

SEJT- ÉS SZÖVETTENYÉSZTÉS

5. Állati sejtek tenyésztése



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Bevezetés

Az élőlények hierarchikus szerveződése:
Sejt Szövet Szerv Szervrendszer

Egyedfejlődés:
embrionális sejt differenciálódott sejtek



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

Történelmi áttekintés

1830 Schleiden-Schwann: kidolgozták a sejtelméletet, miszerint minden élőlény 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 sejtenyésztés

1970 rekombináns DNS technika alkalmazása állati sejteknél

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

A tenyésztés alapjai

Sejtenyésztés: 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

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 készülőek.

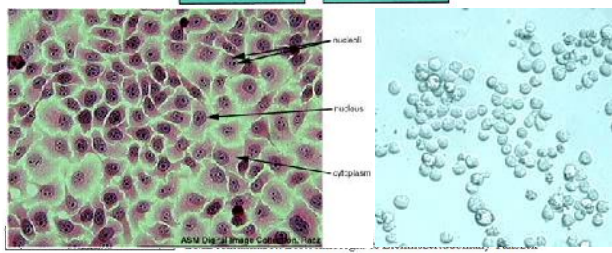
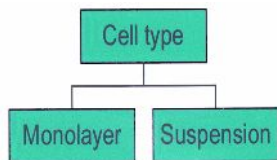
Általában emlős sejteket tenyésztenek, de előfordul madár és rovar sejtek tenyésztése is.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

Tenyésztetek növekedése



A sejtenyésztés jelentősége

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

A fenntartás korlátja

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

Okai:

1. a kromoszómavégek (telomérák) minden osztódási ciklusban bekövetkező megrövidülése
2. aktiválódnak a sejtciklus ellenőrzés (és az leállító) mechanizmusok

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

Szaporítható sejtípusok:

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

Fibroblaszt (kötő szövet): generációs ideje kicsi, felületeken gyorsan nő, 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



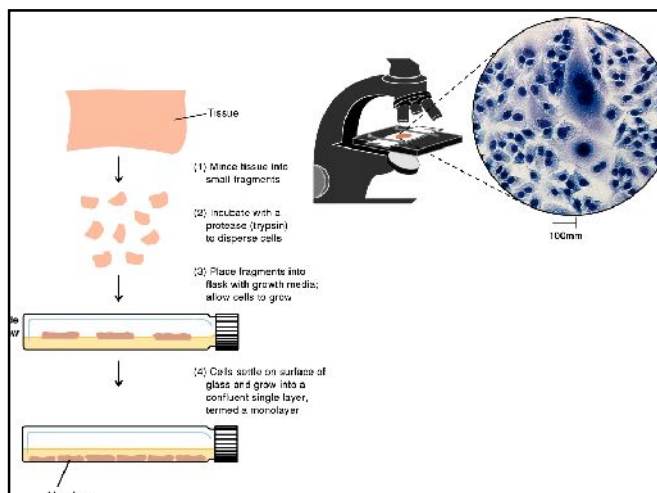
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

Sejtpreparálás tenyésztéshez

1. A sejtenyésztéshez szükséges oldatok elkészítése.
2. A tenyésztés céljára felhasználandó szövet el készítése.
3. Enzimes sejt disszociáció: kollagenáz, tripszin és egyéb proteáz enzimek alkalmazásával
4. A sejtszuszpenzió sz rése a sikeresen diszpergált sejtek és a megmaradt szövetdarabok szétválasztására.
5. A sejtek centrifugálása
6. A sejttöledék reszuszpendálása, friss tápfolyadékban.





Sejtpreparálás tenyésztéshez

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

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



Sejtvonalak eltartása

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

Ezért „gazdálkodni” kell a szaporítási ciklusokkal.

Célszerű a preparálás után kevés átoltással 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 befert z d-tek.

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 átoltásokat törzskönyv-szerűen nyilvántartani.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

Az állati sejtenyésztés tápoldatai

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

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

Módosított Eagle médium (MEM)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium	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
Resorcinol	0.0001	0.0001	Valine	0.094
Magnesium Sulfate (anhydrous)	0.09767	0.09767	VITAMINS	
Potassium Chloride	0.4	0.4	Choline Chloride	0.004
Sodium Bicarbonate	3.7	—	Folic Acid	0.004
Sodium Chloride	6.4	6.4	myo-Inositol	0.0072
Sodium Phosphate Monobasic (anhydrous)	0.109	0.109	Nicotinamide	0.004
AMINO ACIDS			L-Pantoic Acid (Demicalcium)	0.006
L-Arginine • HCl	0.084	0.084	Pyridoxal • HCl	—
L-Cystine • 2HCl	0.0026	0.0026	Pyridoxine • HCl	0.004
L-Glutamine	—	0.584	Riboflavin	0.0004
Glycine	0.03	0.03	Thiamine • HCl	0.004
L-Histidine • HCl • H ₂ O	0.042	0.042	OTHER	
L-Isoleucine	0.103	0.103	D-Glucose	1.0
L-Leucine	0.103	0.103	HEPES	—
L-Lysine • HCl	0.146	0.146	Ribitol Res • Na	0.0158
L-Methionine	0.03	0.03	Pyruvic Acid • Na	0.11
L-Phenylalanine	0.006	0.006	ADD	
L-Serine	0.042	0.042	Glucose	—
L-Threonine	0.05	0.05	L-Glutamine	0.584
L-Thyrosine	0.016	0.016	Sodium Bicarbonate	—

Az állati sejtenyésztés tápadatai

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

Ezt újszülött állatok (borjú, csikó) vérszérumával 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

Az állati sejtenyésztés körülményei

A sejtek nagyon érzékenyek pl. a nyírásra:

- nagyon kíméletes keverés,
- a levegő zivataránál sem lehetnek buborékok

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

Hőmérséklet: emlős sejteknél 37°C, madársejteknél 41°C, rovarsejteknél 25-30 °C



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

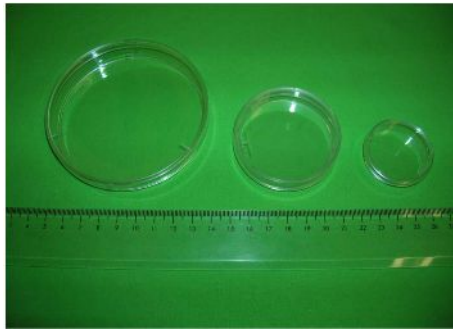
Laboratóriumi tenyésztőedények (felületi)



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)

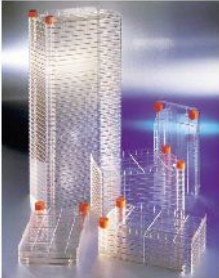


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék


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 ,
 s r ség: 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

El nyei:

- nagy felületet be lehet bevinni egy adott reaktor-térfo-
gatba
- 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 nem (monolayer, kontakt gátlás),

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

25

Mikrokarrieres tenyésztés

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

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

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

A gyöngyöket nem lehet/érdemes újra felhasználni.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

26

„Spinner flask”

Mágneses keverő, lassú mozgató
Mikrokarrieres és szuszpenziós tenyésztésre egyaránt



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

Kevert reaktorok

Általánosan szuszpenziós tenyésztéshez, de mikrokarrierrel 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 cs), nincs károsodás

Kevert : lekerekített formák, hajócsavar, 25-250 rpm



BME Fig. 12. 50. Az ABC: 'Stirrer' az 'in situ' (szilikon cs) a perfúziós levegőztetéshez. Helyes: Több agglomerátum (2) helyett 4.

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29
