenie.

Log-fáza (logaritmická alebo exponenciálna fáza) – počet buniek exponenciálne rastie. V tejto fáze zachytíme najviac buniek v mitóze, čo sa dá využiť na pozorovanie chromozómov.

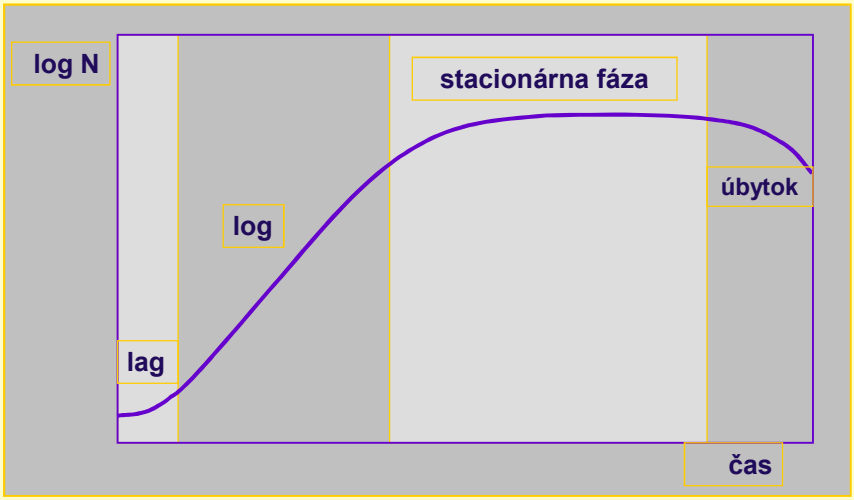


Rastová krivka bunkovej kultúry

– **Stacionárna fáza** – rýchlosť rastu bunkovej populácie postupne klesá, prejavujú sa inhibičné mechanizmy (napr. kontaktná inhibícia, produkcia rastových inhibítorov) a postupné vyčerpávanie živín z média.
– **Fáza úbytku buniek** – dochádza k postupnému odumieraniu buniek spôsobenému nedostatkom živín, znížením pH (následkom zvýšení koncentrácie CO_2 a ďalších kyselinotvorných látok v médiu) a hromadeniu toxických produktov bunkového metabolizmu.

12 in vitro

Rastová krivka bunkovej kultúry



Pozorovanie bunkovej kultúry inverzným mikroskopom

Využitie bunkových kultúr

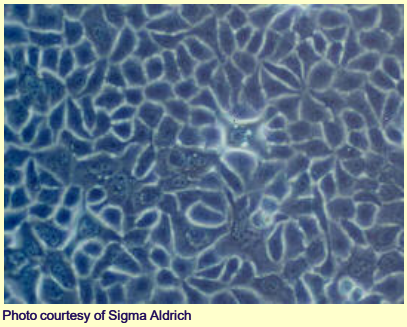
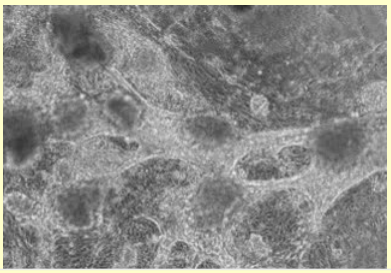
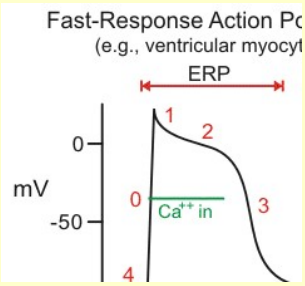


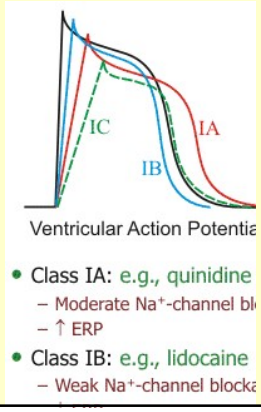
Photo courtesy of Sigma Aldrich

- rast vírusov, ktoré potrebujú hostiteľské bunky
- tvorba monoklonálnych protilátok na diagnostiku a výskum
- výskum
- genetické manipulácie, analýza



štúdium arytmií, vplyv na refraktérnu fázu





- v pokusoch základného výskumu môže byť väčšina vplyvov študovaná v *in vivo* aj *in vitro* podmienkach
- *in vitro* prístup umožňuje detailnejší prístup štúdiu bunkových funkcií, ale nič nehovorí o systémových reguláciách
- preto je potrebné *in vitro* a *in vivo* prístup vhodne kombinovať

ďakujem za pozornosť