

Sejt- és szövettanyésztés

5.1. Állati sejtek tenyésztése

Az eddigi eladások során csak mikroorganizmusokról volt szó, csak a mikrobatenyészetekkel foglalkoztunk. Az, hogy állati sejteket is lehet tenyészteni, a hepatitis B vakcina gyártásának ismertetése során már felmerült, említettük, hogy az egyik lehetséges gyártási mód a sejttanyésztés. Az alapelv hasonló. Ahogyan egysejt organizmusokat lehet életben tartani, szaporítani, anyagtermelésre rábírnunk laboratóriumban, s t ipari körülmények között, ezt ugyanúgy meg lehet tenni ezt a soksejt él lények sejtjeivel is. E sejtek tulajdonságai és környezeti igénye azonban nagymértékben eltér mikrobákétól, emiatt célszerű tenyésztésüket külön tárgyalni.

Az él lények hierarchikus szerveződése:

Sejt Szövet Szerv Szervrendszer

Sejt = A sejt az összes ismert él organizmus szerkezeti és funkcionális építő eleme. Ez a legkisebb egység, amelyet még a természetben él névvel illetnek, mivel ez a legkisebb olyan egység, amely még anyagcserére és szaporodásra is képes.

Szövet = Az azonos módon differenciálódott, azonos funkciókkal rendelkező sejtek együttesét nevezzük szövetnek. (Van hámszövet, izomszövet, idegszövet stb., melyek funkcionálisan máshogyan differenciálódtak).

Szerv = Különböző szövetek együttese alkotja egy szervet. (Itt már többféle funkció van együttesen jelen, pl. a gyomorban van izomszövet, hámszövet stb.)

Szervrendszer = A szervek együttese alkotja a szervrendszert. Pl.: emésztő szervrendszer.

Hogyan alakul ki a többféle differenciálódott szövet?

Egyedfejlődés:

embrionális sejt differenciálódott sejtek

Az emberi sejtek zigóta korban még nem differenciálódtak. Ekkor még minden sejtünk egyforma volt. Majd embrionális korban fokozatosan (szedercsíra állapotban még nem, de

hólyagcsíra állapotban már igen) elkezdnek a sejtek differenciálódni. Ezt követően az embrionális fejlődés alatt kialakulnak azok a szövettípusok, melyeket aztán egész életünkben használunk.

Történeti áttekintés, mérföldkövek:

1830: Ekkorra tehető a sejtelmélet megjelenése. Schleiden-Schwann: kidolgozták a sejtelméletet, miszerint minden élő lény sejtekből áll, és aminek nincsen sejtje, az nem is élő lény. (Egyedül a vírusoknak nincsenek sejtjeik, de éppen emiatt nehéz eldönteni, hogy egyáltalán élő lénynek tekinthető-e).

1855: Virchow: minden sejt sejtéből lesz (omnis cellula e cellula) (Korábban azt hitték, hogy élő lény keletkezhet élettelen anyagból is, mivel nem tudták értelmezni azt a megfigyelést, hogy rovarlárvák jelentek meg a bomló szerves anyagokban.)

1885: Pasteur kortársa Roux, csirkeembriókkal (tojásokkal) foglalkozott, így jutott el a madársejtek *in vitro* fenntartásához.

1967: Van Wezel: a mikrokarrieres sejtenyésztés kidolgozása, a sejtek tenyésztése apró hordozó szemcsék felületén.

1970: rekombináns DNS technika alkalmazása a mikroorganizmusokon kívül állati sejteknél is. Sikert ért el egy vektorral DNS-t bevinni és expresszálni állati sejtbe.

1975: Köhler és Milstein Nobel díjas felfedezése: Kétféle emlős (egér) sejt fúziójával, ún. hibridómát tudott létrehozni, mellyel immunfehérjéket lehetett gyártani.

A tenyésztés alapjai:

Sejtenyésztés: diszpergált sejtek fenntartása *in vitro* körülmények között. Sejtenyésztésről beszélünk akkor, amikor a sejteket egyesével, elkülönítve neveljük. Az *in vitro* kifejezés eredetileg azt jelenti, hogy „üvegben” (üvegedényben, lombikban), mai tudományos jelentése viszont az, hogy nem az élő lényben (**in vivo**), hanem laboratóriumi körülmények között történik a költetés valamilyen folyamatot.

Szövettenyésztés: Nem elkülönült sejteket szaporítanak, hanem szövetet alkotó sejtegyüttest tartanak fenn, úgy, hogy az megőrizzze a sajátos szöveti struktúráját és működéseit. Például amikor hámsejteket elkülönítve nevelnek, az nem igazán viselkedik hámsejtként, az sejtenyésztet. Viszont az égési sérülések kezelésénél gyakran nevelnek tápoldatban „lehántott” hámszöveti „foltokat”, amelyeket aztán visszaültetnek a megégett felületre - ez szövettenyésztés.

A tárgy keretében csak a sejtenyésztésről lesz szó.

Hogyan működik a sejtenyésztés?

Egészen más, mint a mikroorganizmusoké. Ugyanazokat a fogalmakat használják sok esetben, de a szóhasználat sokszor más technikát takar.

A sejtvonalak nagy része csak felülethez kötve növekszik, valamilyen szilárd felületre kitapadnak a sejtek. Az állati sejtek nagy többsége csak ilyen, felülethez kötött kultúrában szaporítható. A sejt fehérjékkel ráragasztja magát a felületre, és osztódni kezd. Az új sejt mellette tapad meg, és így fokozatosan beborítják a rendelkezésre álló felületet. A kialakuló sejtréteg csak egy sejtnyi vastagságú (**monolayer**), a sejtek nem nőnek egymásra. Ennek oka az, hogy ha a szomszéd sejtek érintkeznek, akkor abba az irányba nem növekednek tovább (**kontakt gátlás**). Ez általános szabályszerűség, de a rákos sejtekre nem vonatkozik, a daganatos sejtek átalakulásának egyik fő eleme a kontaktgátlás megszüntése.

Van néhány sejtvonal, ami felületi kötődés nélkül, szuszpenzióban is szaporodik. Ez csak néhány sejtvonal, de mivel ez hatalmas technológiai előny a többihez képest, a technológiák nagy többsége ezekre a vonalakra épül (CHO, BHK, VeRo, HeLa). A rövidítések feloldása:

CHO = Chinese hamster ovary, kínai hörcsög petefészek sejtvonal.

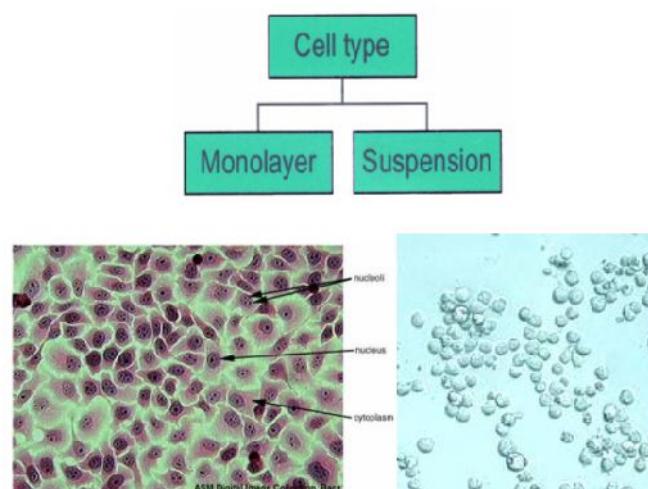
BHK = Baby hamster kidney, embrionális hörcsög vese sejtvonal

VeRo = majom veseszövet

HeLa = Személynévből, egy Henrietta Lacks nevű hölgynek állít emléket, akinek a nyirokgyógyászati tumorából izolálták ezt a sejtvonalat.

Ezek a sejtvonalak szuszpenzióban szaporíthatók és így fermentor-szerű készülékeket lehet használni.

Eddig említett sejteket soroltunk fel, de használnak madársejteket is (első sorban csirke embrióból), és sok helyen rovar sejteket is. A rovar sejtek robusztusabbak, mint az emlős sejtek, kevésbé érzékenyek a környezetre, de rendszertanilag eléggé távol állnak az emlősöktől. Ez egyrészt kedvező, mert a rovar sejt és emberi sejt között a vírusátvitel veszélye gyakorlatilag nulla. De a rendszertani és evolúciós távolság miatt az anyagcseréjük is sokban eltér az emlős sejtektől.



1. ábra: Növekedési típusok: felületi és szuszpenziós

A kép baloldalán monolayeres növekedés látható, a szabálytalan alakú sejtek (jól látható sejtmaggal), hézagmenetesen beborítják a rendelkezésre álló felületet. A jobb oldali kép egy szuszpenziós tenyészetet mutat, ahol a lekerekedett, gömbölyű sejtek lebegnek a tápfolyadékban, és teljes felületükkel érintkeznek az oldattal.

Mire jó a sejtenyésztés?

1. Kutatás: a tudományos vizsgálatokat sokszor egyszerűbb az egyes sejteken elvégezni, mint az élő lényeken. Vizsgálják a jellemző biokémiai utakat, különböző szabályozási mechanizmusokat, genetikai jellemzőket.

2. Termelés:

- Rekombináns fehérjék előállítására, különösen a glikolizált fehérjék esetén (pl. interferonok, hormonok, stb.)
- Monoklonális ellenanyagok termeltetése (hibridóma sejtekkel)
- Vírusok szaporítására vakcinagyártás céljából
- Állatkísérletek kiegészítése, részleges helyettesítése. Az állatvédelmi szemlélet erősödésével tendenciává vált, hogy minél kevesebb kísérleti állatot használjanak fel a különféle vizsgálatok során. A sejtenyésztés lehetővé teszi, hogy a vizsgálatok egy részében ne egy élő állatot használjanak fel, hanem csak annak valamilyen szövetét vagy sejtjét. Sok ilyen vizsgálatot végeznek a gyógyszer- és kozmetikai iparban.

Korlátozott sejtosztódás

A mikrobacejtékkel eltérően az emlős sejtek nem képesek végtelen számú osztódásra. Bizonyos számú osztódás után a tenyészet előregszik. Egyre hosszabb idő telik el két osztódás között, majd az osztódás teljesen leáll. Ezt **szeneszcenciának** hívják, melynek kétféle oka van:

1. A kromoszómavégek (telomérák) minden osztódásnál rövidülnek és idővel, már nem tudnak tovább rövidülni.
2. Aktiválódnak a szaporodási sejtciklust szabályozó (és azt leállító) mechanizmusok, amelyek bizonyos számú osztódás után megszüntetik az osztódást.

Korábban volt szó arról, hogy a növényeket egyetlen sejtől vissza lehet nevelni, ez az állatoknál nem megy. Különösen az összetettebb állatoknál nem működik ez.

Az embereknél is nagyon sok gén vagy géncsoport működése már a magzati differenciálódás során véglegesen lezárul. Tehát amikor kialakult egy bizonyos fejlettségi fok, akkor egyes gének végérvényesen kikapcsolódnak, egyes sejtek tovább nem osztódnak.

Emlékeztető a klónozással létrehozott Dolly barmán esetére, aminél egyetlen egy testi sejtől létrehozták egy birka tökéletes klónját. Fel is nevelték ezt az állatot, létrejött a felnőtt egyed, még szaporították is, de Dolly sokkal gyorsabban öregedett, és rövidebb életet élt, mint fajtársai.

A tumor és a rovar sejtekre viszont a végtelen osztódási képesség jellemző (**immortality**).

Milyen típusú sejteket lehet szaporítani?

Szinte minden szöveti sejt szaporítható, legnehezebben az **izom és idegsejtek**. Az érett vérésejtek nem osztódnak (sem a fehér-, sem a vörösvérésejtek). A vérésejtek is osztódással jönnek létre a vérképző szervekben, de mire kikerülnek a véráramba, már egy érési folyamaton mennek keresztül, és ennek során elvesztik szaporodó képességüket. A vörös vérésejtekben ekkor már nincs is sejtmag, tehát nem tudnak osztódni, a fehérvérésejteknek megvan sejtmagjuk, de az élettartamuk egy-két nap, és ez alatt nem szaporodnak.

Fibroblaszt (köt szövet): Ezek jól szaporodnak, mert generációs idejük kicsi, felületeken gyorsan nőnek, túlnövik az egyéb szöveteket

Epitheliális (hám) sejtek: A bükörk alulról felfelé állandóan megújul. A legalsó rétegben megy végbe a sejtosztódás, de hám alkotja a nyálkahártyákat is, ez borítja az emésztőcsatorna belső felületét is. Kitekintés: a gyomor belső felülete kibírja a gyomorsavat is, de a felülete a bükörkhez hasonlóan folyamatosan kopik. Így a gyomor belső felülete is a hámsejtek osztódásával folyamatosan megújul. Sokszor mondják, azt, hogy az idősebb embereknek „gyenge a gyomra”. Náluk ez a megújulási folyamat lassabb, tehát ha erősen fűszeres étel, vagy tömény szeszes ital fogyasztása esetén lemaródik a belső felület, az nehezebben és lassabban újul meg náluk.

A korai embrionális eredetű sejtek jól szaporodnak. Ezért is használják gyakran a csirke embriót.

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

Sejtpreparálás tenyésztéshez

Egy sejtvonalat létrehozásánál, elindításánál a következőképpen járnak el:

1. A szövettenyésztéshez szükséges oldatok elkészítése.
2. A tenyésztés céljára felhasználandó szövet előkészítése, kioperálása.
3. Enzimes sejtdisszociáció: a szövetekben a sejtek össze vannak tapadva, ezeket az összeragasztó fehérjék elbontásával szét kell választani, kollagenáz, tripszin és egyéb proteáz enzimek alkalmazásával (A kollagenáz a kollagént bontja, a tripszin az többfajta fehérjét is.)
4. A sejtszuspenzió szűrése, a sikeresen diszpergált sejtek és a megmaradt szövetdarabok szétválasztására. (A nagyobb darabok eltávolítása)
5. A sejtek centrifugálása (a kisebb darabok eltávolítása, a sejtek a centrifugacső aljára ülepednek, az apróbb törmelékek a felülúszó folyadékban maradnak).
6. A leülepedett sejtek reszuszpendálása friss tápfolyadékban.

Sejtbank létrehozása:

Ha állandó genetikai tulajdonságú, stabil sejtvonallal szeretnénk dolgozni, akkor létre kell hoznunk egy sejtbankot. Sejtbankot úgy hozhatunk létre, hogy egy genetikailag homogén

állományból ún. **szubkulturákat** készítünk. Az egységes sejttenyészetet sok (akár száz) adagra osztjuk, ezek egy részét tárolják/deponálják, másokat pedig közvetlenül továbbtenyésztésre, manipulációra vagy termelésre használják fel.

Szubkultúra: Egy genetikailag homogén tenyészetet több résztenyészetre osztanak, amelyeknek további felhasználása eltér lehet.

Ha van egy nagy felületünk, melyet benntek a genetikailag azonos sejtek, akkor az adott edényekben egy sejtvonalegyedei vannak, tehát szubkulturákat készíthetünk belőle. Ha van pl. 100 ilyen edény, akkor abból 99-et lefagyaszthatunk cseppfolyós nitrogénbe (ez a sejtbank), és csak eggyel dolgoznak. Ha ezzel valami baj történik, előregszik, akkor vissza tudnak nyúlni a sejtbankba egy másikért. Így nagyon sokáig megőrízhetjük a genetikailag homogén állományt, mindig egyforma sejtekkel dolgozhatunk. Alapszabály, hogy sosem szabad a tenyészet egészét felhasználni, hanem egy részét mindig meg kell őrizni sejtbankban.

A sejtvonaleltartása

Egy sejtvonalel 10-100 átoltás után előregszik, szaporodóképessége csökken, majd a szaporodás leáll, nem lehet tovább a végtelenségig szaporítani. (Egyedül a tumor sejteket lehet a végtelenségig fenntartani.) Ezért „gazdálkodni” kell a szaporítási ciklusokkal. Célszerű a preparálás után kevés átoltással számos szubkulturát készíteni, és ezek nagy részét tartósítani. Ez az ún. „**Master cell bank**”, amihez vissza lehet nyúlni, ha a használatban lévő tenyészetek előregedtek, vagy befertöztek.

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

Vegyünk példaként egy újonnan izolált sejtvonalel, aminek 100 osztódásra elegendő a szaporodási potenciálja. Ha az első szaporítás után elteszik a „Master cell bankba”, ekkor még van 99 osztódási lehetőség, további tenyésztéshez. Ebből egy szubkulturát tenyésztve és újabb szubkulturákra osztva létrehozzák a „working cell bank-ot”. Ha a folyamatot ügyesen végezték el, akkor van még mindig van 98 osztódási lehetőség amit a laborban, üzemben ki lehet használni. Egy nagyobb léptékű tenyésztéshez lépcsőzetes szaporítást is alkalmazni kell, ami a felhasználható osztódások számát meglehetősen csökkenti.

A „Master cell bankot” rendszeresen meg kell újítani és célszerű a tenyészeteket és az átoltásokat törzskönyvszerűen nyilvántartani. Rögzíteni kell minden egyes sejtvonalelnak a sorsát, átoltásait, hogy tudjuk, mekkora szaporodási potenciál maradt az egyes szubkulturáknál.

Szem előtt kell tartanunk, hogy míg a baktériumok több millió éven át képesek változatlanul szaporodni, addig az állati sejtek egy bizonyos idő után előregednek.

Hogyan szaporítják ezeket a sejteket?

Megfelel tápoldatban.

A tápoldatnak lehet leg hasonlítani kell a természetes környezetre. A normál sejteket vér veszi körül, illetve a sejtközi folyadék. Ez nagyon sok komponensből áll, ezeket mind bele kell mérni a tápoldatba. Míg a mikrobáknál elegendő volt a cukor, a szójadara, és néhány m trágya, az állati sejteknél sokféle, tiszta és drága anyagra van szükség:

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

A 2. ábrán egy finomvegyszer cég katalógusából átvett összetételt láthatunk. MEM = Modified Eagle Medium = módosított Eagle-féle tápoldat. Sokféle nagy tisztaságú és emiatt drága anyagból áll össze.

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	D-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

2. ábra: Módosított Eagle médium (MEM)

Az állati sejtenyésztés tápadatai:

Szérum = a sejtmentesített vér. Az állati sejt nem csak a kis molekulájú anyagokból igényli a vérhez hasonló koncentrációt, hanem igényli a vérfehérjék jelenlétét is. Ezt nagyon nehéz szintetikus anyagokkal pótolni. Kénytelenek vagyunk valódi vérszérumot használni. Újszülött állatok (borjú, csikó) vérének használják, pl. a borjú vágásánál steril körülmények között lecsapolják a vért, és az ebből elválasztott szérumot adják tápfolyadékba.

Kitekintés: miért kell ehhez újszülött állat, amikor egy kifejlett marhában sokkal több a vér? Mert tisztább a vérszéruma. A felvett vérbe bele van írva az egész kórtörténete. Benne van az átélte összes fertőző betegség immunfehérjéje, az összes kapott védőoltás által létrehozott immunfehérjék, valamint a lappangó vírusok és vírusfehérjék. Az újszülött állat vérében ezek még nem jelentek meg.

A szérum komponens nagyon drága (és nehezen reprodukálható, hiszen nincs két egyforma állat, még testvérek esetében sincs tökéletes azonosság). A kutatók sok erőfeszítést tesznek a szérummentes tápoldatok kifejlesztésére, vannak is eredmények, de termelési méretben kevés technológiát valósítottak meg szérummentes tápoldattal. A szérum költsége még a laboratóriumi kísérleteket is nagyon megdrágítja.

A vérszérumok legfontosabb komponense az albumin (kb. 2/3), mellette még legalább 40 fehérjét lehet megkülönböztetni, és mindegyiknek van valamilyen funkciója a sejtek működésében.

Vannak „ragasztó” fehérjék, melyek odakötik a sejteket a felületre, vannak hormonok (pl. inzulin) és vannak az osztódást serkentő fehérjék is. Próbálkoznak a fehérjék pótlásával, pl. olcsó poliszacharidokkal (dextrán), de ez inkább csak az albumint tudja pótolni, a többi komponens nem.

Milyen körülmények között lehet a sejteket szaporítani?

Mivel nincs sejtfaluk, ezért nagyon érzékenyek az ozmotikus és a mechanikai hatásokra is. Ugyanúgy kell kezelni ezeket, mint a protoplasztokat. Nem lehet nagy nyíróerejű keverést alkalmazni, mert az szétszakítja a sejteket. Olyannyira érzékenyek, hogy a buborékok létrejötténél és elpattanásánál fellépő áramlási hatások is kárt okozhatnak. Emiatt a fermentoroknál használt levegőztetési rendszer (átbuborékolatás, turbulens keverés) nem alkalmazható.

Szerencsére az **oxigén igényük** elég kicsi, körülbelül százszor kisebb, mint egy hasonló mikroba tenyészté. Emiatt nem kell átbuborékolatni a folyadékot a betáplált levegővel, hanem elegendő a folyadékfelszín felett átáramoltatni a steril levegőt.

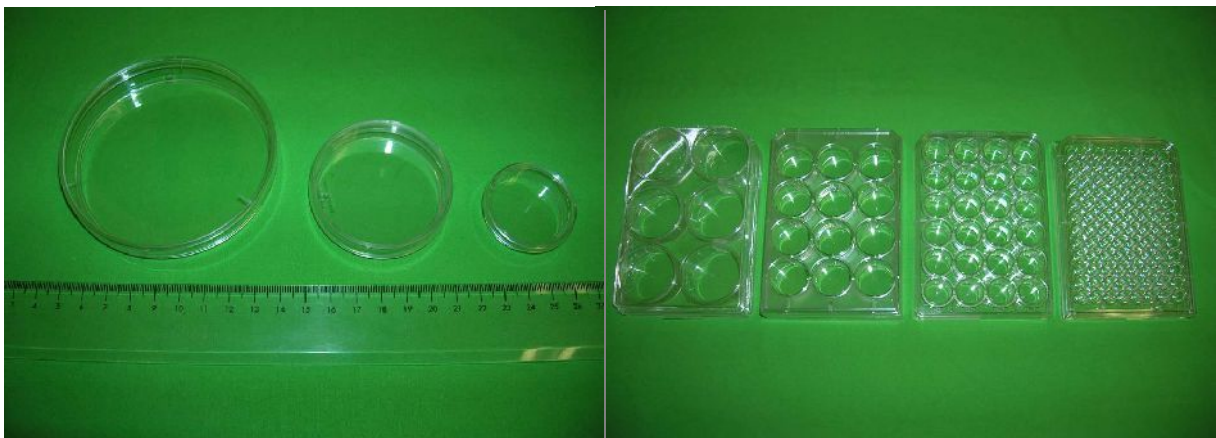
A kis oxigén-igény lassú anyagcserét jelez, lassabban szaporodnak, és lassabban használják fel a cukrot is. Némelyik sejtvonal igényli a széndioxid jelenlétét is a légtérben (2-5%). Ennek magyarázata az, hogy a szervezetben azok a sejtek, amelyek távol vannak a gyors és intenzív gázcserétől, alacsony oxigéntartalom és magas széndioxid tartalom jelenlétében működnek, azaz természetes környezetükben is magas az széndioxid szint.

H mérséklet: emlős sejteknél 37°C, madársejteknél 41°C, rovarsejteknél 25-30 °C. Az emberek és a madarak állandó testhőmérsékletűek, de az evolúció során külön úton jutottak el az állandó testhőmérséklethez, ez okozza az eltérést. A rovarok változó testhőmérsékletűek.



3. ábra: Laboratóriumi tenyésztéskor használt edények (felületi tenyésztéshez)

A 3. ábrán látható tenyésztéskor használt edények alsó sima részét használják szaporításra, tehát a tápoldatot beoltják a sejtekkel, melyek letapadnak a felületre és monolayerrel borítják be az edény alsó falát. A sejt réteg annyira vékony, hogy átlátszó, szabad szemmel alig látszik. Ha egy kicsit megmozgatják az edényt, akkor lehet némi opalizálást lehet látni a felületen. Az edény nyaka nem szimmetrikusan, középen helyezkedik el, hanem fölfelé eltolva. A magasabban lévő nyak miatt a folyadék nehezebben lötytyenhet ki. Az edények különböző méretben, sterilizálva kaphatók, anyaguk műanyag, általában egyszeri használat után eldobhatóak. Üveg edényeket nem szoktak használni, mert az üveg anyagából kálium és nátrium ionok oldódnak ki, és ezek a sejtek érzékenyek az alkáli fémionokra.



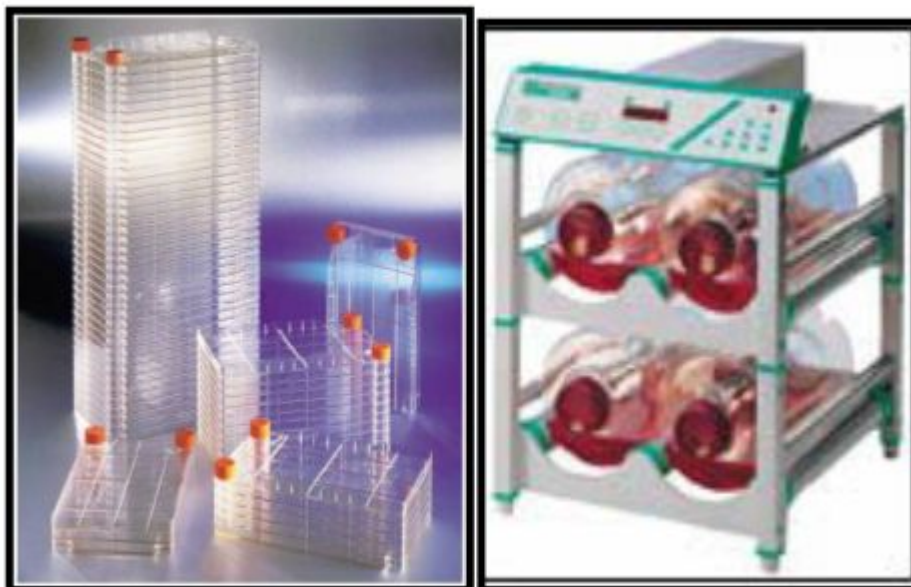
4-5. ábra: Laboratóriumi tenyésztéskor használt edények (felületi tenyésztéshez)

Az ábrán látható, hogy itt is használnak Petri csészéket. A jobb oldali képen látható elrendezés sok (6, 12, 24, 48, 96) kis Petri csésze együttesének fogható fel, ezeket tálcának nevezik. Sorozatvizsgálatokra különösen alkalmasak.



6. ábra: Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi tenyésztéshez)

A táptalaj színe azért piros, mert adnak hozzá egy indikátort, melynek az tulajdonsága, hogy a pH változására megváltoztatja a színét. Ezzel az esetleges fertőzéseket lehet kimutatni. Normális növekedésnél a közeg semleges marad, az indikátor megtartja piros színét. Ha viszont a tenyésztet befertőzött, mert mikroba kerül bele, akkor az megsavanyítja a folyadékot, amitől az indikátor sárga színű lesz. Így ránézésre észre lehet venni a mikrobiális fertőzéseket. Nagyobb léptékű szaporításnál minél nagyobb területre van szükség a készülékekben. Erre többféle szellemes megoldást is kitaláltak.



7. ábra: Multitray

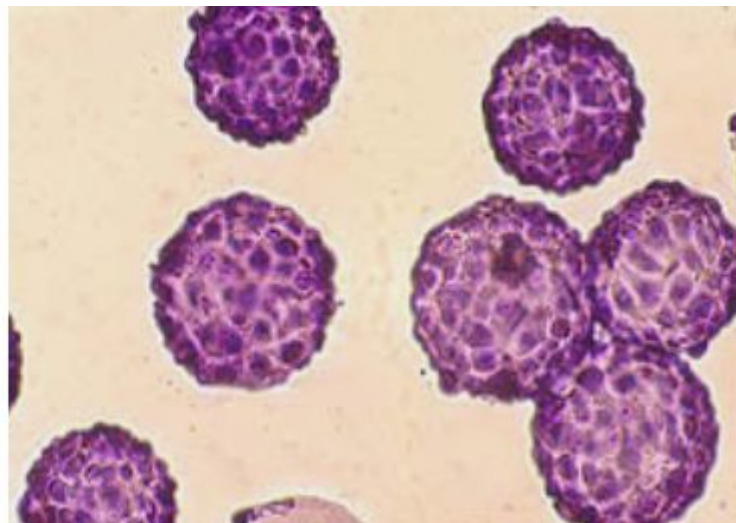
roller bottles

A 7. ábrán látható megoldások nagyobb felületek. A Multitray sok tálca egymásra helyezésével jött létre. A sarkokban lévő csatornák és túlfolyók rendszere úgy van kialakítva, hogy szétszedés nélkül is minden tálca feltölthető vékony rétegben tápoldattal, ugyanakkor mindegyik fölött kialakul egy légréteg is.

A forgó palackok (roller bottles) pontosan henger alakú edények, amelyek vízszintes helyzetben görgőkön fekszenek. A görgőket motor hajtja, ami lassan (kb 1-2 perc alatt) megforgatja az edényt. Kevés tápoldat van benne (a térfogat 10-20 %-a), ami a forgatás miatt folyamatosan nedvesíti a teljes belső felületet. A sejtek így benövik a teljes hengerpalástot. A folyadékból kiemelkedő monolayer a körülfordulás ideje alatt nem szárad ki, nem károsodik, sőt a levegővel érintkezve nagyon jó a sejtek oxigénellátása.

Mikrokarrieres tenyésztés:

A felület növelésének másik lehetősége a fajlagos felület növelése. Ha hordozónak nem sík felületű edényeket, hanem apró szemcséket választunk, akkor ugyanakkora edénytérfogatban sokszoros nagyságú növekedési felületet biztosíthatunk a sejteknek. A **mikrokarrier**ként (= kicsi + hordozó) inert anyagokból készült apró szemcséket alkalmaznak. Ezek néhány száz μm átmérőjűek, azaz a sejtek méreténél egy nagyságrenddel nagyobb gömböcskék.



8. ábra: Inokulálási/tapadási fázis

kialakult monolayer

A 8. ábra bal oldalán a kezdeti állapot látható, csak néhány sejt tapadt meg, míg a jobb oldalon már a teljes borítottság, a kialakult monolayer figyelhető meg.

A mikrokarrieres alkalmazása nagy áttörés volt sejtenyésztés technológiájában (van Wezel 1967). Technológiai paraméterek:

- szemcseátmérő : 100-300 μm ,
- sűrűség: 1020-1050 kg/m^3 (leülepszik a folyadékban, de enyhe keveréssel lebegésben tartható),
- A folyadék térfogatának 8-15%-a hordozó,

- Felülete: 0,5-1,5 m²/liter, ami 10-30 forgó palacknak felel meg, = nagy produktivitás

El nyei:

- nagy felületet be lehet bevinni egy adott reaktortérfogatba
- viszonylag homogén környezet a sejtek számára
- nincs szükség új reaktortípusokra (a mikroba-fermentorok kis átalakítással használhatók)

A karrier gyöngyöket nem szokták újra felhasználni, mivel túlságosan bonyolult lenne a regenerálásuk.

A mikrokarrieres tenyésztés lépései:

inokulum: forgó palackból a tenyészetet tripszinnel leoldják (elbontja a ragasztó fehérjét). Átlagosan 5-6 sejt/szemcsényi mennyiséget viszünk be.

A sejtek megtapadnak a gyöngy felületén, elszaporodnak, egy rétegben nőnek (kontaktgátlás)

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

Nyírás: immobilizált sejtek érzékenyebbek a nyírásra (az összesűrűlő szemcsék ledörzsölhetik a sejteket a felületről), emiatt lekerekített, nagy átmérőjű keverőket alkalmaznak, kis fordulatszámmal. A leggyakoribb keverési megoldások:

„Spinner flask”

Ezeket a keverő edényeket 0,5 l-es 1 a 10 l-es tartalomig használják. A nagy, közepes kupak alsó oldalára helyezve láthatjuk a keverőt. Mágneses meghajtású, alul a kereszttrúdban egy mágnes található. Az edényt rá kell helyezni egy keverő berendezésre, amelyben egy mágnes forog lassan körbe. A forgó mágnes viszi magával a keverő elemet, ami lassan kavarja a karriereket. A fehér háromszöglet teflon lap a keverőn a leülepedt szemcsék felkavarását, „ekézését” végzi. Az oldalsó nyílások arra szolgálnak, hogy a menet közbeni beavatkozásokat (pl.: mintavétel pipettával) ezeket át lehet végezni.

A tenyésztéseket steril körülmények között hajtják végre, az edény minden része



8. ábra: „Spinner flask”

sterilezhet .

A jobb oldali képen gyengén látszik, de a kever ferde rúdjának végén egy golyó alakú kever elem van. Ennek a belsejében található a mágnes. Az edény alatt a meghajtó egység egy mágneset keringet, ez viszi körbe-körbe a gömb alakú kever t. Laborszengben ezt a típust bim-bam kever nek is nevezik, mert a felépítése hasonlít a harang/harangnyelv kialakításához.

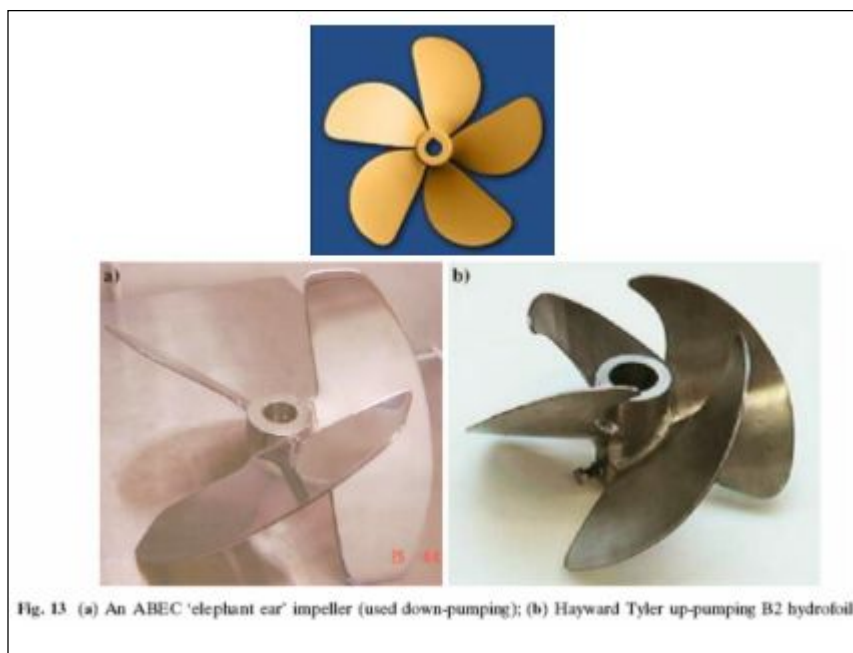


Kever s reaktorok

A nagyobb, ipari berendezésekbe már tengely-hajtású kever berendezéseket építenek be. Nagy átmér j , lekerekített formájú, lassú kever ket használnak. Az energiabevitel nagyon kicsi, kevés oxigén kell a sejteknek, tehát nem a leveg ztetéshez szükséges a keverés, hanem a cél csak a homogenizálás és a sejtek/mikrokarrierek lebegésben tartása.

Leveg ztetés: felületi vagy indirekt leveg ztetés, mert a buborékok itt is károsíthatják a sejteket.

Felületi leveg ztetés: a folyadék feletti leveg térfogatot öblítik át. A folyadék felületén keresztül beoldódik annyi oxigén a folyadékba, amennyi a sejteknek kell.



9. ábra: Kever k: lekerekített formák, hajócsavar forma, 25-250 rpm

Indirekt levegőztetés: a folyadék nem érintkezik a levegővel, csak egy szilikon cső falán keresztül. A szilikon cső fal tulajdonképpen egy membrán, melyen az oxigén jól áthatol és átdiffundál a folyadékba. Emlékeztető: Az oxigén egy apoláris molekula, a szilikon anyag szintén apoláris jellegű, azaz hasonló polaritású anyagok. Ezért az oxigén hajlamos beleoldódni a szilikon anyagába és átdiffundálni rajta. A szilikon csőből tekercset formálnak, és ezt merítik a folyadékba, a csőben áramoltatják a levegőt.

A tápanyag bevitel alapján:

A tápanyagbevitel szerint többféle szaporítási technikát alkalmazhatunk, ugyanúgy, mint a mikrobák szaporításánál.

Szakaszos tenyésztés: (batch): a folyamat legelején az összes tápanyagot bemérik a tápfolyadékba, beviszik az oltótenyészetet, elindul a szaporodás, termékképzés, majd a végén megtörténik a feldolgozás. Menet közben további tápanyagot nem adnak hozzá. Gyenge produktivitás, a sejtkoncentráció $\sim 10^6$ sejt/ml. Időtartama ~ 1 hét.

Rátáplálásos-szakaszos (fed-batch): a szakaszoshoz hasonlóan indul, de menetközben többször is pótoljuk az elfogyasztott tápanyagokat. Általában glükózt és aminosavakat adnak hozzá. A többszöri rátáplálás miatt akár 3 hétig is fenntartható a folyamat, és ennek megfelelően a produktivitás is nagyobb.

Félfolytonos tenyésztés (perfúziós): Itt folytonos vagy kvázi-folytonos tápanyag betáplálást alkalmaznak és ugyanakkor a terméket tartalmazó fermentléből is elvesznek. Mivel a mikrokarrierek könnyen ülepednek a keverés kikapcsolása után, fölülre a fermentlé leszívható, egyszer elválasztani, és bele a terméket kinyerni. A hordozón lévő sejtekre újra friss tápoldatot töltenek. A sejtszám egy idő után már nem növekszik, hiszen a monolayer már kialakult, de az elérhető sejtszám egy nagyságrenddel is nagyobb lehet, elérheti a 10^7 sejt/ml-t is. Ha nagyobb a sejtsűrűség, akkor nagyobb a megtermelt anyag (fehérje) mennyisége is. Napi lefejtéssel és rátáplálással akár 6 hétig is fenntartható egy termelési folyamat. Összességében a termék is koncentráltabb, és a szükséges reaktortérfogat a szakaszosnak csak 1%-a.

A reaktor és módszer kiválasztása sokszor annak alapján történik, hogy mennyi a szükséges termék mennyisége (pl.: ha egy betegnek egy adott hatóanyagból csak néhány μg -ra van szüksége, akkor azt elég kis mennyiségben (forgó palackban) gyártani).