

Zīdītāju šūnu kultūras ievadlekcija

Dr. Inese Čakstiņa
Rīga, 9.02.2012.

Kursa plāns

Kursa mērķis ir sniegt pamatzināšanas par šūnu un audu kultūru iegūšanu, kultivēšanu, pavairošanu un raksturošanu, kā arī standarta audu kultūru laboratorijas iekārtām un darbībām. Kursā tiks parādīti šūnu un audu kultūru saskares punkti ar citām zinātnes nozarēm (medicīna, ķīmija, fizika). Kursa uzdevums ir sniegt izpratni par zīdītāju šūnu un audu kultūru dažādiem pielietojumiem.

- 1. Šūnu un audu kultivēšanas principi, L2**
- 2. Šūnu kultūru laboratorijas iekārtojums un standarta darbības, L4, Ld4**
- 3. Šūnu kultivēšanas process, reaģenti un materiāli, L4, Ld4**
- 4. Šūnu kultūru raksturošana, L4**
- 5. Šūnu un audu kultūru pielietojumi, L6, S4**

Kursa prasības

Studentu semestra vērtējumu veido:

- rakstveida eksāmens (50 %),
 - referāts (30 %),
- laboratorijas darbu (4) apmeklējums un uzdevumu izpilde (20 %).

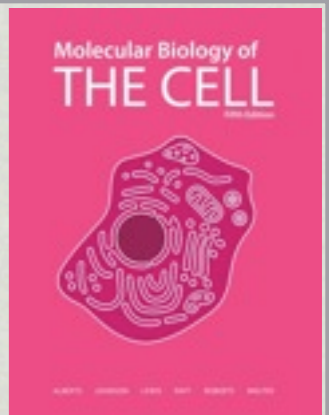


Mācību pamatliteratūra

Selga, Tūrs. Šūnu bioloģija. LU Akadēmiskais apgāds, 2008

Alberts, Bruce et al. The Molecular Biology of the Cell, 4th Edition, 2002

Cheryl D. Helgason, Cindy L. Miller. Basic cell culture protocols. Humana Press, 2005



Papildliteratūra

Freshney, R. Ian, Pfragner, Roswitha. Culture of Human Tumor Cells. Wiley, 2005.

Berthiaume, Francois; Morgan, Jeffrey. Methods in Bioengineering: 3D Tissue Engineering. Artech House, 2010.



Periodika un citi informācijas avoti

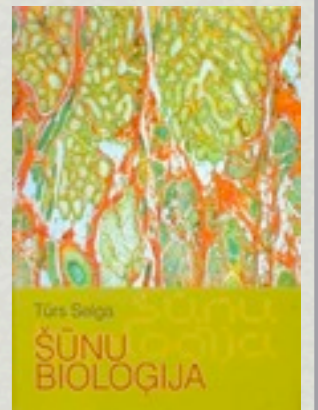
1. The Proceedings of the National Academy of Sciences USA (PNAS)

Biological Sciences

<http://www.pnas.org/>

2. Cell

<http://www.cell.com/>



**1. temats: Šūnu un audu kultivēšanas principi – Dr.Jānis Ancāns (marts)
(L2)**

**2. temats: Šūnu kultūru laboratorijas iekārtojums un standarta darbības
– Ēriks Jākobsons (16.02.2012. un 23.02.2012.) L4, Ld2**

**3. temats: Šūnu kultivēšanas process, reaģenti un materiāli – Dr.Inese
Čakstiņa (9.02.2012.) un Dr.Jānis Ancāns (marts) L4, Ld2**

Lekcijas plāns

Īss ievads par zīdītāju šūnu kultūrām

Reaģenti

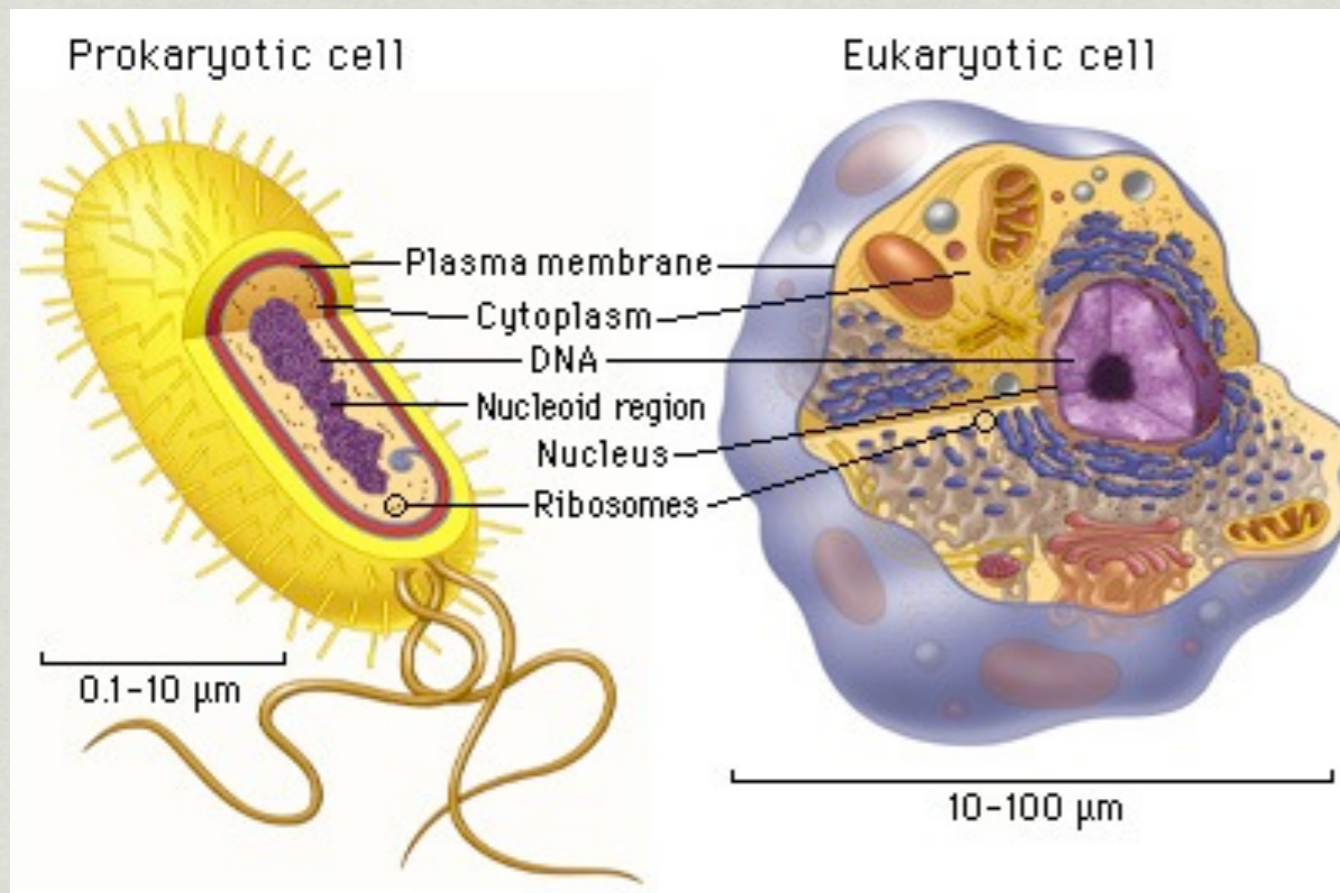
Šūnu vides

Šūnu un audu vides bez seruma

Serums: tā veidi, izcelsme, pielietojumi, priekšrocības/trūkumi

Galveno seruma proteīnu funkcijas, iespējas tos aizvietot

Ķīmiski definētas barotnes piedevas un seruma aizstājēji



http://www.phschool.com/science/biology_place/biocoach/cells/common.html

Citoplazma – citozols, organelas un citas daļiņas, kas suspendētas tajā

Ribosomas – organelas, kurās notiek proteīnu sintēze

Kopējs

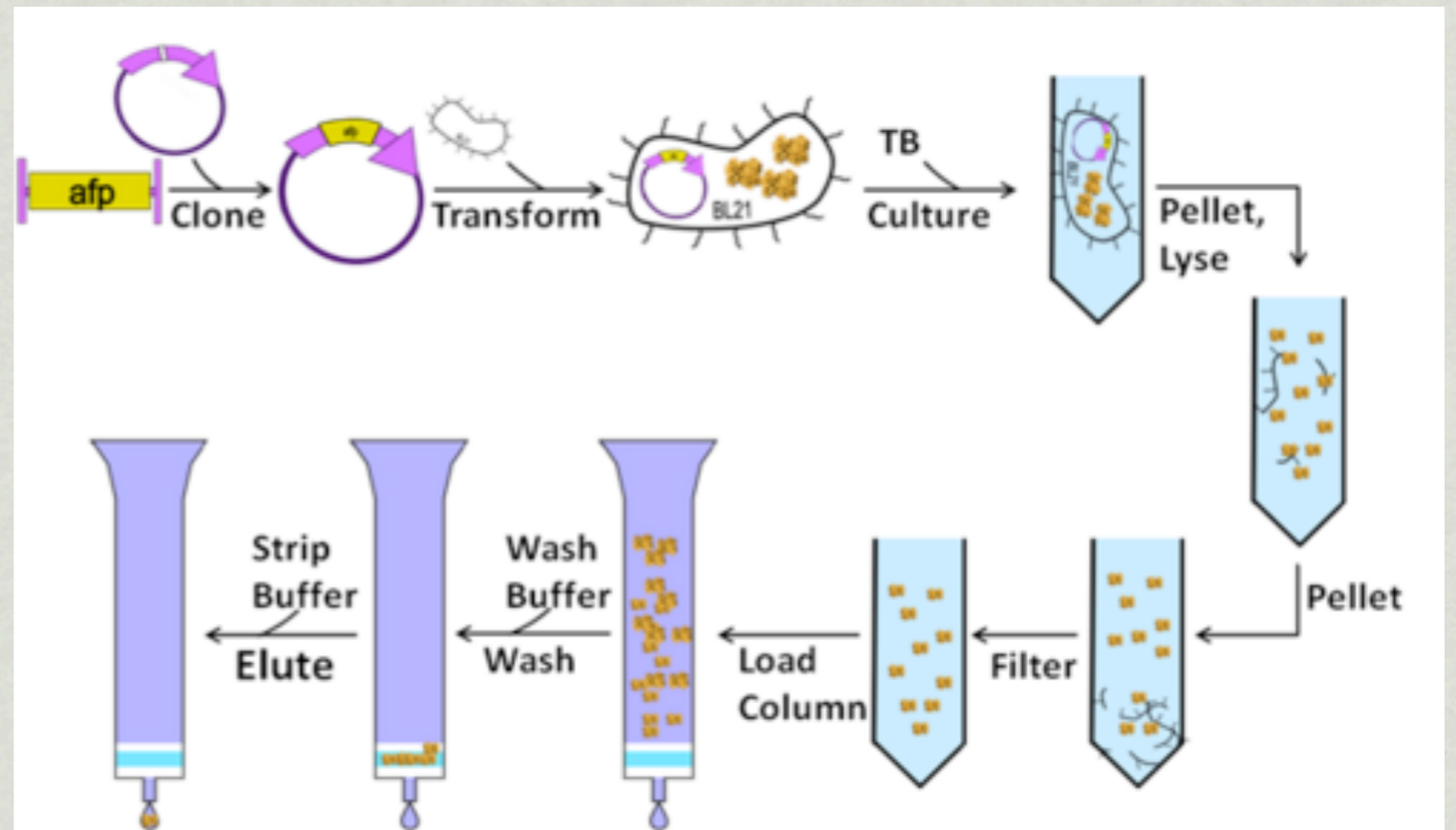
DNS – prokariotos lokalizēts nukleoīda rajonā (nenorobežots); eikariotos lokalizēta ar membrānu norobežotā kodolā

Plazmas membrāna – fosfolipīdu slānis, kas atdala šūnu no apkārtējās vides; importa un eksporta materiālu selektīvā barjera

Atšķirīgais

Šūnas iekšējās vides struktūra un uzbūve

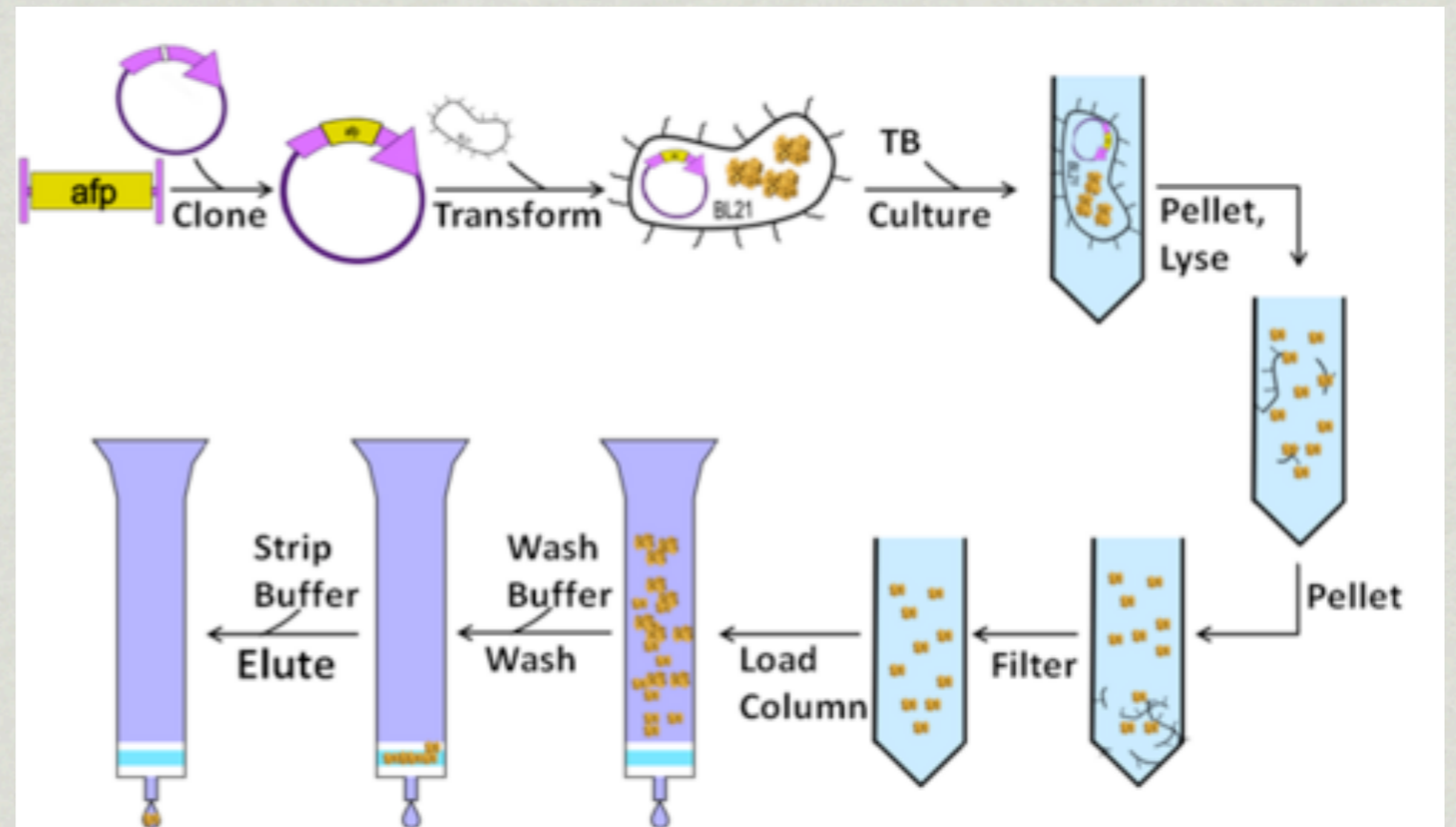
Zīdītāju šūnu kultūru pielietojums



<http://2009.igem.org/wiki/images/thumb/d/dd/OldPurificationGraphic.png/500px-OldPurificationGraphic.png>

Zīdītāju šūnu kultūru pielietojums

Rekombinanto proteīnu producēšana



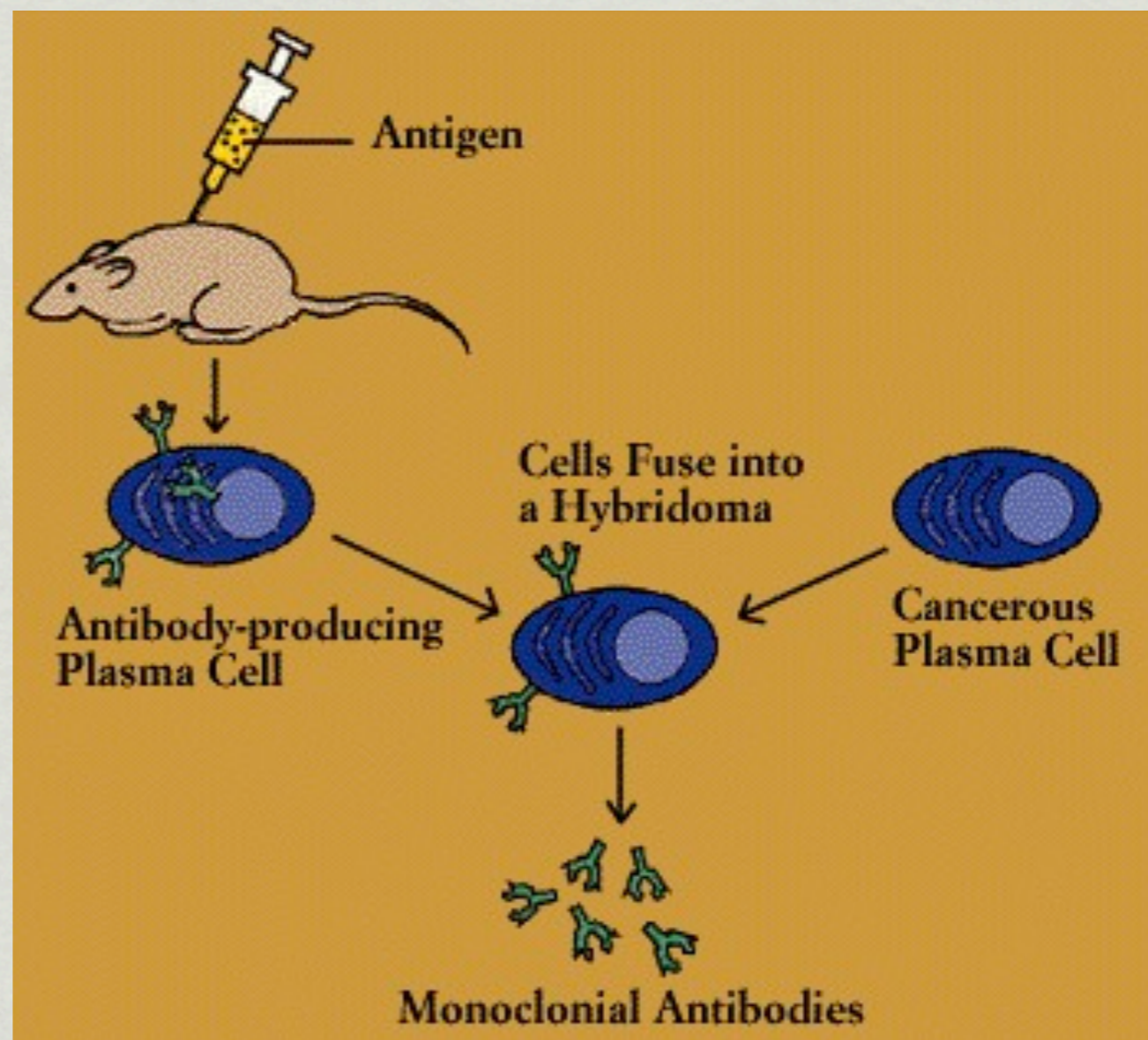
<http://2009.igem.org/wiki/images/thumb/d/dd/OldPurificationGraphic.png/500px-OldPurificationGraphic.png>

Zīdītāju šūnu kultūru pielietojums



Rekombinanto proteīnu producēšana

MAb producēšana, hibridomu veidošana



http://2.bp.blogspot.com/_ck14E7ECiVQ/SMTXf7fojsI/AAAAAAAAAAs/PTWtbHzBBWM/s320/Hybridoma+technology.gif

Zīdītāju šūnu kultūru pielietojums



Rekombinanto proteīnu producēšana

MAb producēšana, hibridomu veidošana

Šūnas bioloģijas pētījumi



Zīdītāju šūnu kultūru pielietojums



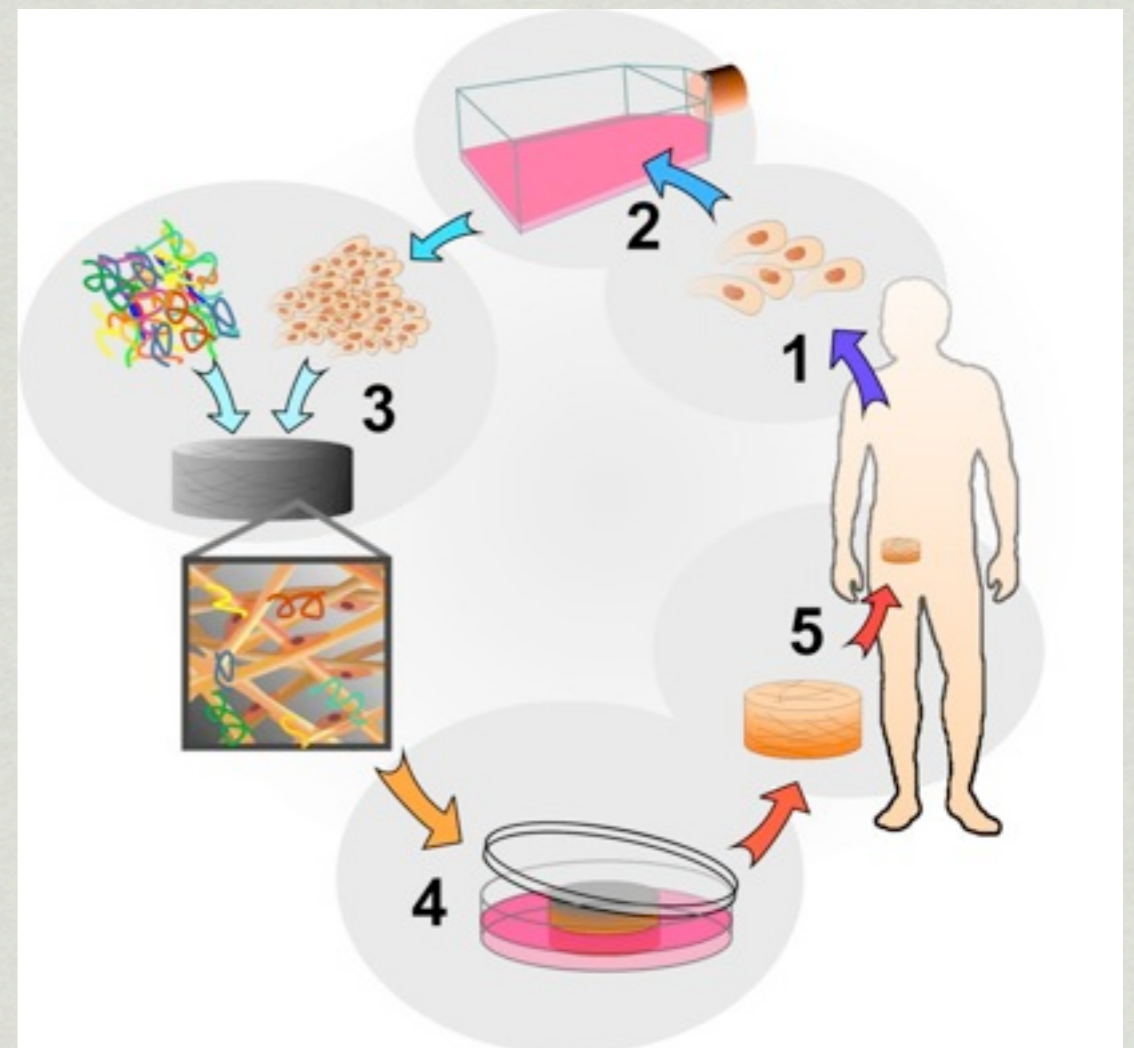
<http://www.smashinglists.com/wp-content/uploads/2010/04/mouse-ear.jpg>

Rekombinanto proteīnu producēšana

MAb producēšana, hibridomu veidošana

Šūnas bioloģijas pētījumi

Audu inženierija



http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108_2007_Groups/group12/TEModelLarge.jpg

Zīdītāju šūnu kultūru pielietojums



http://gotorgans.yolasite.com/resources/artificial_bladder.jpg

Rekombinanto proteīnu producēšana

MAb producēšana, hibridomu veidošana

Šūnas bioloģijas pētījumi

Audu inženierija

Mākslīgie orgāni

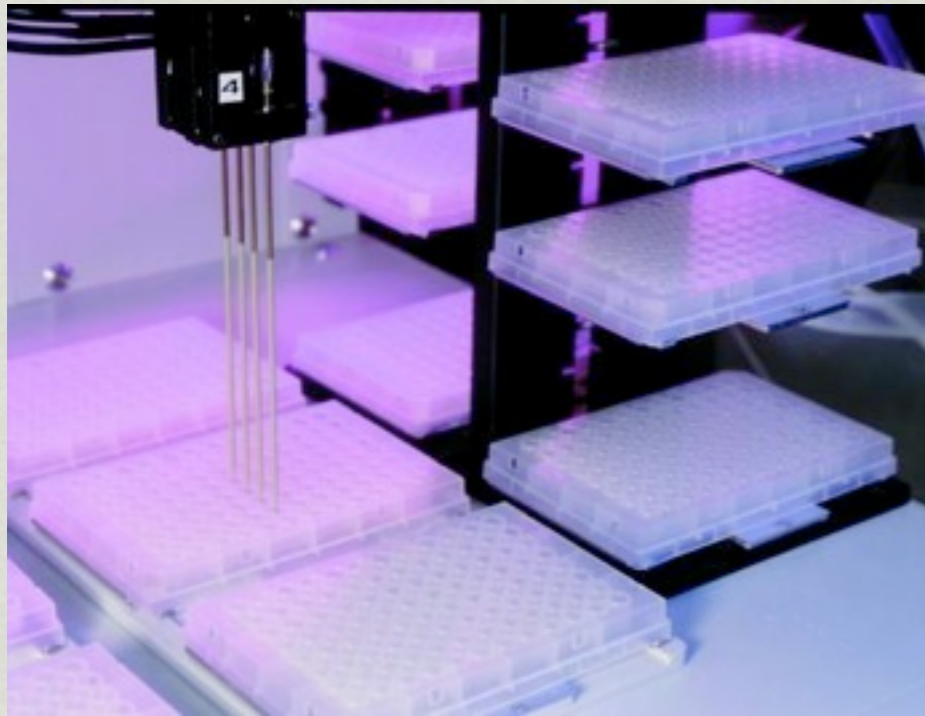


<http://bioartificialorgans.net/images/bio-artificial-organs.jpg>



http://zapp5.staticworld.net/images/article/2011/07/stem_cell_windpipe-5193539.jpg

Zīdītāju šūnu kultūru pielietojums



<http://www.ddw-online.com/img/32/800/600/0/0/high-throughput-screening-high-content-screening-primary-and-stem-cells.jpg>

Rekombinanto proteīnu producēšana

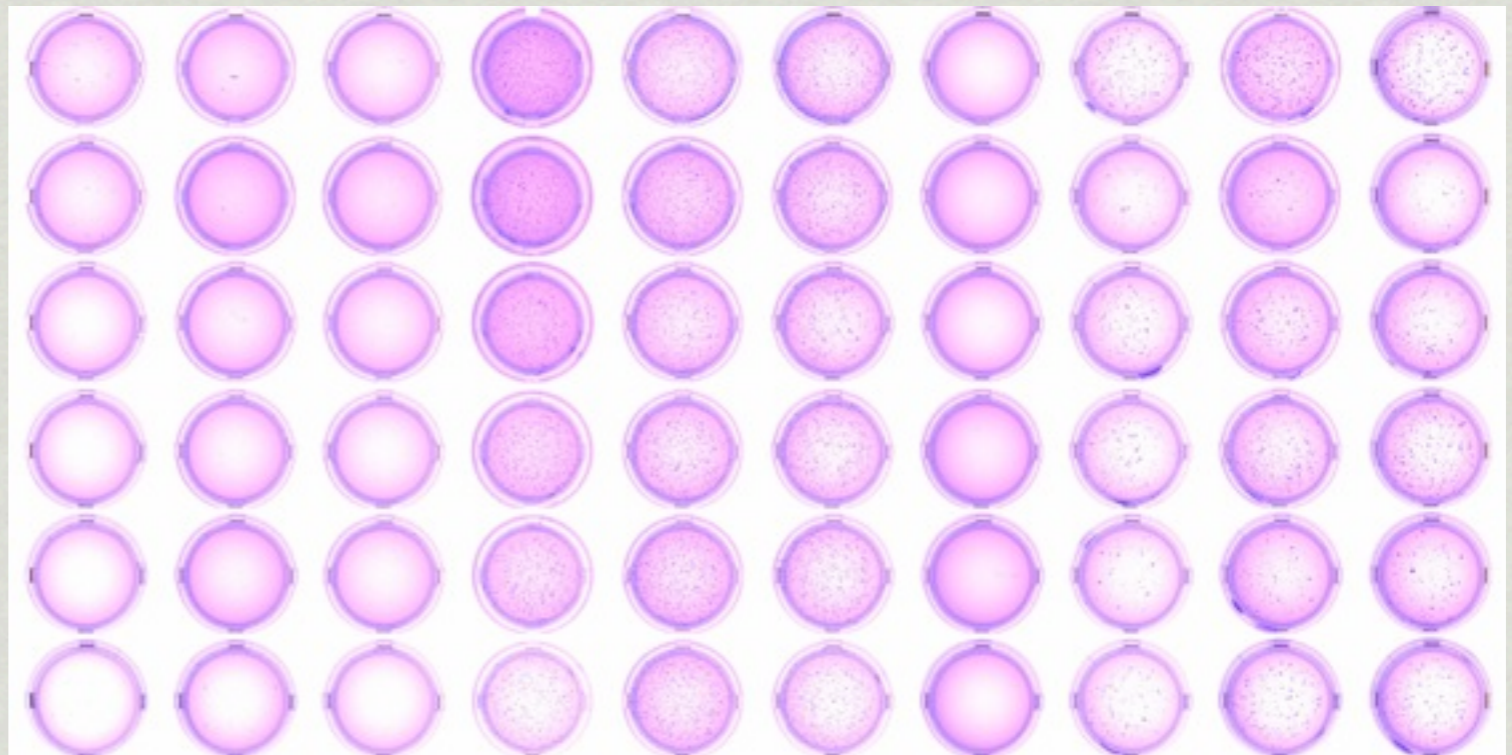
MAB producēšana, hibridomu veidošana

Šūnas bioloģijas pētījumi

Audu inženierija

Mākslīgie orgāni

Dažādu vielu toksicitātes un iedarbības pārbaude *in vitro*



Zīdītāju šūnu kultūras vs. Dzīvnieki

Priekšrocības

- konsekvence un atkārtojami rezultāti
- noteiktu komponentu ietekme uz specifiskiem šūnu tipiem (piem. aknu šūnas)
- izvairīšanās no piesārņojuma

Trūkumi

- šūnu raksturlielumi var mainīties (augšana un bioķīmiskie faktori)
- šūnām jāpiemērojas citām barības vielām

Zīdītāju šūnu kultūru produkti

Šūnas kā galaprodukti

- mākslīgā āda
- mākslīgie orgāni (b-šūnas (aizkuņģa dz.) hepatocīti (aknas)
- limfocīti
- gēnu/šūnu terapija

Šūnu galaprodukti

- Augšanas hormoni (NGF, EGF)
- Proteāzes (urokināze u.c.)
- Hormoni (Hum GF, insulīns utt.)
- MAb (viena tipa specifiski saistošā av, izmantojami diagnostikā un kā terapeitiskie aģenti)
- Vakcīnas (cūciņas, dzeltenais drudzis utt.)
- Rekombinantie glikoproteīni (Citokīni) Interferoni (bloķē vīrusu replikāciju), asisns recēšanas faktori (VIII, IX), glikoproteīnu hormoni , EPO

Zīdītāju šūnas

No saistīšanās neatkarīgās (suspensijas šūnas):

- asins šūnas
- dažas vēža šūnu līnijas

Adherentās šūnas:

- nepieciešama virsma, kas atbalstītu šūnu augšanu
- primārās šūnas

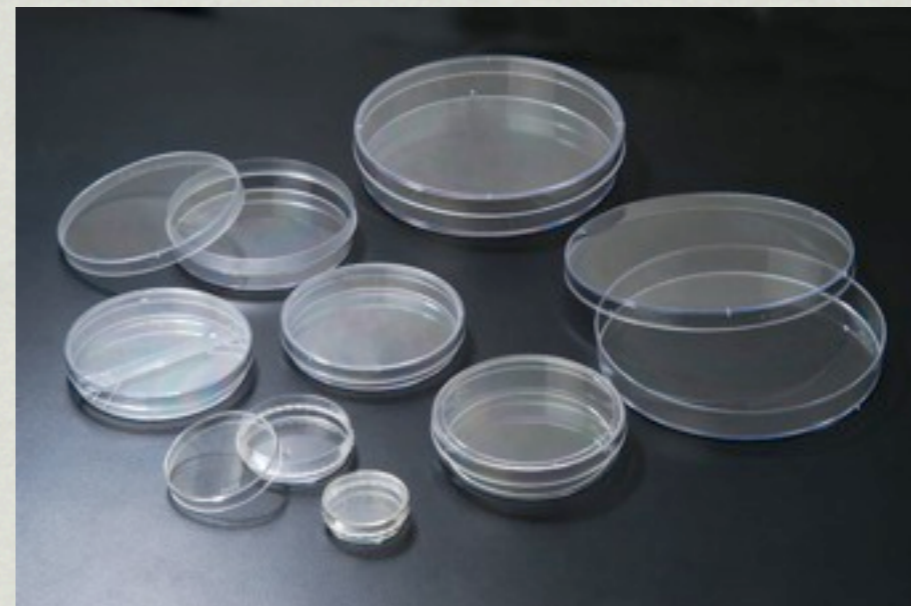
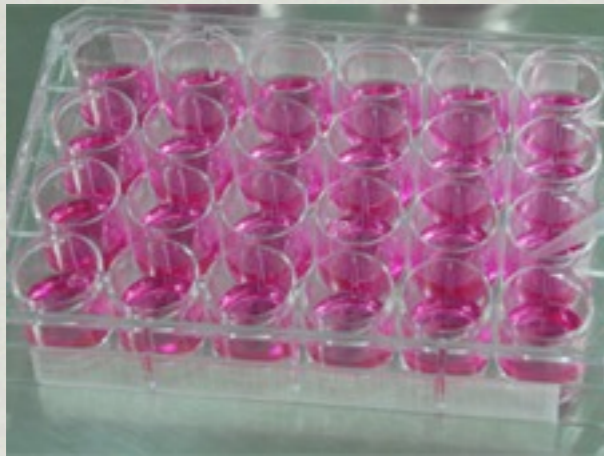
Kultivēšana

Kultivēšanas trauki: audu kultivēšanas flakoni, plates, bioreaktors



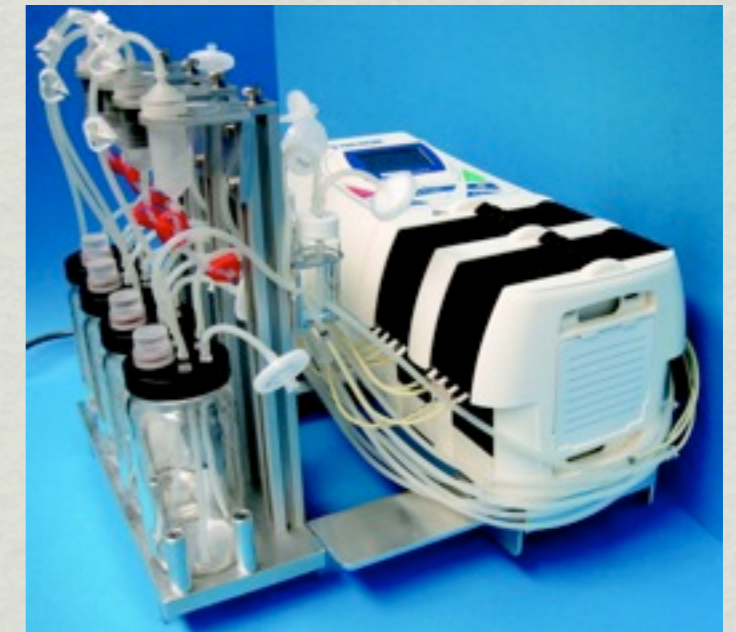
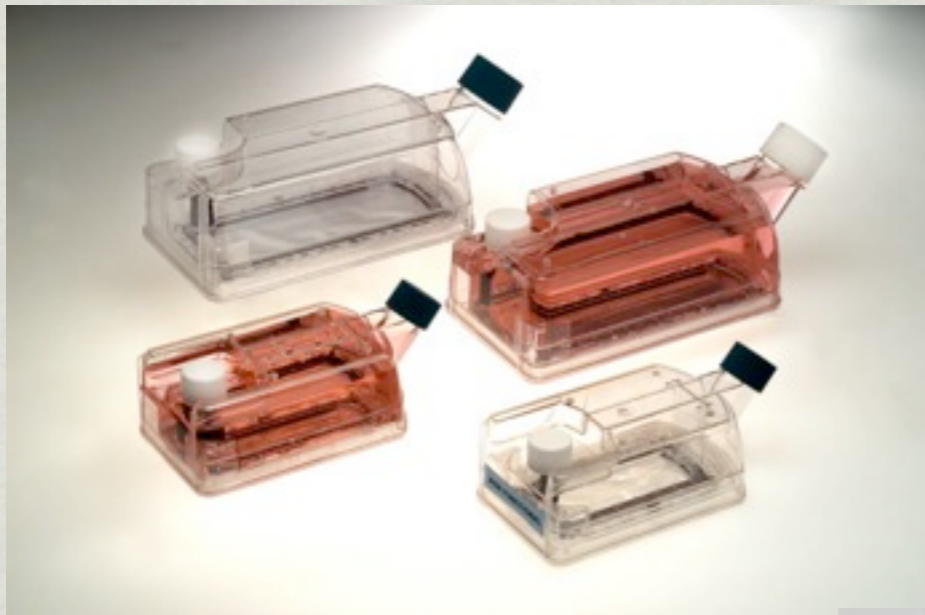
Kultivēšana

Kultivēšanas trauki: audu kultivēšanas flakoni, plates, bioreaktors



Kultivēšana

Kultivēšanas trauki: audu kultivēšanas flakoni, plates, bioreaktors



Kultivēšana

Kultivēšanas trauki: audu kultivēšanas flakoni, plates, bioreaktors

Kultivēšana vides: DMEM, MEM, RPMI utt.

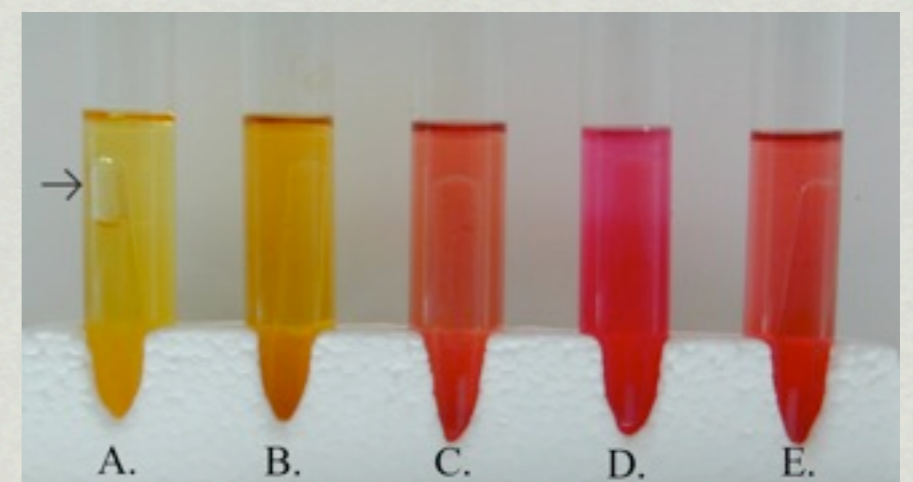
CO₂ inkubators: 5 – 10%; pH 6,9 – 7,4; 37 °C

Sterilizācija – filtrēšana

Uzglabāšanai N₂ vai ultrazemas temperatūras frīzerī

Vides

- **Ogļhidrāti**
enerģijas avots glikoze (4-5g/L), fruktoze
- **Aminoskābes (0.1-0.2mM)**
obv prekursori, glutamīns (2-4mM)
- **Sāļi (buferi): K, Mg, Ca**
izotoniski, osmolaritāte 300 mOsm/L; PBS, HEPES
- **Vitamīni (mM) un hormoni**
Metabolisma kofaktori
- **Fenola sarkanais**
Indikators, pH 7.4 (sarkans)
7.0 (oranžs), 6.5 (dzeltens)



<p>Inorganic Salts (g/liter)</p> <p>CaCl₂ (anhydrous) 0.20000 Fe(NO₃)₃·9H₂O 0.00010 MgSO₄ (anhydrous) 0.09770 KCl 0.40000 NaHCO₃ 1.50000 NaCl 6.40000 NaH₂PO₄·H₂O 0.12500</p>	<p>Vitamins (g/liter)</p> <p>Choline Chloride 0.00400 Folic Acid 0.00400 myo-Inositol 0.00720 Nicotinamide 0.00400 D-Pantothenic Acid 0.00400 (hemicalcium) Pyridoxine·HCl 0.00400 Riboflavin 0.00040 Thiamine·HCl 0.00400</p>
<p>Amino Acids (g/liter)</p> <p>L-Arginine·HCl 0.08400 L-Cystine·2HCl 0.06260 L-Glutamine 0.58400 Glycine 0.03000 L-Histidine·HCl·H₂O 0.04200 L-Isoleucine 0.10500 L-Leucine 0.10500 L-Lysine·HCl 0.14600 L-Methionine 0.03000 L-Phenylalanine 0.06600 L-Serine 0.04200 L-Threonine 0.09500 L-Tryptophan 0.01600 L-Tyrosine·2Na·2H₂O 0.10379 L-Valine 0.09400</p>	<p>Other (g/liter)</p> <p>D-Glucose 4.50000 Phenol Red, Sodium Salt 0.01500 Sodium Pyruvate 0.11000</p>

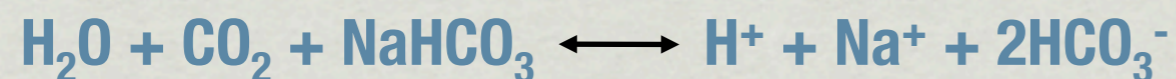
Vides papildsastāvdaļas

Nātrija bikarbonāts

Šūnu metabolismam nepieciešami nelieli oglekļa dioksīda (CO₂) daudzumi, lai tās varētu normāli augt. Šūnu kultivēšanas vidēs bikarbonāta joni ir vienādā daudzumā ar oglekļa dioksīda joniem. CO₂ brīvi šķīst vidē un reaģējot ar tajā esošo ūdeni veido karbonskābi. Šūnām augot un metabolizējot tās ražo arvien vairāk CO₂, vides pH samazinās nobīdot zemāk redzamo reakciju pa labi:



Otpimālais pH ir robežās no 7.2 līdz 7.4 un to var regulēt pievienojot videi nātrija bikarbonātu un regulējot gaisā esošo CO₂ daudzumu (tāpēc mēs izmantojam CO₂ nevis parastos termostatus) kā parādīts vienādojumā:



Parasti izmanto 1.2 līdz 2.2 g/l nātrija bikarbonātu inkubatoros ar 5%CO₂ un 3.7 g/l pie 10% CO₂ sastāva inkubatora gaisā.

Vides papildsastāvdaļas

HEPES buferis ir vēl viena bufersistēma, ko izmanto šūnu kultūru vidēs, lai normalizētu vides pH. Tomēr HEPES var būt toksiskas dažām diferencētām šūnu līnijām, tāpēc tā efekts jāpārbauda pirms lietošanas.

L-glutamīns

L-glutamīns ir neaizvietojamā aminoskābe, kas nepieciešama gandrīz vidu zīdītāju un insektu šūnu augšanai kultūrā. To izmanto kā enerģijas avotu proteīnu ražošanai, kā arī nukleīnskābju metabolismā. L-glutamīns ir nestabilāks kā citas aminoskābes. Tā noārdīšanās ātrums ir atkarīgs no produkta uzglabāšanas apstākļiem, ilguma un pH.

L-glutamīns bieži vien tiek pievienots videi atsevišķi, jo, kā jau minēts šķidrā formā, tas ir nestabils.

Šūnu kultūrās L-glutamīna daudzums variē no 0.68 mM vidē Medium 199, līdz 4 mM DMEM'ā. Vajadzētu būt uzmanīgiem ar L-glutamīna likšanu klāt papildus videi. L-glutamīna degradācijas rezultātā uzkrājas amonijaks, kas var atstāt nelabvēlīgu iespaidu uz šūnām. Amonjaka toksicitāte ir daudz graujošāka šūnām, kā L-glutamīna nepietiekamība.

Vides papildsastāvdaļas

Aizvietojamās aminoskābes (*Nonessential amino acids*)

Visas šūnu kultūru vides satur neaizvietojamās aminoskābes, kā arī cisteīnu, glutamīnu un tirozīnu. Pārējo aizvietojamu aminoskābju (alanīna, asparģīna, glicīna, glutamīnskābes, prolīna, serīna un asparģīnskābes) pievienošana šūnu kultūru videi atvieglo šūnu metabolisko slodzi, kā rezultātā uzlabojas šūnu porliferācija.

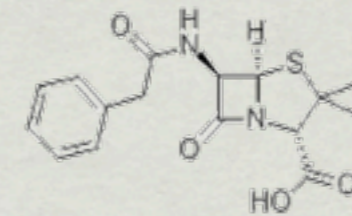
Nātrijs piruvāts

Piruvāts ir glikolīzes starpprodukts, kā arī pirmais Embdena-Meijerhofa ceļa komponents. Tas var brīvi pārvietoties no vides šūnā un otrādāk. Tā pievienošana videi kalpo gan kā enerģijas avots, gan kā oglekļa skelets anabolisko procesu laikā. Šūnas piruvāta metabolisma laikā veidojas CO₂, kas aiziet atmosfērā, un vidē veido bikarbonātu. Nātrijs piruvātu pievieno līdz 1 mM vairumā vidēs. Tas ir paaugstināts Leibovitz's L15 vidē, lai varētu kultivēt šūnas CO₂ brīvā vidē.

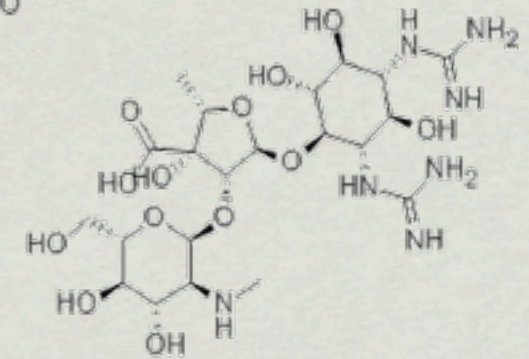
Piedevas

Antibiotikas un pretsēņu preparāti

-Penicilīns G (100 U/ml) inhibē G+ baktērijas

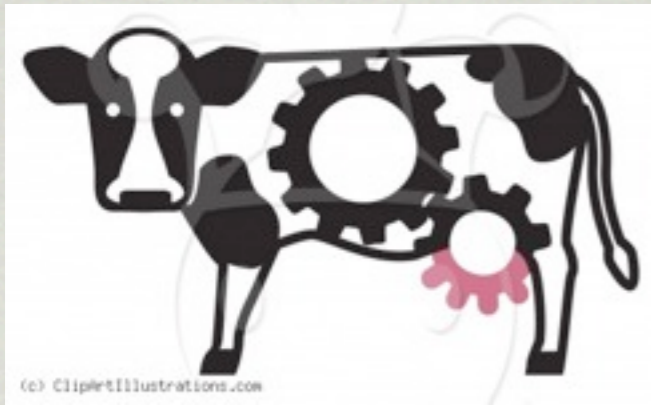


-Streptomycin (50 mg/L) G+ un G-



-Amfotericīns B (25 mg/L) pretsēnīšu preparāts

-Nepieciešamība – baktērijas (tD 30 min) aug ātrāk kā zīdītāju šūnas, kurām normāls dubultošanās laiks ir sākot no 24 h



Piedevas

Serums



Plazmas daļa, kas palikusi pēc asins sarecēšanas, kuras laikā plazmā esošais proteīns fibrinogēns tiek pārveidots par fibrīnu, kas paliek receklī

FBS iegūst no teļa augļa asinīm kautuvēs izmantojot slēgtu sistēmu

Izmanto tāpēc, ka zems antivielu līmenis un satur daudz augšanas faktorus

Galvenais FBS komponents ir albumīns (BSA)

Seruma iegūšana

Aseptiska asins savākšana

Asins sarecēšana

Centrifugēšana, lai atdalītu serumu

Seruma sasaldēšana pirms turpmākās apstrādes

Daudzpakāpju filtrēšana, kas noslēdzas ar 0.1 μm membrānu filtru izmantošanu

Kvalitātes kontrole atbilstoši sertificēta produkta prasībām

Analīzes sertifikāts satur informāciju par: filtrēšanu, valsti, kur serums iegūts, testiem, kuros pārbaudīt šūnu augšana, mikrobu tīrības testi, mikoplazmas un vīrusu skrīnings, endotoksīnu, hgb, IgG un kopējo proteīnu analīzes

Piedevas

Serums

- Proteīni (immunoglobulīni, albumīni, transferīni, fibronektīns)
- Augšanas faktori
- Insulīns (glikozes uzņemšanai)
- Steroīdi
- Minerāli (Fe, Cu, Zn, Se)
- Augšanas inhibitori



Seruma izmantošana

Komerčiāli pieejams no daudziem ražotājiem

Testē katru loti, ja tā mainās, tad izmanto 50% iepriekšējo loti+ 50% seruma no jaunās lotes

Uzglabā sasaldētā veidā – komponentu stabilitāte

Nogulsnes pie atsaldēšanas ir normāla parādība un neietekmē seruma kvalitāti. Nogulsnes var likvidēt centrifugējot 5 min 400 x g.

Lai izvairītos no nogulsnēm, seruma atsaldēšanu veic pie 2 līdz 8 grādiem un alikvotē



Piedevas

Seruma aizvietotāji

Specifiski šūnu tipiem: insulīns, transferīns, B27, Na selenīts utt.

Bezseruma vides

Nepieciešamas papildus piedevas atkarībā no šūnu tipa: insulīns, antioksidantu piedeava, dažādi lipīdi, hormoni

Šūnu izpēte Latvijā

PSKUS ŠTC

LU BF BBML / MF

BMPC

OSI

Inovātīvo biomedicīnas tehnoloģiju centrs

RSU?



Pateicos par uzmanību!

