

# Imortalizace buněk

Proč?

- převedení primokultur v permanentní linie
- zjednodušení kultivačních podmínek

a) Spontánně – pomalé, často málo účinné

b) Cíleně

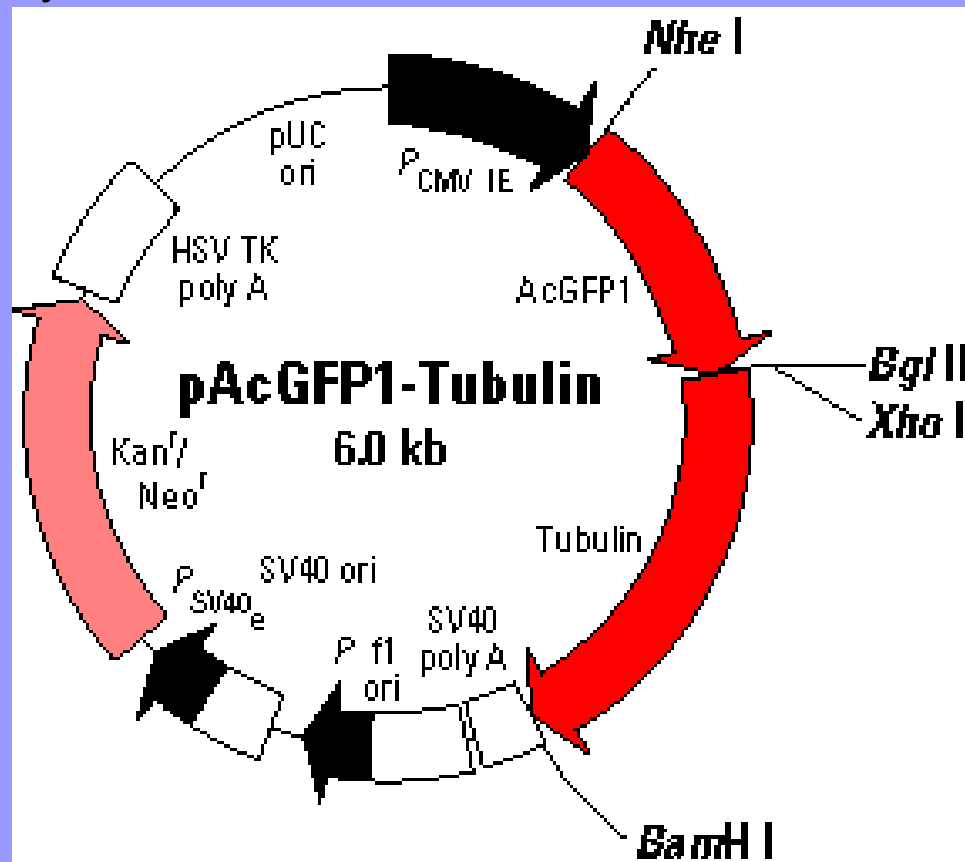
- fyzikálními faktory: Gama záření, Rentgenové záření (záření X), teplota
- chemickými faktory: NiCl, NiSO<sub>4</sub>, Dimethylsulphate, N-methyl-N-nitrosouera (MNU), benzo[a]pyrene diol epoxide, 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO)
- biologickými faktory: **viry** - virus Epstein Barrové, virus myší leukémie, virus Rousova sarkomu, SV40  
**vektory** (plasmidy / viry) exprimujícími transformující protein, např. antigen SV40 large T nebo adenovirus E1A,..



## Cílené genetické manipulace

Změny genetické informace, vložením, poškozením nebo vypnutím genu / genů

- Vektory plasmidové a virové
- Chemicky nebo fyzikálně – viz. imortalizace

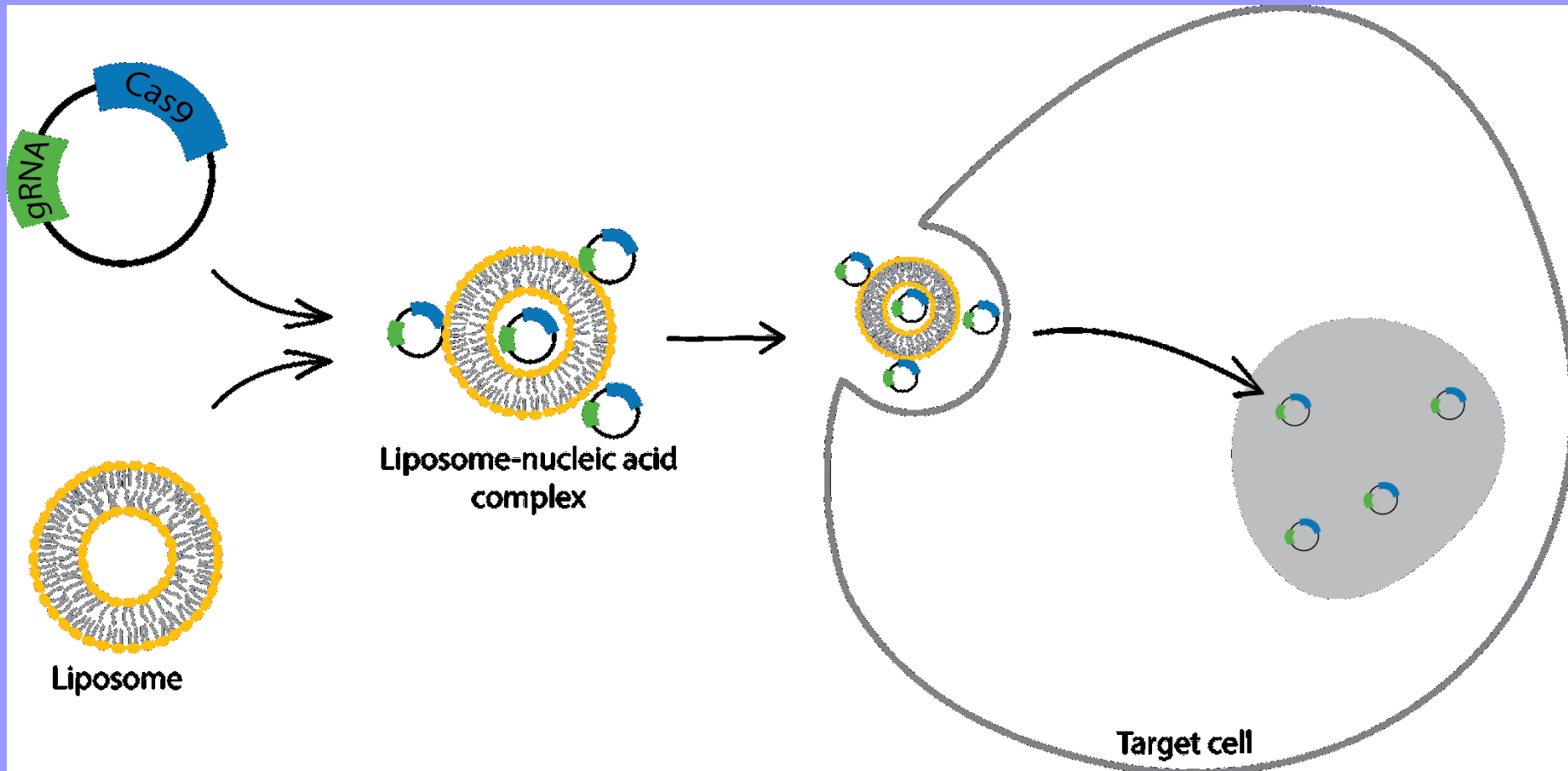


## Vnesení vektoru do buněk

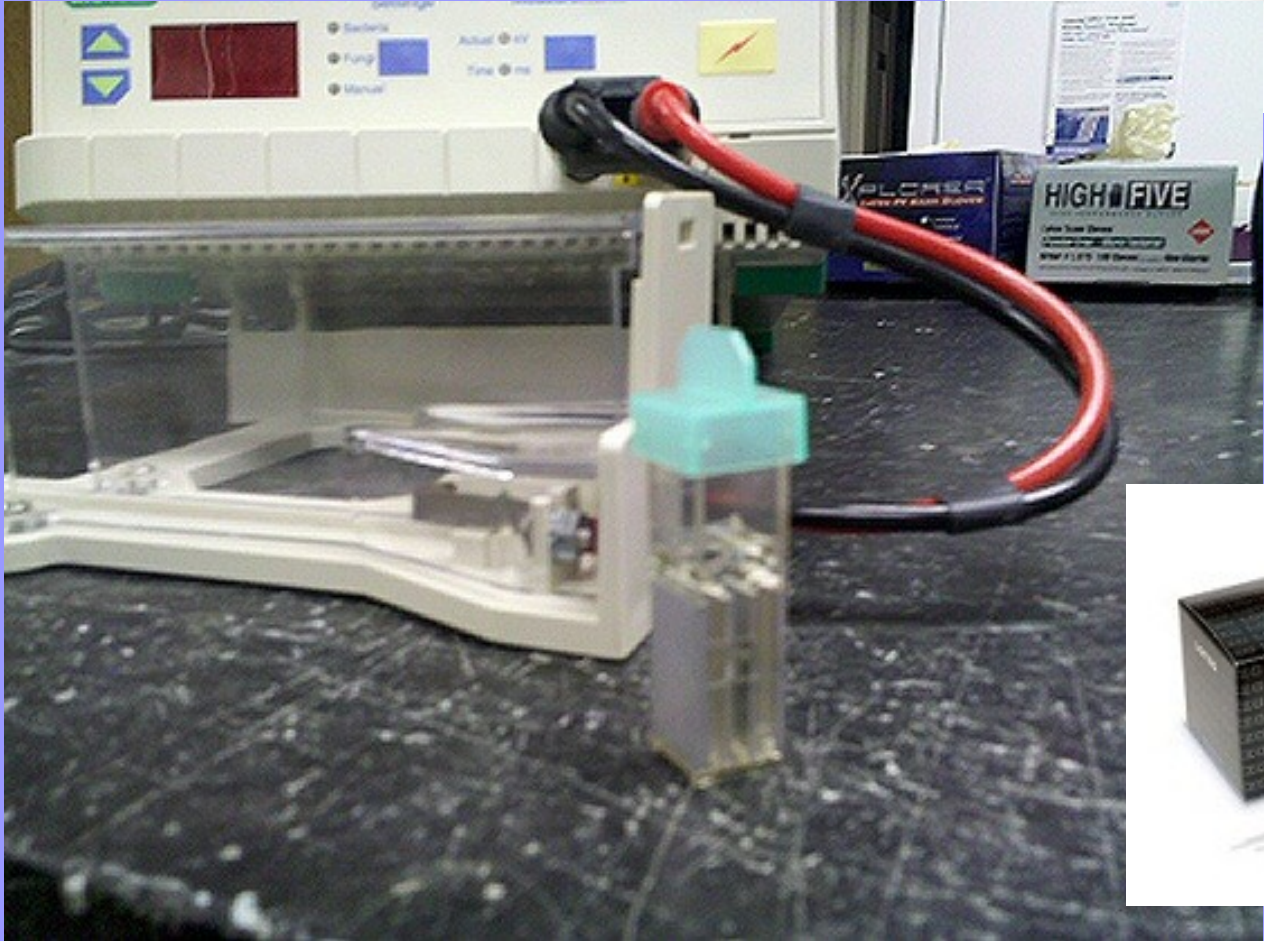
- a) Infekcí – viry
- b) Chemicky
  - lipofekce: obalení vektoru s lipidy a fúze komplexu s cytoplasmatickou membránou
  - $\text{Ca}^{2+}$  precipitace: vysrážení vektoru na povrchu buněk v komplexu s  $\text{Ca}^{2+}$  a jeho pohlcení buňkou endocytózou
  - transfekce pomocí dextranu: komplex vektor / dextran spojený diethylaminoethylem je endocytován do buňky
  - transferofekce: vektor je navázán na transferin a přes transferinový receptor endocytován do buňky
- c) Mikroinjikace
- d) Elektroporace - narušení buněčné membrány elektrickým výbojem a difúze vektoru do buňky
- e) Nucleofekce - elektroporace v kombinaci s chemií, přenos vektoru do jádra
- f) Biolisticky – vektor navázaný na partikuli (zlato, wolfram) je vstřelen do tkáně, buněk



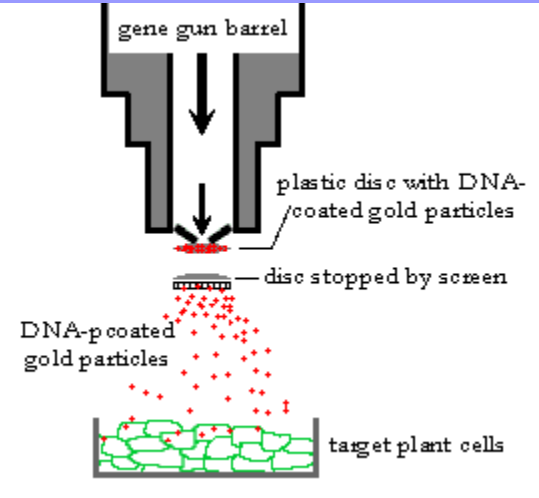
# Lipofekce



# Elektroporace & nukleofekce

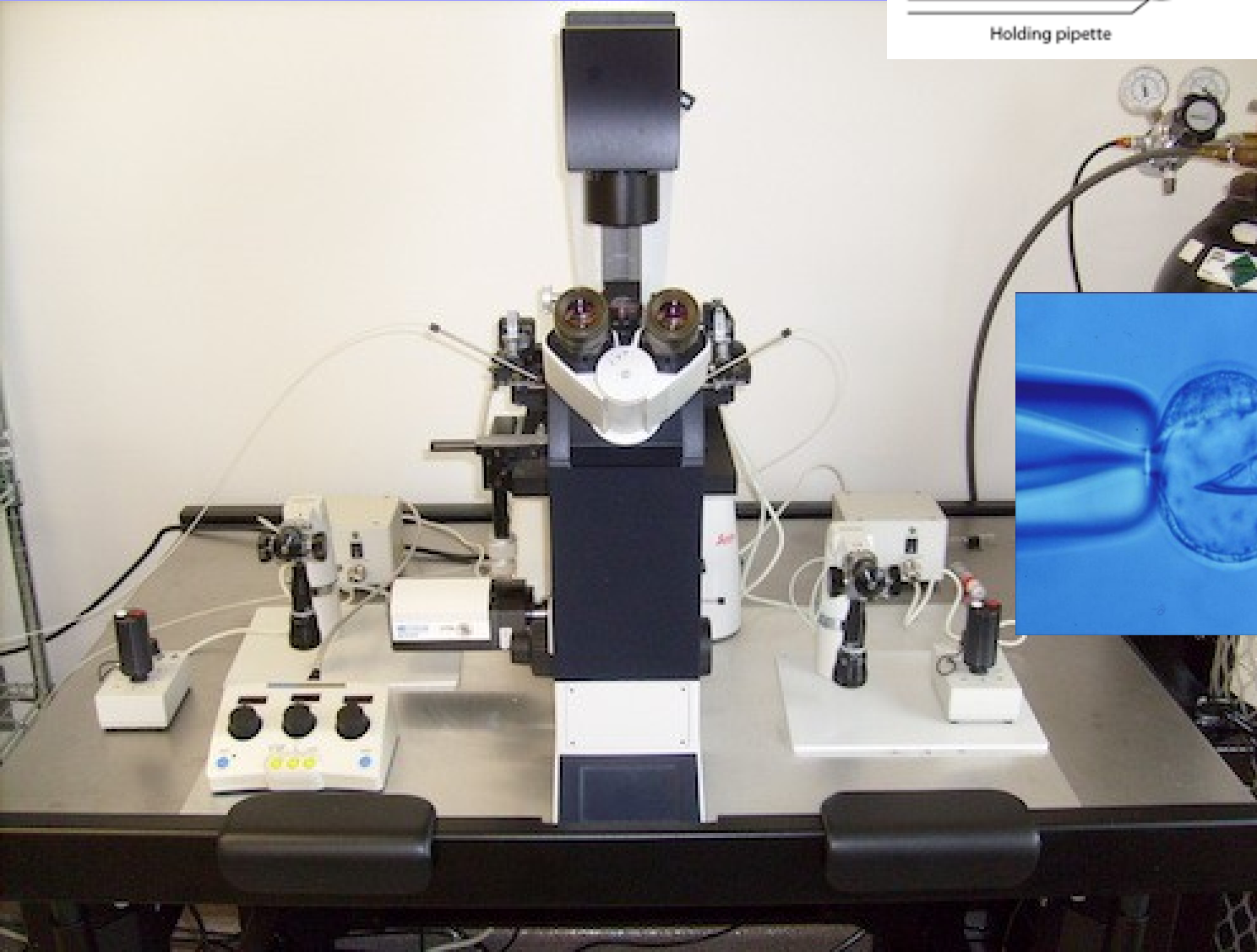
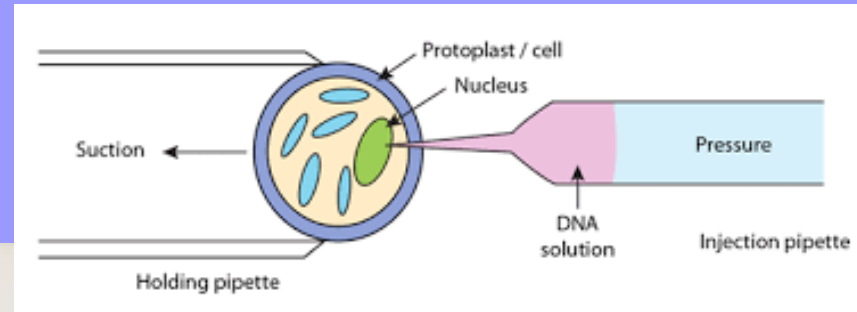


# Biolistika





# Mikromanipulátor



## Selekce buněčných klonů

**Adherentní buňky** pod selekčním antibiotikem, při dostatečné nízké účinnosti transfekce nebo jejich konfluenci tvoří samostatné kolonie, které lze mechanicky, případně za pomoci proteáz (trypsin, kolagenáza) oddělit

**Suspenzní buňky** pod selekčním antibiotikem je třeba rozklonovat mezním ředěním (někdy potřeba i u adherentních), nebo růst v polotekutém / viskózním médiu (agar apod.)

Nejběžnější selekční antibiotika pro savčí buňky

G418 / Neomycin, Hygromycin B, Puromycin





## Dodatek – TKÁNĚ a ORGÁNY

Tkáně umíme kultivovat / připravovat jen velice omezeně, většinou jde pouze o uchování po určitou dobu, podobně jako orgány.

U orgánů je již aktuální otázka přívodu živin, kyslíku a odvodu metabolitů a CO<sub>2</sub>. Orgány je tedy třeba mít metabolicky utlumeny (podchlazením) a nebo napojeny na oběh s živinami simulující krevní zásobení.

V současné době je zvládnutá problematika krve (lze zamrazit), částečně pak epidermis / kůže a jaterní tkáně. Intenzivně se studují možnosti využití buněk pankretu (Langernhansových ostrůvků) z prasat. Velkým příslibem pro transplantace jsou také buňky a tkáně připravené z kmenových buněk.

Epidermis – primokultury prasečích / lidských keratinocytů pěstované na syntetických nosičích se používají k regeneraci poškození epidermis po popáleninách apod.

Částečné úspěchy jsou při přípravě umělých jater, kdy separované hepatocyty jsou vysety do reaktoru na rozvodné potrubí z polopropustných membrán. Celý takový bioreaktor pak připomíná skutečná játra s krevním oběhem a odvodem žluči. Hepatocyty se však zatím nedaří dostatečně efektivně zamrazovat k dlouhodobému uskladnění a tak využití podle potřeby.



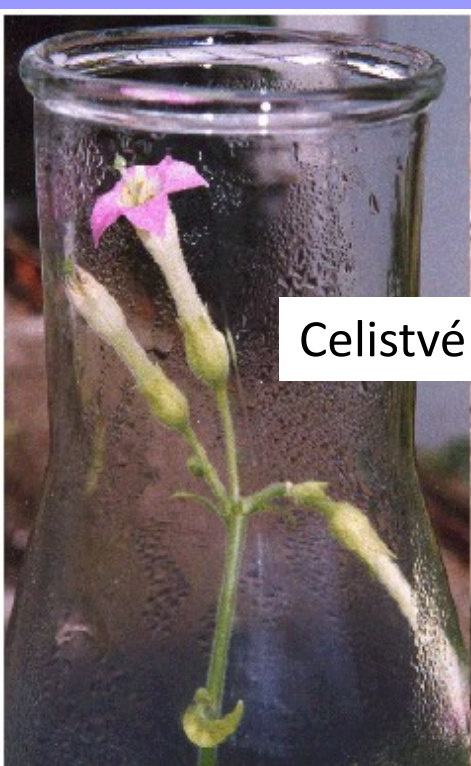
# Rostlinné explantáty

RNDr. Helena Lipavská, Ph.D.

Podobné tkáňovým kulturám

- Nároky na čistotu / sterilitu
  - Práce v laminárních boxech
  - Růst za sterilních podmínek +/-
  - Speciální inkubátory, klimaboxy – světelný režim
  - Živné půdy s agarem (pevné), v závislosti na typu +/- glukóza





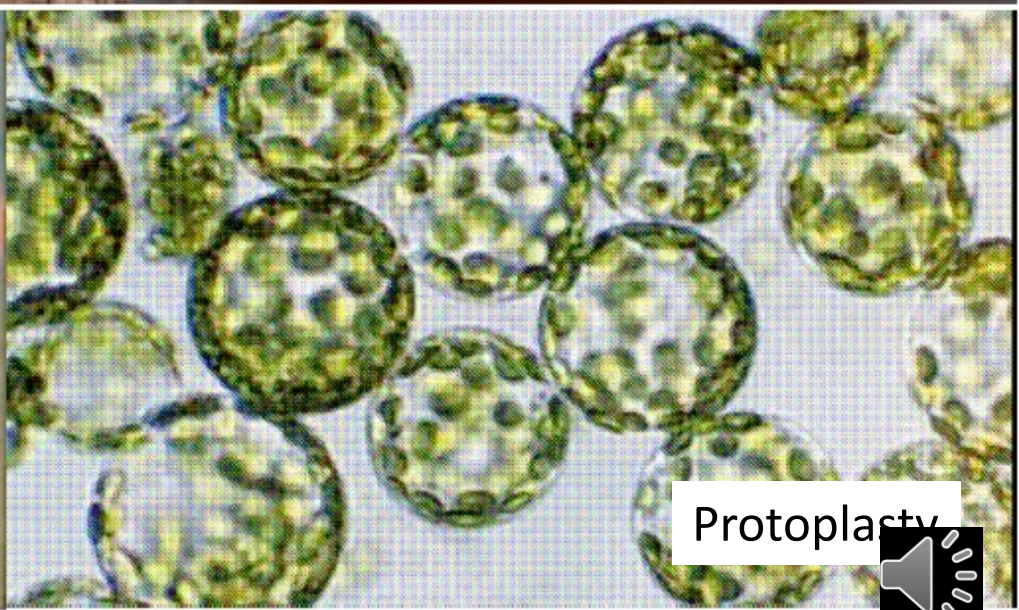
Celistvé rostliny



Rostlinná pletiva -kalus



Mikrospóry



Protoplasty

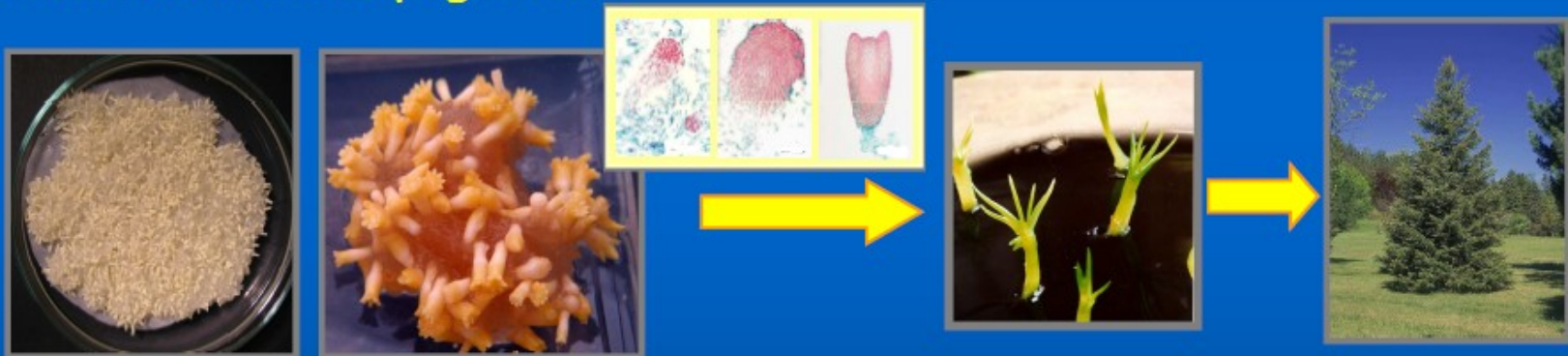




## Organogeneze in vitro



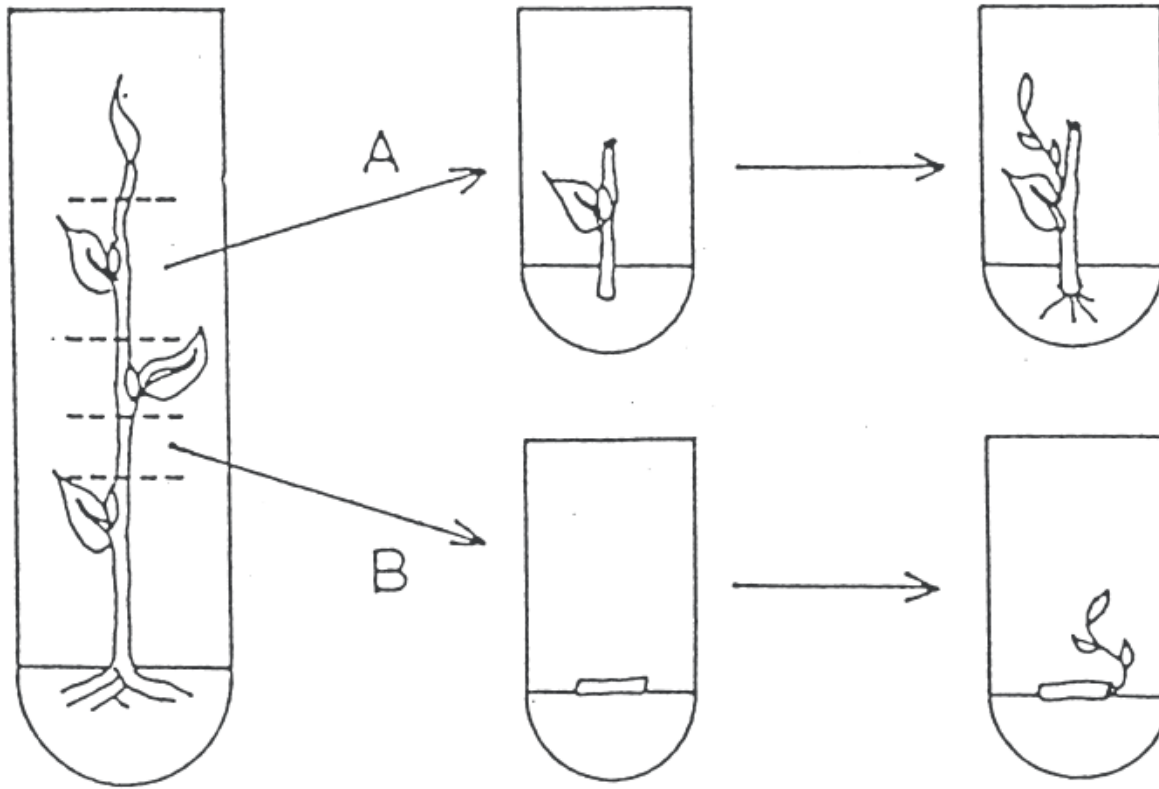
## Somatická embryogeneze



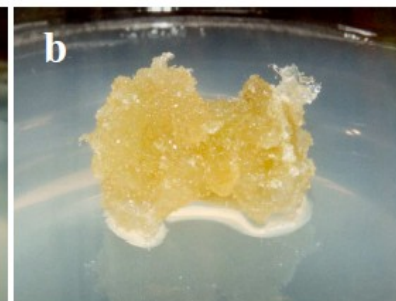
## Pylová embryogeneze



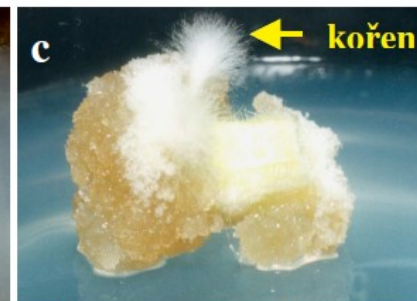
# Založení kultury a její regulace



↑ cytokinin : ↓ auxin



cytokinin ≈ auxin



↓ cytokinin : ↑ auxin

## **Doporučená literatura:**

Lesko, J. a kol.: Práce s tkanivovými kulturami, Bratislava, Vydavateľstvo slovenskej akadémie ved 1975, s. 212.

Alberts, B. a kol.: Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky. Ústí nad Labem, Espero Publishing 1998, 630 s.

Alberts, B. a kol.: Molecular biology of the cell. New York & London, Garland Publishing, Inc. 1994, 1294 s.

Spector, D. L. a kol.: Cells. A laboratory manual. Volumes 1, 2, 3. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1998, 3 197 s.

Cellis, J. E. a kol.: Cell Biology. A laboratory handbook. San Diego, London, Academic Press Inc. 1994, 1714 s.

Sambrook, J. a kol.: Molecular Cloning. A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989, 1832 s.

Ausubel, F. a kol.: Short Protocols in Molecular Biology. USA, Published by John Wiley & Sons Inc. 1995, 728 s.

