

SEJT- ÉS SZÖVETTENYÉSZTÉS

5. Állati sejtek tenyésztése



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Bevezetés

Az él lények hierarchikus szervez dése:
Sejt Szövet Szerv Szervrendszer

Egyedfejl dés:
embrionális ssejt differenciálódott sejtek



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

Történeti áttekintés

1830 Schleiden-Schwann: kidolgozták a sejtelméletet, miszerint minden élő lény sejtekből áll

1855 Virchow: minden sejt sejtéből lesz (omnis cellula e cellula)

1885 Roux embrionális (madár) sejtek in vitro fenntartása

1967 Van Wezel: a mikrokarrieres sejttenyésztés

1970 rekombináns DNS technika alkalmazása állati sejteknél

1975 Köhler-Milstein: hibridóma sejt előállítás és monoklonális antitestek (immunfehérjék) termelése



A tenyésztés alapjai

Sejttenyésztés: diszpergált sejtek fenntartása *in vitro* körülmények között.

Szövettenyésztés: a szövet fenntartását jelenti oly módon, mely lehetővé teszi a sejtek differenciálódását ill. a struktúra és/vagy funkció megőrzését.



Állati sejt/szövettenyésztés

Egészen más, mint a mikroorganizmusok tenyésztése.

A sejtvonalak egy része csak felülethez kötve növekszik (monolayer, kontakt gátlás) speciális tenyésztő edények

Van néhány, ami szuszpenzióban is szaporodik (CHO, BHK, VeRo, HeLa), mint a mikrobák fermentorszer készülőkk.

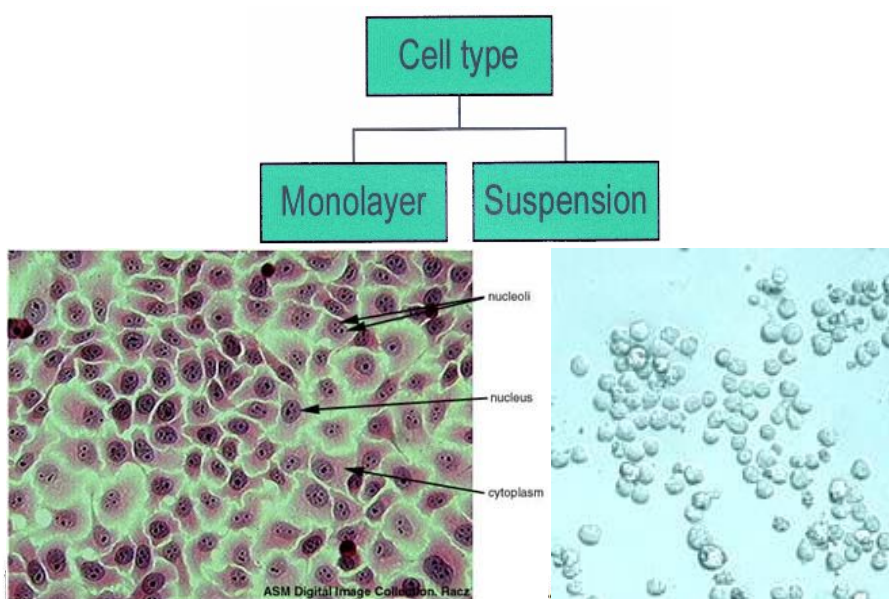
Általában emlős sejteket tenyésztünk, de előfordul madár és rovar sejttenyésztése is.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

Tenyészetek növekedése



A sejtenyésztés jelentősége

- kutatás: az állati sejtekre jellemző biokémiai utak, különböző sejtszint szabályozások
- rekombináns fehérjék előállítására (pl. interferonok, növekedési hormonok, stb.)
- monoklonális ellenanyagok (immunfehérjék) termelése (hibridóma sejtekkel)
- vírusok szaporítására vakcinagyártás céljából
- állatkísérletek kiegészítése, részleges helyettesítése



A fenntartás korlátja

A gerincesek legtöbb sejtje csak korlátozott számban osztódik az izolálást követően, azaz a tenyészet előregszik (= szeneszencia)

Okai:

1. a kromoszómavégek (telomérák) minden osztódási ciklusban bekövetkező megrövidülése
2. aktiválódnak a sejtciklust ellenőrző (és azt leállító) mechanizmusok

Csak a tumor- és a rovarsejtek osztódnak korlátlanul (immortality).



Szaporítható sejtípusok:

Szinte minden szövet szaporítható, az izom és ideg kivételével. Az érett vörsejtek nem osztódnak.

Fibroblaszt (köt szövet): generációs ideje kicsi, felületesen gyorsan n , túlnövi az egyéb szöveteket

Epitheliális (hám) sejtek: sok specializálódott sejt van

A korai embrionális eredetű sejtek jól szaporodnak

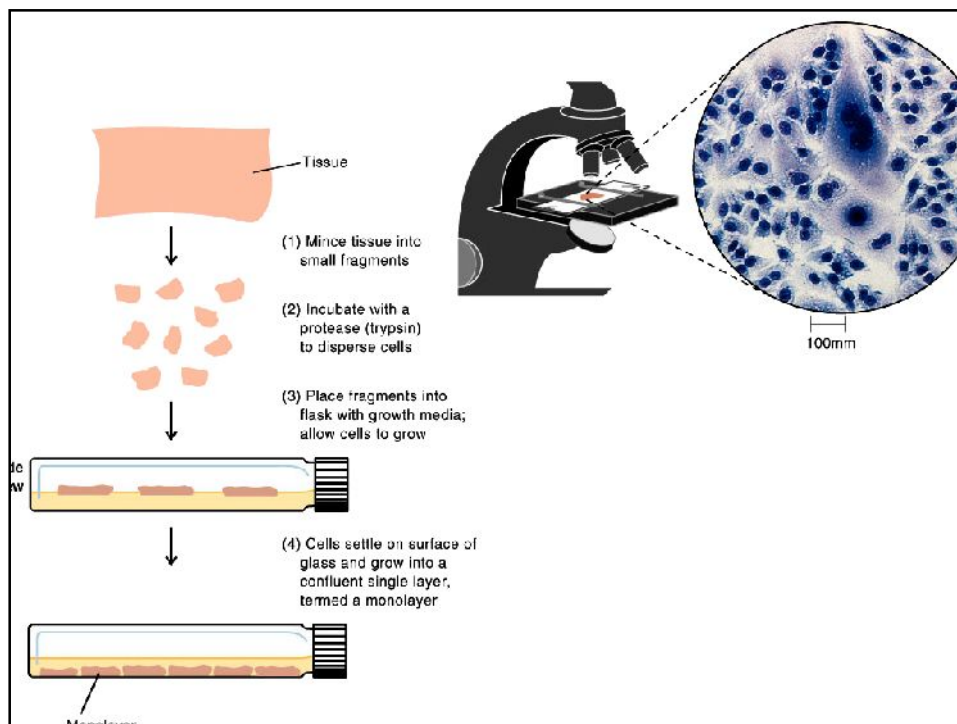
Rágcsálók (pl. egér, patkány, hörcsög) sejtjei is



Sejtpreparálás tenyésztéshez

1. A sejtenyésztéshez szükséges oldatok elkészítése.
2. A tenyésztés céljára felhasználandó szövet előkészítése.
3. Enzimes sejt-disszociáció: kollagenáz, tripszin és egyéb proteáz enzimek alkalmazásával
4. A sejt-suszpenzió szélesítése a sikeresen diszpergált sejtek és a megmaradt szövetdarabok szétválasztására.
5. A sejtek centrifugálása
6. A sejtüledék reszuszpendálása, friss tápfolyadékban.





Sejtpreparálás tenyésztéshez

Ha elérték a megfelelő sejtsűrűséget, a tenyészetből szubkultúrákat készítenek, ezek egy részét tárolásra/deponálásra elkészítik (→ eltarthatóság ld. később), illetve közvetlenül továbbtenyésztésre, manipulációra vagy termelésre használják fel.

Szubkultúra: egy genetikailag homogén tenyészetet több résztenyészetre osztanak, amelyeknek további felhasználása eltérő lehet (pl. konzerválják, termelésre használják, stb).



Sejtvonalak eltartása

Egy sejtvonal átlagosan 100 átváltás után előregszik, szaporodó képessége csökken, majd a szaporodás leáll.

Ezért „gazdálkodni” kell a szaporítási ciklusokkal.

Célszerű a preparálás után kevés átváltással számos szubkultúrát készíteni, és ezek nagy részét tartósítani. Ez az ún. „Master cell bank”, amihez vissza lehet nyúlni, ha a használatban lévő tenyészetek előregedtek, vagy befertözödtek.

Az egyes munkahelyeken (labor, üzem) is létrehozhatnak tartósan tárolt szubkultúrákat a kapott sejtvonalakból, amihez vissza lehet nyúlni a szaporodó tenyészetek elvesztése esetén („working cell bank”).

Célszerű a tenyészeteket és az átváltásokat törzskönyvszerűen nyilvántartani.



Az állati sejttenyésztés tápadatai

Tápoldatok: reprodukálni kell a természetes környezetet:
→ vér, sejtközi folyadék (sokkomponensű, drága)

- Szénforrás: glükóz (mint a vércukor), glutamin! → energia és N-forrás.
- 15 - 20 féle aminosav,
- vitaminok,
- koenzimek,
- lipidek,
- ásványi ionok (pontos összetétel, ozmózis nyomás)



Módosított Eagle médium (MEM)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium					
Component	D5546 [1x] g/L	D5648 g/L		D5546 [1x] g/L	D5648 g/L
INORGANIC SALTS					
Calcium Chloride	0.2	0.2	L-Tyrosine • 2Na • 2H ₂ O	0.10379	0.10379
Ferric Nitrate • 9H ₂ O	0.0001	0.0001	L-Valine	0.094	0.094
Magnesium Sulfate (anhydrous)	0.09767	0.09767	VITAMINS		
Potassium Chloride	0.4	0.4	Choline Chloride	0.004	0.004
Sodium Bicarbonate	3.7	—	Folic Acid	0.004	0.004
Sodium Chloride	6.4	6.4	myo-Inositol	0.0072	0.0072
Sodium Phosphate Monobasic (anhydrous)	0.109	0.109	Niacinamide	0.004	0.004
AMINO ACIDS					
L-Arginine • HCl	0.084	0.084	o-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.004	0.004
L-Cystine • 2HCl	0.0626	0.0626	Pyridoxal • HCl	—	0.004
L-Glutamine	—	0.584	Pyridoxine • HCl	0.004	—
Glycine	0.03	0.03	Riboflavin	0.0004	0.0004
L-Histidine • HCl • H ₂ O	0.042	0.042	Thiamine • HCl	0.004	0.004
L-Isoleucine	0.105	0.105	OTHER		
L-Leucine	0.105	0.105	D-Glucose	1.0	4.5
L-Lysine • HCl	0.146	0.146	HEPES	—	—
L-Methionine	0.03	0.03	Phenol Red • Na	0.0159	0.0159
L-Phenylalanine	0.066	0.066	Pyruvic Acid • Na	0.11	—
L-Serine	0.042	0.042	ADD		
L-Threonine	0.095	0.095	Glucose	—	—
L-Tryptophan	0.016	0.016	L-Glutamine	0.584	—
			Sodium Bicarbonate	—	3.7

Az állati sejtenyésztés tápadatai

SZÉRUM: a sejtvonalak nagy része igényli a vérfehérjék jelenlétét is, enélkül a legtöbb sejtvonal elpusztul.

Ezt újszülött állatok (borjú, csikó) vérérumával biztosítják (5-15%). Ez nagyon drága (és nehezen reprodukálható), ezért törekszenek a minimalizálására, helyettesítésére vagy teljes elhagyására.

Komplex rendszer, az albumin mellett sok szabályozó, serkent és gátló faktort tartalmaz.



Az állati sejtenyésztés körülményei

A sejtek nagyon érzékenyek pl. a nyírásra:

- nagyon kíméletes keverés,
- a levegőztetésnél sem lehetnek buborékok

Az oxigénigény nagyon kicsi, rendszerint elég a fejtérfogatot átöblíteni levegővel. Sok sejtvonal kedveli a CO₂ jelenlétét (2-5%)

Hőmérséklet: emlősejtekénél 37°C, madársejtekénél 41°C, rovarsejtekénél 25-30 °C



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

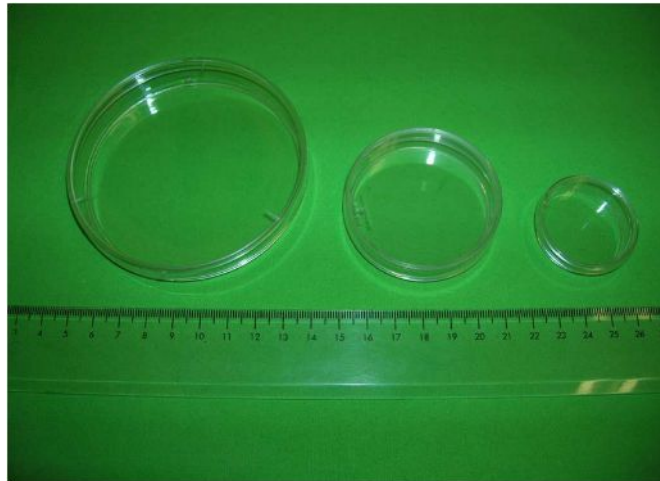
Laboratóriumi tenyésztőedények (felületi)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

Laboratóriumi tenyészt edények (felületi)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

Laboratóriumi tenyészt edények (felületi)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

20

Laboratóriumi tenyészt edények (felületi)

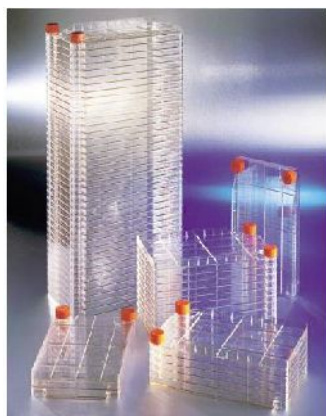


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

Felület növelése

Multitray



roller bottles



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

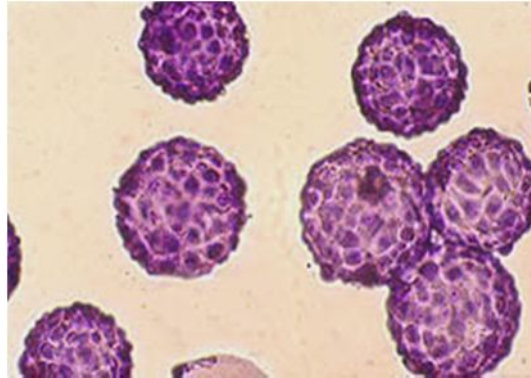
22

Mikrokarrieres tenyésztés

Inokulálási/tapadási fázis



kialakult monolayer



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

Mikrokarrieres tenyésztés

van Wezel 1967: DEAE Sephadex A50-en

Apró, szuszpendált gyöngyök felületén,

átmér : 100-300 μm ,

sűrűség: 1,02-1,05 g/cm^3 (lebegésben tartható),

A fermentor térfogatának 8-15%-a hordozó,

felülete 0,5-1,5 m^2/l , ami 10-30 forgó palacknak felel meg,

= nagy produktivitás

Előnyei:

- nagy felületet be lehet bevinni egy adott reaktor-térfogatba
- viszonylag homogén környezet
- nincs szükség új reaktortípusokra



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24

Mikrokarrieres tenyésztés

Lépések:

inokulum: forgó palackból a tenyészetet tripszinnel leoldják

A sejtek megtapadnak a gyöngy felületén, átlagosan 5-6 sejt egy gyöngyön, elszaporodnak, egy rétegben nőnek (monolayer, kontakt gátlás),

függ: sejtvonaltól, mikrokarrier jellemzőitől, a sejt növekedési fázisától, a médium összetételétől és a sejt/mikrokarrier számaránytól



Mikrokarrieres tenyésztés

Keverés: az immobilizált sejtek érzékenyebbek a nyírásra, lekerekített keverő, nagy keverő átmérő, kis fordulatszám

Levegőtetés: direkt levegőtetésnél a felszálló és szétpukkanó buborékok károsíthatják a sejteket, ezért a felső légterben vagy indirekt módon.

A gyöngyök könnyen leülepednek, főleg a tápoldat lecserélhető, illetve könnyű feldolgozni.

A gyöngyöket nem lehet/érdemes újra felhasználni.



„Spinner flask”

Mágneses keverő, lassú mozgatás
Mikrokarrieres és szuszpenziós tenyésztésre egyaránt



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

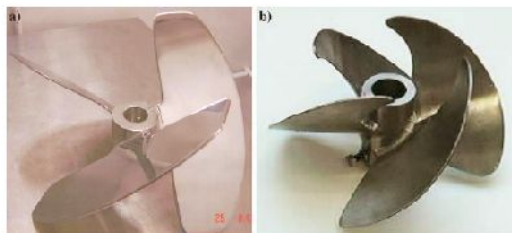
Keverő reaktorok

Általánosan szuszpenziós tenyésztéshez, de mikrokarrieres felületi tenyészetekhez is használható.

Energiabevitel kisebb, kevesebb O_2 kell, így kevésbé károsodik a sejt, néha elegendő a felületi levegőztetés, a cél csak a homogenizálás és szuszpenzióban tartani a sejteket/mikrokarriereket

perfúziós levegőztetés: valamilyen elválasztón keresztül (acélszita, szilikon cső), nincs károsodás

Keverő: lekerekített formák, hajócsavar, 25-250 rpm



BME Fig. 13 (a) An ABEC 'depart car' impeller (used down-pumping); (b) Hayware Tyler up-pumping B2 hydrofoil

Összehasonlítás

Szakaszos: rossz produktivitás, sejtkoncentráció $\sim 10^6$ sejt/ml, ~ 1 hét

Rátáplálásos: glükóz + aminosavak, 3 hét, nagyobb produktivitás

Folytonos (lefejtés - rátöltés): sejtkoncentráció $\sim 10^7$ sejt/ml, 6 hét, termék is koncentráltabb, a szükséges reaktortérfogat a szakaszosnak csak 1%-a

A reaktor és módszer kiválasztása az alapján történik, hogy mennyi a szükséges termék mennyiség:

rEPO: 100 μ g/beteg \rightarrow elegendő a forgó palack,

rtPA: 100 mg/ beteg \rightarrow fermentor

