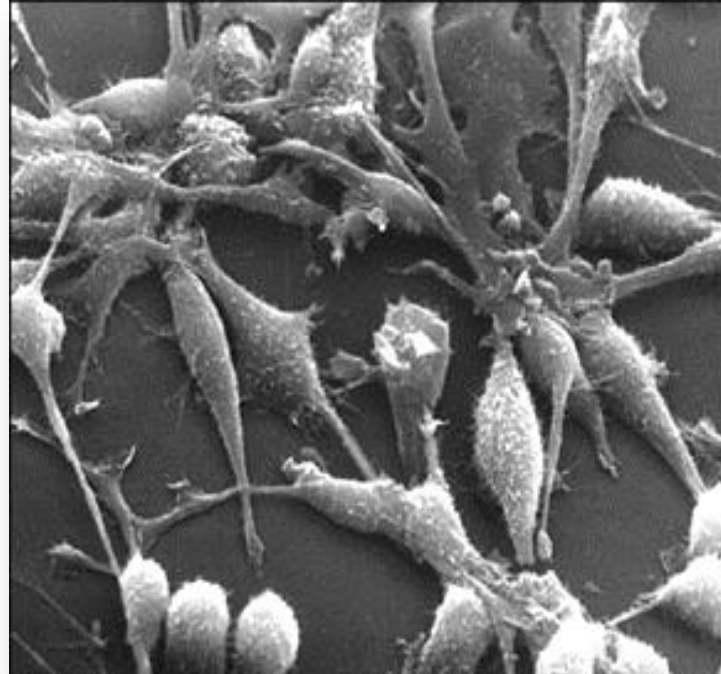


# STUDIUM BUNĚK V PODMÍNKÁCH *IN VITRO*



prof. RNDr. Renata Veselská, Ph.D., M.Sc.  
RNDr. Jakub Neradil, Ph.D.  
Ústav experimentální biologie  
Přírodovědecká fakulta MU

## Program přednášky:

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

**VÝVOJ KULTIVACÍ  
ŽIVOČIŠNÝCH BUNĚK  
V PODMÍNKÁCH *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.)

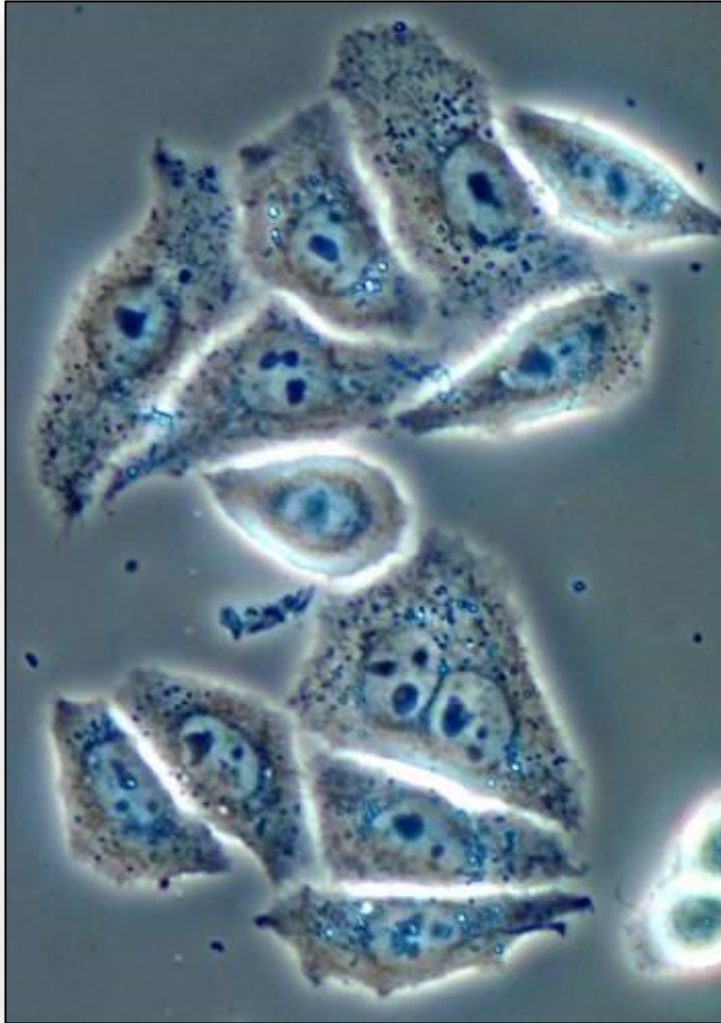


## 1952 - stabilizace první lidské linie HeLa (Gey et al.)

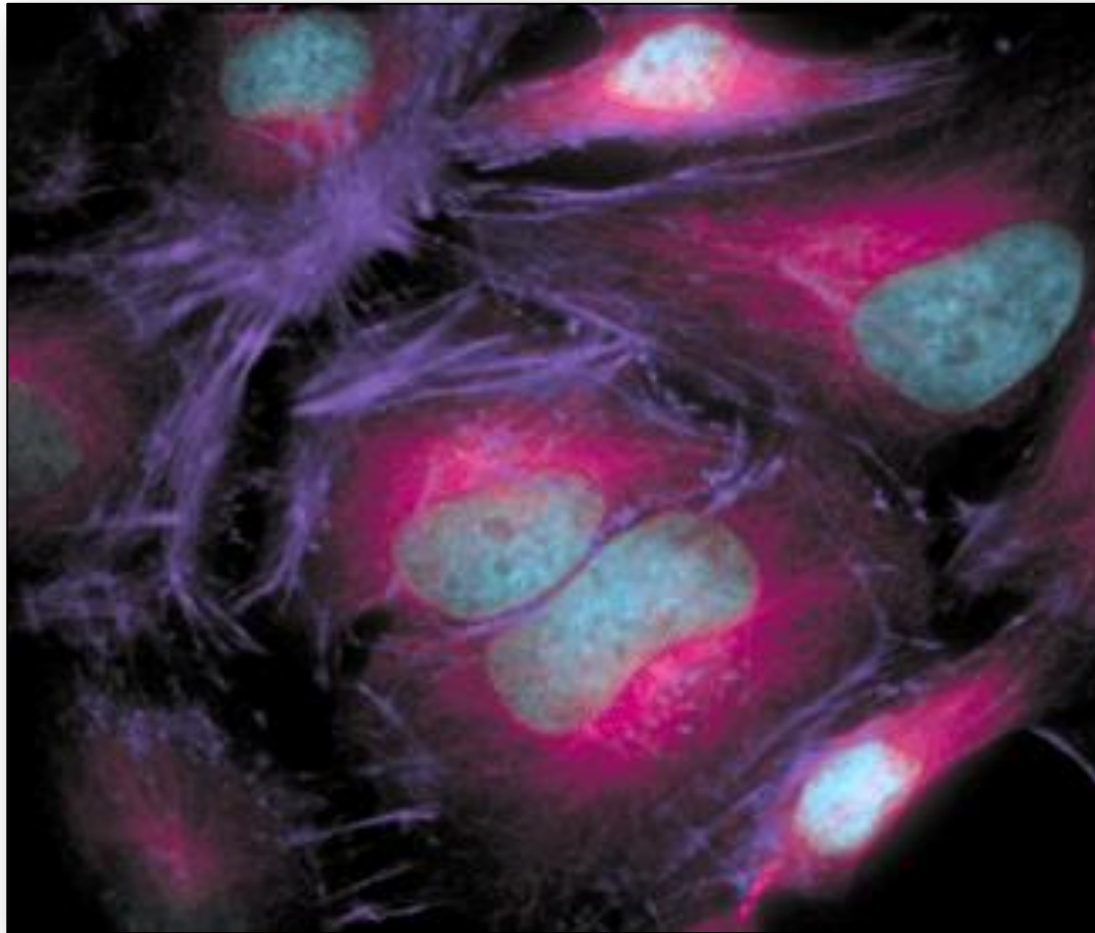
- karcinom děložního krčku
- Henrietta Lacks (1920-1951)
- Johns Hopkins University Hospital (Baltimore, USA)



## Linie HeLa:

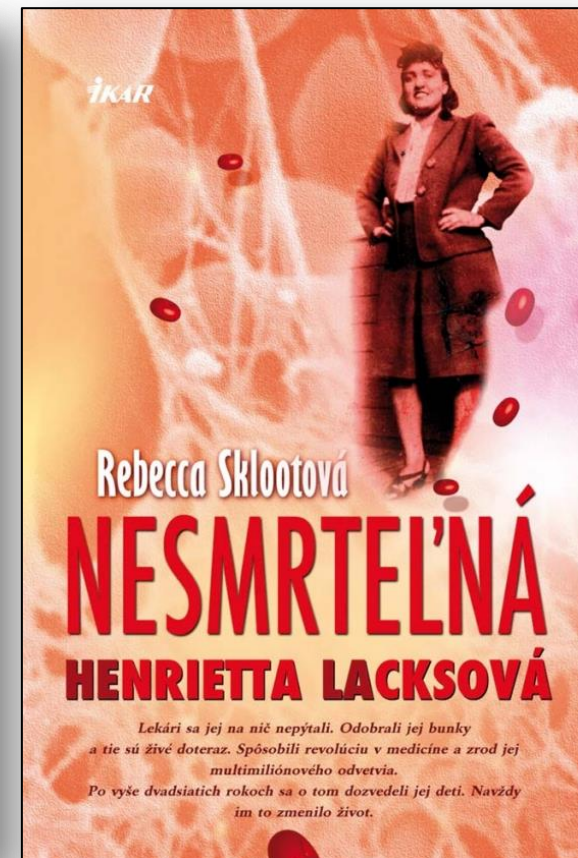
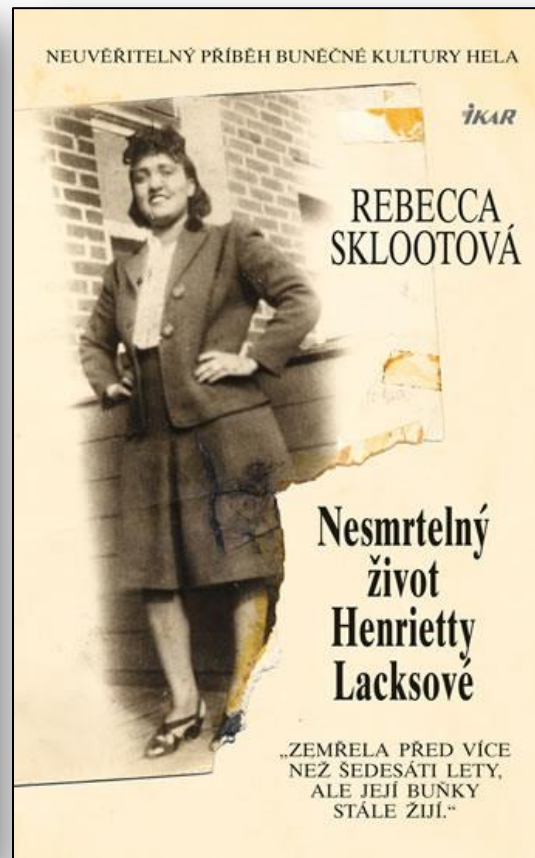
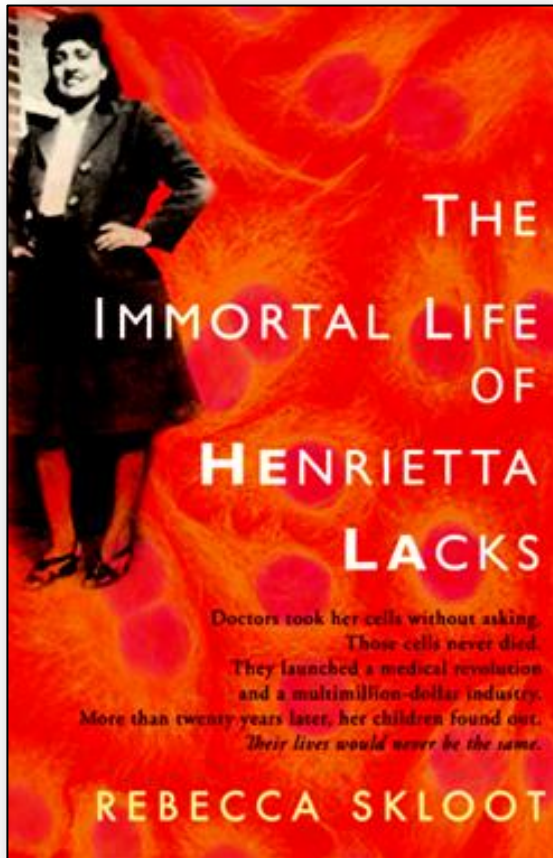


# Linie HeLa:



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





**PODMÍNKY KULTIVACE  
SAVČÍCH / LIDSKÝCH  
BUNĚK *IN VITRO***

## Kultivační podmínky pro savčí a lidské buňky

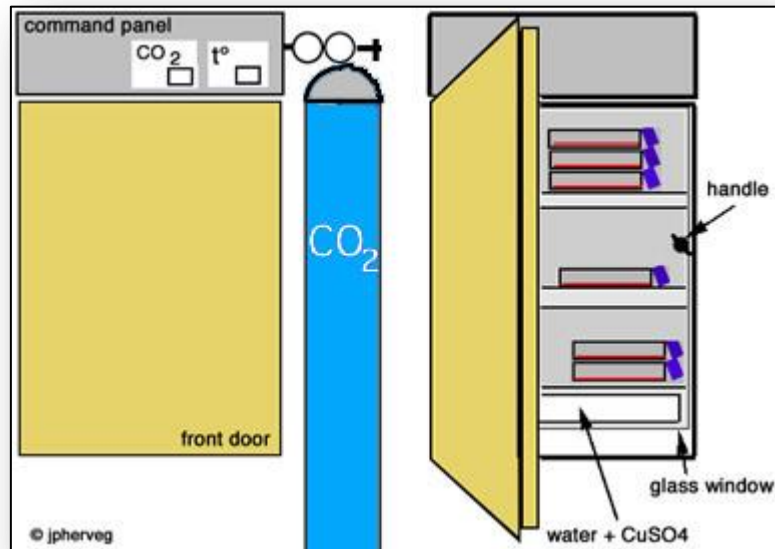
- co nejpodobnější podmínkám v původním organismu:
  - ✓ teplota 37°C,
  - ✓ maximální vlhkost vzduchu, 5% CO<sub>2</sub>
  - ✓ neutrální pH (6,8 až 7,2)
  - ✓ živiny
- sterilní prostředí



# 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** (inzulín, hydrokortizol)
  - **glukóza** (zdroj energie)
  - **fenolová červeň** (indikátor pH)
  - **antibiotika** (penicilin + streptomycin)

## Product Information

### Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DME)

Many modifications of Eagle's Medium have been developed since the original formulation appeared in the literature. Among the most widely used of these modifications is **Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)**.

DMEM is a modification of Basal Medium Eagle (BME) that contains a 4-fold higher concentration of amino acids and vitamins, as well as additional supplementary components. The original DMEM formula, first reported for culturing embryonic mouse cells, contained 1,000 mg/L of glucose. An alteration with 4,500 mg/L glucose is optimal in cultivating certain cell types.

	D0422	D1145	D0819	D1152	D2429
COMPONENT	[1x] g/L	[1x] g/L	[1x] g/L	[powder] g/L	[10x] g/L
<b>Inorganic Salts</b>					
CaCl <sub>2</sub>	0.265	0.265	0.2	0.2	2.65
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> • 9H <sub>2</sub> O	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.001
MgSO <sub>4</sub>	0.09767	0.09767	0.09767	0.09767	0.9767
KCl	0.4	0.4	0.4	0.4	4
NaHCO <sub>3</sub>	3.7	3.7	3.7	—	—
NaCl	6.4	6.4	6.4	4.4	64
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.109	0.109	0.109	0.109	1.09
<b>Amino Acids</b>					
L-Alanyl-L-Glutamine	—	—	0.869	—	—
L-Arginine • HCl	0.084	0.084	0.084	0.084	0.84
L-Cystine • 2HCl	—	0.0626	0.0626	0.0626	0.626
L-Glutamine	—	—	—	0.584	—
Glycine	0.03	0.03	0.03	0.03	0.3
L-Histidine • HCl • H <sub>2</sub> O	0.042	0.042	0.042	0.042	0.42
L-Isoleucine	0.105	0.105	0.105	0.105	1.05
L-Leucine	0.105	0.105	0.105	0.105	1.05
L-Lysine • HCl	0.146	0.146	0.146	0.146	1.46
L-Methionine	—	0.03	0.03	0.03	0.3
L-Phenylalanine	0.066	0.066	0.066	0.066	0.66
L-Serine	0.042	0.042	0.042	0.042	0.42
L-Threonine	0.095	0.095	0.095	0.095	0.95
L-Tryptophan	0.016	0.016	0.016	0.016	0.16
L-Tyrosine • 2Na • 2H <sub>2</sub> O	0.12037	0.12037	0.10379	0.10379	—
L-Tyrosine	—	—	—	—	1.13033
L-Valine	0.094	0.094	0.094	0.094	0.94
<b>Vitamins</b>					
Choline Chloride	0.004	0.004	0.004	0.004	0.04
Folic Acid	0.004	0.004	0.004	0.004	—
myo-Inositol	0.0072	0.0072	0.0072	0.0072	0.072
Niacinamide	0.004	0.004	0.004	0.004	0.04
D-Pantothenic Acid • ½Ca	0.004	0.004	0.004	0.004	0.04
Pyridoxal • HCl	—	—	—	0.004	—
Pyridoxine • HCl	0.00404	0.00404	0.00404	—	0.04
Riboflavin	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.004
Thiamine • HCl	0.004	0.004	0.004	0.004	0.04
<b>Other</b>					
D-Glucose	4.5	4.5	4.5	4.5	10
HEPES	—	—	—	5.958	—
Phenol Red • Na	0.0159	—	0.0159	0.0159	0.159
Pyruvic Acid • Na	0.11	—	—	—	1.1
<b>ADD</b>					
Glucose	—	—	—	—	—
L-Glutamine	0.584	0.584	—	—	0.584 at 1x
NaHCO <sub>3</sub>	—	—	—	3.7	3.7 at 1x





## 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)

## 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

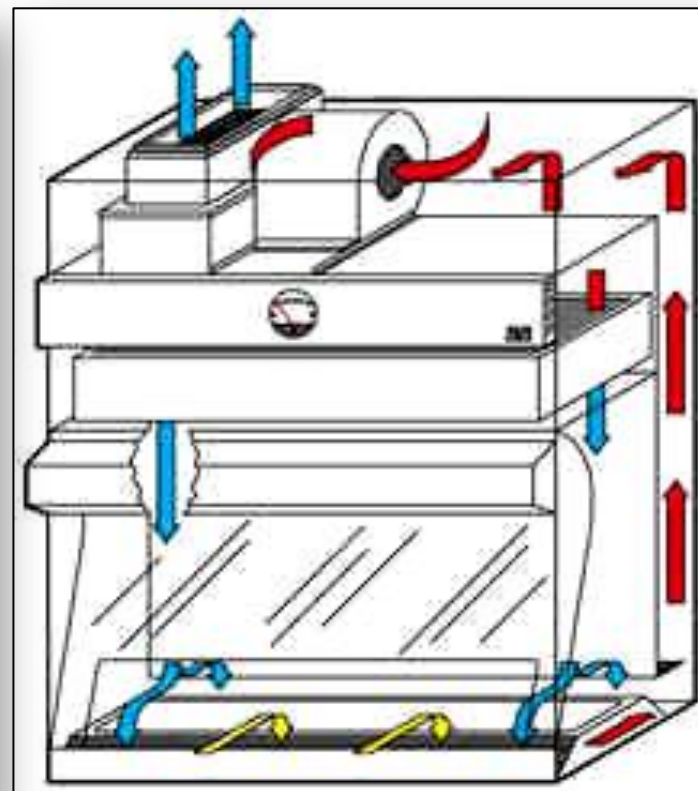


horizontální

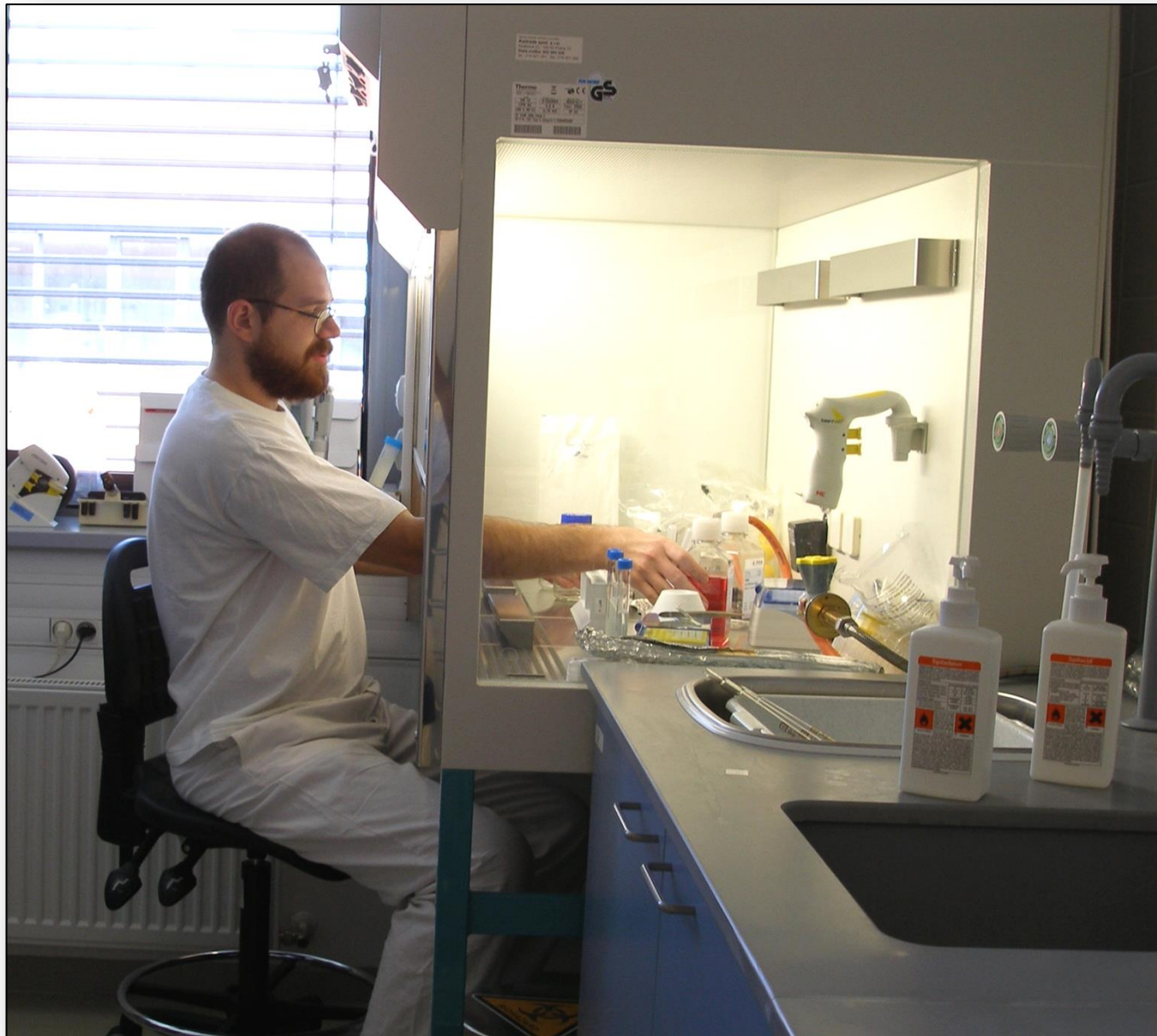


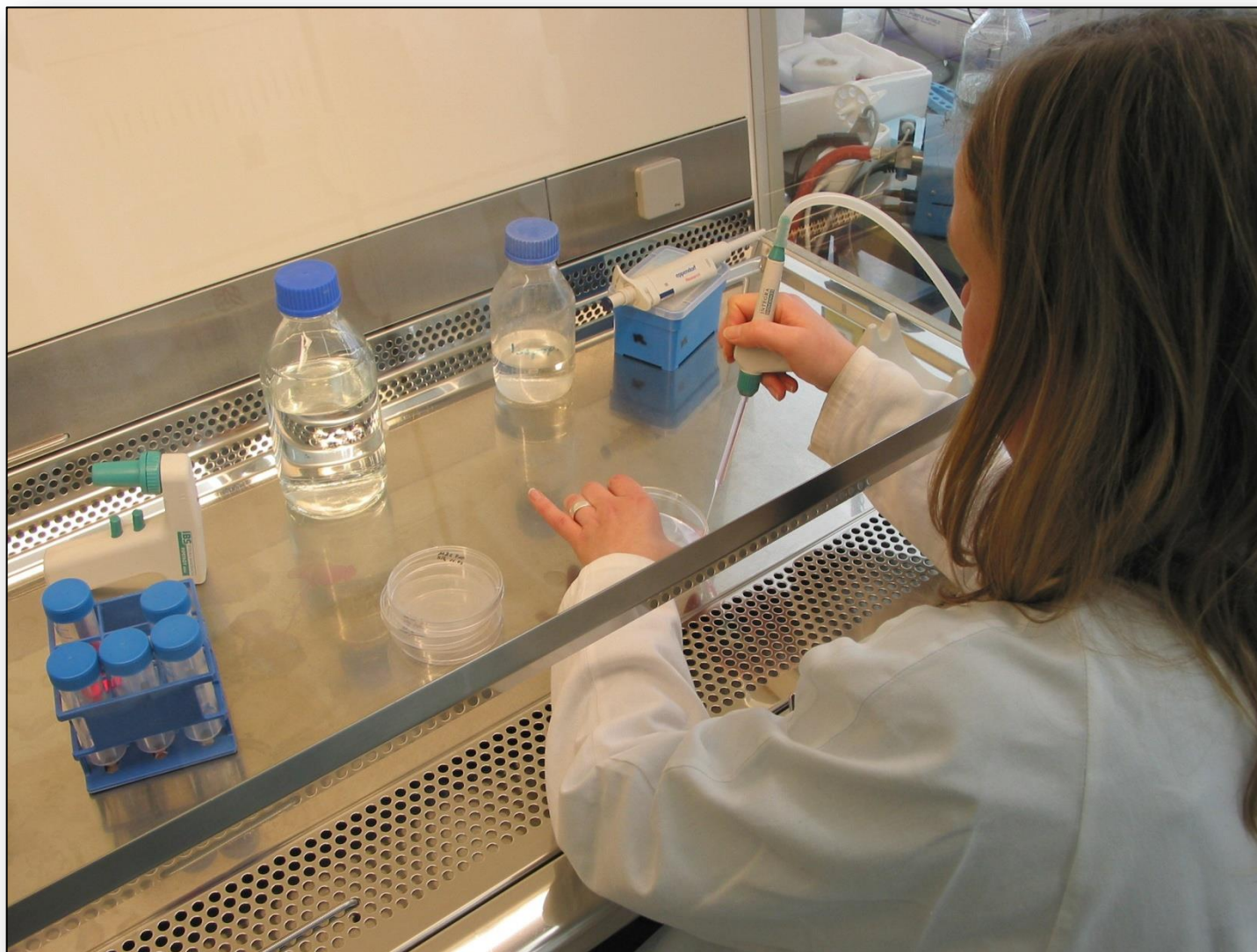
vertikální

## 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)




**DUSTIN HOFFMAN**

**RENE RUSSO**

**MORGAN FREEMAN**

This animal carries a deadly virus... and the greatest medical crisis in the world is about to happen.

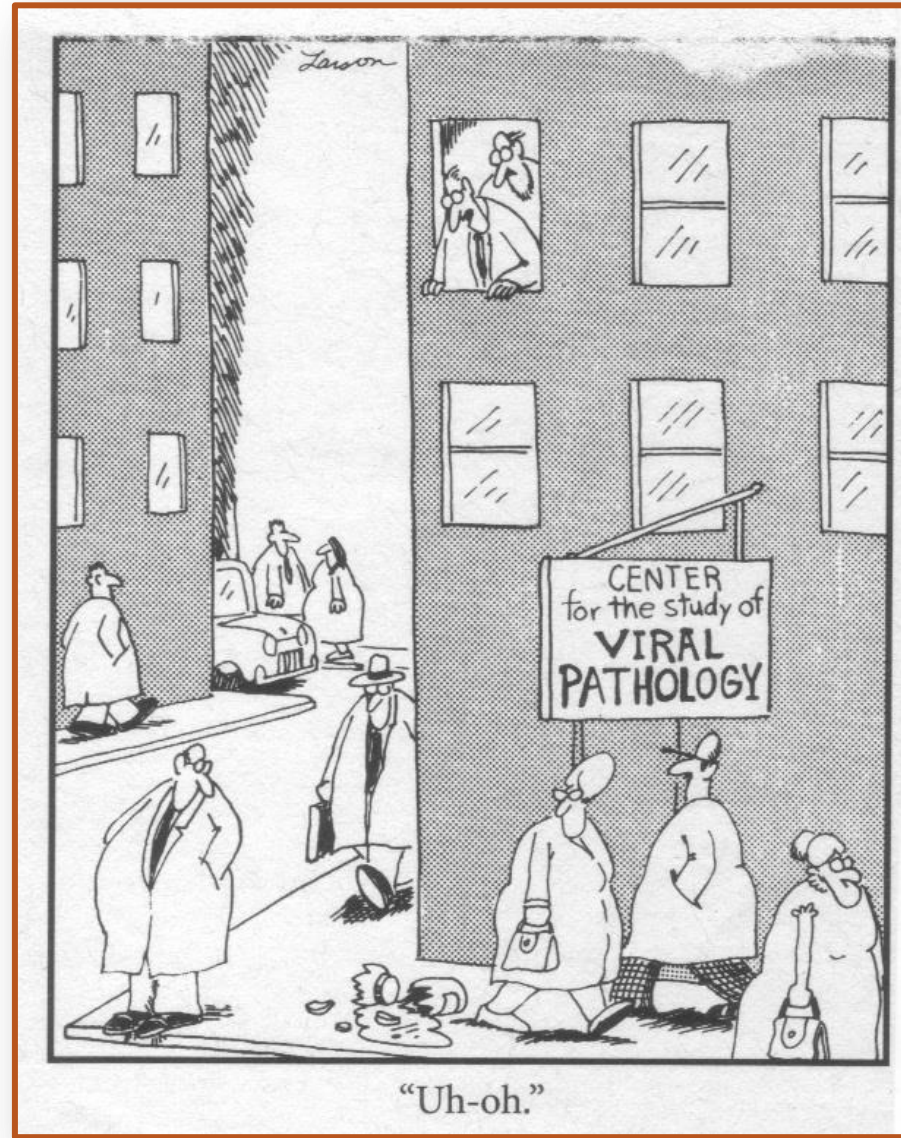


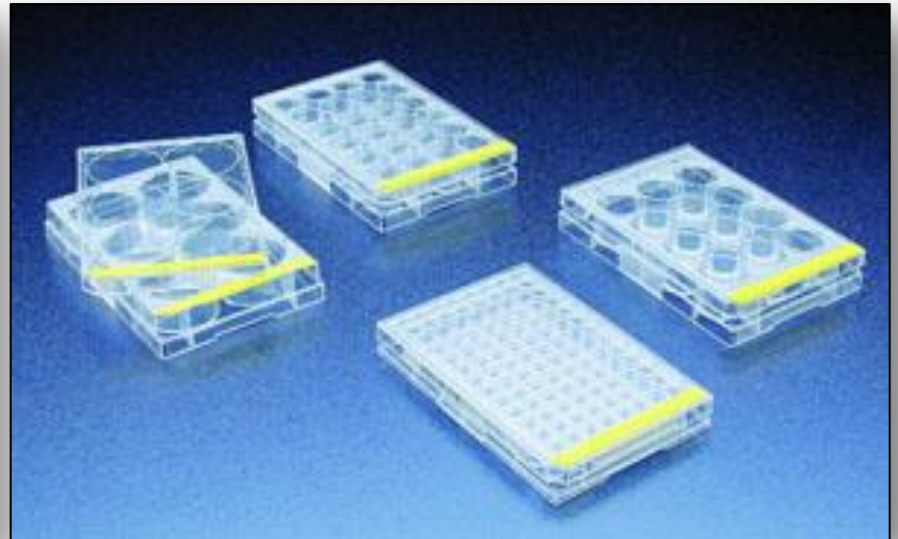
**OUTBREAK**

Try to remain calm.

WARNER BROS. presents  
 Produced by WOLFGANG PETERSEN. Story by ARNOLD KOPELSON, WOLFGANG PETERSEN and CARL ANET. Screenplay by LAURENCE D'ARNEY & ROBERT FRY POOL.  
 Directed by WOLFGANG PETERSEN. Executive Producers: MICHAEL BALLHAUS, J.C.C. Producers: WILLIAM SAMBELL, NEIL TRAVIS, J.C.C. Director of Photography: JONTE KINOWAL, A.C.E. and WILLIAM HEP.  
 Editor: JAMES KEATON HOWARD. Music by DUSTIN HOFFMAN, RENE RUSSO, MORGAN FREEMAN, SARA COOKING, JR., FRANK DEMPSEY and DONALD SUTHERLAND. Executive Producers: JAMES KEATON HOWARD, DUSTIN HOFFMAN, RENE RUSSO, MORGAN FREEMAN, SARA COOKING, JR., FRANK DEMPSEY and DONALD SUTHERLAND. Executive Producer: KEVIN SPACEY.  
 Produced by ARNOLD KOPELSON. Produced in Association with PUNCH PRODUCTIONS, INC. A WOLFGANG PETERSEN Film.







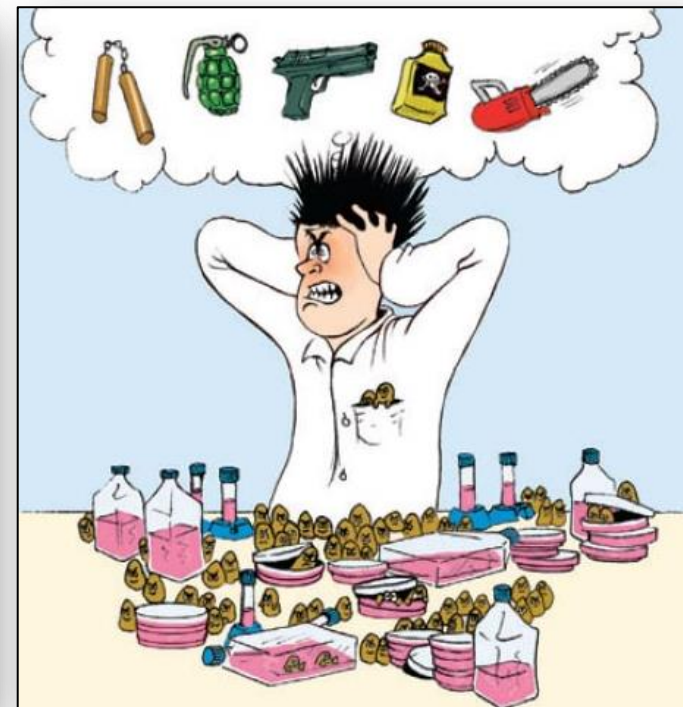
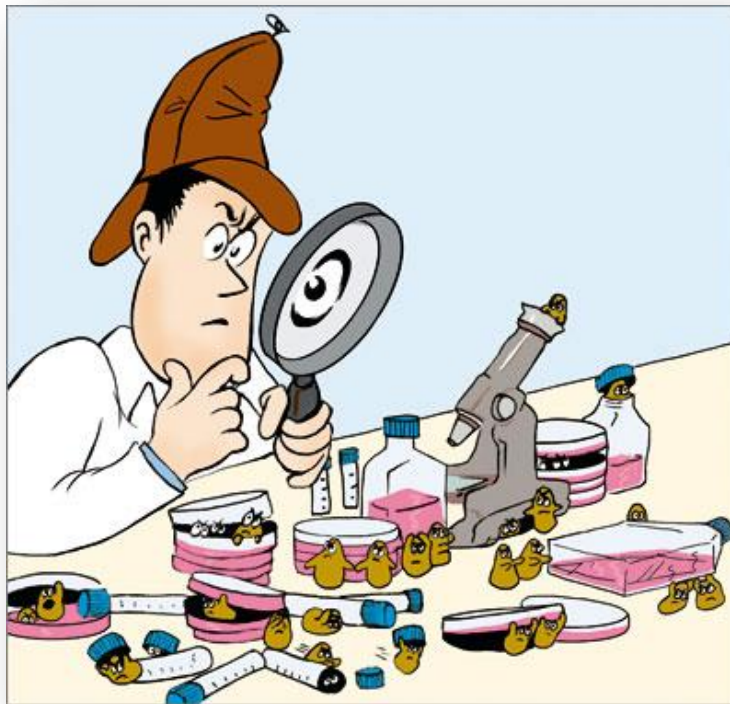
(Treated for cell culture)



## Cell factories

## Typy kontaminací

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

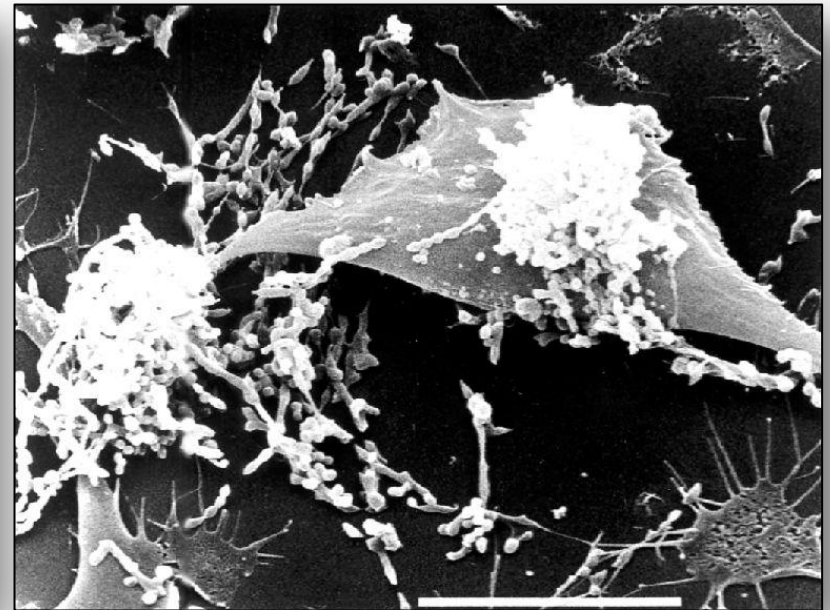
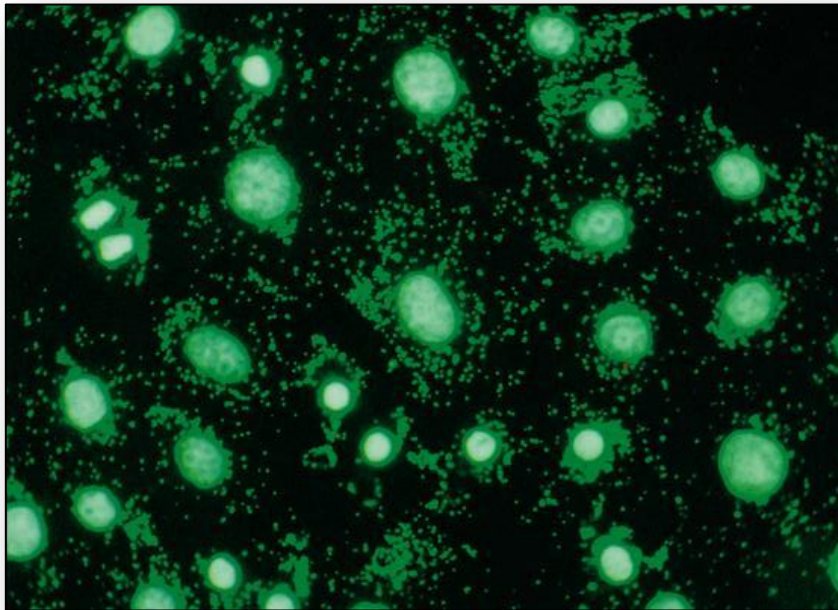
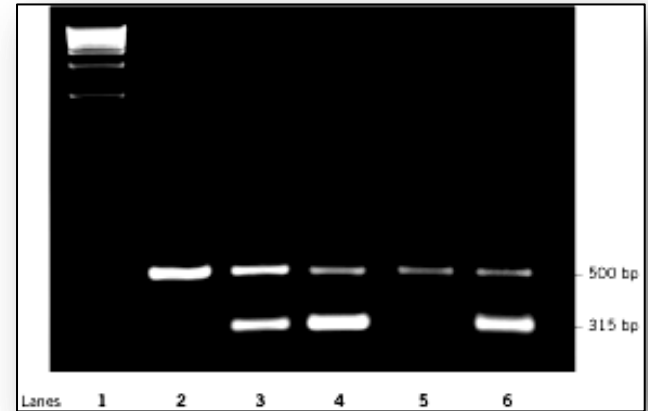




## Kontaminace – mykoplazmata

### Detekce mykoplazmat:

- fluorescenční mikroskopie  
(značení DNA)
- PCR – specifické primery



## Autentizace linií

### Profil STR (short tandem repeats):

- srovnání se sbírkou nebo jiným vzorkem

293 [HEK-293] (ATCC<sup>®</sup> CRL-1573<sup>™</sup>)

Organism: *Homo sapiens, human* / Tissue: *embryonic kidney* /

GENERAL INFORMATION

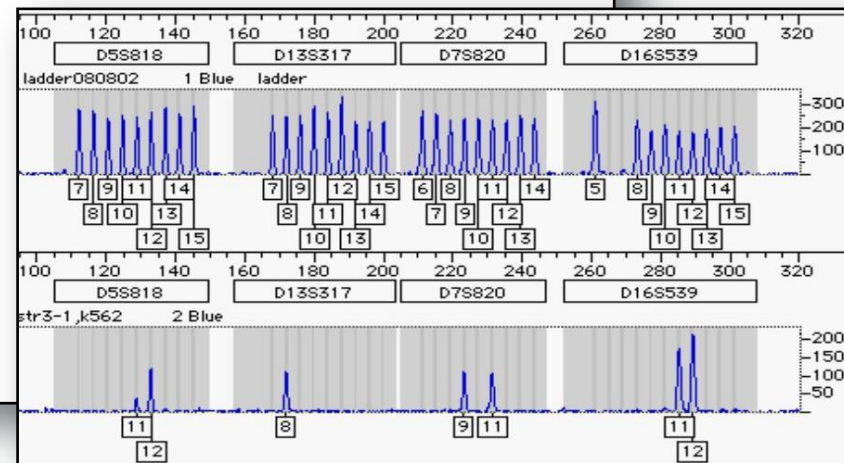
CHARACTERISTICS

CULTURE METHOD

SPECIFICATIONS

#### STR Profile

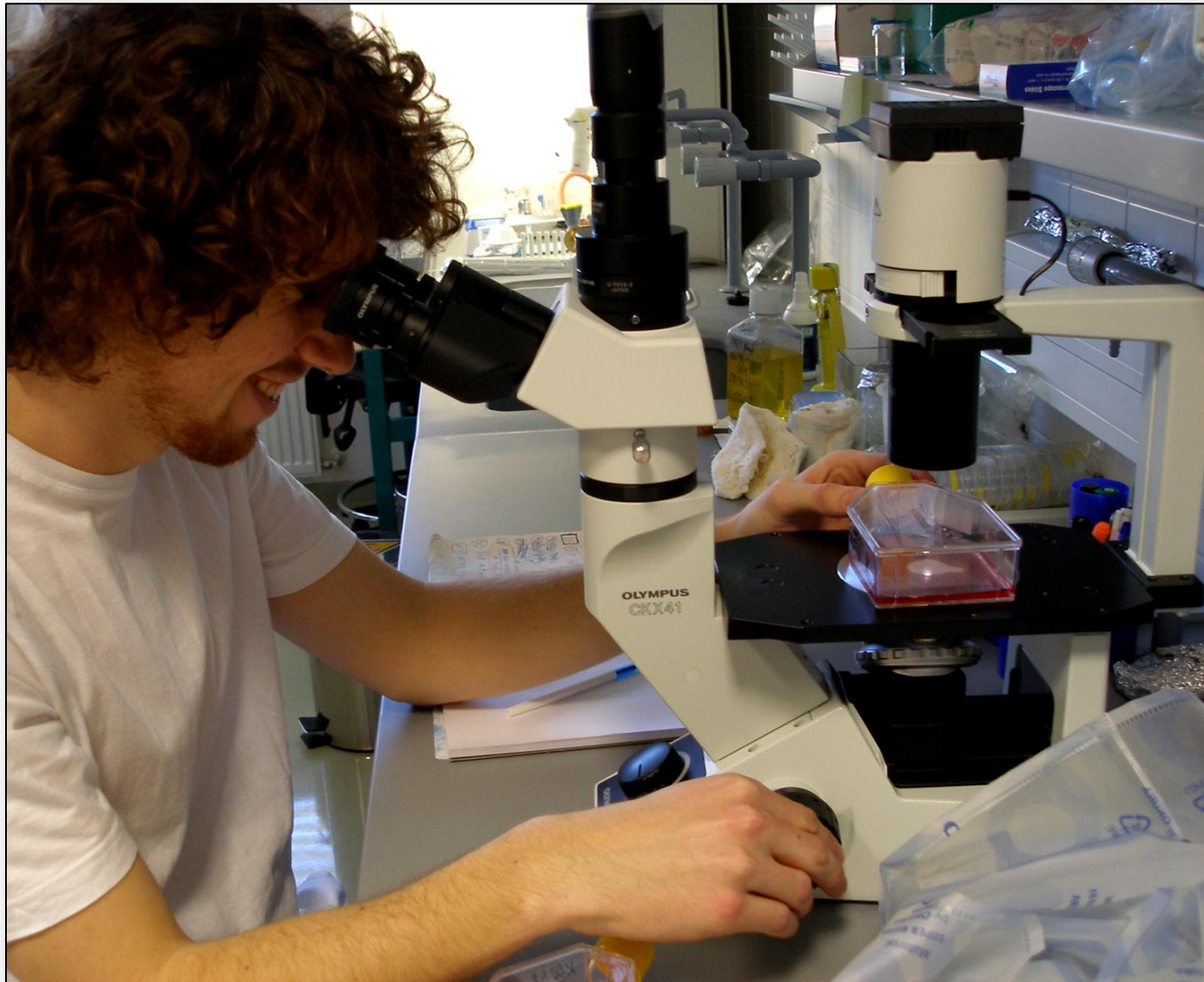
Amelogenin: X  
 CSF1PO: 11,12  
 D13S317: 12,14  
 D16S539: 9,13  
 D5S818: 8,9  
 D7S820: 11,12  
 THO1: 7,9.3  
 TPOX: 11



# KULTIVAČNÍ POSTUPY



invertovaný mikroskop



## 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)

## 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 / EDTA/ accutase)
- 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)**

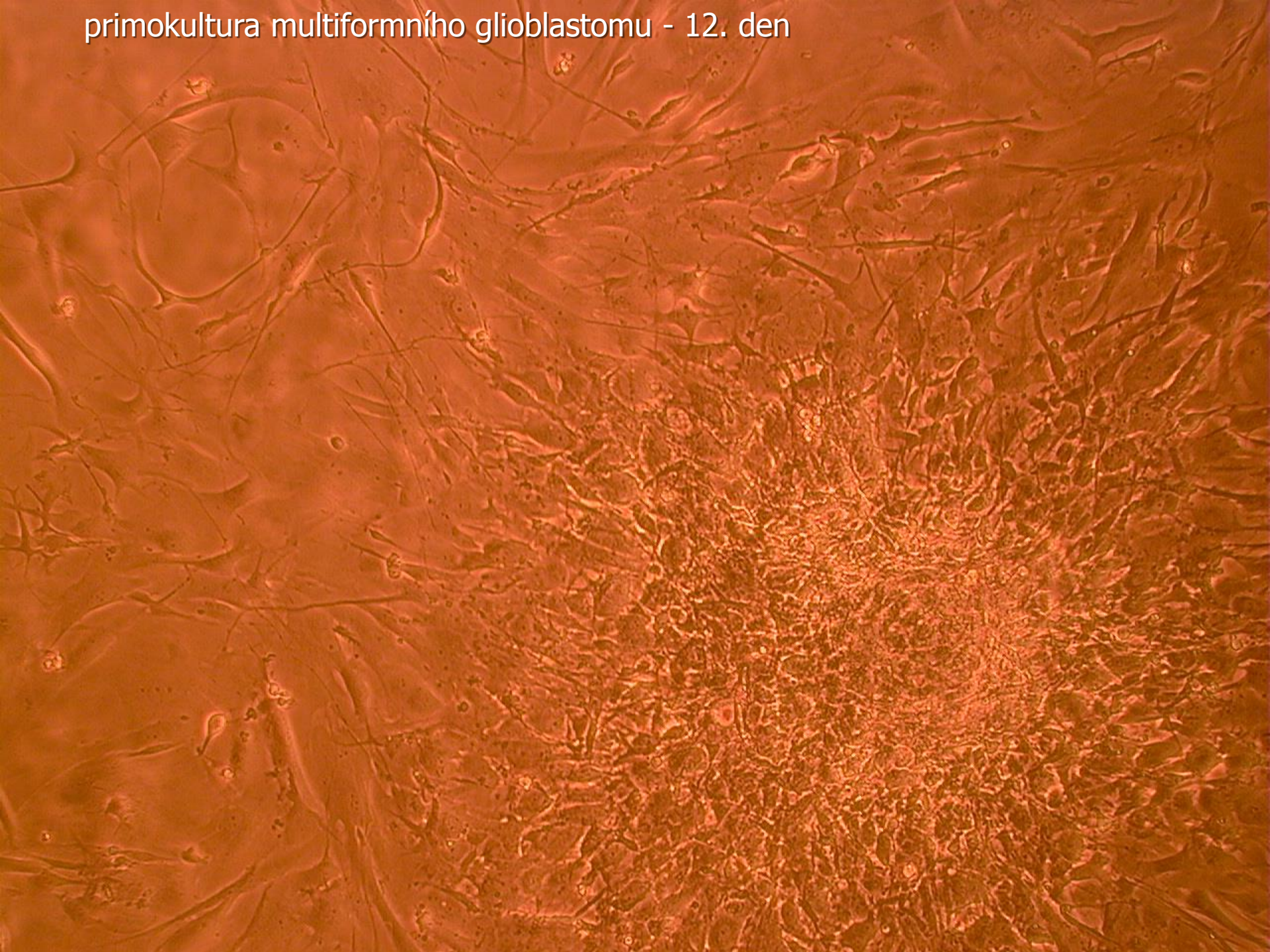
# TKÁŇOVÉ KULTURY / CELL CULTURES

- 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  
→ primární buňky, primární linie

primokultura multiformního glioblastomu - 5. den



primokultura multifornního glioblastomu - 12. den



primokultura multiformního glioblastomu - 12. den



## Buněčná linie

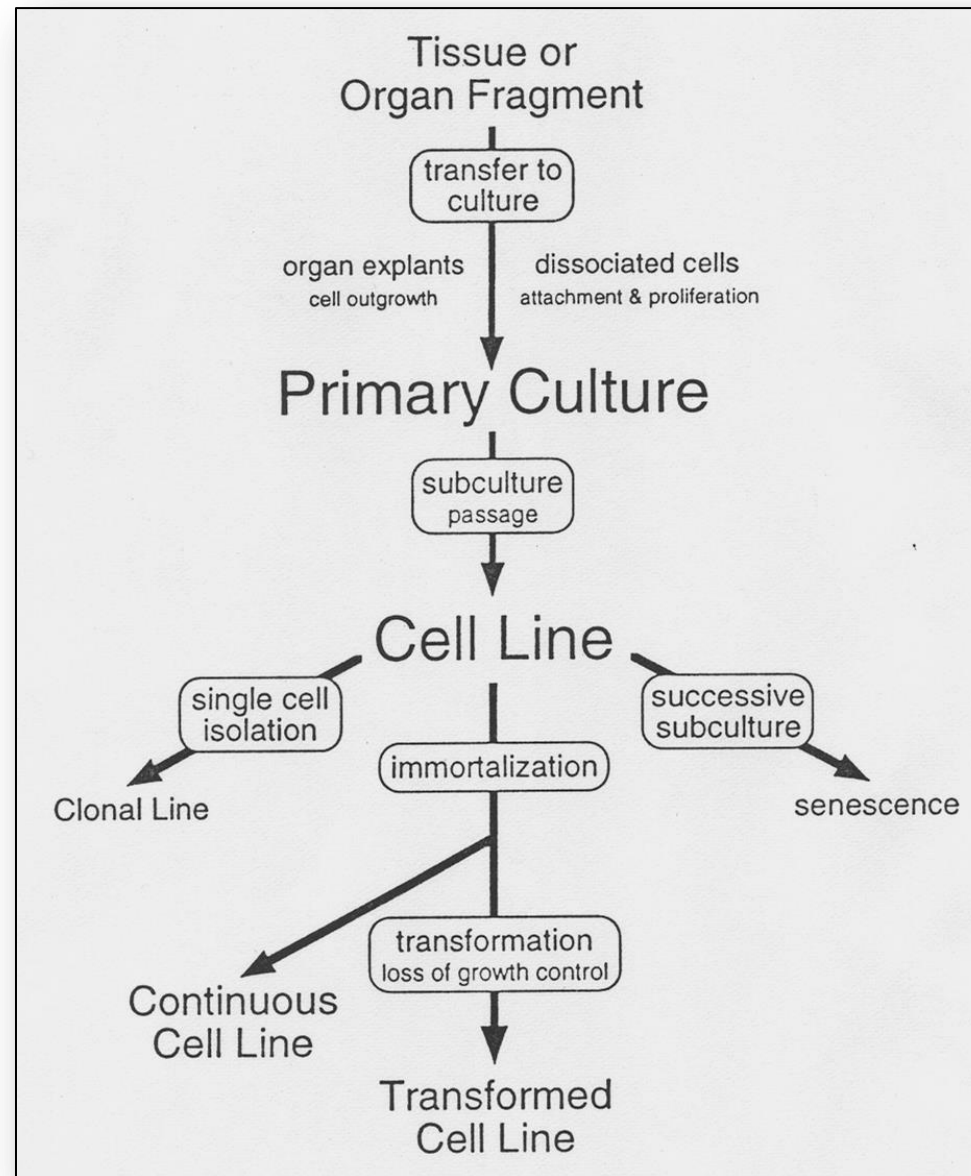
- populace buněk odvozená z primokultury při první pasáži a dále udržovaná v podmínkách *in vitro* (pasáž = přenos buněk z jedné kultivační nádoby do nádoby nové)
- **diploidní** (normální nenádorové buňky)
- **stabilizovaná** (nádorově transformované buňky)
- charakterizace buněčné linie:  
označení (název), druh organismu, pohlaví, věk, výchozí orgán, typ kultury, počet pasáží, růstové parametry, morfologie, karyotyp, markery

## Buněčný kmen

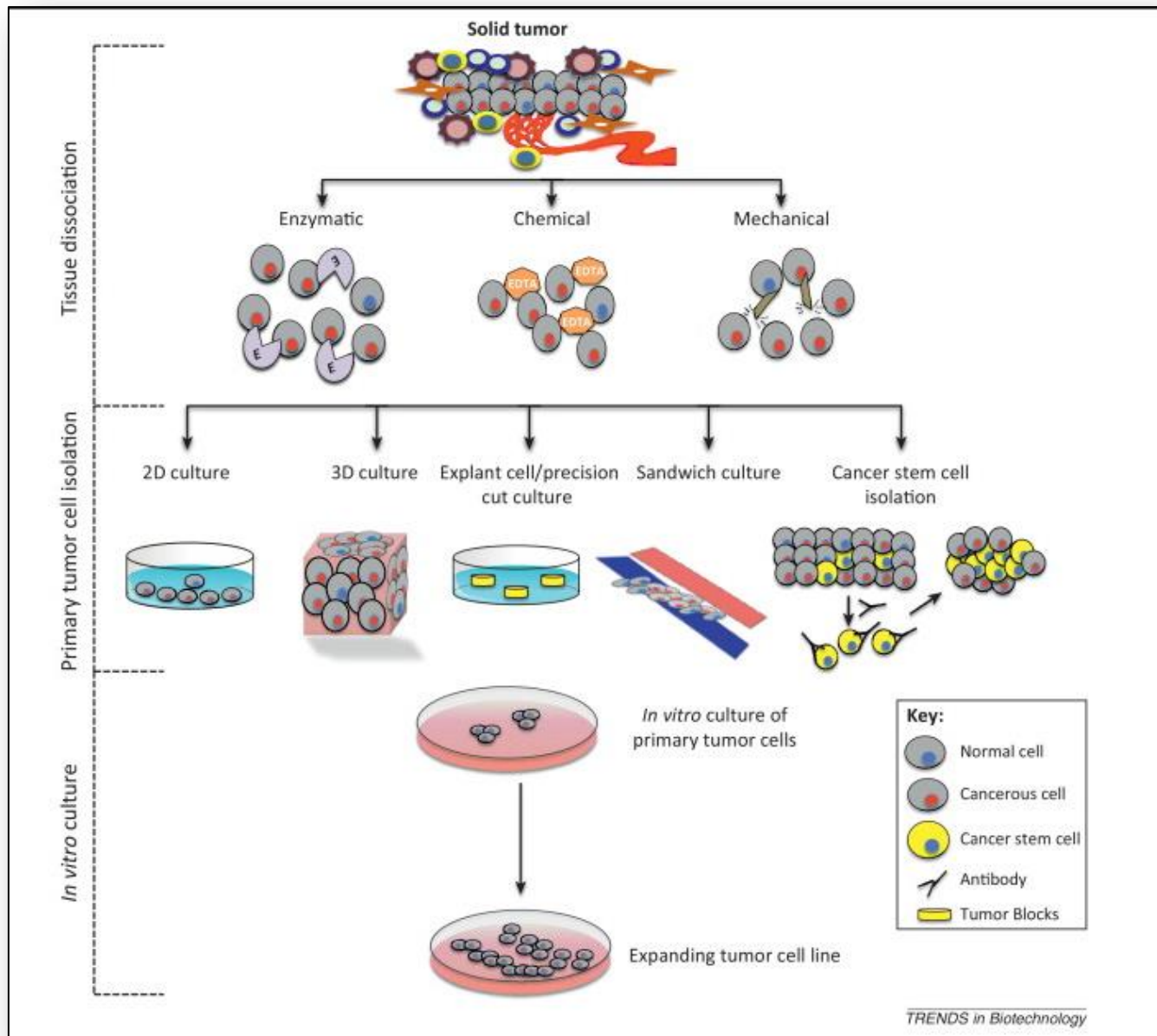
- buněčná populace, získaná subkultivací z původní linie - vyselektována na základě exprese určitého znaku

## 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



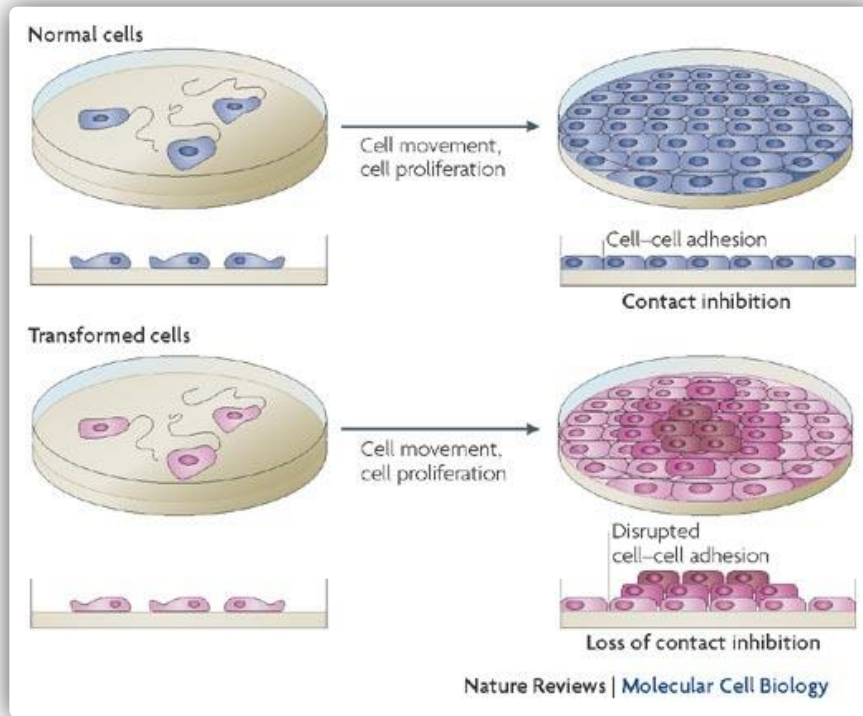




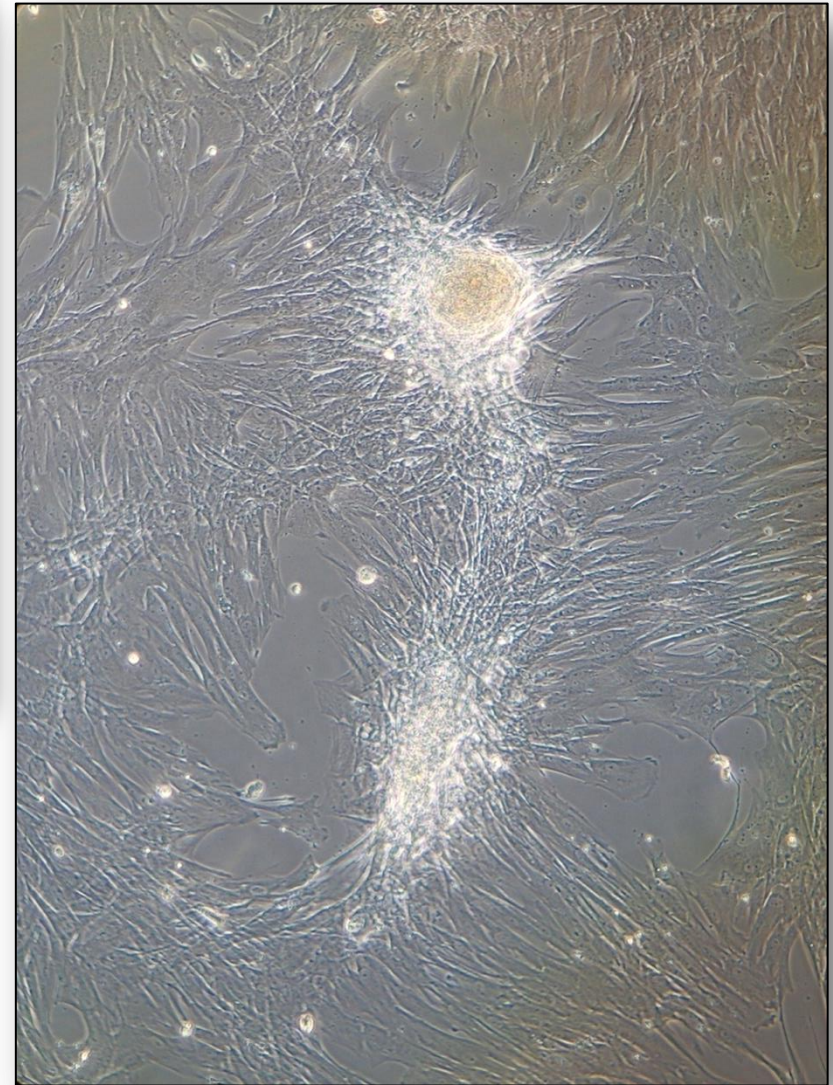
# **NORMÁLNÍ A TRANSFORMOVANÉ BUNĚČNÉ LINIE**

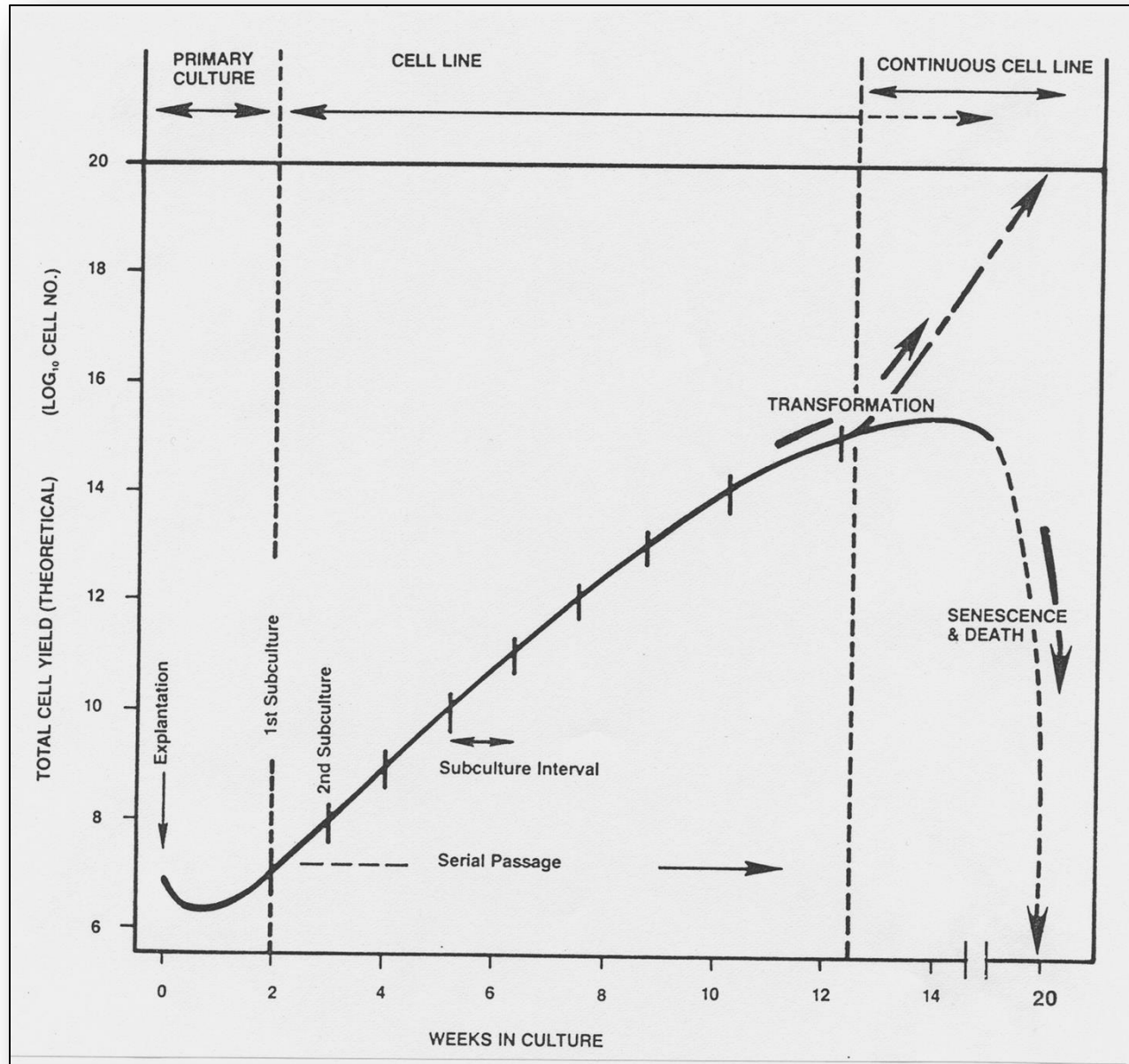
## Růstové parametry buněčných linií:

- **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





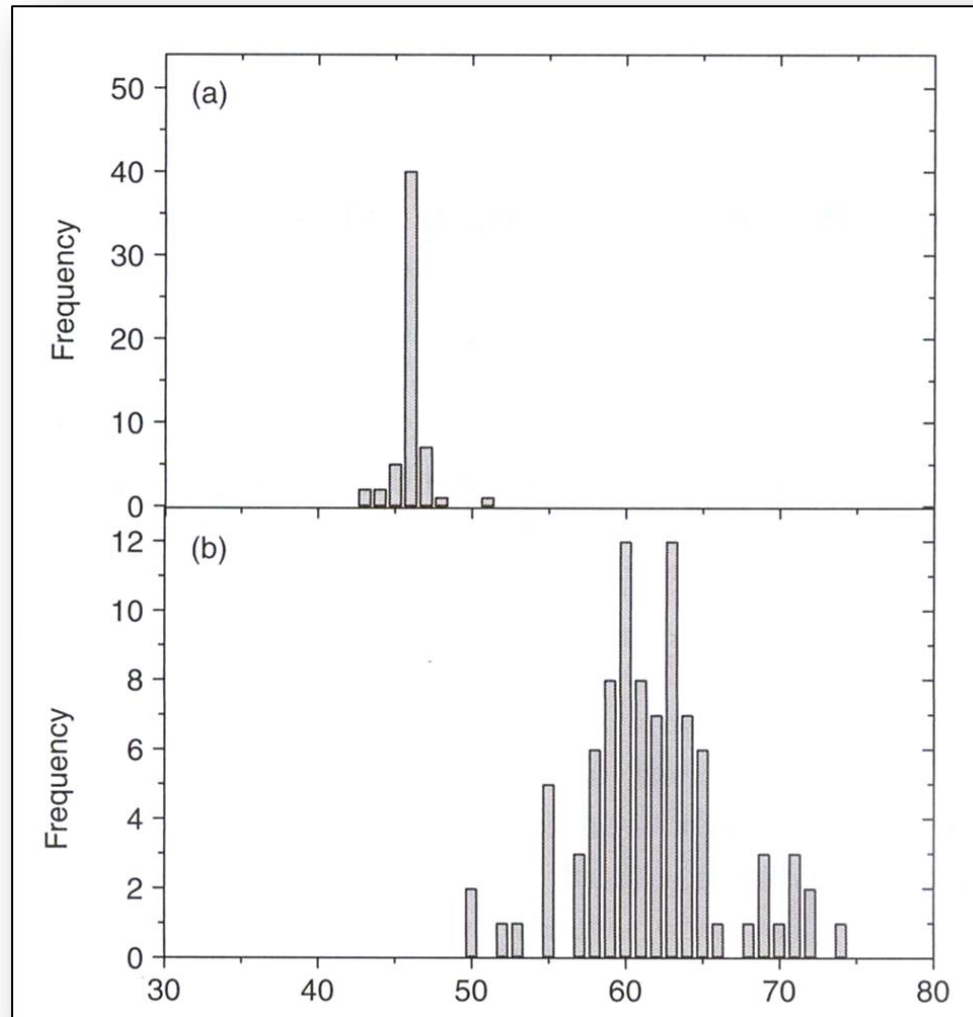
## Diploidní buněčné linie:

- normální nenádorové buňky
- omezená délka života *in vitro*
- standardní karyotyp (diploidní)
- obvykle anchorage-dependent (vyžadují podklad k přichycení = náhrada ECM)
- 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



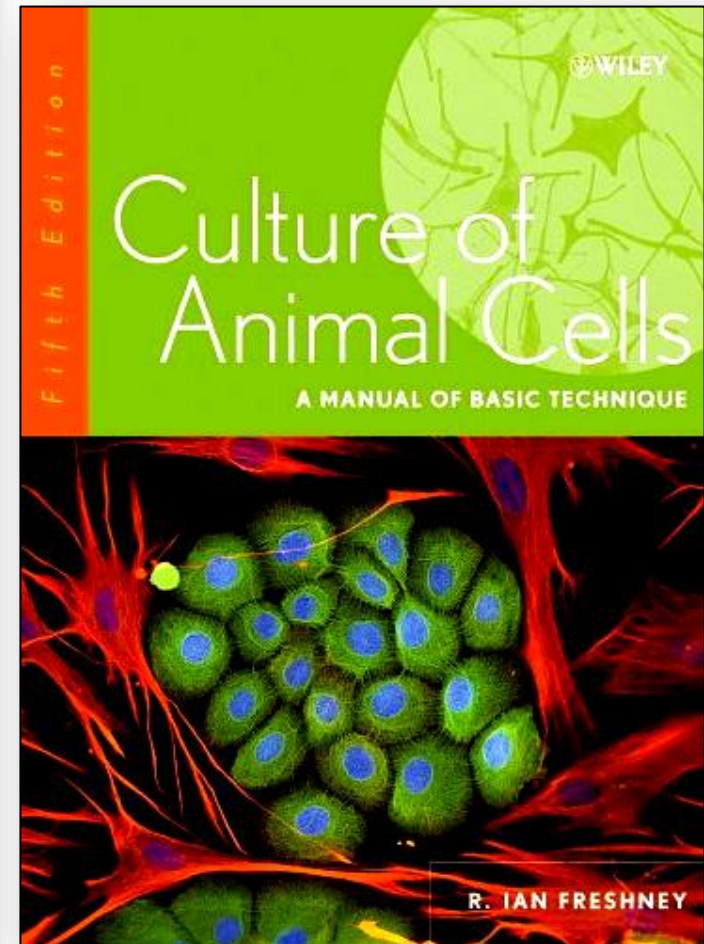
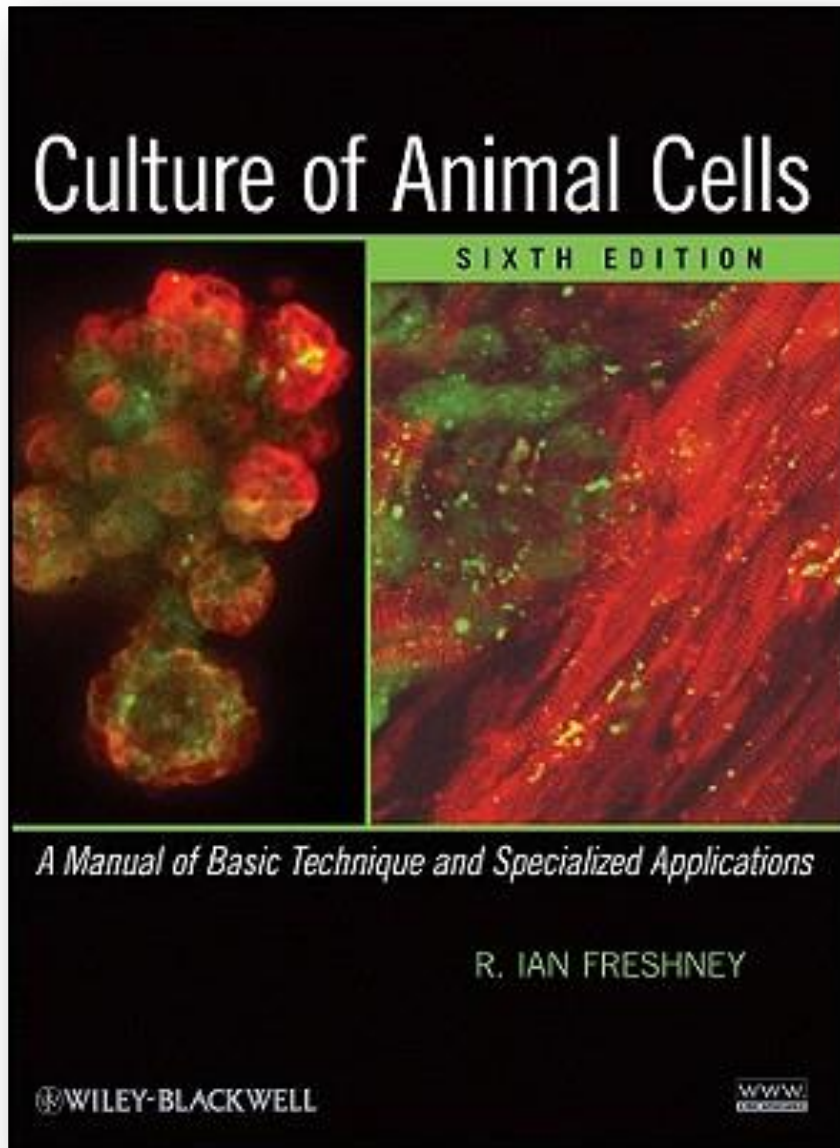
normální buňky  
(gliové buňky)

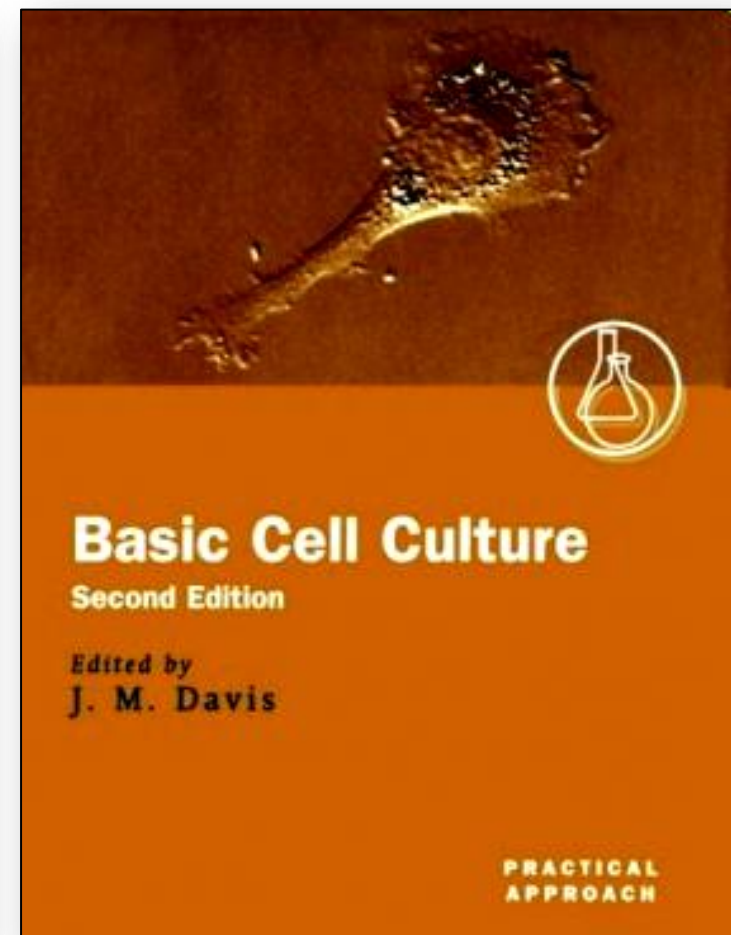
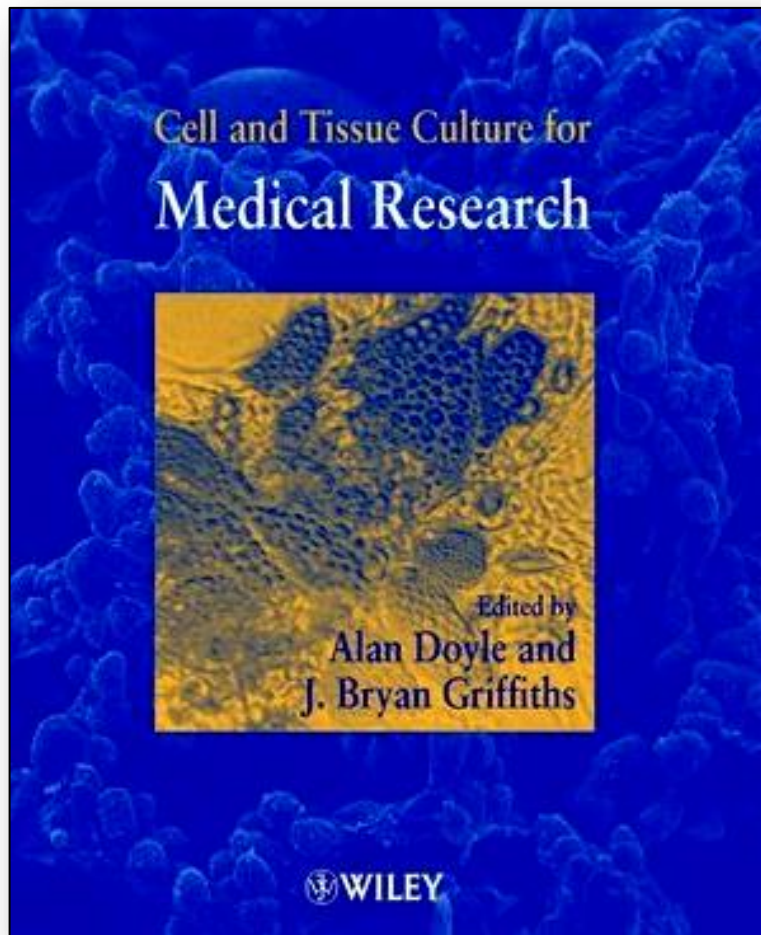
transformované buňky  
(maligní melanom)

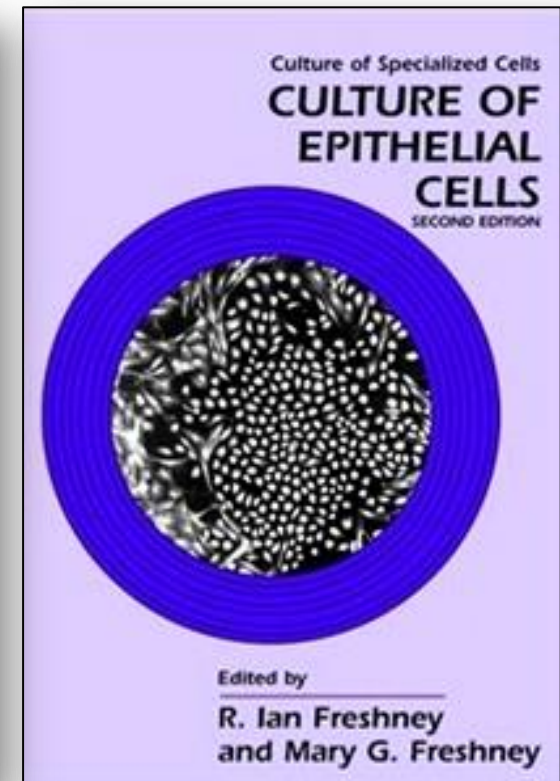
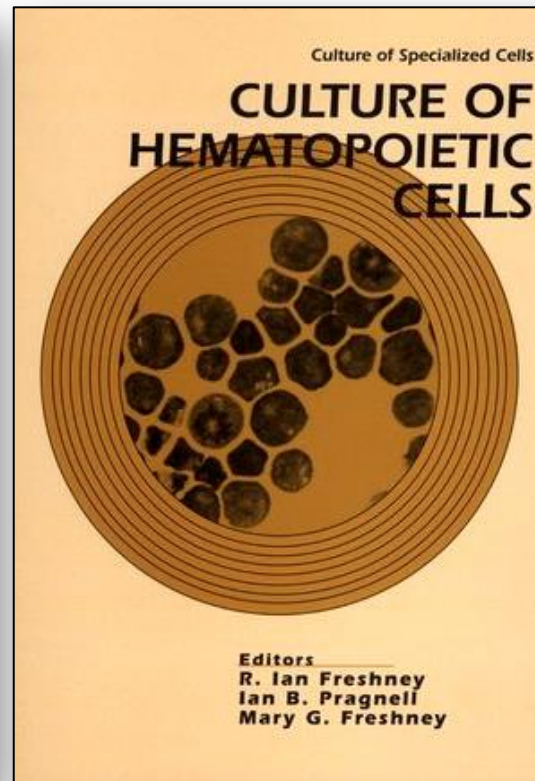
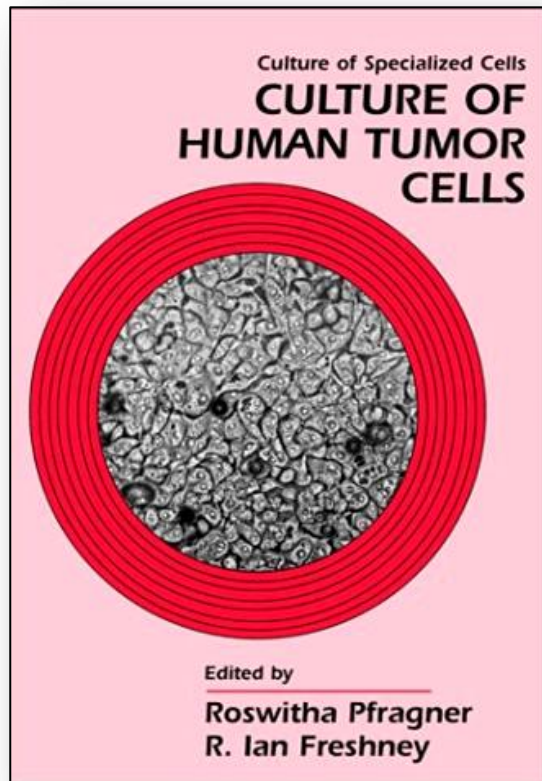


# PRAKTICKÉ APLIKACE

- **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)
- **regenerativní medicína** (příprava buněčných a tkáňových derivátů)







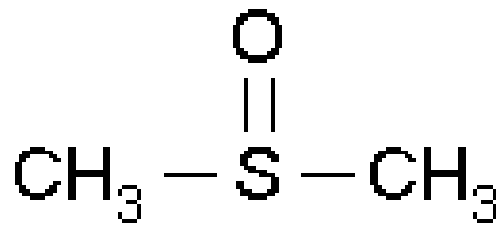
**KRYOKONZERVACE,  
ARCHIVACE,  
SBÍRKOVÁ PRACOVNÍŠTĚ**

## Kryokonzervace živočišných buněk

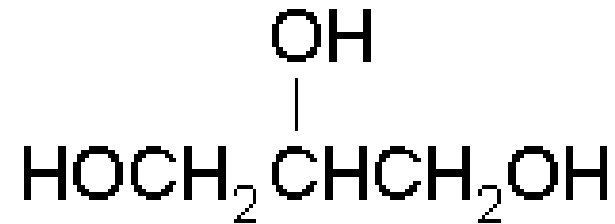
- kultura v exponenciální fázi růstu
- po trypsinizaci resuspendování v zamrazovací směsi: 90% sérum (FCS) + 10% kryoprotektivum (DMSO, glycerol)
- **dvoustupňové zamrazování:**
  - "pomalý krok" (optimální pokles o 1°C za minutu)
  - "rychlý krok" (přemístění kryoampulí z -80°C do -150°C (hlubokomrazicí 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:



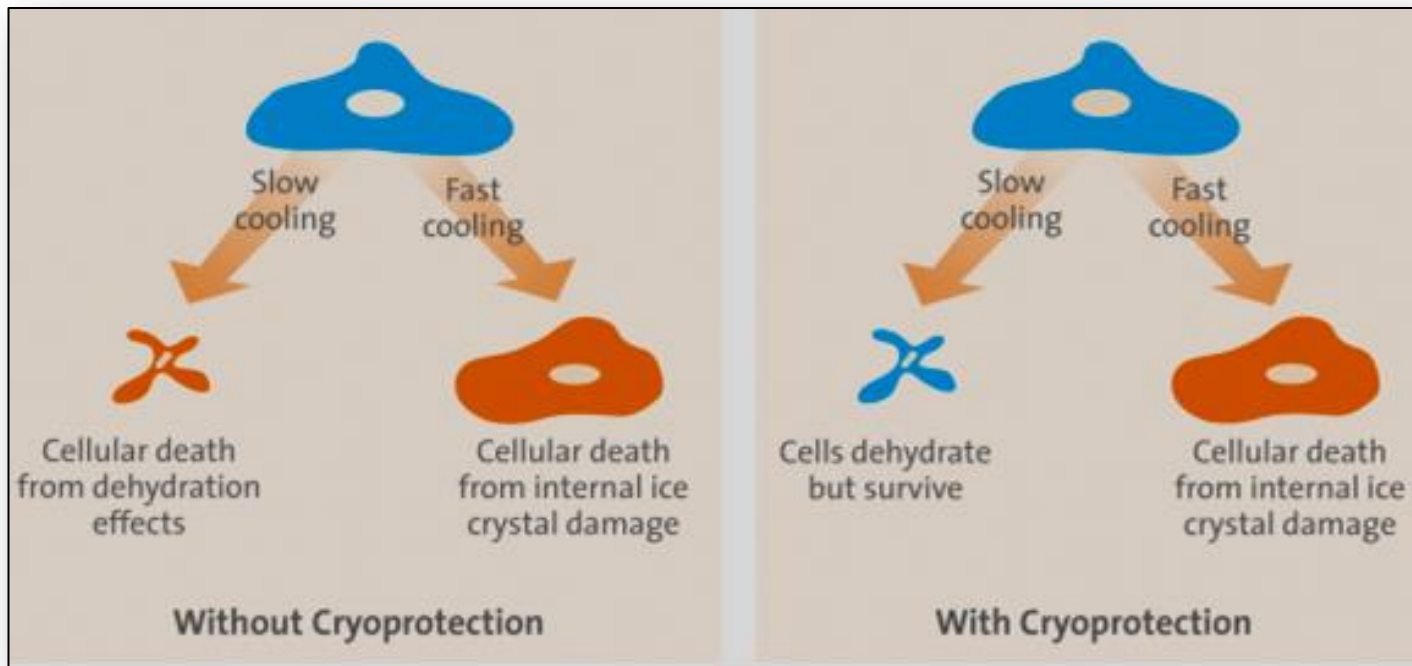
**dimethylsulfoxid  
(DMSO)**



**glycerol**



## Vliv rychlosti zamražování na přežití buněk:



# American Type Culture Collection (ATCC)

[Login](#) | [Create a Profile](#) | [Quick Order](#) | [🛒 \(0\)](#) | [Czech Republic](#) | [EUR €](#) | [1.800.638.6597](#)

**ATCC** | IN PARTNERSHIP WITH LGC STANDARDS

Search by Keyword or Catalog No.  [Q](#) [Advanced Search](#)

[Products](#) [Services](#) [Standards](#) [Resources](#) [Customer Support](#) [About](#)

## Biorepository Services<sup>SM</sup>

- New, streamlined deposit process
- Revenue sharing opportunities
- Global distribution & cold chain supply

[Learn more](#)

[What's New](#) | [PRODUCTS](#) | [WEBINARS](#) | [EVENTS](#) | [PRESS RELEASES](#)

### Cell Biology Research

High performance cells and culture systems to support your research.

### Antimicrobial Resistance

Complete solutions that support multidrug resistance research and drug toxicity studies

<https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-2.aspx>

# European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)



Public Health England

🛒 Your Cart 0 Items

Search

Home
Products
Services
Technical Support
Ordering
Contact Us
Quality
News
About Us

PHE Website

## Culture Collections

You are here: [Home](#) > [Collections](#) > [European Collection of Authenticated Cell Cultures \(ECACC\)](#)

**Menu**

- [About Us - Culture Collections](#)
- [Products](#)
- [Services](#)
- [Technical Support](#)
- [How to Order](#)
- [Glossary](#)
- [Forms](#)

### About ECACC



**ECACC**  
European Collection of Authenticated Cell Cultures  
Operated by Public Health England

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

ECACC was established in 1985 as a cell culture collection to service the research community and provide an International Depository Authority recognised patent depository for Europe. Over the last 30 years ECACC has expanded and diversified to become one of the premier collections of authenticated cell cultures in the world and this remains the core of ECACC's business. The collections currently hold over 40,000 cell lines representing 45 different species, 50 tissue types, 300 HLA types, 450 monoclonal antibodies and at least 800 genetic disorders.

The development and maintenance of such a diverse collection has inevitably produced a high level of specialist knowledge and this, combined with the support of Public Health England, has enabled ECACC to position itself as a centre of expertise in all aspects of cell culture. ECACC has developed a comprehensive range of cell culture services and diversified into new product areas such as high quality genomic DNA extracted from cell lines.

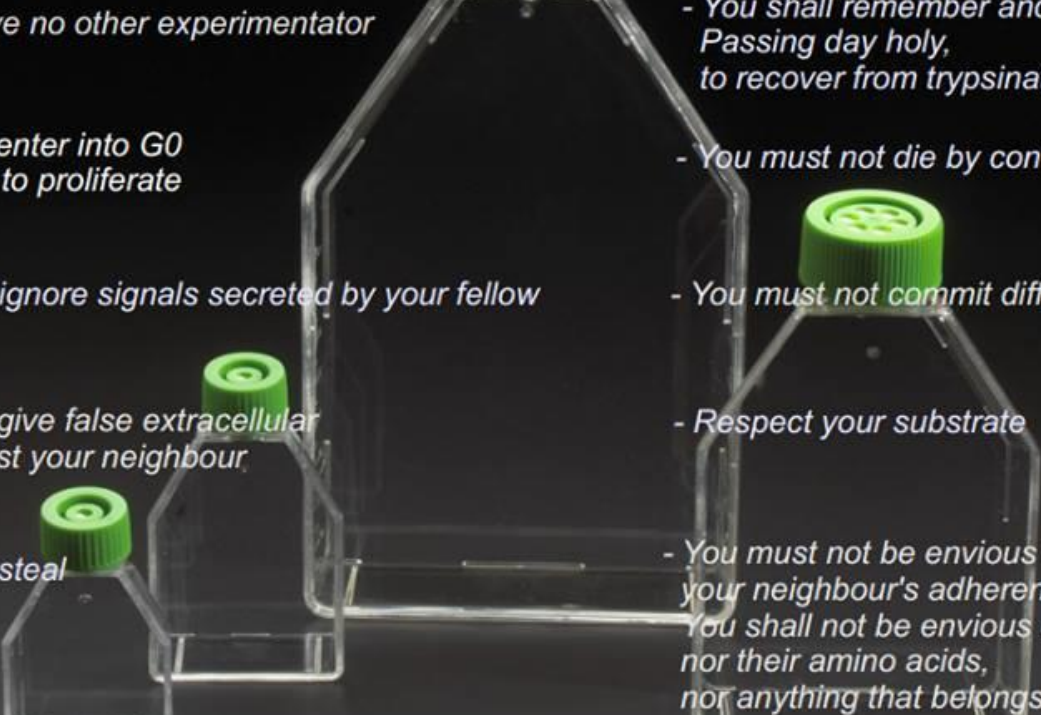


**Related Links**

- [ECACC Home](#)
- [Browse cell lines](#)
- [Search cell lines](#)
- [New cell lines](#)
- [ECACC News](#)
- [Culture Collections News](#)
- [Cell culture training courses](#)
- [Cell culture laboratory handbook](#)
- [Cell culture videos](#)
- [ECACC brochure](#)
- [ICLAC](#)

[https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=93021013&collection=ecacc\\_gc](https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=93021013&collection=ecacc_gc)

## The 10 Commandments of cell culture :

- 
- *You shall have no other experimentator but me*
  - *You shall not enter into G0 and continue to proliferate*
  - *You shall not ignore signals secreted by your fellow*
  - *You must not give false extracellular signals against your neighbour.*
  - *You must not steal*
  - *You shall remember and keep the Passing day holy, to recover from trypsination*
  - *You must not die by contamination*
  - *You must not commit differentiation*
  - *Respect your substrate*
  - *You must not be envious of your neighbour's adherence. You shall not be envious of their sugars nor their amino acids, nor anything that belongs to your neighbour*