

# SEJT- ÉS SZÖVETTENYÉSZTÉS

## 5. Állati sejtek tenyésztése



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

### Bevezetés

Az él lények hierarchikus szerveződése:  
Sejt Szövet Szerv Szervrendszer

Egyedfejlés:  
embrionális sejt differenciálódott sejtek



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

2

---

---

---

---

---

---

---

---

### Történeti áttekintés

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

1858 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 Élelmiszertudományi Tanszék

3

---

---

---

---

---

---

---

---

## 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 Élelmiszertudományi Tanszék

4

---

---

---

---

---

---

---

---

## Állati sejt/szövettenyésztés

Egészen más, mint a mikroorganizmusok tenyésztése.

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

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

Általában emlős sejteket tenyésztenek, de előfordul madár és rovar sejttenyésztése is.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

5

---

---

---

---

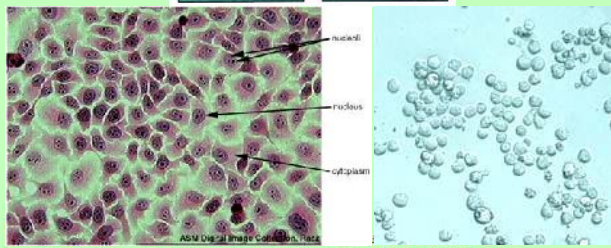
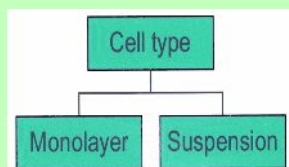
---

---

---

---

## 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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

7

---

---

---

---

---

---

---

---

## A fenntartás korlátja

A gerincesek legtöbb sejtje csak korlátozott számban osztódik az izolálást követően, azaz a tenyészet elöregszik (= szenescencia)

Okai:

1. a kromoszómavégek (telomérák) minden osztódási ciklusban bekövetkező megrövidülése
2. aktiválódnak a sejtciklus ellenőrzés (és az leállító) mechanizmusok

Csak a tumor- és a rovarsejtek osztódnak korlátlanul (immortality).



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

8

---

---

---

---

---

---

---

---

## Szaporítható sejtípusok:

Szinte minden szövet szaporítható, az izom és ideg kivesé. Az érett vesejtek nem osztódnak.

Fibroblaszt (kötő szövet): generációs ideje kicsi, felületeken gyorsan nő, túlnövi az egyéb szöveteket

Epiheliális (hám) sejtek: sok specializálódott sejt van

A korai embrionális eredetű sejtek jól szaporodnak

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

9

---

---

---

---

---

---

---

---

## 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-suszpenzió szűrése a sikeresen diszpergált sejtek és a megmaradt szövetdarabok szétválasztására.
5. A sejtek centrifugálása
6. A sejttöredék reszuszpendálása, friss tápfolyadékban.




---

---

---

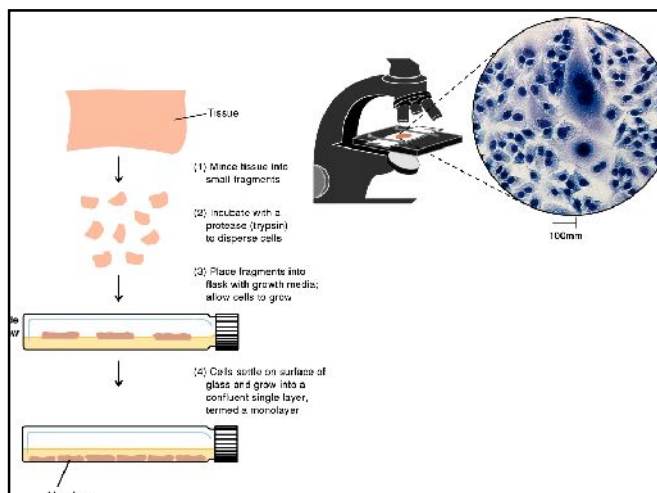
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

## Sejtpreparálás tenyésztéshez

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

Szubkultúra: egy genetikailag homogén tenyészetet több résztenyészetre osztanak, amelyeknek további felhasználása eltérő lehet (pl. konzerválják, termelésre használják, stb).




---

---

---

---

---

---

---

---



## 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 körülményei

A sejtek nagyon érzékenyek pl. a nyírásra:

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

Az oxigénigény nagyon kicsi, rendszerint elég a fejtér-fogatot átöblíteni levegővel. Sok sejtvonal kedveli a CO<sub>2</sub> jelenlétét (2-5%)

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

---

---

---

---

---

---

---

---

## Laboratóriumi tenyésztőedények (felületi)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

---

---

---

---

---

---

---

---

Laboratóriumi tenyészt edények (felületi)



EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 19

---

---

---

---

---

---

---

---

Laboratóriumi tenyészt edények (felületi)



EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 20

---

---

---

---

---

---

---

---

Laboratóriumi tenyészt edények (felületi)



EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 21

---

---

---

---

---

---

---

---

### Felület növelése

Multitray



roller bottles





BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

22

---

---

---

---

---

---

---

---

### Mikrokarrieres tenyésztés

Inokulálási/tapadási fázis



kialakult monolayer





BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

23

---

---

---

---

---

---

---


---

### Mikrokarrieres tenyésztés

van Wezel 1967: DEAE Sephadex A50-en  
 Apró, szuszpendált gyöngyök felületén,  
 átmér : 100-300  $\mu\text{m}$ ,  
 s r ség: 1,02-1,05  $\text{g/cm}^3$  (lebegésben tartható),  
 A fermentor térfogatának 8-15%-a hordozó,  
 felülete 0,5-1,5  $\text{m}^2/\text{l}$ , ami 10-30 forgó palacknak felel meg,  
 = nagy produktivitás

El nyei:

- nagy felületet be lehet bevinni egy adott reaktor-térfo-  
gatba
- viszonylag homogén környezet
- nincs szükség új reaktortípusokra



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi 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 nőnek (monolayer, kontakt gátlás),  
 függ: sejtvonaltól, mikrokarrier jellemzőitől, a sejt növekedési fázisától, a médium összetételétől és a sejt/mikrokarrier számaránytól



25

---

---

---

---

---

---

---

---

### Mikrokarrieres tenyésztés

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

**Levegőtetés:** direkt levegőtetésnél a felszálló és szétpukkanó buborékok károsíthatják a sejteket, ezért a felső légkörben vagy indirekt módon.

A gyöngyök könnyen leülepednek, főleg a tápoldat lecserélhető, illetve könnyű feldolgozni.

A gyöngyöket nem lehet/érdemes újra felhasználni.



26

---

---

---

---

---

---

---

---

### „Spinner flask”

Mágneses keverő, lassú mozgató  
 Mikrokarrieres és szuszpenziós tenyésztésre egyaránt






27

---

---

---

---

---

---

---

---

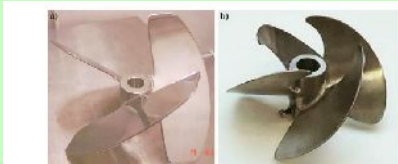
## Kevert reaktorok

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. 50. Az ABC 'Stirrer' és 'Impeller' típusú kevert reaktorok. Helyes Többszörös (2) kevert reaktorok.

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Összehasonlítás

**Szakaszos:** rossz produktivitás, sejtkoncentráció  $\sim 10^6$  sejt/ml,  $\sim 1$  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  $\mu$ g/beteg  $\rightarrow$  elegendő a forgó palack,

rtPA: 100 mg/ beteg  $\rightarrow$  fermentor



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

29

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---