



Культивирование клеток *in vitro*

Выполнила: Марина Гаськова
481а

Культивирование

Культуры клеток представляют собой гомогенную популяцию генетически однородных клеток, растущих в постоянных условиях.

Исследователь может изменить эти условия в определенных пределах, что позволяет ему оценить влияние на рост клеток различных факторов-рН, t, концентрации АК, витаминов, и т.д.

Преимущества по сравнению с исследованиями на животных:

- Возможность пожизненного наблюдения клеток с помощью микроскопа
- Рост клеток может быть оценен в течении короткого периода времени либо по увеличению числа или размера клеток
- Существенные результаты могут быть получены при использовании небольшого кол-ва клеток
- При введении исследуемого хим.в-ва нет опасности, что оно метаболизируется печенью, запасается мышцами или экскретируется почками
- Реальные значения скорости включения или метаболизма исследуемых соединений

Важное преимущество, когда дело касается человека...

- Эксперименты, требующие для выяснения того или иного вопроса использования 100 крыс или 1000 человек, могут быть с равной статистической достоверностью поставлены на 100 культурах на покровных стеклах.
- Если каждую клетку рассматривать как независимый объект эксперимента, то одна культура на покровном стекле даст более достоверный ответ, чем целая клиника больных.
- Это снимает этические проблемы

Применение

- Культивирование позволило глубоко проникнуть в механизмы роста и дифференцировки клеток.
- Способность клеток к росту в культуре привела к развитию методов клонирования, хранения и слияние клеток.
- Крупномасштабное про-во моноклональных Ат (кл. селезенки+кл. миеломы)
- КК-ценные источники гормонов и др. секретлируемых материалов.
- Тестирование и изучение на КК м-ма д-я различных ЛП, детергентов, косметических средств, инсектецидов, консервантов

Первичные клетки

- Термином «первичная» обозначают клеточную культуру, полученную непосредственно из тканей человека или животных в эмбриональном или постнатальном периоде. Срок жизни таких культур ограничен. По прошествии определенного времени в них возникают явления неспецифической дегенерации, что выражается в грануляции и вакуолизации цитоплазмы, округлении клеток, утрате связи между клетками и твердым субстратом, на котором они выращивались. Периодическая смена среды, изменение состава последней и другие процедуры могут лишь несколько увеличить сроки жизни первичной клеточной культуры, но не могут предотвратить ее конечной деструкции и гибели. По всей вероятности, этот процесс связан с естественным угасанием метаболической активности клеток, выведенных из-под контроля нейро-гуморальных факторов, действующих в целостном организме.

Первичные клетки человека

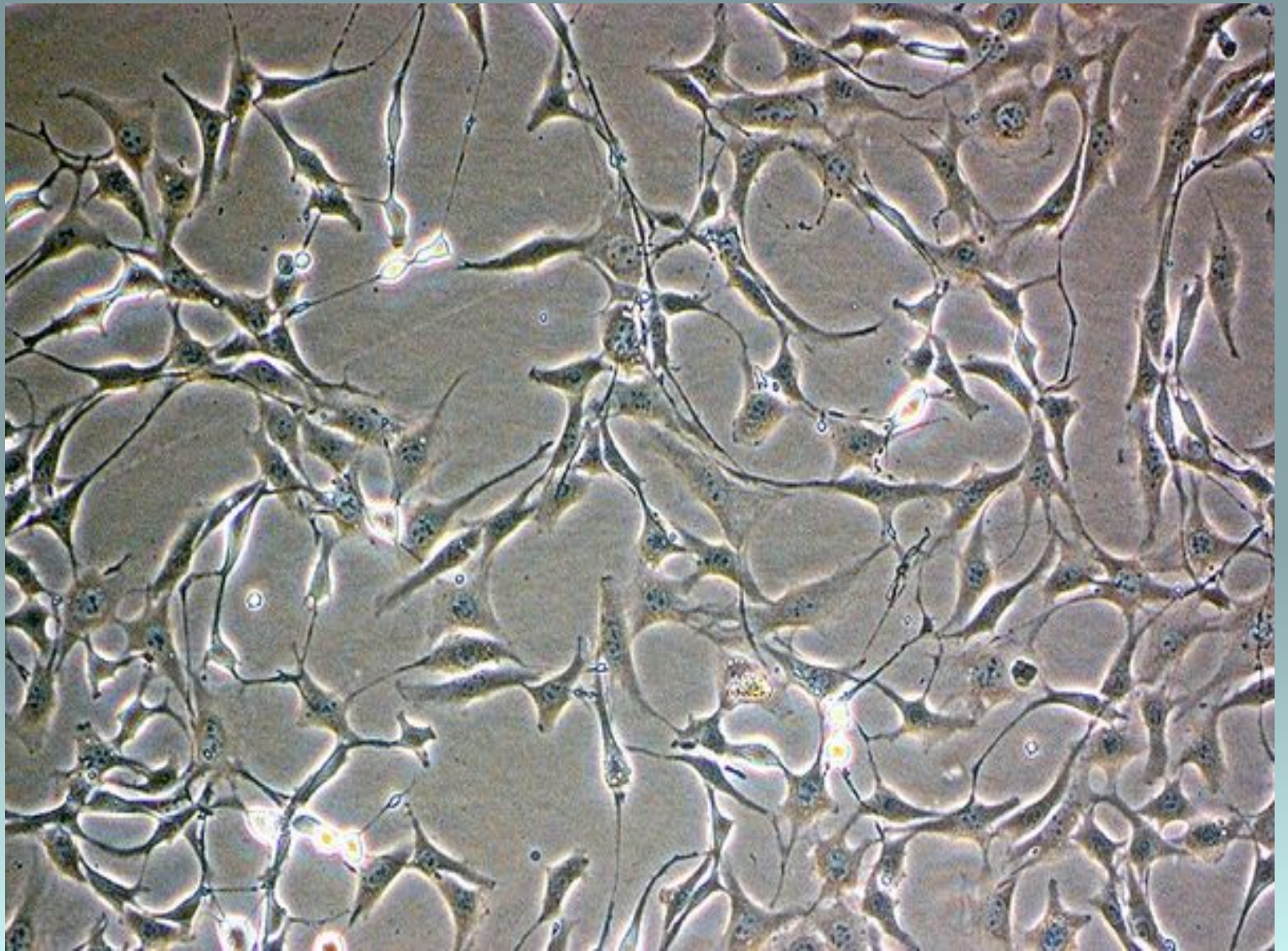
- Лимфоциты –служат идеальным источником ткани человека для изучения генетических заболеваний. Требуют митогенной стимуляции, претерпевают несколько делений, затем гибнут.
- Фибробласты кожи также имеют ограниченный более продолжительный период жизни в культуре, но их редко удается получить в таком же кол-ве.

Лимфоциты

- Кровь отбирают в сосуд с гепарином
- Отстаивают 40 мин
- Обогащенную плазму отсасывают и центрифугируют
- Вносят в питательную среду (для индукции бластогенеза вносят митоген)
- Инкубируют сутки

Культура фибробластов

- Биопсия кожи человека(выбор участка без волос и минимально кератинизирован)
- Стерилизация участка 70% этанолом, с помощью хирургических щипцов взять кусочек кожи
- Острыми ножницами вырезать блок 1мм^3 и поместить его в чашку Петри
- Добавить каплю полной ростовой среды с эмбриональной сывороткой теленка и разрезать блок на 10-15 кусочков
- Распределить их по поверхности чашки и покрыть каждый каплей среды
- Инкубировать ночь
- Осторожно, чтобы не сместить фрагменты, добавляют 3 мл среды и продолжить инкубацию



Перевиваемые клетки

- Лишь отдельные клетки или группы клеток популяции на фоне дегенерации большей части клеточного пласта могут сохранить способность к росту и размножению. Эти клетки, обнаружив потенцию бесконечного размножения *in vitro*, при многократных перевивках дают начало перевиваемым культурам клеток.
- Основное преимущество линий перевиваемых клеток, по сравнению с любой первичной культурой, состоит в потенции неограниченного размножения вне организма и относительной автономности сближающей их с бактериями и одноклеточными простейшими.
- Способность перевиваемых клеток к бесконечному размножению *in vitro* знаменует собой качественный скачок, в результате которого клетки приобретают способность к автономному существованию, подобно микроорганизмам, выращиваемым на искусственных питательных средах. Совокупность изменений, приводящих к появлению у клеток таких особенностей, называют трансформацией, а клетки перевиваемых тканевых культур — трансформированными.

Направления в культивировании животных

- Суспензионные культуры предпочтительнее с точки зрения увеличения выхода клеток.
- Монослойные культуры обладают рядом преимуществ

Преимущества Монослойных культур

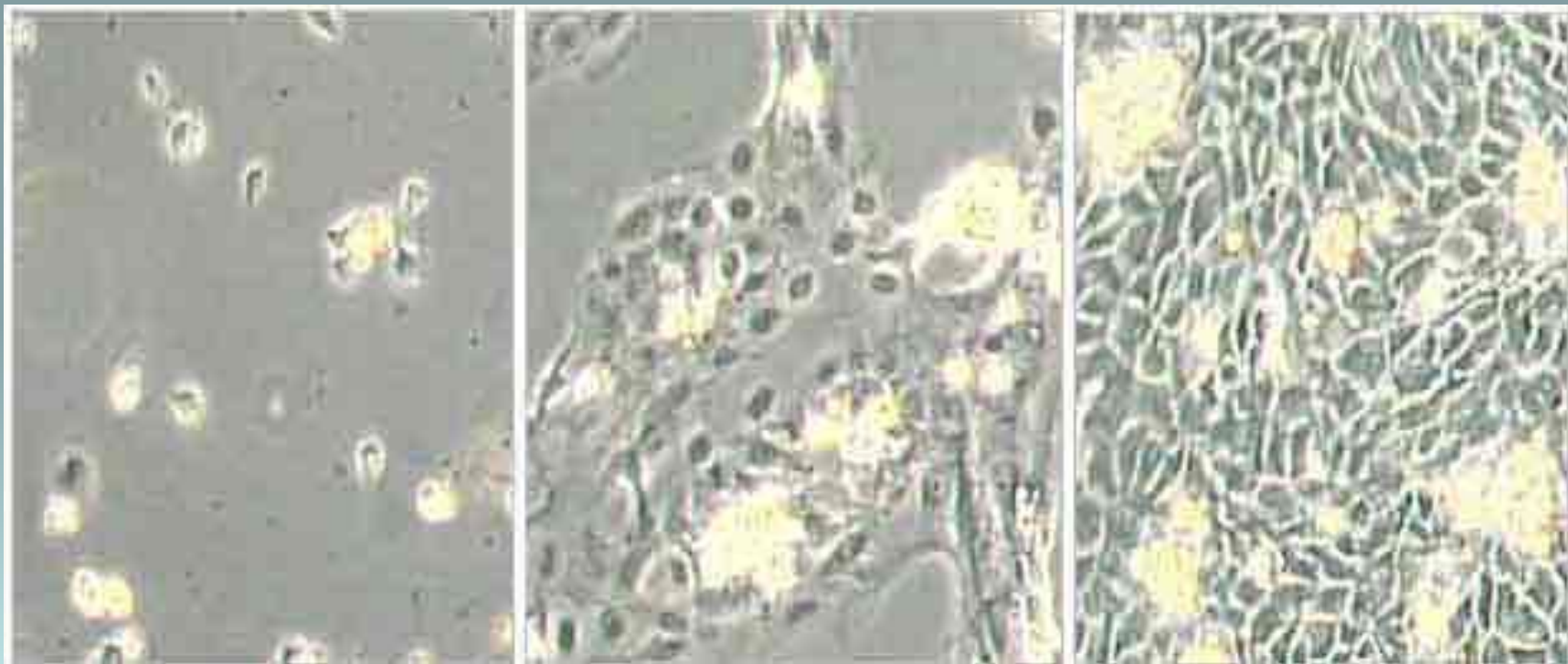
- 1. Легко провести полную замену среды и промыть клетки перед добавлением свежей питательной среды. Это важно в тех случаях, когда рост клеток идет в одних условиях, а наработка продукта в других условиях, например при переносе клеток из среды с сывороткой в бессывороточную среду. Можно также полностью удалять нежелательные компоненты.
- 2. Позволяют обеспечить высокую плотность клеток.
- 3. У многих клеток экспрессия требуемого продукта идет эффективнее, если клетки прикреплены к субстрату.
- 4. Монослойные культуры могут быть использованы для любого типа клеток, что обеспечивает наибольшую гибкость исследований.
- 5. В некоторых случаях, например для распространения вирусов, требуются тесные межклеточные контакты.

•

Недостатками монослойных культур

- требования большого пространства;
- возрастание стоимости и трудоемкости при увеличении масштаба;
- недостаточно эффективный контроль, обусловленный трудностями отбора пробы;
- сложности в определении и контроле рН, концентрации кислорода

Формирование монослоя



Суспензионные культуры

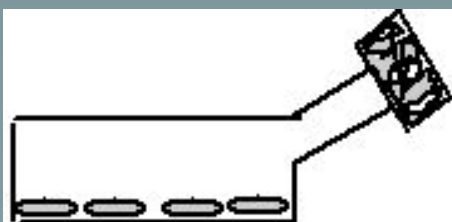
Лимфоциты не обнаруживают тенденции к агрегации к поверхности стекла или пластика и выживают на дне сосуда под тонким слоем среды.

Другие клетки, если не перемешивать суспензию, могут осаждаться и прикрепляться к субстрату.



Направления культивирования

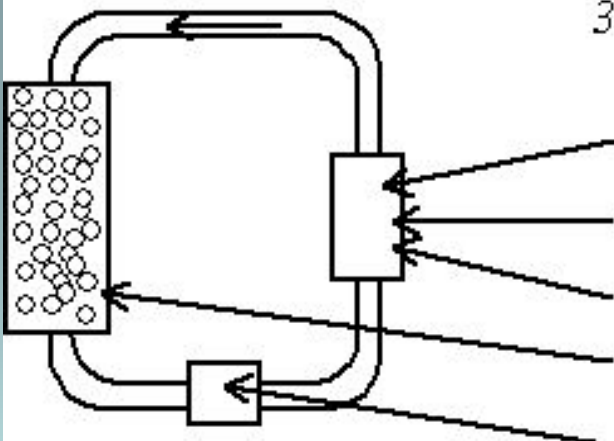
- 1. Культивирование в плоских флаконах (матрацах).
- 2. Культивирование во вращающихся бутылках, когда в каждый момент времени 15-20% поверхности бутылки покрыто питательной средой, а клетки находятся попеременно то в среде, то в воздухе.
- 3. Культивирование в колонках на микроносителях, в качестве которых выступают плотно упакованные, не смещающиеся стеклянные бусы диаметром 35 мм, стопка пластин и др., а питательная среда омывает их, протекая сверху вниз



1. Чашка Колле, плоский флакон с клетками на дне



2. Вращающаяся бутылка (круглый сосуд) с клетками на дне и стенках



3. Колонка с клетками на микроносителях

pH, давление, CO₂, температура

система контроля и регенерации среды

компоненты питательной среды

стеклянные бусы

перистальтический насос

Работа в культуральной лаборатории

Как правило, лаборатория, где проводят работы с культурами клеток, состоит минимум из 3-х помещений. Это бокс, где ведутся стерильные работы; комната для приготовления питательных сред, хранения химикатов, оборудования и т.д.; автоклавная.



Подготовка бокса к работе

- Непосредственно перед работой необходимо протереть внутренние поверхности ламинара этиловым спиртом, разложить в нем необходимые инструменты и материалы: спирт в закрытой посуде, спиртовку (горелку), спички, пинцет, серологические пипетки, резиновую спринцовку и культуральную посуду.
- Все операции, связанные с разливом питательных сред, пересевом клеточных культур проводят в ламинарах.





Посуда

Выбор посуды:

- Растут ли клетки в монослое или суспензии?
- Масштаб эксперимента
- Допустим ли газообмен с атмосферой или культуральные сосуды должны быть закупорены?

Газообмен
обеспечивает
поддержание рН,
который
контролируется по
цвету среды
(феноловый
красный)-чашка
Петри.

Закупоренные
сосуды-бутылки с
пробкой или
крышкой(буфер
Нерес\бикарбонат

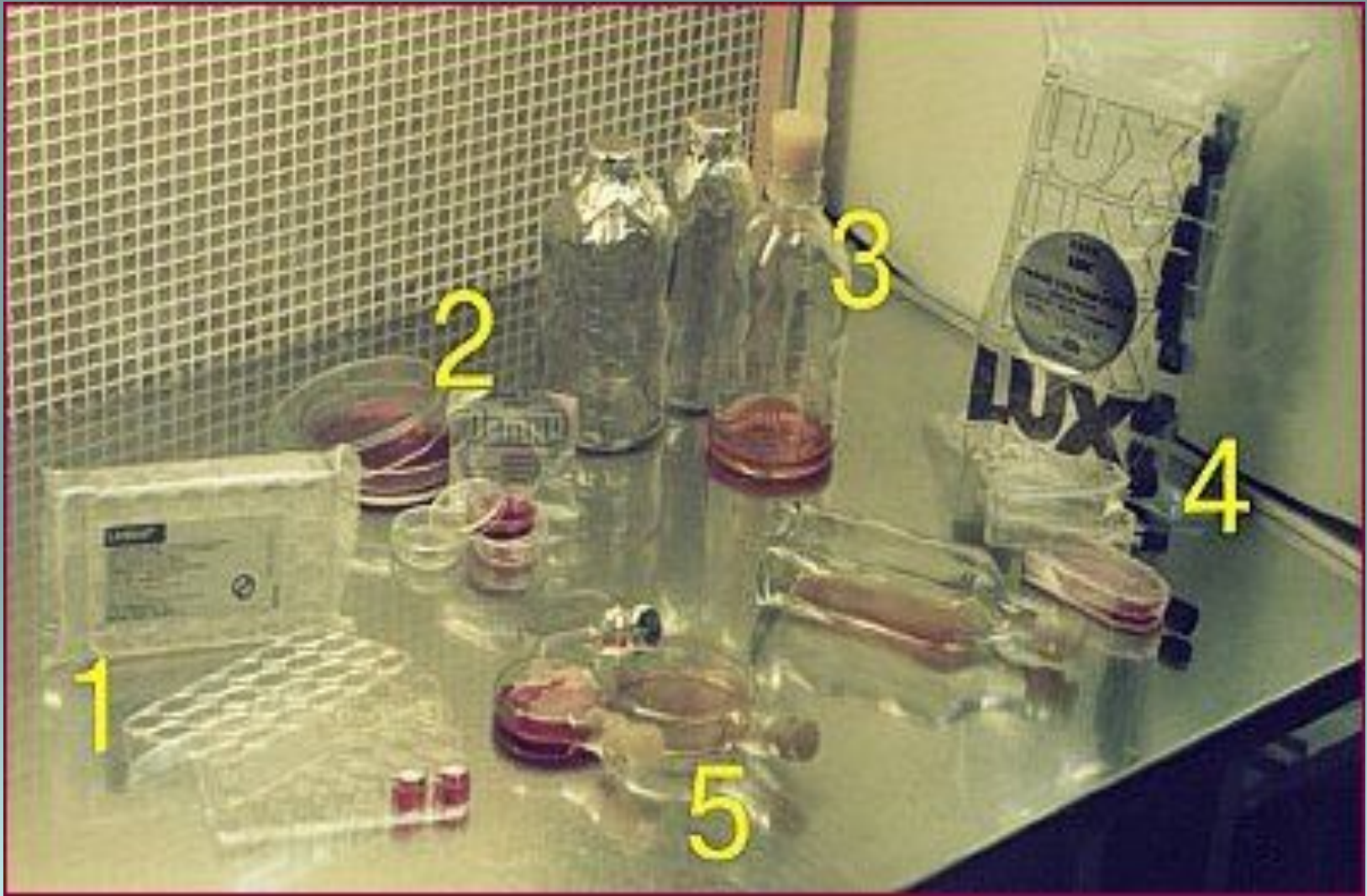


Мелкомасштабные культуры

- Бутыль Ру
- Плоские медицинские бутылки(125,250 мл)
- Флакон Фалькона

- Пластинки Линбро и Фалькона(24 лунки)
- Пластика для микротитрования(96 лунок)

- Универсальные контейнеры



Крупномасштабные культуры

- Вращающиеся сосуды
- Фабрика клеток(мультипластинчатые блоки из 10 спаянных друг с другом пластин)
- Перфузионные сосуды(аппараты, обеспечивающие постоянную перфузию вращающихся бутылок с помощью вращающихся пробок, через которые проходят различные питающие трубки)
- Капиллярные подложки



Стерилизация посуды

- Вначале посуду тщательно моют с использованием детергентов, а также раствора двуххромовокислого калия в серной кислоте (хромпика). Вымытую посуду ополаскивают водопроводной, затем дистиллированной водой и высушивают в сушильном шкафу .
- При сухом способе стерилизации посуду, завернутую в плотную бумагу, стерилизуют в сушильном шкафу при температуре 140°C в течение 2 часов, при температуре 180°C - 30 минут. При более высоких температурах ватные пробки буреют, а бумага становится ломкой.



Посуду выдерживают в автоклаве (рис. 2, б) под давлением в течение 20-40 минут при температуре 100-130°С. Продолжительность автоклавирования зависит от его режима: при давлении 0.5 атмосферы - 20-40 минут, при 1 атм. - 15 минут.

Среды для культуры клеток

1955г. Игл провел анализ компонентов для роста клеток млекопитающих.

БСИ:12 незаменимых АК, 9 витаминов;
глутамин, антибиотики добавляются вместе с 5% сывороткой КРС(требуется ежедневной смены)

МСИ:10-кратный концентрат требует разведения дистиллированной водой и послед.добавления глутамина, сыворотки, бикарбоната, антибиотиков.



Состав среды Игла

- 1. л-аргинина - 17,4
- 2. л-цистина - 4,8
- 3. л-гистидина - 3,1
- 4. л-изолейцина - 26,2
- 5. л-лейциина - 13,1
- 6. л-лизина - 14,6
- 7. л-метионина - 7,5
- 8. л-фенилаланина - 8,3
- 9. л-треонина - 11,9
- 10. л-триптафана - 2,0
- 11. л-тирозина - 18,1
- 12. л-валина - 11,7
- 13. биотина - 0,24
- 14. холина - 0,12
- 15. холин-хлорида - 0,14
- 16. витамина В12 (птероилглутаминовой кислоты) - 0,44
- 17. никотинамида - 0,12
- 18. пантотеновой кислоты - 0,22
- 19. пантотената кальция - 0,48
- 20. пиридоксаля (пиридоксин хлоргидрата) - 0,20
- 21. тиамин-хлоргидрата - 0,34
- 22. рибофлавина - 0,04
- 23. хлористого натрия - 5850,0
- 24. хлористого калия - 373,0
- 25. фосфата натрия однозамещенного ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) - 138,0
- 26. кальция хлористого - 111,0
- 27. двууглекислого натрия (NaHCO_3) - 1680,0
- 28. магния хлористого ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) - 102,0
- 29. глюкозы - 900,0
- 30. л-глутамина - 146,2—292,3
- 31. пенициллина - 50,0
- 32. стрептомицина - 50,0
- 33. фенола красного - 5,0
- 34. воды до 1000,0

Сбалансированные солевые растворы

- Среды составляют на основе сбалансированных буферных солевых растворов, которые важны для снабжения клеток необходимыми ионами и поддержания осмотического баланса (СБСР Эрла, Хенкса).
- Правильное значение $pH=7.2-7.5$
- Подщелачивание-красная
- Закисление-желтая
- Ионы Са-прикрепление клеток к поверхности
- Ионы Na, K-осмотический баланс

Усложненные среды (для отдельных линий)

- Среда Мак-Коя 5А-стандартная для клонирования(модифицирована в RPMI-1629)
- Среда Хэма F10-клонирование диплоидных клуток яичников хомяка(в присутствии min сыворотки)
- CMRL, NCTC-в отсутствие сыворотки

Сыворотка

- Подавляющее большинство клеток способно к пролиферации только в среде с природными добавками.
- Используют сыворотку КРС либо от эмбрионов, либо от новорожденных телят.

