

## Buněčné a tkáňové kultury (Mgr. Jiří Štika, PhD.)

Buněčné a tkáňové kultury	1
1 Historie	2
2 Využití tkáňových kultur	3
3 Základní informace a pojmy	3
4 Poznámky ke kultivaci jednotlivých buněčných typů	4
5 Popis nové buněčné linie	4
6 Vybavení laboratoře	4
6.1 Laminární box	4
6.2 Termostat s CO <sub>2</sub>	4
6.3 Hemocytometr	4
6.4 Inverzní (objektivy zespodu) mikroskop	4
6.5 Centrifuga	4
6.6 Lednička, mrazicí box	5
6.7 Vodní lázeň	5
6.8 Příslušenství	5
7 Pomocné laboratoře	5
7.1 Přípravna	5
7.2 Umyvárna	5
7.3 Sterilizační místnost	5
7.4 Tkáňová banka	5
8 Média	5
8.1 Základní složky média	5
8.2 Voda	5
8.3 Solné roztoky	5
8.4 Další složky médií	6
8.5 Pufrční systémy	6
8.6 Sérum	6
9 Základní metodika	6
9.1 Pasážování (přenesení b. do čerstvého média, určitý počet po určité době)	6
9.2 Uchovávání	7
9.3 Přeprava	7
9.4 Dezinfekce a sterilizace	7
9.4.1 Vlhké teplo	7
9.4.1.1 Autoklávování	7
9.4.1.2 Var	7
9.4.1.3 Pasterizace	8
9.4.2 Suché teplo	8
9.4.2.1 Sterilizace v plameni	8
9.4.2.2 Sterilizace v horkovzdušných troubách	8
9.4.3 Záření	8
9.4.3.1 UV záření	8
9.4.3.2 Gama záření	8
9.4.4 Plynná alkylační činidla	9
9.4.4.1 Etylén oxid	9
9.4.4.2 Plynný formaldehyd	9
9.4.5 Sterilizační roztoky	9
9.4.5.1 Aldehydy	9
9.4.5.2 Prostředky na bázi chloru	9
9.4.5.3 Fenoly	9
9.4.5.4 Alkohol	9
9.4.5.5 Další sterilizační roztoky	9
9.4.6 Filtrace	9
9.5 Detekce kontaminace	10
9.6 Detekce proliferace	11
9.6.1 V populaci	11
9.6.2 U jednotlivých buněk	11

9.6.3 Detekce antigenů spojených s proliferací a buněčným cyklem .....	11
9.7 Viabilita .....	11
9.8 Buněčný cyklus .....	11
9.9 Použití antibiotik (vhodnější je možná termín antimikrobní látky) .....	12
10 Speciální metody .....	13
10.1 Synchronizace buněk .....	13
10.2 Současná kultivace více buněčných typů .....	14
10.3 Klonování .....	14
10.3.1 Metoda limitního ředění .....	15
10.3.2 „Tečkování“ .....	15
10.3.3 Mikromanipulace .....	15
10.3.4 Využití sortovacího zařízení připojeného k flowcytometru .....	15
10.3.3 Využití kroužků .....	15
10.3.6 Využití misek s fólií .....	16
10.3.7 Využití média s vysokou viskozitou .....	16
10.4 Genová amplifikace .....	16
10.5 Vpravení cizorodých molekul do buňky .....	16
10.5.1 Mikroinjekce .....	16
10.5.2 Metody využívající narušení cytoplazmatické membrány .....	16
10.5.3 Biolistika .....	16
10.5.4 Virové obaly .....	17
10.5.5 Lipofekce .....	17
10.5.6 Dextran .....	17
10.5.5 Fosforečnan vápenatý .....	17
10.6 Příprava transgenních zvířat .....	17
11 Bezpečnost .....	17

## 1 Historie

1885 - udržoval Willhelm Roux embryonální kuřecí buňky naživu v solném roztoku.

Koncem 19 stol. byla zavedena v zemědělství metoda uchovávání semene dobytka ve zmraženém stavu.

1907 – Ross Harrison izoloval části žabí embryonální tkáň a pozoroval po dobu několika hodin růst axonu z embryonální buňky in vitro. Prokázal tak, že nervové vlákno je výrůstek jedné nervové buňky.

1912 – Alexis Carrel kultivuje déle jak 2 měsíce buňky konektivní tkáň a pozoruje kontrakci srdeční svaloviny in vitro.

1916 - Rous a Jones ošetřují b. trypsinem - první zpráva o pasážování. Po dlouhou dobu se dařilo pěstovat pouze velké části excizovaných tkání, které musely být implantovány na sérové podloží, sraženinu krevní plazmy nebo na extrakty embrií.

1929 Alexander Fleming objevil penicilin.

1935 Gerhard Domagk objevil sulfonamidy (první antibiotika používaná v terapii).

1940 Earle: první kontinuálně kultivovaná linie z konektivní tkáňe myši (subklonem těchto buněk jsou dnešní buňky L929).

1949 Alan Parks zavedl protokol pro uchování buněk v tekutém dusíku.

1949 Bylo zjištěno, že poliovirus (původce dětské obrny) může růst v kultuře lidských buněk. Toto zjištění umožnilo přípravu polio vakcíny. Polio vakcína připravená z deaktivovaného viru byla jedním z prvních komerčních produktů kultivovaných živočišných buněk. K přípravě virových vakcín se tkáňové kulturní kultury používají dodnes,

1952 - George Gey: první lidské b. kontinuálně pěstované v kultuře byly HeLa (buňky z nádoru děložního čípku ženy, které mají 70-80 chromozómů; lidské buňky mají běžně 46 chromozómů), médiem bylo složené z krevní plazmy, extraktů hovězích embrií a séra lidské placentární šňůry (do té doby se předpokládalo, že nádorové buňky nelze kultivovat, ukázalo se však, že naopak rostou rychleji a jsou méně náročné na vnější podmínky).

1954 – Michael Abercrombie a Joan Heaysman pozorovali kontaktní inhibici u fibroblastů.

1955 zjistil Eagle, že lze pěstovat HeLa b. v definovaném médiu pouze s 1% dialyzovaného koňského séra. čímž se dramaticky snížil obsah nedefinovaných složek v kultivační směsi. Dále zjistil, že viry jsou schopné růst na HeLa b. i při úplné absenci séra, tento výsledek nasvědčoval tomu, že bude možné produkovat vakcínu tvořenou oslabenými viriony bez nežádoucích sérových proteinů.

1958 Gao (Čína, z bource morušového) a 1961 (nezávisle na něm Grace Austrálie z Antherea eucalypti - druh australského martináče) připravili první kontinuální hmyzí linii. Grace vyvinul první médium pro kultivaci hmyzích buněk (na bázi hemolymfy), je nazýváno Grace's insect medium.

1961 Leonard Hayflick a Paul Moorhead popsali omezenou délku života nenádorových lidských buněk v kultuře – „Hayflickův limit“.

1962 Buonassisi publikoval metodu dlouhodobé kultivace diferencovaných nádorových buněk.

1965 Ham ukázal, že některé typy buněk lze pěstovat na zcela definovaném médiu bez proteinů.

1968 David Yaffe studoval diferenciaci nenádorových myoblastů in vitro.

Počátek sedmdesátých let – rozvoj kultivace specifických buněčných typů v chemicky definovaných médiích.

V 70 letech byla vyvinuta rekombinantní DNA technologie (exprese savčích genů u bakterií). Výroba buněčných produktů touto cestou je snadnější a levnější, než s využitím živočišných buněk. Brzy se ukázalo, že vlastnosti (např. terapeutické působení) velkých komplexních proteinů jsou závislé na posttranslačních modifikacích (např. glykozilace, fosforylace), kterých nejsou bakteriální buňky schopny, proto byly vytvořeny geneticky upravené živočišné buňky pro masivní komerční výrobu terapeuticky účinných produktů. Často jsou pro tyto účely využívány CHO (Chinese Hamster /křečík čínský = *Cricetulus griseus*/ Ovary) buňky. Tyto buňky jsou schopné růst přisedle i v suspenzi. Vyšší čistoty tvořeného proteinu je dosahováno použitím média bez živočišných produktů a bez proteinů.

1975 Fúzí dvou nebo více buněk byly připraveny hybridní buňky (hybridomy), které slouží k produkci protilátek, které jsou využívány v diagnostice a terapii chorob.

## 2 Využití tkáňových kultur

Uplatnění v cytofyziologii, cytogenetice, onkologii, imunologii, biochemii, molekulární biologii, virologii, toxikologii, medicíně atd. Prenatální diagnostika (namnožení b. a následná karyotypizace); výzkum (zdroj obrovského množství poznatků, jedna z nejdůležitějších okolností, která umožnila rozvoj biologie, zkoumá se rakovina, signálová transdukcce, možnosti klonování, genetické úpravy, ap.); kosmetika (testy přípravků); farmakologie (testy léčiv); výroba očkovacích látek (virové vakcíny); průmyslová výroba specifických buněčných produktů; kultivace pro transplantace (např. kůže a urothelium).

## 3 Základní informace a pojmy

Buňky metazoi mohou být pěstovány IN VITRO v tkáňových (orgánových) kulturách (výchozím materiálem je fragment orgánu), nebo buněčných kulturách (výchozím materiálem jsou suspenzní b.)

Kultury rozlišujeme: **přisedlé** (na pevném podkladu - sklo, plastik, kolagen; adhezi zprostředkují integriny)  
**suspenzní** (volně v médiu)

Výměna média: **periodicky** (pasážování)  
**kontinuálně** (b. mohou tvořit mnohvrstevnou kulturu)

Primární kultury- nejčastěji odvozeny z kůže, nebo celých embryí. Připraví se rozvolněním čerstvě explantovaných tkání ve vhodném médiu. Nejčastěji se jedná o fibroblasty- buněčný typ, nacházející se v konektivních tkáních všech tělních částí. Primokultury se však nemnoží neomezeně, po určitém počtu dělení (u fibroblastů 50-70 generací) dochází ke změnám (stárnutí) buněk, až zástavě růstu - Hayflickův limit. Příčina tohoto jevu není známa (uvažuje se o tom, že by se na jevu mohlo podílet zkracování telomer), ale zajímavé je, že buňky získané z novorozenců rostou po více generací, než b. ze starších jedinců.

Po prvním pasážování již nemluvíme o primokulturách, ale o buněčné linii. Pasážování znamená přenesení buněk do nové kultivační lahvičky a přidání čerstvého kultivačního média. Buňky z této lahvičky pak označujeme jako pasáž (subkulturu). Buňky po 1. pasážování se označují jako sekundární kultura (1. pasáž).

V průběhu kultivace může dojít k mutaci, která zapříčiní „nesmrtelnost“ buněčné linie (tyto buňky však ještě neztratily kontrolu nad svým růstem) a můžeme tak b. pasážovat neomezeně dlouho. Pokud však získáme buňky přímo z nádoru, případně transformujeme buňky původně nenádorové, či dojde ke spontánní transformaci buněk v průběhu kultivace, vyznačují se tyto b. ztrátou růstové kontroly, vyšší saturační densitou (hustota populace buněk /cm<sup>2</sup>), navíc často získávají schopnost růst, aniž by musely přisednout (pro většinu netransformovaných buněk je přisednutí nutnou podmínkou růstu). Některé transformované buňky jsou tumorogenní (schopné tvořit nádory po přenesení do organismu). TK mohou být heteroploidní i diploidní. U nesmrtelných a transformovaných bun. linií je změněno chromozomální složení (alterace v počtu, ale i morfologii chromozomů). Tudiž b. v kulturách již neodpovídají původním b. ze kterých kultury vznikly.

Nesmíme proto zapomenout, že se jedná o model, který není shodný se situací v organismu. Navíc i když se snažíme b. vytvořit do jisté míry takové prostředí, jaké měly v organismu, přece jen jsou zde jisté odlišnosti: 1. kultivační médium je odlišné od tkáňového moku, 2. b. jsou obklopeny mnohem větším množstvím mimobuněčné tekutiny - tím dochází k vyřetování látek produkovaných b., 3. dochází k selekci b. typů, které byly pod neg. kontrolou organismu a v novém prostředí přerůstají typ původně početnější.

Na druhou stranu nám tento model dává ohromné možnosti uchopení biologických jevů, které by před námi zůstaly v komplexním prostředí organismu utajeny, případně by byly těžko přístupné vědeckému zkoumání. Máme k dispozici rozsáhlé relativně homogenní definované populace buněk a můžeme přesně definovat a snadno ovlivňovat kultivační podmínky.

Rozlišujeme 3 fáze růstu b. v kultuře: **lag** - b. ještě nerostou (u primokultur počet dokonce klesá),

**logaritmická** - log. počtu b. je lineární fce času,

**stacionární** - b. dosahují tzv. saturační density, která je dána kontaktní inhibicí (u nádorových b. většinou chybí - vytvoří další vrstvu, nebo začnou růst suspenzně), dále ji charakterizuje vyčerpání živin, přítomnost inhibitorů růstu, méně vhodné pH.

**Generační doba** - období mezi dvěma mitózami (trvání buněčného cyklu).

**„Doubling time“** - čas, potřebný ke zdvojnásobení počtu buněk v populaci.

**Růstová křivka** - graficky znázorněná závislost počtu buněk na době kultivace.

**Buněčný kmen** je populace buněk selektovaná na základě určitých specifických vlastností.

**Klon** je populace b. vzniklá z jedné buňky.

**Linie transformované teplotně senzitivními onkogeny** - při nižší permissivní teplotě se chovají jako nádorové (32°C), při vyšší jako normální.

#### **4 Poznámky ke kultivaci jednotlivých buněčných typů**

Není známa metoda kultivace buněk jater, svalů, nervů a ledvin.

Epiteliální b. tvoří jednovrstevné kolonie, fibroblasty mohou tvořit až 3 vrstevné kolonie.

V kultuře lze snadněji transformovat a immortalizovat buňky myši než buňky lidské.

#### **5 Popis nové buněčné linie**

Popis nové b. linie, by měl zahrnovat:

1. zda byl vých. org. nádorový, či ne
2. tkáň od dospělého (příp. věk), mláďáte či embrya,
3. druh dárce (pohlaví)
4. druh výchozího orgánu
5. buněčný typ kultury
6. označení linie (zkratka často označuje lab. původu) písmena, čísla
- (7. zda byla linie klonována)

Dobré je když popis obsahuje co nejvíce detailů, např.:

- historie linie
- počet pasáží
- použité médium
- růstové charakteristiky
- morfologie
- karyotyp
- výskyt b. o různém počtu chromozomů v kult.
- zda byli provedeny testy sterility
- zda byl potvrzen původ b. a jakými metodami
- citlivost b. k virům

#### **6 Vybavení laboratoře**

- samostatná laboratoř, neprůchozí místnost (omezení průvanu) vybavená UV zářičem
- používají se přezůvky, laboratorní oděv

##### **6.1 Laminární box**

Vybaven filtry s póry 0,3 $\mu$ m, vertikální proudění vzduchu (horizontální proudění je nepřipustné – fouká ven z boxu, je zde riziko ohrožení pracovníka patogeny, protože neexistuje 100% jistota, že kultura je prostá virů). Box je denně sterilizován UV-lampou, v průběhu dne 70% ETOH (příp. Ajatin Desident). Pro důkladnější očistu lze použít 10% formaldehyd v 70% ETOH, nebo 2% glutaraldehyd. Box obsahuje kahan, pipetus, poblíž boxu je přívod elektřiny.

##### **6.2 Termostat s CO<sub>2</sub>**

Kontrolované parametry: teplota (většina savčích buněk roste nejlépe při 37 °C, bezpečnější je však nastavit inkubátor na 36,5°C, protože při 39 °C buňky rychle hynou, kultury ze studenokrevných vyžadují nižší teplotu, ptačí buňky naopak vyžadují vyšší teplotu), % CO<sub>2</sub> (zajišťováno plynovou bombou), vlhkost vzduchu (zajišťována nádobou umístěnou na dně inkubátoru; do vody je možné dát thimerosal, nebo 1% dezinfekční detergent, azid je nevhodný, protože reaguje s kovem). Pro speciální aplikace jsou k dispozici inkubátory s přívodem CO<sub>2</sub> i O<sub>2</sub>.

##### **6.3 Hemocytometr**

Počítací krevních elementů.

##### **6.4 Inverzní (objektivy zespodu) mikroskop**

Nejlépe s fázovým kontrastem (pracuje s lomem světla- je dobře patrná vnitřní struktura buněk), pozorování morfologie, kontaminace, kolonií buněk, apod.

##### **6.5 Centrifuga**

Na stáčení buněk. Pro některé metodiky je vhodné pokud je chladitelná. Navíc se může hodit vysokootáčková centrifuga na endorfy.

##### **6.6 Lednička, mrazicí box**

-20°C, -70°C. Některé mrazicí boxy mohou obsahovat CO<sub>2</sub>, nebo LN<sub>2</sub>, což umožňuje udržení nízké teploty i v případě, že dojde k poruše kompresoru, nebo k přerušení přívodu elektrické energie.

##### **6.7 Vodní lázeň**

Nastavená na 36,5°C slouží k ohřívání médií, rozmrazování zamražených aliqotů reagentů a buněk. Voda v lázni se mění každý týden a je vhodné do ní přidat thimerosal.

## 6.8 Příslušenství

pH metr, osmometr (není zcela nezbytný), filtrační zařízení (jednorázové filtry, autoklávovatelné filtrační jednotky, filtry 0,22μM, vakuová pumpa), sklo (pipety, kádinky, válce na pipety, odměrné válce, ap.) automatické pipety, plastik (špičky, kultivační nádoby, zkumavky s uzávěrem).

## 7 Pomocné laboratoře

### 7.1 Přípravna

Místnost, kde se provádějí přípravné práce, nevyžadující sterilitu prostředí.

### 7.2 Umyvárna

Používají se speciální procedury pro mytí skla, nejlepší je používat vysoce kvalitní borosilikátové sklo. Pokud je sklo špatně umyté, vznikají při tepelné sterilizaci pro tkáňové kultury toxické sloučeniny (patrně denaturované proteiny).

### 7.3 Sterilizační místnost

Obsahuje horkovzdušný sterilizátor, autokláv.

### 7.4 Tkáňová banka

- tekutý dusík (-196°C)

## 8 Média

### 8.1 Základní složky média

Základem jsou 3 složky: H<sub>2</sub>O, práškové médium (obsahuje soli, které s vodou tvoří solné roztoky – viz níže), uhličitan sodný (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Médium obsahuje veškeré potřebné živiny (*definice živiny* – “chemická látka zabudovaná do buněčných struktur, sloužící jako substrát pro biosyntézu a energetický metabolismus, nebo sloužící v metabolismu jako katalyzátor”).

### 8.2 Voda

Pro tkáňové kultury se používá ultrapure type I voda: resistivita 18MΩ.cm (MΩ.cm<sup>2</sup>/cm) při 25°C (konduktivita se udává v μS/cm), taková voda může obsahovat neutrální organické kontaminanty (toxicita pro b.), proto musí současně splňovat podmínku TOC (total organic carbon) pod 10 ppb (parts per billion – definice: hmota rozpouštěné látky/hmota rozpouštědla x 10<sup>9</sup>), používá se pro stopové koncentrace – pak je ppb velmi blízké = μg/l). Voda v láhvi údajně není type I, protože dochází k uvolňování kontaminantů z obalu (po otevření i ze vzduchu).

K úpravě vody pro tkáňové kultury se používají systémy kombinující zařízení založená na různých principech. Využívá se: reverzní osmóza, absorpce na aktivní hlíky, iontoměniče, elektrodeionizace, Pyroguard – 5000 Da filtr (rezistentní k NaOH /používá se k sanitizaci/, redukuje hladinu pyrogenů (endotoxinů) pod 0,001 EU/ml /endotoxin units/ a odstraňuje nukleázy), UV záření - generuje ozón z rozpuštěného O<sub>2</sub>, následně vznikají OH radikály, které oxidují org. látky a zabíjí bakterie (org. látky jsou nežádoucí, protože se vážou na matrice iontoměniče, OH rad. navíc zabíjí bakterie) – vzniká CO<sub>2</sub>, které je v rovnováze s H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, které se vážou na iontoměniče.

### 8.3 Solné roztoky

BSS (balanced salt solutions) – obsahují kombinaci anorganických solí, které udržují pH (tlumí aciditu) a osmotický tlak (většina buněk vyžaduje 280-320mOsmol/kg, osmolalitu lze upravit NaCl). Soli dále udržují membránový potenciál, slouží jako kofaktory enzymů a umožňují adhezi buněk. Především se jedná o tyto ionty: Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Kromě těchto iontů potřebují buňky k růstu též minimální množství stopových prvků: Fe, Zn, Cu, Se, ap. BSS většinou neobsahují živiny pro dlouhodobou kultivaci (ale mohou obsahovat např. glukózu), mohou být pufrovány na použití v 5, 10% CO<sub>2</sub>, nebo v běžné atmosféře.

Typy BSS:

- EBSS (Earle's balanced salt solution)
- DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline)
- HBSS (Hank's balanced salt solution)
- ESSS (Eagle's spinner salt solution)

HBSS, DPBS se používají na vzduchu, EBSS a ESSS vyžadují 5% atmosféru CO<sub>2</sub>.

### 8.4 Další složky médií

- aminokyseliny (vedle esenciálních /arginin, histidin, isoleucin, leucin, lysin, methionin, fenylalanin, threonin, tryptofan, valin/ potřebují živočišné tkáňové kultury navíc cystein, glutamin /zvířata tvoří v játrech a ledvinách/ a

tyrosin /zvířata tvoří v játrech z phenylalaninu/) aminokyseliny lze nahradit hydrolyzátem proteinů, který obsahuje krátké peptidy. Pro účely kultivace savčích buněk jsou používány lyzáty z nesavčích proteinů, aby bylo minimalizováno riziko biologické kontaminace.

- lipidy (esenc. MK, cholesterol, etanolamin apod.)
- vitamíny (nezbytné jsou především vitamíny skupiny B)
- zdroj energie - glukóza (či jiný cukr, ř. glutamin)
- mohou obsahovat i proteiny a peptidy (fetuin,  $\gamma$ -globulin, fibronectin, albumin, transferrin)
- případně hormony a růstové faktory pro ř. b. typy,
- nukleosidy,
- aditiva.

### 8.5 Pufrací systémy

Optimální pH je pro většinu buněk 7,2-7,4. Buňky většinou mohou růst i při pH 6,8 až 6,5 a krátkodobě snesou pH přes 8. pH se upravuje 1M NaOH, či 1M HCl. Jako optická kontrola se do médií přidávají indikátory pH (např. fenolová červeně).

K pufraci se nejčastěji využívá  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Pufrace je nutná pro kompenzaci buněčné produkce  $\text{CO}_2$  a laktátu. Při nízké b. denzitě je  $\text{CO}_2$  málo na to, aby pufrací systém založený na  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  správně fungoval, proto se buňky standardně pěstují v  $\text{CO}_2$  atmosféře, nedochází pak k nežádoucímu vyředování  $\text{CO}_2$  z kultivačních nádob do atmosféry inkubátoru (pokud se využívá otevřený systém – atmosféra v kultivační nádobce komunikuje s atmosférou v inkubátoru). Při kultivaci v uzavřeném systému, kdy nedochází k prostupu plynů z kultivační nádoby do atmosféry inkubátoru, se používá cca poloviční množství  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a  $\text{CO}_2$  v atmosféře inkubátoru není třeba.

K pufraci se mohou ale užívat i jiné látky, např. organické pufrы třeba: HEPES (nepotřebuje  $\text{CO}_2$  v atmosféře a lépe vyrovnává rychlé změny pH, je však drahý a ve vyšších koncentracích či při nesprávné přípravě toxický), Bes, Tes.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  však musí být i tak v médiu přítomno, protože má i nutriční funkci.

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)

### 8.6 Sérum

Médium bez séra se označuje jako bazální médium; se sérem (nebo jinými vhodnými tekutinami jako např. embryonální extrakty) jako kompletní. Dodává se nezmražené v tekutém stavu, připraví se alikoty a zamrazí. Užívá se např. hovězí, telecí, fetální, koňské. Ze zvířat chovaných v málo ekologicky poškozených oblastech. Obsahuje nedefinované složky, proto je někdy vhodné použít definované náhrady sér (pokud jsou k dispozici). Bezsérová média se používají také v případě produkce rekombinantních produktů, které jsou využívány v léčebných postupech humánní medicíny. Eliminuje se tak riziko biologické kontaminace spojené s používáním séra a živočišných proteinů, také čistota získaných produktů je vyšší. Pro zvýšení produkce rekombinantních proteinů se používají suplementy, které podporují růst buněk: např. polyamin a antioxidační suplementy.

## 9 Základní metodika

### 9.1 Pasážování (přenesení b. do čerstvého média, určitý počet po určité době)

Na hemocytometru spočítáme koncentraci buněk (Pokud jde o přisedlé kultury - odstraníme médium, opláchneme PbS, aplikujeme trypsin, případně směs trypsinu a EDTA /váže vápenaté kationty, nezbytné pro přisednutí buněk/, tím se buňky uvolní, pak neutralizujeme sérem, nebo médiem se sérem) potřebné množství buněčné suspenze dáme do kultivačních lahvíček s čerstvým (ohřátým) médiem a sérem. Některé přisedlé b. vyžadují extracelulární matrix k tomu, aby mohly přisednout a růst. V tom případě můžeme na dno kultivační nádoby aplikovat vysoce nabytý polymer (polylysin, nebo polyornitin). Tento postup můžeme použít i pokud nám jde o přisednutí buněk, které obvykle rostou suspenzně. Jiné přisedlé b. mohou zase vyžadovat tzv. feeder layer - vrstva b. inaktivovaná zářením, nebo chemicky (slouží jako podklad pro růst specifických typů buněk). Na lahvíčku uvedeme: linii, datum, pasáž, typ média, šarži séra.

### 9.2 Uchovávání

- krátkodobě, týdny až měsíce (70-80°C), dlouhodobě, roky (pod -150°C) v tekutém dusíku.
- b. (v logaritmicke fázi růstu) se resuspendují v zamrazovacím médiu do hustoty 2,5-8 miliónů b./ml, médium pro zamrazení obsahuje kryoprotektivum (DMSO 5-10%, glycerol /méně vhodné/ 0-30%), sérum, suspenze se rozpípetuje do zamrazovacích ampulí a označí
- pokles teploty je postupný (protože led překrystalizovává během poklesu teplot)
- při rozmrazování přeneseme b. okamžitě do 37°C, opláchneme a kultivujeme ve vhodném médiu

### 9.3 Přeprava

-v zamraženém stavu, nebo v kultivačním médiu za vhodných podmínek

### 9.4 Dezinfekce a sterilizace

dezinfekce – zahubení bezprostředně nebezpečných patogenů, nejsou však zahubeny všechny živé

zárodky, včetně spor

sterilizace – likvidace včetně spor

antiseptice – zneškodňování patogenů lokálně v tkáních (rány, sliznice, kůže), namířena hlavně proti mikrobům způsobujícím hnisání

aseptice - je souhrn opatření vedoucí k minimalizaci výskytu mikroorganismů v prostředí.

chemoterapie – selektivní poškození patogenů ve vnitřním prostředí makroorganismu.

Mikroorganismy vykazují různou odolnost vůči různým sterilizačním technikám. Bakteriální endospory jsou rezistentní vůči teplotě, neobalené viry jsou rezistentní vůči organickým rozpouštědlům a detergentům, priony vůči teplotě (za sucha vydrží 360°C, i po 10 min při 600°C vzniklý popel ještě vykazoval schopnost vyvolávat onemocnění, k jejich zničení je třeba autoklávovat při 132°C 1 hodinu), záření, detergentům, formaldehydu, peroxidu vodíku, jodové tinktury, kyselině peroctové, etylén oxidu, alkoholu, lyzolu. Kromě autoklávování lze likvidovat priony koncentrovanými louhy, nebo bělidly (např. chlornan sodný). Odolnost mikroorganismů může ovlivňovat pH, přítomnost solí, proteinů a sacharidů. Výsledkem závislosti logaritmu počtu přežívajících mikroorganismů na čase je přímka.

#### 9.4.1 Vlhké teplo

##### 9.4.1.1 Autoklávování

Jedná se o sterilizaci párou (vlhkým teplem). Vlhké teplo je při sterilizaci účinnější než suché, mimo jiné proto, že vodíkové můstky držící terciální strukturu bílkovin se snadněji rozruší, je-li přítomna polární molekula vody. Vlhké teplo způsobuje nejen denaturaci proteinů, ale může poškozovat i nukleové kyseliny. Díky nižší efektivní teplotě ve srovnání se suchým teplem může být využito ke sterilizaci předmětů, které nejsou odolné vůči vysoké teplotě. Autoklávování při 121°C vydrží většina plastů (výjimkou je např. polystyren). Většina mikroorganismů je lehce deaktivována při vlhkém teple 60-80°C. U bakteriálních endospor (které jsou zvláště odolné díky dehydrataci) se předpokládá, že vlhké teplo způsobuje poškození DNA, buněčné membrány, nebo buněčné stěny.

Nejjednodušší je zařízení na principu Papinova hrnce. Obdobně fungují i složitější stolní typy autoklávů. Mají však již svůj vlastní zdroj tepla a mohou mít i časový spínač, automatické napouštění vody do autoklávu, program pro sterilizaci roztoků, teploměr, manometr, apod. Větší autoklávy jsou určeny k postavení rovnou na zem. U dokonalejších typů je pára do komory napouštěna zhora, což je efektivnější v odstranění vzduchu z blízkosti sterilizovaných předmětů, protože pára je lehčí než vzduch. Nejdokonalejší autoklávy mají funkci, střídavě aplikace vakua a páry. To umožní, aby se co možná nejefektivněji odstranil vzduch z obalů ve kterých věci sterilizujeme a pára se dostala do těsného kontaktu s povrchem sterilizovaných předmětů. Autoklávy mohou mít několik programů, zapisovač teploty během programu, mohou mít mechanismy zabezpečující rychlejší ochlazení sterilizovaných předmětů, některé po autoklávování odstraňují vodu z předmětů prostřednictvím vakua. Minimální sterilizační časy:

teplota (°C)	Přetlak MPa	Přetlak (atm)	čas (minuty)
100	0,00	0,00	1200
109	0,03	0,33	150
115	0,07	0,67	50
121	0,10	1,00	15
126	0,13	1,33	10
134	0,20	2,00	3

Nejčastěji se používá 121°C 20 min.

##### 9.4.1.2 Var

5-10 minut je velmi účinná metoda sterilizace (ničí dokonce i některé endospory, bohužel ale ne všechny).

Tyndalizace označuje proces, kdy aplikujeme teplo třikrát po sobě s přestávkami mezi jednotlivými aplikacemi. Během přestávek dochází k aktivaci spor.

##### 9.4.1.3 Pasterizace

60°C 10 hodin se užívá ve farmaceutickém průmyslu k deaktivaci virů (HIV, hepatitidy B a C) při výrobě produktů z krevní plazmy. Z těchto produktů se při kultivaci buněk mohou používat např. albumin a transferin.

#### 9.4.2 Suché teplo

Inaktivace organismů je zapříčiněna především jejich oxidací.

##### 9.4.2.1 Sterilizace v plameni

Teplota plamene by měla dosahovat alespoň 350°C, kovové předměty je možné před ožehnutím namočit do alkoholu. Krátkodobě lze ožehávat i plastové předměty.

#### 9.4.2.2 Sterilizace v horkovzdušných troubách

Metoda je jednodušší než sterilizace vlhkým teplem. Některé plasty je možné sterilizovat pouze při teplotě 120°C po dobu 18 hodin. Trouba by se neměla zaplnit zcela, aby nebylo bráněno cirkulaci vzduchu.

Optimální kombinace teploty a časů sterilizace:

teplota (°C)	čas (hodiny)
180	0,5
170	1
160	2
150	2,5
140	3
120	18

Čas je počítán od úplného prohřátí sterilizovaných předmětů.

#### 9.4.3 Záření

##### 9.4.3.1 UV záření

Využívá se ke sterilizaci vzduchu, vody, hladkých ploch. Protože má slabou penetrační schopnost, musí být tyto plochy důkladně očištěny. Bakteriální spory a priony jsou vůči tomuto způsobu sterilizace rezistentní.

Ultrafialové záření (UV) představuje elektromagnetické záření v rozmezí 100-400 nm (někdy se uvádí 10-400 nm), tedy rozsah mezi X-paprsky (RTG) a viditelnou částí spektra. Fotony mají vyšší energii, než viditelné světlo {Elektromagnetické záření (ve vakuu) o vlnové délce  $\lambda$  má frekvenci  $f$  a jemu připisovaný foton má energii  $E$ . Vztah mezi nimi vyjadřují následující rovnice:  $\lambda=c/f$ ,  $E=hf$  (kde  $c$  je rychlost světla ( $3 \times 10^8$  m/s) a  $h = 6.65 \times 10^{-34}$  J·s = 4.1  $\mu$ eV/GHz - Planckova konstanta)}.

Můžeme jej klasifikovat na Vacuum UV (100-200 nm, je neúčinnější, neboť působí nespecifickou ionizací molekul a tím ireverzibilní ztrátou jejich fce, v praxi se však nepoužívá, protože je absorbováno vzduchem a sterilizace by tedy musela probíhat ve vakuu), UV-C (200-280 nm), UV-B (280-315 nm), UV-A (315-400nm). NK absorbují při 240-280 nm, s maximem při 260-265 nm (vznikají dimery pyrimidinů /nejčastěji thyminu/, kovalentní vazby uvnitř molekul, přetržení řetězce, aj.) bílkoviny vykazují absorpční maxima 180 nm (odpovídá peptidové vazbě) a 280 nm (odpovídá aromatickým kyselinám (tryptofanu, tyrosinu, histidinu).

Monochromatické nízkotlaké UV lampy (254 nm) nepoškozují v dostatečném rozsahu případně přítomné reparační proteiny. Účinnější jsou polychromatické UV lampy (200-400 nm), které poškozují i proteiny, včetně reparačních. Pro účinnost dezinfekce je důležitou veličinou tzv. UV-dávka {UV-dávka (mJ/cm2, mWs/cm2) = intenzita UV-záření (mW/cm2) x expozice (s)}, ovšem při stejné UV-dávce má vyšší účinnost větší intenzita při kratší expozici, než méně intenzivní dlouhodobá expozice. Intenzita UV klesá se čtvercem vzdálenosti ozařovaného objektu. Musíme též počítat s tím, že UV-zářivka stárne a po určitém čase ztrácí svou účinnost a je nezbytné ji vyměnit.

##### 9.4.3.2 Gama záření

Ionizující záření elektromagnetické povahy s ještě kratší vlnovou délkou (pod 0,01 nm) než RTG, tudíž fotony mají velmi vysokou energii a pronikají do hloubky, vzniká při radioaktivních, ale i jiných jaderných a subjaderných dějích. Poškozuje přímo DNA, navíc způsobuje tvorbu volných radikálů a peroxidu z vody. Zdrojem gama záření v praxi je obvykle radioaktivní kobalt ( $^{60}\text{Co}$ ). Používá se především ke sterilizaci materiálů, které nelze sterilizovat teplotně. Prodávány laboratorní plast a některé chemikálie (např. antibiotika) jsou sterilizovány především tímto způsobem. Bakteriální spory a viry jsou rezistentnější vůči tomuto ozařování. Priony jsou extrémně rezistentní. Rezistence mikroorganismů vzrůstá (2-5x) za nepřítomnosti kyslíku a v případě sterilizace mražených vzorků.

#### 9.4.4 Plynná alkylační činidla

Poškozují nukleové kyseliny a proteiny mikroorganismů. Užívá se Etylén oxid, plynný formaldehyd. Jsou efektivní i vůči virům. V případě Etylén oxidu jsou bakteriální spory o něco odolnější. Alkylační činidla jsou účinnější za vyšší teploty a vyšší vlhkosti vzduchu. V potaz musíme brát, že alkylační činidla jsou toxická.

##### 9.4.4.1 Etylén oxid

Způsobuje alkylaci amino, sulfhydrylových, karboxylových a hydroxylových skupin. Používá se ke sterilizaci ve speciálních autoklávech, kde může být kombinován s párou. Tímto způsobem je využíván spíše v nemocnicích. Prodávány laboratorní plast může být též sterilizován tímto způsobem. Po sterilizaci však mohou na plastu zůstat toxické zbytky etylén oxidu, proto je vhodnější sterilizace gama zářením.

##### 9.4.4.2 Plynný formaldehyd

Používá se především ke sterilizaci sterilních boxů (s vývodem z místnosti ven) a místností. Pokud je sterilizována místnost, je nutné odstranit citlivé elektronické přístroje. Některé přístroje (např. některé CO<sub>2</sub> inkubátory) mají pro tyto účely oddělovací display. Místnost se utěsní a nechá zaplněná přes noc a ráno se pořádně vyvětrá a vyčistí od zbytků formaldehydu. Je nezbytné pracovat s pomůckami chránícími dýchací soustavu.

#### 9.4.5 Sterilizační roztoky

Jsou méně účinné než jiné metody sterilizace (např. teplota). Některé dezinfekční roztoky jsou neutralizovány organickou hmotou, některé jsou toxické. Používají se ke sterilizaci ploch, použitého skla před mytím, biologického materiálu před likvidací. Efektivita jednotlivých typů sterilizačních roztoků:

typ	Houby	Bakterie	Endospory	Viry
aldehyd	O.K.	O.K.	O.K.	O.K.
hypochlorit	O.K.	O.K.	O.K.	O.K.
fenol	O.K.	O.K.	neefektivní	O.K.*
alkohol	neefektivní	O.K.	neefektivní	O.K.*

\*... v případě některých neobalených virů je účinnost desinfekce slabší.

##### 9.4.5.1 Aldehydy

Formaldehyd (4%), nebo glutaraldehyd (2%). Nejsou neutralizovány organickou hmotou. Minimální doba působení je 30 minut, ke zničení všech bakteriálních spor ovšem déle. Glutaraldehyd by se měl používat maximálně týden od přidání aktivátoru.

##### 9.4.5.2 Prostředky na bázi chloru

Relativně levné, ovšem málo účinné v přítomnosti většího množství organické hmoty. Nevhodný pro dezinfekci kovů, protože způsobují korozi. Doba působení - minimálně 30 minut, nejlépe však přes noc.

##### 9.4.5.3 Fenoly

Nejsou neutralizovány organickou hmotou. Užívány v koncentraci 2-5%. Mohou zanechat lepkavé zbytky.

##### 9.4.5.4 Alkohol

Především k dezinfekci povrchů a rukavic, nebo rukou (lépe je však používat speciální přípravky na ruce, které nevysušují tolik pokožku a jsou navíc účinnější. Optimální koncentrace je 70-80%. Povrch je třeba pořádně namočit a přebytek alkoholu nechat odpařit.

##### 9.4.5.5 Další sterilizační roztoky

peroxid vodíku (5-10%), kyseliny, zásady (bakterie většinou rostou v pH 4,5-8, některé tolerují pH 1 – octové a chemolitotrofní sirmé; nebo naopak pH 9 - *Alcaligenes faecalis*. Vůči nízkému pH jsou výrazně odolnější spory) detergenty, případně mix různých desinfekčních činidel.

#### 9.4.6 Filtrace

Rozlišujeme dva druhy filtrů: 1. hloubkové, 2. membránové.

Hloubkové zachytávají nežádoucí částice ve hmotě filtru. Vynalezeny byly koncem 19. století. Filtrační hmota může být z porcelánu, skla, azbestu. Používají se k filtraci plynů a jako předfiltrace před použitím membránových filtrů, které se snadno ucpávají.

Membránové filtry působí spíše jako síta (zachytávají mikroorganismy na svém povrchu). Vyvinuty byly v padesátých letech 20. století. V současné době se používají membránové filtry ke sterilizaci roztoků, které nemohou být sterilizovány zvýšenou teplotou kvůli obsahu termolabilních složek (sérum, médium, buněčné produkty, apod.). Vyrobeny jsou z nylonu, polysulfonu, polykarbonátu, acetátu celulózy, nitrátu celulózy, případně z mixu obou derivátů celulózy. Speciální mají filtry se sníženou schopností vázat proteiny (polyvinylidín difluorid).

K odstranění bakterií a hub se používají filtry s póry 0,2 μm, které však nezachytí mykoplazmata, viry a priony. K odstranění mykoplazmat a dokonce i některých větších virů (např. parainfluenzy-3, který může být přítomen v séru) jsou používány filtry s póry 0,1 μm (tyto filtry se používají též při výrobě produktů ze séra). K odstranění menších virů se používají filtry s menšími póry. Vždy je třeba vědět, co potřebujeme ve filtrované tekutině zachovat. Existují např. filtry, které jsou schopné zachytit částice větší jak 180kDa (vyrábějí se však i filtry s póry zachycujícími částice nad 70kDa), této hodnotě je blízko molekulární hmotnost imunoglobulinu G. Proto je třeba otestovat, jestli jsme náhodou neodstranily i imunoglobulin v případech, kdy by nám to mohlo vadit. Filtry sloužící k odstranění virů jsou velmi drahé, jedná se o poměrně novou technologii.

V průběhu filtrace se póry ucpávají. Proto pokud filtrujeme kapaliny s větším obsahem nerozpustných částic (např. sérum), je vhodné provést nejprve filtraci filtrem s většími póry, abychom ušetřily filtry s malými póry, které jsou výrazněji dražší. V membránových filtrech se mohou vyskytovat zbytky látek používané při jejich výrobě, např. surfaktant, zbytky etylenoxidu. K dispozici jsou však i filtry s extrémně nízkým obsahem extrahovatelných látek sterilizované zařazením gama, případně můžeme vyhodit přefiltrovanou tekutinu z počátku filtrace.

Některé kultivační lahvičky mají ve svých uzávěrech zabudovány filtry. Plyny od buněk a především k buňkám procházejí přes tento filtr, což snižuje možnost kontaminace kultury. Tento systém je často využíván pokud jsou kultivována velká množství buněk. Dále jsou k dispozici filtry chránící např. pipety před kontaminací tekutinou, či vzduchem, přímo v pipetě, případně ve špičce k pipetě.

Ke sterilizaci vzduchu v místnosti a v sterilním boxu se používají HEPA (high efficiency particulate air) filtry. Působí jako hloubkové filtry a odstraňují 99,97% částic o velikosti 0,3 μm. Odstraňují i viry, které jsou navázány na částičky prachu. Existují předpisy kolik je nejvyšší přípustná koncentrace částic pro místnost, nebo box sloužící k určitým účelům.

Sterilní boxy a HEPA filtry je třeba nechat pravidelně testovat (1x, 2x do roka) pokud se pracuje s nebezpečnými patogeny. Koncentraci částic v místnosti lze monitorovat prostřednictvím počítače částic. Biologickým testem je umístění mikrobiálních agarových ploten do boxu, nebo sterilní místnosti.

Ke sterilizaci médií můžeme používat: 1. jednorázové filtry (rychlé, spolehlivější sterilita, ale drahé), nebo 2. filtrační zařízení k opakovanému použití, kdy měníme pouze membránu (po počáteční investici do zařízení je filtrace levnější, je zde ale riziko nesprávné funkce filtru v důsledku špatného sestavení zařízení, nevýhodou je též časová náročnost - po filtraci je nutné sterilizační zařízení umýt, sestavit s novým membránovým filtrem, zabalit a sterilizovat autoklávováním).

Filtrace může probíhat za pozitivního tlaku (malé objemy do 50 ml stříkačkou, větší objemy pumpou), nebo za negativního tlaku (vývěvou). Pokud filtrujeme médium obsahující uhličitán sodný, zvyšuje se po filtraci pH. Výrazněji za použití negativního tlaku. Při použití negativního tlaku, může navíc docházet k pění roztoku a denaturaci proteinů.

Správnou funkci filtrů lze testovat (většinou po použití filtru) např. měřením odporu, který klade filtr proudícímu vzduchu. Filtry lze testovat též tím, že u filtrovaného produktu zjišťujeme, jestli je tento produkt sterilní. Inkubujeme produkt v podmínkách podporujících růst mikrobů (vhodná teplota, případně použijeme též médium vhodné pro mikroby), pokud po určité době inkubace mikroby nedetekujeme, filtr je pravděpodobně v pořádku. U filtrů s póry 0,2 μm se využívají malé bakterie, např. *Pseudomonas diminuta*.

## 9.5 Detekce kontaminace

bakterie, kvasinky, plísně:

- zrakem - je patrný zákal. Navíc kontaminace způsobuje změnu pH, pokud je přítomen indikátor, tak dochází ke změně zbarvení média. Bakteriální kontaminace pH snižuje, houby pH zvyšují.

-

- mikroskopicky (méně výrazná kontaminace)

- kultivačně (ještě méně výrazná kontaminace, kultivace 4 týdny bez antibiotik)

- Buněčná kultura může být též infikována jinou buněčnou kulturou.

Bakterie se odstraňují antibiotiky, případně je možné využít centrifugaci. Kvasinky a plísně se odstraňují antimykotiky. Viry prakticky nelze odstranit.

### 9.5.1. Detekce mykoplazmat

Mykoplazmata nepřerůstají kultivované buňky, jedná se intracelulární parazity, kteří ovlivňují metabolismus buněk. Mohou být v kultuře nepozorovány i několik let. Jedná se o prokaryotické org. ohraničené trojvrstevnou cytopl. membr., bez b. stěny, patří k nejjednodušším org. schopným autonomní reprodukce, průměr nejmenších druhů je kolem 200nm.

1. fluorescenční barvení (Hoechst 33342/33258) - modře svítí jádra b. a mykoplazmata uvnitř b.

2. inkorporace uracilu (utilizují mykoplazmata)/ uridinu (utilizují savčí b.)

urac./urid.=400-1000 (<100= infekce)

3. Pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) – detekce specifického fragmentu DNA po jeho namnožení.

4. RNA hybridizace – detekce specifické RNA pomocí značené oligonukleotidové sondy.

5. Měření aktivity mykoplazmatických enzymů.

6. Kultivačně – využívají se speciální média pro mykoplazmata.

K likvidaci mykoplazmat se používají specifická antibiotika, či jiné látky selektivně likvidující mykoplazmata.

## 9.6 Detekce proliferace

### 9.6.1 V populaci

- klonogenní studie (Pokud jsou buňky vysety ve vhodné koncentraci, odpovídá počet kolonií, které se po čase vytvoří, počtům vysávaných buněk). Výhody: velice přesné, počítáme jen buňky živé a dělicí se. Nevýhody: lze použít jen u buněk tvořících kolonie; časově náročné, tudíž nepoužitelné pro větší počet vzorků; pokud se b. v některých koloniích přestanou po čase dělit, kolonie budou menší a mohou být při hodnocení pod mikroskopem přehlédnuty a tím podhodnoceny počty vysávaných buněk.

- **počítání** buněk (v Burkerově komůrce, hemocytometrem, průtokovým cytometrem). Pozn.: hemocytometr nerozlišuje živé a mrtvé b., je třeba ještě stanovovat životnost. Výhody: rychlé (především v případě cytometrů), levné.
- scintilační měření **inkorporace <sup>3</sup>H thymidinu** po 2-24 hodinové inkubaci do DNA syntetizujících buněk. Výhody: citlivé (stačí 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> buněk), lineární měření proliferace v širokém logaritmickém rozsahu, nízké pozadí. Nevýhody: práce s radioaktivitou, tvorba radioaktivního odpadu.
- **inkorporace bromdeoxyuridinu (BrdU)** po 2-24 hodinové inkubaci do DNA syntetizujících buněk, odstranění supernatantu, následně inkubace s anti-BrdU protilátkou konjugovanou s peroxidázou, přidání substrátu pro peroxidázu a následná detekce produktu na elisareaderu. Výhody: lze celé provádět na kultivační destičce, tudíž není potřeba buňky přenášet, je neradioaktivní. Nevýhody: závislost absorbance na koncentraci je lineární jen v omezeném rozsahu, časově náročnější (existují však kity např. od firmy Roche, které tyto nevýhody odstraňují, navíc mohou mít citlivost jako zmíněná radioaktivní metoda).
- **MTT test** (založen na měření metabolické aktivity buněk, ze které extrapolujeme buněčné počty). MTT přidané k buňkám (obvykle na 4 hodiny) je metabolicky přeměněna na ve vodě nerozpustný formazan, ten rozpustíme a na elisareaderu měříme zbarvení při 550-600nm. Výhody: lze celé provádět na kultivační destičce, tudíž není potřeba

buňky přenášet, lze použít pro všechny typy buněk, levné. Nevýhody: závislost absorbance na koncentraci je lineární jen v omezeném rozsahu. Pozn.: existují i jiné dražší látky, poskytující ve vodě rozpustný produkt (odpadá rozpouštěním), zde lze měřit jednu kultivační nádobku vícekrát v čase, nelze je však použít pro všechny typy buněk.

- **spektrofotometrické stanovení celkových proteinů s využitím Amidové černě.**

### 9.6.2 U jednotlivých buněk

- autoradiografie: inkubace buněk s <sup>3</sup>H thymidinem, pokud je méně než hodinová, tak se označí pouze buňky v S fázi, fixace a ponoření do emulze. Jako výsledek získáme černá zrna na filmu. Nevýhody: dlouhý čas expozice (dny), práce s radioaktivitou.
- inkubace buněk s BrdU, pokud je méně než hodinová, tak se označí pouze buňky v S fázi, fixace a denaturace DNA, přidání protilátky proti BrdU konjugované buď s fluoresceinem (detekce pomocí fluorescenční mikroskopie, nebo flowcytometrie), nebo s alkalickou fosfatázou (detekce pomocí světelné mikroskopie po přidání substrátu) - výhody: výsledek během pár hodin, lze barvit současně i na tkáňovou morfolologii, nevýhody: obarvené vzorky nelze dlouho skladovat.
- detekce S-fáze na průtokovém cytometru v rámci hodnocení buň. cyklu po obarvení DNA např. propidiumjodidem. Výhoda: rychlá metoda.

### 9.6.3 Detekce antigenů spojených s proliferací a buněčným cyklem

Využití myších protilátek proti antigenům: Ki-67, PCNA, topoisomerase II $\alpha$ , aj., přidání protilátek proti myším protilátkám značených buď fluoresceinem (detekce fluorescenční mikroskopii, nebo průtokovým cytometrem); nebo peroxidázou, či alkalickou fosfatázou (detekce pomocí světelné mikroskopie po přidání substrátu). Výhody: výsledek během pár hodin, lze barvit současně i na tkáňovou morfolologii. Nevýhody: Vazba protilátek na antigeny může být znemožněna posměněním vazebního místa na antigenu v průběhu některých fixačních postupů.

### 9.7 Viabilita

- inkorporace značených metabolických prekurzorů (<sup>3</sup>H thymidin, <sup>35</sup>S methionin, <sup>3</sup>H uridin)
- barviva, neporušená membrána zabraňuje nabytím barvivům ve vstupu do b. (trypanová modř, eosin, safranin), u živých b. navíc nejsou porušeny mechanismy vylučující barvivo ven z b.
- FDA (fluorescein diacetát) – bez náboje, lipofilní – prochází cytoplazmatickou membránou do buňky, je štípan esterázami (v živých buňkách) a vzniká lipofobní fluorescein, který je v buňkách, živé buňky pak emitují fluorescenci.
- MTT

### 9.8 Buněčný cyklus

Metody detekce buněčného cyklu lze rozdělit do 2 kategorií:

1. Měření v jednom časovém bodě (nezískáme infci ohledně kinetiky b. cyklu).

- Měří se obsah DNA (pomocí fluorochromu vážícího se na DNA: DAPI, propidium iodid + RNase A<sub>1</sub>). Největší obsah DNA mají b. v G<sub>2</sub>/M fázi, poloviční mají b. v G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fázi. Na histogramu, kde je na ose x obsah DNA a na ose y počet b. se nám b. v G<sub>2</sub>/M a G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> zobrazí jako píky. Mezi těmito píky je patrná populace buněk v S fázi. Menší obsah DNA než buňky v G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> mají b. apoptické, které v průběhu apoptózy ztrácejí DNA. Neodlišíme G<sub>0</sub> od G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub> od M.
- Možno měřit další parametr, který se mění v průběhu buněčného cyklu, nebo v závislosti na tom, jestli b. je či není v klidovém stádiu:
  - o měříme citlivost DNA k denuraci

Závisí na míře kondenzace chromatinu: největší kondenzace je v mitóze a nejmenší při vstupu b. do S fáze.

V G<sub>0</sub> fázi je chromatin také kondenzován, ovšem méně, než v mitóze. Využívá se fluorochrom akridinová oranž (AO), která odlišně barví dvouvláknovou a denaturovanou DNA. Buňky se fixují pomocí 70% EtOH, inkubují s RNasou, pomocí 0,1M HCl částečně denaturujeme DNA, a barvíme AO. Rozlišíme G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, M. Nelze použít u buněk s vysokým obsahem glykózaminoglykanů a keratinů (také se barví AO). AO se váže na hadičky FCM, po měření je třeba přístroj propláchnout, aby nedocházelo k rušení následných měření.

o měříme expresi antigenů asociovaných s buněčným cyklem:

PCNA, Ag detekovatelný protilátkou Ki-67, nebo jaderný antigen p120. Dle zvoleného antigenu volíme vhodnou metodu fixace, nejčastěji se k fixaci používá formaldehyd, někdy směs etoh s acetonem, metoh apod. Po fixaci se b. resuspendují ve vhodném roztoku, přidá se Ab, přidá se sekundární Ab s fluorochromem a PI s RNasou. Protilátky vyvinuté proti denaturovaným proteinům, na detekci po westernovém blottingu, mohou být pro tuto metodu nevhodné.

2. sledujeme cytokinetiku

- měření v delším časovém období u b., u kterých zablokujeme b. cyklus.
  - o Synchronizujeme např. pomocí colcemidu, vinblastinu. Uvedené látky navozují blok v mitóze. V určitých časových intervalech sledujeme poměrné zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného

cyklu vyjádřeného jako  $f_x$ . Do grafu vyneseme závislost  $\log(1+f_x)$  na čase. Jedná se o přímku (od okamžiku, kdy se účinek synchronizačního činidla projeví. Trvání buněčného cyklu odpovídá rychlosti, se kterou jsou b. akumulovány v mitóze. Pokud měříme pouze obsah DNA, tak sledujeme akumulaci buněk v  $G_2/M$ . Posun přímky pro akumulaci buněk v  $G_2/M$  oproti přímce pro akumulaci b. v  $M$  ukazuje délku trvání  $G_2$ . Místo sledování akumulace buněk v mitóze, můžeme sledovat úbytek buněk z  $G_1$  populace, případně průchod b. S fází. Různé b. mají k synchronizačním činidlům různou citlivost, je proto třeba vyzkoušet různé koncentrace a následně vybrat tu nevhodnější. Ke stanovení délky trvání fáze buněčného cyklu je možné využít též autoradiografických metod.

b) kombinované sledování DNA replikace i DNA obsahu

- Replikace se sleduje pomocí BrdUrd. Při krátkodobé aplikaci se BrdUrd inkorporuje do DNA syntetizujících buněk namísto thymidinu. BrdUrd lze následně detekovat na základě jeho schopnosti zhášet fluorescenci fluorochromů: Hoechst 33358, nebo AO, nebo se k detekci využívá značených Ab. (V grafu, kde na ose y je obsah BrdUrd a na ose x obsah DNA nám vyjde obrácené U.) Pro detekci BrdUrd je třeba DNA denaturovat. Barvitelnost buněk závisí na struktuře chromatinu, takže pro určitý druh buněk je třeba metodu optimalizovat. Je třeba otestovat různé teploty denaturace (80-100°C), případně různé koncentrace HCl (1-4 M).

### 9.9 Použití antibiotik (vhodnější je možná termín antimikrobní látky)

Buněčné linie je vhodnější kultivovat bez antibiotik. Především pro to, že rutinní používání antibiotik často vede k vytvoření rezistentních mikrobiálních kmenů. Antibiotika také mohou ovlivňovat metabolismus kultivovaných buněk. Kultivace bez antibiotik je náročnější na sterilitu práce, a proto jsou antibiotika často rutinně používána. Antibiotika mohou být přírodní, semisyntetická (upravená přírodní), syntetická (přirozeně se vyskytující, ovšem připravená chemicky), chemoterapeutické látky (chemicky připravená, v přírodě se nevyskytující). Antibiotika mohou mít cidní (hubící) efekt, nebo statický (brzdící růst) efekt.

- proti bakteriím, kvasinkám, plísním a mykoplazmatům

kritéria pro antibiotika:

- nesmí inhibovat růst a ani ovlivňovat metabolismus b.
- musí ochraňovat po celou dobu experimentu
- netoxické a bezpečné pro uživatele
- kompatibilní s ostatními složkami média
- rozpustné v netoxických rozpouštědlech

Antibiotika používaná při kultivaci buněk.

Antibiotikum	likviduje	mechanismus účinku	mechanismus rezistence
Penicilin (samostatně se neužívá)	G+	ISBS	
Penicilin G	G+	ISBS	
Ampicilin	G+, G-		
Penicilin/streptomycin	G+, G-		
Penicilin/streptomycin/neomycin	G+, G-		
Gentamycin	G+, G-, mykoplazmata	IP, aminoglykosidové	
Kanamycin	G+, G-, mykoplazmata	IP, aminoglykosidové	
Streptomycin	G+, G-	IP, aminoglykosidové	mutace v genu pro S12 ribozomální protein, inaktivace prostřednictvím aminoglykosidové transferázy (Podává se obvykle v kombinaci, kvůli vysokému riziku vzniku rezistence.)
Neomycin	G+, G-	IP, aminoglykosidové	
Paromomycin	G+, G-, ř. protozoa, omezeně helminti	IP, aminoglykosidové	
Spektinomycin	G-, G+ (gonokoky)	IP, bakteriostatický účinek strukturně podobné aminoglykosidům.	mutace v genu pro ribozomální protein S5.

Tylosin	G+, mykoplazmata	IP, makrolidové	
Tetracyklin	G+, G-	IP	ztráta permeability buněčné stěny
Mytomycin C	G+, G-	I synt. DNA	
Polymyxin	G-	Polypeptid s hydrofóbním koncem, který funguje jako kationický detergent. Vazba na lipid A bakteriálních LPS, vytváří póry do cytoplazmatické membrány	
Amphotericin B (makrolidové)	kvasinky, plísně	vazba na steroly membrány hub, vytváří kanály do buněčné membrány	
Nystatin	kvasinky, plísně	vazba na steroly membrány hub, vytváří kanály do buněčné membrány	

Často se používají deriváty v tabulce uvedených látek. Dodávají se prášková, nebo v tekuté formě.

G+ ... grampozitivní bakterie

G- ... gramnegativní bakterie

IP ... inhibuje proteosyntézu

ISBS ... inhibuje syntézu bakteriální stěny

## 10 Speciální metody

### 10.1 Synchronizace buněk

Normálně musí b. dosáhnout určité velikosti, aby vstoupila do S fáze. Velikost sama o sobě může, ale nemusí být iniciátorem vstupu do S fáze, spíše se předpokládá, že iniciace je způsobena akumulací určitých chemických látek uvnitř buňky. Normální, ale i některé nádorové b. jsou schopny vstupu do G<sub>0</sub> fáze v důsledku kontaktní inhibice, nebo snížení množství séra. Většina nádorových b. vstupu do G<sub>0</sub> fáze schopna není.

Synchronizace se používá především k výzkumu b. cyklu a dějů s ním souvisejících. Pomocí micrarrays na synchronizovaných buňkách (jde o systémy obsahující na společné podložce více oblastí s různými sondami, tyto čipy se konstruují fotolitograficky, podobně, jako již dávno různé integrované polovodičové součástky, prozkoumávaná NK předem fluorescenčně značená se podle stupně své podobnosti se sondami na jednotlivá místa čipu přichytí, následná diferenciacce se provádí buď řízeným proudem tekutiny nebo změnou napětí, která způsobí elektrostatické odpuzování špatně držící NK, měření množství NK, která se přes diferenciacce "udržela" se provádí skenováním fluorescence), které umožnily sledovat expresi ohromného množství genů (pro hybridizaci na mikroarrays se použije mRNA) současně, se zjistilo, že exprese stovek genů (např u primárních lidských fibroblastů exprese 700 genů) koreluje s b. cyklem.

Fyzikální metody:

- mitotický detachment (u přisedlých b., které se nedrží podkladu příliš pevně, až 90% účinnost, b. nejsou ovlivněny chemikáliemi, ani nedostatkem živin), buňky v mitóze se drží podkladu nejméně, takže po přenesení na jinou misku získáváme populaci b., které vstupují do G<sub>1</sub> fáze. Setřepává se několikrát opakovaně (setřese se b. které jsou v mitóze – tzn. b. na počátku této fáze b. cyklu, ale i na jejím konci), následuje přestávka např. 2h (během níž jsou b. umístěny v inkubátoru) a pak se setřepávají b., které použijeme (získáme b. které vstoupili do mitózy maximálně před 2 hodinami).

- gradientová centrifugace (G<sub>1</sub> jsou nejlehčí),

- centrifugační elutrace (médiu teče proti sedimentaci b., b. jsou děleny na základě velikosti, velmi účinná metoda, navíc b. nejsou ovlivněny chemikáliemi, ani nedostatkem živin ap., je však třeba drahá centrifuga), jediná metoda, jak lze získat velká množství b. na základě jejich velikosti.

- pomocí sortování při flowcytometrii

- membránové vymývání je nově vyvinutá metoda. Exponenciálně rostoucí b. se naváží na membránu. Při dělení zůstává jedna dceřinná b. na membráně a druhá se uvolňuje. (U takto získaných buněk odpovídá množství cytoplazmy fázi buněčného cyklu.)

Chemické metody:

G<sub>1</sub>/S blok - izoleucinová deprivace (musí se dialyzovat izoleucin ze séra) G<sub>1</sub>

- deprivace séra G<sub>1</sub>

- n-butyrát (inhibuje acylaci histonů)

- hydroxyurea (inh. synt. RNA, nutné pro synt. DNA) S

- deprivace séra + hydroxyurea

- deprivace vápníku

- dvojitý thymidinový blok (vysoké koncentrace thymidinu blokuji DNA synt.) S

G<sub>2</sub>/M blok - kolchicin, kolcemid, vinblastin, nocodazole

Chemické metody synchronizace b. jsou spojeny s četnými problémy. Je třeba pohlídat si, jestli jsou b. opravdu synchronizované, či nikoli. Např. v případě lovastatinu, což je inh. 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reduktázy, u

kterého se předpokládalo, že zastavuje b. v G1 fázi a že je možné cyklus opět rozběhnout přidáním k. mevalonové (produkt, který je katalyzován enzymem, který produkuje inhibovaný enzym) se nověji zjistilo, že b. nesyndronizuje, ale pouze brzdí jejich proliferaci.

Statistická reanalýza dat z experimentů s microarrays ukázala, že cyklicita exprese genů může být náhodná, že cyklicita a pík cyklicity se liší při opakování téhož experimentu, že amplituda v druhém cyklu není vždy menší, než v 1. cyklu. Z toho vyplývá, že genů, jejichž exprese koreluje s b. cyklem nemusí být stovky, ale podstatně méně. Skutečnost zkrusluje také fakt, že při použití synchronizačních činidel nejsou publikovány experimenty, při kterých k synchronizaci nedošlo. Při synchronizaci pomocí chemikálií nezískáme homogenní populaci buněk, protože i když je zásah stejný, tak buňky na kterých probíhá, jsou odlišné. S touto skutečností souvisí rychlá ztráta synchronnosti (většinou se ztrácí již po prvním cyklu). Pokud zablokujeme jeden proces (např. syntézu DNA), tak ostatní probíhají dál. Buňky pak mají jednu vlastnost společnou, ale v ostatních se liší stejně jako b. původní. Při pokusu o synchronizaci může být inhibován proces, který je na b. cyklu nezávislý. Navíc exprese genů po odblokování synchronizace může být specifická pro použitou metodu synchronizace a nemusí tedy odpovídat expresi genů v průběhu normálního průchodu buněk buněčným cyklem. Také je třeba si uvědomit, že fáze buněčného cyklu má určité trvání, takže např. inhibitory DNA syntézy zablokují b. v tom stádiu S fáze, ve kterém se právě nacházejí (některé na počátku, některé ke konci S fáze).

Synchronizované b. musí mít stejné množství DNA, rozsah distribuce velikosti b. musí být menší, než v původní populaci, nejdůležitější podmínkou je, že synchronizované b. vykazují synchronizované b. dělení (musí být synchronizované i po průchodu buněčným cyklem po synchronizaci).

Úspěšnost synchronizace se ověřuje pomocí sledování vstupu buněk do S fáze (autoradiograficky, pomocí protilátek proti PCNA, cyklinům, BrdUrd). Množství buněk v mitóze lze sledovat v mikroskopu s fázovým kontrastem.

Existují teplotně senzitivní mutanty, které za vyšších teplot nejsou schopny průchodu určitým místem v buněčném cyklu.

## 10.2 Současná kultivace více buněčných typů

Za pomoci speciálních filtračních vložek jsou buňky v jedné misce prostorově odděleny, ale vzájemně na sebe působí prostřednictvím látek uvolňovaných do média.

## 10.3 Klonování

Klonování se používá ke snížení genetické variability v buněčné populaci. Nepříjemné je, že se klony stávají po určité době generací opět heterogenními populacemi, pro udržení homogenity je třeba klonování opakovat. Rychlost s jakou se ztrácí homogenita buněčné populace je dána nejenom vlastnostmi buněk, ale i vlastnostmi kultivačního prostředí. Ke klonování můžeme použít buňky primokultury (úspěšnost klonování je nižší, nenádorové buňky se množí jen po omezený počet generací, což limituje velikost získaných klonů), nebo buňky buněčné linie.

Problémem při klonování je, že, přinejmenším po několik prvních generací, jsou buňky vystaveny nefyziologické situaci. Chybí jim společnost ostatních buněk, což má za následek snížené množství autokrinně a parakrinně produkovaných růstových faktorů a nedostatek interakcí mezi buňkami a buňkami a mezibuněčnou matrix. Z těchto důvodů jsou kladené vysoké nároky na kultivační médium. U médií a sér, která hodláme použít ke klonování, je třeba zjistit jestli jsou schopná podporovat růst buněk v nízkých buněčných koncentracích. Mezi jednotlivými šaržemi séra jednoho typu je v tomto směru velká variabilita. Navíc šarže, která podporuje růst klonu jedné buněčné linie, může působit inhibičně na růst klonu jiné buněčné linie. Pro účely klonování se používá vyšší koncentrace séra, např. 20%. Vyšší koncentrace růstových faktorů v kultivačním médiu se dosahuje použitím kondiciovaného média. Jedná se o médium získané z kultury po dosažení 50% konfluente, nebo po dosažení 50% normální maximální koncentrace buněk. Případně se používá vrstva vyživujících buněk (feeder layer), které jsou po ozáření RTG zbaveny schopnosti proliferovat.

Pro klonování se používají výhradně aktivně rostoucí kultury v logaritmické fázi růstu. U žádné z metod si nemůžeme být 100% jisti, že je získaná populace buněk skutečně klonem. Dokonce i v případě mikromanipulace, existuje, i když nízká, pravděpodobnost, že budou nechtěně místo jedné buňky izolovány buňky dvě. Techniku klonování volíme s ohledem na efektivnost tvorby kolonií (CFE) klonovaných buněk. CFE zjistíme pokud vysejeme určité množství buněk a po několika dnech sledujeme množství vzniklých kolonií. CFE = počet kolonií / počet vysetých buněk, obvykle se vyjadřuje v procentech. U některých primokultur může být pod 1%, naopak u stabilních linií se může blížit k hodnotě 100%.

### 10.3.1 Metoda limitního ředění

Jedná se o nejpoužívanější metodu. Připravíme 3 buněčné suspenze (každou po 10 ml) o třech různých koncentracích buněk (koncentrace volíme v závislosti na CFE, např. pro 5-10% CFE volíme koncentrace 500, 100 a 50 buněk/ml). Každou suspenzi rozpipetujeme do jednoho 96 jamkového platička po 100 $\mu$ l. A přidáme 100 $\mu$ l kompletního, nebo kondiciovaného média. Po několika dnech je třeba médium vyměnit. Při výměně média může dojít k uvolnění některých přisedlých buněk, které mohou dát vzniknout novým koloniím. Proto je vhodné měnit médium teprve jsme-li si jisti, že v jamičce se nachází pouze jedna kolonie (pozorujeme v mikroskopu). Po napěstování dostatečného množství buněk, vybereme platičko, ve kterém se objevují buňky jen v menším počtu jamek a s tím budeme pracovat dále. Vždy jednu kolonii (z jamky ve které je jenom jedna kolonie) přepasážujeme do jedné jamky na 24 jamkovém platičku. Opět kultivujeme a měníme médium. Přepasážujeme do lahvičky (25 cm<sup>2</sup>) a následně do větší lahvičky (75 cm<sup>2</sup>). Buňky zamrazíme.

### 10.3.2 „Tečkování“

Připravíme si buněčnou suspenzi o koncentraci 500 – 1000 buněk/ml. Do suspenze ponoříme špičku Pasterovy pipety. Díky kapilární elevaci dojde k nasátí suspenze. Suspenzi z pipety přenášíme do středu jamiček na 96 jamkovém

platičku, tak aby byl přenášený objem zhruba 1 $\mu$ l. Za pomoci mikroskopu zjistíme ve kterých jamičkách je pouze jedna buňka. Do takových jamiček přidáme 200 $\mu$ l vhodného média. Stejně jako u předešlé metody napěstujeme dostatečné množství buněk a zamrazíme.

### **10.3.3 Mikromanipulace**

Jedná se o finančně a časově náročnou techniku, vyžadující velkou míru zručnosti. Může být prováděna ručně, nebo za pomoci mikromanipulátoru. V obou případech se používá Pasterova pipeta s extra tenkým koncem napojená na mikrolitrovou pumpu. Nejprve nabereme 100 $\mu$ l média bez buněk (zajistí vyplavení buňky při přenosu na 96 jamkové platičko), trochu vzduchu a potom se snažíme pod inverzním mikroskopem umístěným ve sterilním boxu nabrat pouze jednu buňku s troškou média. Obsah Pasterovy pipety přeneseme do jamky na 96 jamkovém platičku. Postup opakujeme, dokud nezaplníme všechny jamky. Mikroskopicky zjišťujeme ve kterých jamičkách je skutečně pouze jedna buňka. Do takových jamiček přidáme dalších 100 $\mu$ l média. Stejně jako u předešlých metod napěstujeme dostatečné množství buněk a zamrazíme.

### **10.3.4 Využití sortovacího zařízení připojeného k flowcytometru**

Metoda vyžaduje zvládnutí složitého a drahého zařízení a je spojena s vyšším rizikem infikování buněčné kultury. Můžeme volit parametry (měřitelné na flowcytometru), které musí vybrané buňky splňovat. Každá buňka je nejprve změřena a pokud vyhovuje našim podmínkám je přenesena do jamičky na 96 jamkovém platičku. Další vyhovující buňka je přenesena do další jamičky, atd. Přidáme vhodné množství média. Stejně jako u předešlých metod napěstujeme dostatečné množství buněk a zamrazíme.

### **10.3.3 Využití kroužků**

Metoda je použitelná pouze u přisedlých buněk. Vysejeme buňky v takové koncentraci, abychom získaly oddělené kolonie. Vhodné je 4 jamkové platičko. Do jamek vyséváme různá množství buněk např. 10 000, 1000, 100 a 10. Po několika dnech si označíme kolonie, které jsou dobře oddělené od okolních buněk. Odstraníme médium. Pomocí sterilní pinzety uchopíme kroužky (nejčastěji se používají skleněné, z nerezavějící oceli, nebo PTFE, lze je koupit, nebo je možné si je nařezat z vhodné rourky) a ponoříme jejich spodní okraj do silikonového mazadla (mazadlo je třeba stejně jako kroužky předem sterilizovat v horkovzdušné troubě). Kroužky ohraničíme vybrané kolonie. Do kroužků napipetujeme trypsin, po 20 sekundách většinu trypsin odsajeme (necháme pouze tenkou vrstvu), sledujeme, kdy dojde k uvolnění buněk, pak naplníme kroužky kompletním médiem a přeneseme na 24 jamkové platičko. Stejně jako u předešlých metod napěstujeme dostatečné množství buněk a zamrazíme.

### **10.3.6 Využití misek s fólií**

Metoda je použitelná pouze u přisedlých buněk. Na dně misek je hydrofilní FEP (fluorovaný ethylen propylen) fólie. Vysejeme buňky v nízké hustotě, tak abychom získaly kolonie, následně oddělíme kolonie rozřezáním fólie skalpelem. Přeneseme do jamek v mikrotitrační destičce, kde provedeme trypsinizaci. Stejně jako u předešlých metod napěstujeme dostatečné množství buněk a zamrazíme.

### **10.3.7 Využití média s vysokou viskozitou**

Metoda je použitelná pouze pro suspenzní buňky. Díky viskozitě média, kterou zajišťuje agar, nebo metyl celulóza, se dceřinné buňky nevzdalují od buňky mateřské. Opět vyséváme buňky o vhodné nízké koncentraci. Po vytvoření kolonií je přenášíme pomocí Pasterovy pipety do jamiček s médiem. Stejně jako u předešlých metod napěstujeme dostatečné množství buněk a zamrazíme.

## **10.4 Genová amplifikace**

Metoda je využívána např. pro zvýšení tvorby specifických buněčných produktů. K selekci buněk s amplifikovanými geny je možné využít systém dihydrofolátreduktáza - metotrexát. Zvolený gen kotransfekujeme s genem dhfr (pro dihydrofolátreduktázu). V médiu obsahujícím metotrexát (inhibitor dhfr) mohou přežít jen ty buňky, které spontánně amplifikují gen dhfr a tak překonají inhibici metotrexátem. Koncentraci metotrexátu postupně zvyšujeme. Takto je možné po několika měsících vyselektovat buňky s až 100 násobně amplifikovanou DNA pro dhfr. Spolu s dhfr se amplifikuje i námi požadovaný gen.

## **10.5 Vpravení cizorodých molekul do buňky**

Nejčastěji se vpravují nukleové kyseliny (vpravení DNA se označuje jako transfekce), ale mohou se vpravovat proteiny, fluorescenční próby a další látky. Buňky cizorodou DNA normálně nepřijímají, proto je třeba speciálních technik.

### **10.5.1 Mikroinjekce**

- pomocí tenoučké kapiláry. Do jádra savčích buněk lze vpravit maximálně 10-20 pl, do jejich cytoplazmy maximálně 100-200 pl, větší objemy buňku většinou zahubí. Smrt buňky nastává rovněž pokud dojde k propíchnutí buňky skrz – v mikroskopu se objeví bílá skvrna.

Nejefektivnější procedura, ovšem je pomalá a vyžaduje drahé zařízení. Je možno ji provádět ručně, nebo pomocí počítačově řízeného automatu. Automat výrazně usnadňuje a urychluje manipulaci, lze kontrolovat vpravovaný objem (je dán tlakem pod kterým je roztok vypuzován z kapiláry a dobou po kterou je kapilára v buňce), počítač si pamatuje polohu buněk (není potřeba mřížka na podkladu na který necháme b. přisednout).

Plovoucí buňky můžeme přinutit k přisednutí pomocí concanavalinu A, nebo phytohemaglutitinu P, nebo IgG. Nebo můžeme využít pipetky, kterou buňku přidržíme. Stejně tak je pipetka přínosem pokud není adheze přisedlých buněk dostatečně pevná.

Mikroinjekce je spojena s přechodným nárůstem  $Ca^{2+}$ , je třeba s tím počítat, případně použít vhodné kontroly, abychom odlišili jeho vliv.

### **10.5.2 Metody využívající narušení cytoplazmatické membrány**

Membrána buněk je lokálně přechodně narušena, což umožní proniknutí látek, které jsou obsaženy v okolním roztoku. Metody vyžadují optimalizaci pro určitý buněčný typ a vpravovanou látku, abychom docílili vysokého výtěžku při současném nízkém rozsahu poškození buněk.

Narušení může být navozeno elektrickými pulzy – elektroporace, nebo mechanicky:

1. opatrným seškrabováním přisedlých buněk ze dna kultivační misky, které jsou převrstveny roztokem látky (kterou chceme do b. vpravit) v PBS pomocí gumové škrabky. Po přidání vyhřátého média se buňky přenesou do zkumavky, stočí a nasadí na další kultivaci.

2. Protahováním buněk přes stříkačku s jehlou. Zde je třeba udržovat během procedury pro b. vhodnou teplotu a kontrolovat, jestli ve vzdušné atmosféře nedochází ke změnám pH ohrožujícím životnost b. Metoda je použitelná i pro buňky rostoucí v suspenzi.

### **10.5.3 Biolistika**

(odvozeno od slova balistika) – nastřelování materiálu obaleného v kovových (wolfram, zlato) částicích. Používá se u rostlinných buněk.

### **10.5.4 Virové obaly.**

Možné vpravit materiál do buněk s receptory pro příslušný vir.

### **10.5.5 Lipofekce**

Využívá se liposomů, které fúzí s cytoplazmatickou membránou. Liposomy jsou dvě nebo více lipidických dvouvrstev (můžou být nahrazeny vrstvami detergentu) střídajících se s vodním prostředím, takže je lze využít ke vpravení molekul nepolárních i polárních.

### **10.5.6 Dextran**

Inkubace DNA s dextranem na který je navázán dietylaminoetyl, který má kladný náboj a může se tak na něj vázat DNA, celý komplex se do buňky dostává prostřednictvím endocytózy. DNA se dostane do jádra, nebo je již v cytoplazmě degradována. První metoda pro přenos DNA do většího počtu buněk. Pro většinu buněk je tato metoda málo efektivní.

### **10.5.5 Fosforečnan vápenatý**

Endocytóza DNA ve formě precipitátu s fosforečnanem vápenatým je mnohem efektivnější, než s využitím dextranu. Suspenzní b. jsou velmi odolné vůči transfekci fosforečnanem vápenatým.

## **10.6 Příprava transgenních zvířat**

Nejčastěji se jedná o transgenní myši. Nejprve je třeba připravit si rekombinantní (uměle sestavenou) DNA, která obsahuje: gen, vektorovou DNA, která umožní vložení do hostitelské DNA a sekvence promotoru a enhanceru, které zajistí expresi genu. Transformují se (vpraví se cizorodá DNA) do embryonálních kmenových buněk, získaných z blastocysty. Vyselektují se transformované buňky a vpraví do jiné blastocysty, která se implantuje do dělohy pseudopregnantní myši (získá se po páření se samcem u něhož byla provedena vasktomie - chirurgické přetětí chámovodů, samotné páření u myši vyvolá příhodné hormonální změny pro uhníždění embrya v děloze). V kousku tkáně z ocasu potomků se testuje přítomnost genu. myši s přítomným genem jsou heterozygotní a je třeba je spářit, abychom získali homozygoty. Jejichž pářením získáme transgenní kmen.

Gen se inkorporuje do různých míst v genomu, je však možné vložit jej na určité místo a přitom nahradit gen původní, pokud známe část sekvence před a za příslušným genem. Tak je možné obnovit funkci u mutantního zvířete, nebo „vypnout“ původně funkční gen.

Vpravovaná DNA obsahuje:

neo<sup>r</sup> - gen pro enzym inaktivující antibiotikum neomycin a jeho deriváty, jako G418 – letální pro savčí buňky.  
tk – gen pro thymidin kinázu, enzym, který fosforyluje nukleosidový analog gancyclovir. DNA polymeráza pak používá tento nefunkční nukleotid jako substrát, takže gancyclovir zabíjí b., které obsahují gen tk.  
sekvence homologní k sekvencím před a za příslušným genem. neo<sup>r</sup> leží mezi těmito sekvencemi, tk mimo tyto sekvence. Pokud se naváže na sekvence před a za genem, tak dojde k homologní rekombinaci a tk sekvence se neinkorporuje. Pokud je inkorporace náhodná, tak je včetně tk.  
Selektuje se médiem s G418 a gancyclovirem.

## **11 Bezpečnost**

Pro člověka představují nebezpečí infekce především viry, mykoplazmata a plísňe. Je třeba mít na paměti, že každý živočišný biologický materiál je pro člověka potenciálně infekční. Dokonce byl popsán i případ úmrtí člověka po nákaze z tkáňových kultur. U primárních kultur je nebezpečí větší ve srovnání s buněčnými liniemi. Jsou popsány případy nakažení člověka (např. hantavirem, virem choriomeningitis) z primární kultury hlodavců. Infekční mohou být i buněčné linie, médium a sérum, proto je tkáňové banky a solidní výrobci v tomto směru testují. Užívání tkání a krve z pracovníků laboratoře pro přípravu transformovaných buněčných linií je zakázáno, protože osoba, ze které byly buňky získány, není vůči těmto buňkám imunní. Nádorové buňky z jiného než vlastního organismu jsou obvykle zničeny imunitním systémem. Ani to však nemusí být pravidlem, zvláště je-li snížena imunita. Potenciální nebezpečí představují též genetické modifikace, které mohou aktivovat infekční agens z klidového stádia, nebo mohou rekombinací vzniknout nová infekční agens.

Odpad od tkáňových kultur se odkládá do speciálních kontejnerů, které se spalují, infekční věci se však ještě předtím sterilizují (např. autoklavují).