



Cvičení 4: Pasážování buněk

Cílem cvičení je seznámit se s kultivací buněk *in vitro* a následně provést pasážování buněčné linie.

Kultivace buněk *in vitro* (ve zkumavce)

Pokud dojde k odebrání buněk ze lidské tkáně či zvířecí a následném kultivování mimo jejich přirozený organismus, jedná se o kultivaci buněk *in vitro*. Buňky odebrány přímo z organismu se nazývají primární linie. Pokud dojde k jejich pasážování, nazýváme je buněčné kmeny. Buněčné linie, vznikají z buněčných kmenů, jsou opět buňky odebrané z organismu, nicméně mají schopnost neomezeného buněčného dělení. Jedná se například o nádorové buňky.

Kultivací *in vitro* se rozumí napodobení co nejvíce přirozenějšího prostředí pro buňky. Buněčné linie se rozdělují na adherentní a suspenzní, kde toho jak v prostředí *in vitro* proliferyjí a dělí se. Adherentní buňky adherují (sedají) na dno kultivační nádoby (případně scaffoldu) a většinou rostou v jedné vrstvě. Pokud je dno pokryto ze 70-80 % buňkami, je nutné je naředit a obměnit kultivační médium, tento úkon je nazýván pasážování. Suspenzní linie neadherují na dno, ale proliferyjí a dělí se v suspenzi – médiu.

Kultivační podmínky

- povrch kultivační nádoby
- složení kultivačního média
- teplota: 37°C
- složení atmosféry: 5% CO₂ (odpovídá poměrům v extracelulární tekutině, podílí se na udržení pH médií s bikarbonátovým pufrům) + relativní vlhkost atmosféry 90% (zamezení odpařování vody z kultivačního média)
- adherentní buněčné kultury: rostou na vhodném kultivačním povrchu (polystyrenová nádoba s hydrofilním povrchem, popř. potažená adhezivními faktory – polypeptidy, kolagen, fibronectin, laminin)

Kultivační média

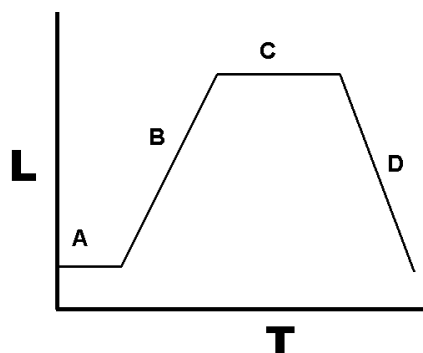
- tvoří tenkou vrstvu kapaliny nad adherovanými buňkami – dostatečně rychlá difúze O₂ a CO₂
- obsahují anorganické soli, pufrů, glukózu, esenciální aminokyseliny, vitaminy, bílkoviny, růstové faktory, mastné kyseliny, lipidy, stopové prvky
- přísávek séra pro doplnění významných organických látek (růstové faktory, bílkoviny, vitaminy, stopové prvky) – nejčastěji fetální bovinní sérum (FBS)
- sterilizace sér filtrací, tepelnou inaktivací – zabrání přenosu virové infekce
- pH 7,4
- acidobazický indikátor – fenolová červeň (jasně červený při pH 7,4; kyselé pH – žlutý; zásadité pH – fialový)
- rostoucí buňky vylučují do média kyselé metabolity (zežloutnutí – nutnost výměny média)



- přidavek antibiotik/antimykotik - zábrana kontaminace

Růst buněčné kultury

- A) statická fáze (lag fáze): příprava na buněčné dělení
- B) exponenciální (log) fáze: intenzivní množení buněk do vyčerpání živin
- C) stacionární fáze (plató): počet buněk se nemění, počátek akumulace toxických produktů
- D) fáze odumírání



T (osa x) = čas, L (osa y) = počet buněk v kultuře

- při kultivaci snaha o udržení log fáze (exponenciální nárůst počtu buněk)
- kontaktní inhibice – zastavení dělení
- před dosažením plató fáze (konfluence mezi 70 – 80 %) se kultura naředí a nasadí do nových kultivačních nádob v takové hustotě, aby rostla opět exponenciálně (= pasážování)
- konfluence = stav, kdy je vytvořena souvislá vrstva buněk (monolayer), které se vzájemně dotýkají

Pasážování buněk

Většina buněčných kultur je adherentních, což znamená, že rostou na pevných površích (obvykle na kultivačním plastiku). Pokud jsou okolní podmínky vyhovující, dochází k neustálému dělení buněk (viz růstová křivka). Buňky porůstají stále větší část povrchu. V určitém kritickém bodě je nutné jejich "naředění" a přenesení do nových lahviček, aby nedošlo k jejich útlumu (tzv. kontaktní inhibici).

Pasážování se provádí ideálně v momentě, kdy buňky pokrývají cca 70-80% povrchu materiálu (= konfluence, odhad se provádí mikroskopicky zhodnocením plochy porostlé buněčnou kulturou). Před vlastním pasážováním zkontrolujte buňky v kultivační lahvičce mikroskopicky (jejich morfologii a stupeň konfluence), запиšte si název buněčné linie a číslo pasáže.

Pro pasážování jedné kultivační lahvičky budete potřebovat: **trypsin**, pufr **PBS**, **kompletní médium**. Před vlastním pasážováním si do boxu připravte vše potřebné - vždy postříkat 70% roztokem etanolu, otřít a vložit do boxu.

Postup pasážování:

- 1) Z kultivační lahvičky odsát médium, přidat k buňkám cca 5 ml PBS pufru. Buňky opláchnout a pufr odsát.
- 2) Přidat 2 ml trypsinu a kultivační lahvičku vložit na 4 - 5 minut do inkubátoru (mikroskopická kontrola - zakulacení buněk, plavání v médiu).
- 3) Po trypsinizaci buňky jemně mechanicky sklepat ze dna a přidat 4 ml připraveného kompletního **média**. Buňky šetrně resuspendovat v tomto médiu (rozbít shluky buněk).
- 4) Všechnu buněčnou suspenzi odebrat do připravené falkony.
- 5) Napočítat na počítadle Luna a nasadit do nové kultivační láhve $2 \cdot 10^5$ buněk.
- 6) Přidat nové médium (12 ml).
- 7) Buňky zkontrolovat pod mikroskopem a vložit do inkubátoru.

Vypracování protokolu

- 1) Formální stránka (úprava, hlavička, úvod, popis praktické části, závěr)
- 2) Faktická stránka (potřebné chemikálie, buněčná linie a číslo pasáže, potřebný plastik, jednotlivé kroky pasážování)
- 3) Úvod – zadání cvičení, praktická část – popis cvičení a jednotlivých kroků, závěr – shrnutí cvičení, komentář a odpověď na případné otázky