

SEJT- ÉS SZÖVETTENYÉSZTÉS

5. Állati sejtek tenyésztése



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

A tenyésztés alapjai

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

Szövettenyésztés: a szövet fenntartását jelenti oly módon, mely lehet vé teszi a sejtek differenciálódását ill. a struktúra és/vagy funkció meg r zését.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

4

Bevezetés

Az él lények hierarchikus szervez dése:
Sejt Szövet Szerv Szervrendszer

Egyedfejl dés:
embrionális ssejt differenciálódott sejtek



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

2

Állati sejt/szövettenyésztés

Egészen más, mint a mikroorganizmusok tenyésztése.

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

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

Általában eml s sejteket tenyésztenek, de el fordul madár és rovar sejt tenyésztése is.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

5

Történeti áttekintés

1830 Schleiden-Schwann: kidolgozták a sejtelméletet, miszerint minden él lény sejtekb l áll

1855 Virchow: minden sejt sejt b l 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

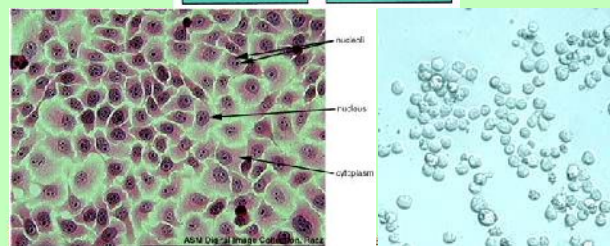
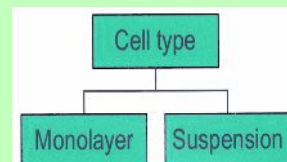
1975 Köhler-Milstein: hibridóma sejt el állítása és mononális antitestek (immunfehérjék) termelése



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

3

Tenyészetek 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. Enzimesejtdisszociáció: kollagenáz, tripszin és egyéb proteáz enzimek alkalmazásával
4. A sejtuszpenzió szünet a sikeresen diszpergált sejtek és a megmaradt szövetdarabok szétválasztására.
5. A sejtek centrifugálása
6. A sejtledelek reszuspendálása, friss tápfolyadékban.



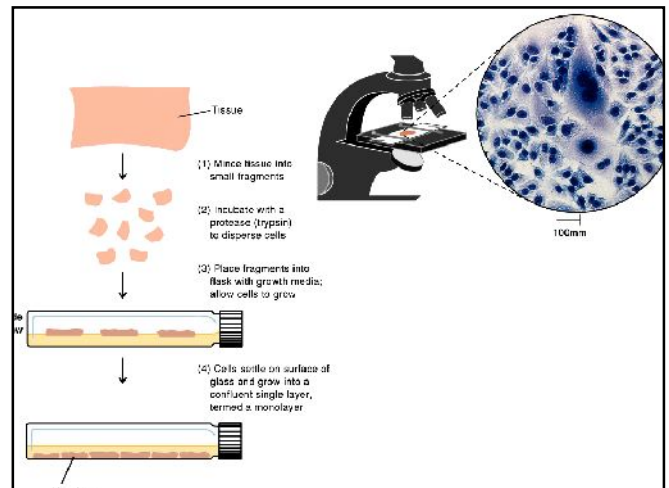
A fenntartás korlátja

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

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 (immortalit).



Szaporítható sejtípusok:

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

Fibroblaszt (kötőszövet): 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 sejttsűrűséget, a tenyésztetből szubkultúrákat készítenek, ezek egy részét tárolásra/deponálásra előkészítik (→ eltartás 1d. később), illetve közvetlenül továbbtenyésztésre, manipulációra vagy termelésre használják fel.

Szubkultúra: egy genetikailag homogén tenyésztetből több résztenyésztetbe 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 befertöztek.

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 Élelmiszertudományi 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) véréből biztosítják (5-15%). Ez nagyon drága (és nehezen reprodukálható), ezért töreksenek a minimalizálására, helyettesítésére vagy teljes elhagyására.

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

16

Az állati sejtenyésztés tápoldatai

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)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

14

Az állati sejtenyésztés körülményei

A sejtek nagyon érzékenyek pl. a nyírásra:

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

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

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



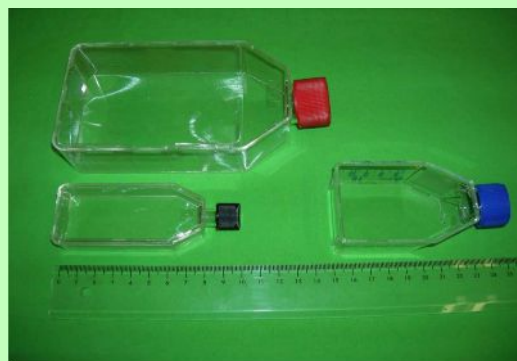
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

17

Módosított Eagle médium (MEM)

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
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-Tryptophan • Acid (anhydrous)	0.006
Arginine • HCl	0.084	0.084	Pyridoxal • HCl	—
Cysteine • 2HCl	0.0676	0.0676	Pyridoxine • HCl	0.004
Glutamine	—	0.584	Riboflavin	0.0004
Glycine	0.03	0.03	Thiamine • HCl	0.004
Histidine • HCl • H ₂ O	0.042	0.042	OTHER	
Leucine	0.103	0.103	D-Glucose	1.0
Leucine	0.103	0.103	HEPES	—
Lysine • HCl	0.146	0.146	Phenol Red • Na	0.0158
Methionine	0.03	0.03	Pyruvic Acid • Na	0.11
Phenylalanine	0.066	0.066	ADD	
Serine	0.042	0.042	Glucose	—
Threonine	0.055	0.055	Glutamine	0.584
Threonine	0.016	0.016	Sodium Bicarbonate	3.7

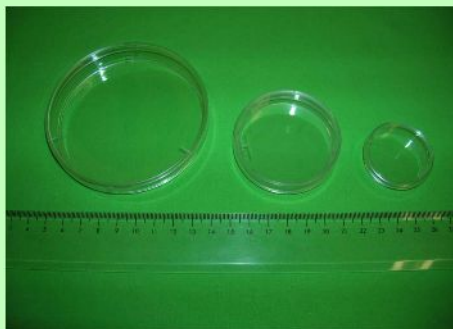
Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

18

Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)

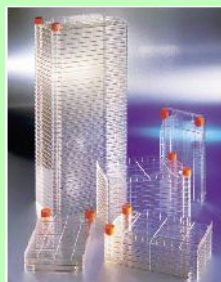


EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

Felület növelése

Multitray



roller bottles



EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22

Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)

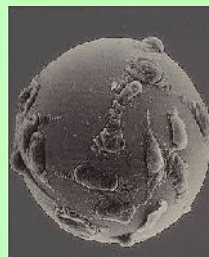


EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

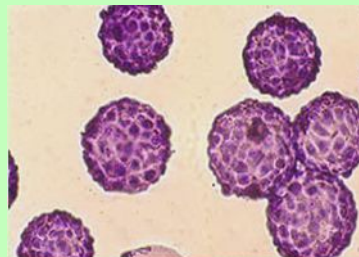
20

Mikrokarrieres tenyésztés

Inokulálási/tapadási fázis



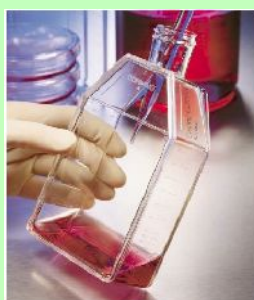
kialakult monolayer



EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)



EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

Mikrokarrieres tenyésztés

van Wezel 1967: DEAE Sephadex A50-en

Apró, szuszpendált gyöngyök felületén,

átmérő : 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

EME 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 Élelmiszertudományi Tanszék

25

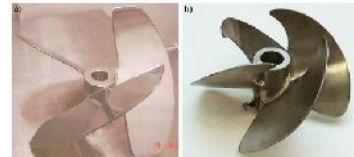
Kevert reaktorok

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: lekerekített formák, hajócsavar, 25-250 rpm



BME Fig. 12.10. Az ABEU 'Spinner flask' in a 125 ml Erlenmeyer flask. (a) Hetero-Telo system. (b) Hetero-Telo system. (c) Hetero-Telo system.

Mikrokarrieres tenyésztés

Keverés: az immobilizált sejtek érzékenyebbek a nyírásra, lekerekített 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 Élelmiszertudományi 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 $\mu\text{g}/\text{beteg}$ \rightarrow elegendő a forgó palack,

rtPA: 100 mg/ beteg \rightarrow fermentor



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

29

„Spinner flask”

Mágneses keverő, lassú mozgató

Mikrokarrieres és szuszpenziós tenyésztésre egyaránt



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

27