

SEJT- ÉS SZÖVETTENYÉSZTÉS

5. Állati sejtek tenyésztése



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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

Bevezetés

Az élő lények hierarchikus szerveződése:
Sejt Szövet Szerv Szervrendszer

Egyedfejlés:
embrionális sejt differenciálódott sejtek



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

Állati sejt/szövettenyésztés

Egészen más, mint a mikroorganizmusok tenyésztése.

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

Van néhány, ami szuszpenzióban is szaporodik (CHO, BHK, VeRo, HeLa), mint a mikrobák fermentációs rendszer készítői.

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

Történeti áttekintés

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

1855 Virchow: minden sejt sejtből 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

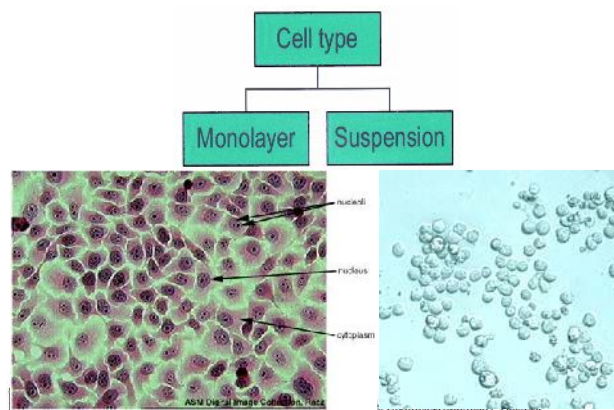
1975 Köhler-Milstein: hibridóma sejt előállítás és monoklonális antitestek (immunfehérjék) termelése



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

Tenyésztetek növekedése



A sejtenyésztés jelentősége

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



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-szuszpenzió szűrése a sikeresen diszpergált sejtek és a megmaradt szövetdarabok szétválasztására.
5. A sejtek centrifugálása
6. A sejtledek reszuszpendálása, friss tápfolyadékban.



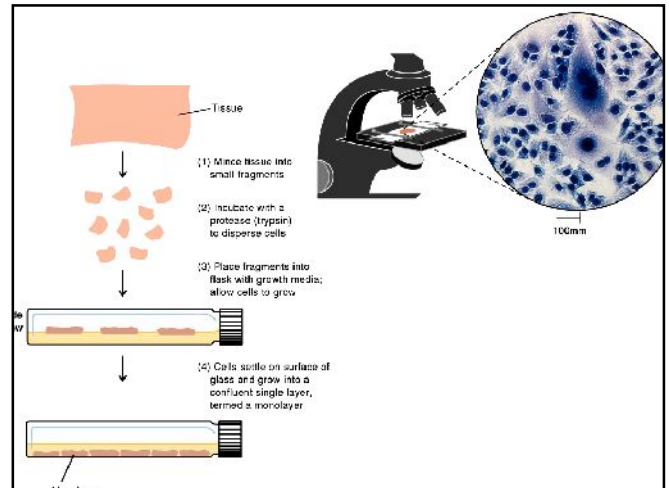
A fenntartás korlátja

A gerincesek legtöbb sejtje csak korlátozott számban osztozik az izolálást követően, azaz a tenyésztés előregszik (= szeneszcencia)

Okai:

1. a kromoszóma-vegek (telomérák) minden osztódási ciklusban bekövetkező megrövidülése
2. aktiválódnak a sejt-ciklust ellenőrző (és azt leállító) mechanizmusok

Csak a tumor- és a rovarsejtek osztoznak korlátlanul (immortalitás).



Szaporítható sejtípusok:

Szinte minden szövet szaporítható, az izom és ideg kevésbé. Az érett vörsejtek nem osztoznak.

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



Sejtpreparálás tenyésztéshez

Ha elérték a megfelelő sejt-sűrűséget, a tenyésztetből szubkultúrákat készítenek, ezek egy részét tárolásra/deponálásra előkészítik (→ eltartás ld. később), illetve közvetlenül továbbtenyésztésre, manipulációra vagy termelésre használják fel.

Szubkultúra: egy genetikailag homogén tenyésztet több résztenyésztetre 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 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 átváltásokat törzskönyv-szerűen nyilvántartani.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

Az állati sejtenyésztés tápoldatai

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, serkentő és gátló faktort tartalmaz.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

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

Az állati sejtenyésztés körülményei

A sejtek nagyon érzékenyek pl. a nyírásra:

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

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

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

Módosított Eagle médium (MEM)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium	D5546 [1x] g/l	D5648 g/l	D5546 [1x] g/l	D5648 g/l
Component				
INORGANIC SALTS				
Calcium Chloride	0.2	0.2	L-Tyrosine • 2Na • 2H ₂ O	0.10379
Calcium Nitrate • 6H ₂ O	0.0001	0.0001	Valine	0.004
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	Niacinamide	0.004
			L-Pantoic Acid (Demicalcium)	0.004
AMINO ACIDS			Pyridoxine • HCl	—
L-Arginine • HCl	0.084	0.084	Pyridoxine • HCl	0.004
L-Cystine • 2HCl	0.0026	0.0026	Riboflavin	0.0004
L-Glutamine	—	0.584	Thiamine • HCl	0.004
Glycine	0.03	0.03	OTHER	
L-Histidine • HCl • H ₂ O	0.042	0.042	D-Glucose	1.0
L-Isoleucine	0.103	0.103	HEPES	—
L-Leucine	0.103	0.103	Phenol Red • Na	0.0158
L-Lysine • HCl	0.146	0.146	Pyruvic Acid • Na	0.11
L-Methionine	0.03	0.03	ADD	
L-Phenylalanine	0.006	0.006	Glucose	—
L-Serine	0.042	0.042	L-Glutamine	0.584
L-Threonine	0.051	0.051	Sodium Bicarbonate	—
L-Thyrosine	0.016	0.016		3.7

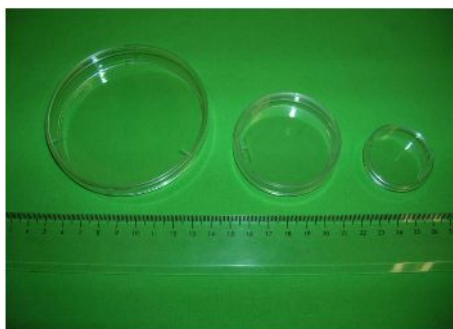
Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)

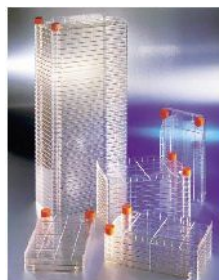


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

Felület növelése

Multitray



roller bottles



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22

Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

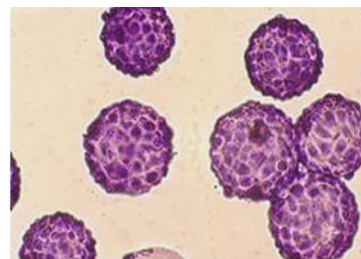
20

Mikrokarrieres tenyésztés

Inokulálási/tapadási fázis



kialakult monolayer



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

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 (levegésben 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 nem (monolayer, kontakt gátlás),

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

25

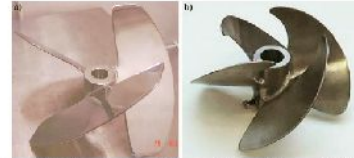
Kevert reaktorok

Általában 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: lekerékített formák, hajócsavar, 25-250 rpm



BME Fig. 12.50. Az ABC 'Spinner flask' in plastic (and also in stainless steel). Heterocell suspension (2) (a) (b) (c)

Mikrokarrieres tenyésztés

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

Levegőztetés: direkt levegőztetésnél 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

26

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

„Spinner flask”

Mágneses keverő, lassú mozgató

Mikrokarrieres és szuszpenziós tenyésztésre egyaránt



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27