

# SEJTENYÉSZTÉS

A sejtek szervezeten kívüli, *in vitro* (= üvegben) szaporítása

## *Előnyei:*

- Jól definiált és módosítható környezet (99% páratartalom, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> → médium pH-ját biztosítja)
- Meghatározott sejtípusok
- Nagy mennyiségű sejt nyerhető
- Sok sejtfunkció vizsgálható
- Állatkísérletek részbeni kiváltása
- Vizsgálhatók emberi sejtek

## *Korlátai:*

- Nem modellezi a szervezet komplexitását
- Spontán *in vitro* evolúció

## **Cél: Sejtkultúrák létrehozása**

### *Sejtkultúra típusok:*

#### A) Fejlődés szempontjából:

1. Primer sejtkultúra
2. Szekunder sejtkultúra
3. Sejtvonal
4. Sejttörzs

#### B) Letapadás szempontjából:

##### *1. Adherens (letapadó) sejt:*

- a sejtek mátrix fehérjéket termelnek és szorosan tapadnak a tenyésztőedény falához, ún. egyrétegű (**monolayer**) kultúrát alkotnak

- a sejtek átoltása során, passzáláskor a letapadás megszüntetéséhez **enzimes kezelés** (tripszin) szükséges

- a tenyészet növekedését a rendelkezésre álló tenyésztőfelület limitálja → kontakt gátlás

2. *Nem adherens (szuszpenziót alkotó) sejtek:*

- a sejtek lebegnek a tápfolyadékban
- a tenyészet növekedését a sejtek koncentrációja limitálja

## Tenyésztő edények

**Típusok:**

- Régen üveg flaskák
- Petri csésze
- Plate
- GlassBottom
- Műanyag tenyésztő flaska (T25: max. 10 ml  
T75: max. 35 ml)

*Flaskabevonatok:* (sejtek letapadását segíti)

- Zselatin bevonat
- Feederlayer: tápláló sejtréteg (szaporodásban gátolt, de még élő sejtek használata)
- Kollagén bevonat

## Tápfolyadékok

***A tápfolyadék általános összetevői:***

Sóoldat: anorganikus sók ionjai ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ), pl. PBS, HBSS

Nyomelem: pl. Fe, Cu, Zn stb. Felvételük fehérjéhez kötött formában lehetséges, és ezen konjugáció csak a sejten belül zajlik.

Fehérjék és peptidek: szállítófehérjék, hormonok, növekedési faktorok

Glükóz: energiaforrás a sejtek számára (anyagcseréhez lipid, fehérjeszintézishez), fenntartja az ozmolaritást

Vitaminok: pl. folsav, kolin, tiamin, biotin, B<sub>12</sub> vitamin stb.

Esszenciális aminosavak: pl. arginin, lizin, treonin, valin; ezeket a gerincesek nem tudják előállítani pl.: lizin

Pufferrendszer: a pH fenntartásához szükséges (HEPES vagy CO<sub>2</sub>/bikarbonát puffer)

Indikátor: Fenol-vörös: jelzi a pH-változását (a sejtek anyagcseretermékeinek hatására savas irányba tolódik a pH)

*A komplett médium tartalmaz még utólag hozzáadott:*

Szérum (Vérsavó): pl. FBS, FCS

A sejtek proliferációjához (szaporodásához) szükséges anyagokat foetális (magzati) vagy felnőtt szérummal egészítik ki a médiumot (5-20%-kal)

Antibiotikum, antimicotikum: (pl. gentamycin, penicillin)

a bakteriális fertőzések ellen véd, opcionális, a steril munkavégzési szabályok betartásával nélkülözhető. Tárolás: -20°C

***Leggyakrabban használt szintetikus tápoldatok (médium):***

- RPMI 1640
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium → magasabb glükóz tartalom az RPMI-hez képest)
- Ham's Nutrient Mixtures (F12)

***Médium színváltozása:***

- Sárga: savas (A sejtek táplálkozása során savas anyagcseretermékek keletkeznek)
- Piros: semleges
- Lila: lúgos

## **Sejtenyésztéshez használt fontosabb anyagok**

- ▶ **FBS** (FetalBovineSerum): borjú vérsavó
- ▶ **PSN**: (Penicillin+Streptomycin+ Neomicin) antibiotikum
- ▶ **DMSO**: (glicerin → sterilizendő) dimetil-szulfoxid
  - Sejtek lefagyasztásakor megakadályozza a sejtfal károsodását
  - krioprotektív szer (megakadályozza a jégkristály képződést)
  - a fagyasztóoldat általában FBS és DMSO 9:1 arányú oldata

**PBS:** (Phosphate Buffered Saline)

- Az egyik legáltalánosabban, és leggyakrabban használt sóoldat
- $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Mg}^{2+}$  hozzáadásával: **DPBS** (erősebb a sejtek letapadása)

**Tripszin:**

- Az adherens sejtek felszedésére használjuk a flaska belső aljzatáról
- Hatására a kihorgonyzó fehérjeszálak leemésződnek
- Hatóideje függ a sejtek fajtájától, koncentrációjuktól (konfluencia), de maximum 10 percig emészthetünk vele, 37 °C-on.

## Sejtszámolás

Sejtszuszpenzióból (az oldat, amiben a sejtek a lehető legegyszerűsebben vannak eloszlatva) **10 µl mintát + 10 µl tripánkék** festék szuszpendálása → meghatározzuk a sejtszámot → következtetünk a teljes mennyiségre

### Bürker kamra:

Egy vastagabb üveglemezből és egy vékony fedőlemezből áll (a vastag lemezre finom beosztás van karcolva)

1. A fedőlemezt a vastag lemezre leszorítjuk és a vizsgálandó anyagot a kettő közti részbe cseppentjük
2. Fénymikroszkóp alatt vizsgáljuk, 16x vagy 40x-es nagyítású objektívvel
3. Megszámoljuk 25 négyzetben, ill. azok ugyanazon 2-2 oldalán látható sejtek számát és összeadjuk őket → sejtszám

### Számolás

1 ml tápfolyadékban lévő sejtek száma:

**kapott sejtszám**

**x hígítás** (10 µl sejthez, ha 10 µl tripán-kék oldatot adtunk, az 2x-es hígítás)

**x 10<sup>4</sup>**

$$\text{pl: } 30 \times 2 \times 10^4 = 600.000 / \text{ml}$$

## Sterilizálás

### Kuktázás (121°C, 20 perc)

- A sterilizálandó eszközöket alufóliába csomagoljuk (sérülésmentesen!)
- A kuktába 1,5-2 cm magasságig desztillált vizet öntünk
- A kukta aljára helyezett petri csészékre pakoljuk a becsomagolt eszközöket (ne érjen az aljuk a vízbe)
- A lezárt kuktát rezsón melegítjük
- A kukta forrásától (8-10 perc) számított 20 percen keresztül végezzük a sterilezést
- Ezután levesszük a kuktát a melegítőről, kikapcsoljuk rezsót, majd 5-6 perc hűlés után levehetjük a tetejét

Sterilizálható eszközök: fémtárgyak, klávozható gumi- és műanyag termékek, üveg- és porcelán eszközök

### Hőlégmentesítés(180°C, 25 perc)

- A sterilizálandó eszközöket légmentesen zárható, hőálló és jó hővezető csomagolásba helyezünk. Ilyen a zárt fémdoboz, hőálló üvegedény, speciális alumínium fólia.
- Egy darab sterilizáló szalagot ragasztunk a csomagolásra (színváltozása jelzi, hogy az eszköz már steril)
- Fontos: a műteti eszközök tárolójának 2 oldalán található reteszt a sterilezés előtt kinyitjuk; majd a folyamat végén, még a sterilizátorból való kivétel előtt visszazárjuk

Sterilizálható eszközök: műteti eszközök, fémtárgyak, porcelán- és üvegtermékek (pl. üvegpipetták)

Csak alaposan elmosogatott, vízkömentesített, szárazra csöpögtetett eszközt sterilizálunk!

A sterilizált eszközöket csak steril fülke alatt vesszük ki a csomagolásukból, és csak kihűlt állapotukban használjuk őket!

## Gyakorlat

### *A steril munkavégzés szabályai:*

Köpeny gumikesztyű használata kötelező!

Bemosakodás lépései: - kézmosás

- 70%-os alkohollal fertőtlenítés

- gumikesztyű használata

- Pakoljunk, be a steril fülkébe minden szükséges anyagot majd fertőtlenítsük le 70%-os alkohollal.
- Gondoljuk át munkavégzésünk lépéseit, mielőtt dolgozni kezdünk.
- Ellenőrizzük a steril csomagolások épségét.
- Munkavégzés közben figyeljünk oda, hogy a pipetta hegye, illetve az eszközök, amikkel dolgozunk ne érjen semmihez a fülkében.
- Nyitott edények felett ne emeljünk át semmit.
- Munka végétével 70%-os alkohollal fertőtlenítsük a munka helyszínét.

### **1. Sejt felvétele fagyasztásból:**

A  $-70^{\circ}\text{C}$ -on tárolt sejteket kiolvasztjuk, majd 1ml tápfolyadék hozzáadásával steril centrifugacsőbe tesszük. A centrifugálást 5 percig végezzük 1000 rpm centrifugális erővel.

Centrifugálás után leöntjük a felülúszót és 1 ml tápfolyadékkal felszuszpendáljuk a sejteket.

4 ml tápfolyadékot teszünk T-25-ös tenyésztőedénybe, majd hozzáadjuk pipettával a felszuszpendált sejteket.

A sejteket inkubátorba tesszük ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ - tartalom, 99% páratartalom)

### **2. Sejtek etetése:**

*A) Letapadó sejtek esetében:*

Az inkubátorból kivett sejtekről pipettával leszívjuk az elsárgult tápfolyadékot, majd 5 ml friss tápfolyadékot pipetázunk rájuk.

*B) Nem letapadó sejteknél:*

A sejtekről pipettával leszívjuk a tápfolyadékot, steril centrifugacsőbe helyezzük, majd 5 percig 1000 rpm fordulaton centrifugáljuk. Leöntjük a felülúszót és 1 ml tápfolyadékkal felszuszpendáljuk a sejteket. A flaskába 4 ml tápfolyadékot pipetázunk, majd hozzáadjuk a sejteket.

### 3. Sejtek passzálása/átoltása:

Ezt a műveletet a sejtek több flaskába történő szétosztása miatt végezzük.

#### A) *Letapadó sejteknél:*

- A sejtekről pipettával leszívjuk a tápfolyadékot, 1ml PBS-sel átmoszuk a tenyészetet.
- 1 ml tripszint adunk a sejtekhez, majd az inkubátorba tesszük őket 10 percre. Ez a sejtek felválását segíti elő a flaska aljáról.
- Ha a sejtek felváltak, 1 ml tápfolyadék hozzáadásával 5 percig 1000 rpm fordulaton centrifugáljuk őket
- Centrifugálás után a felülúszót leöntjük, és 1ml tápfolyadékkal szuszpendáljuk őket.
- A felszuszpendált sejteket ezután a kívánt mennyiségű flaskába osztjuk szét és 5 ml ösztérfogatra egészítjük ki őket tápfolyadékkal.

#### B) *Nem letapadó sejtek esetén:*

- pipettával felszívjuk a sejteket és centrifugacsőbe tesszük őket, a tripszines elválasztási lépés kimarad.

### 4. Sejtek fagyasztása:

#### A) *Letapadó sejteknél:*

- A sejtekről a tápfolyadékot pipettával eltávolítjuk, majd 1 ml PBS-sel átmoszuk őket.
- 1 ml tripszinnel a sejteket inkubátorba tesszük, majd 5 percig állni hagyjuk.
- A sejtek felválása után 5 percig 1000 fordulaton 1ml tápfolyadék hozzáadása után centrifugáljuk.
- után a sejtekről leöntjük a felülúszót és 1 ml fagyasztó oldatban (10% DMSO, 90% FBS) felszuszpendáljuk őket.
- A fagyasztócsőbe 0,5 ml fagyasztóoldathoz hozzáadjuk a sejteket és  $-70^{\circ}\text{C}$ -on tároljuk őket.

#### B) *Nem letapadó sejteknél:*

- A tripszines elválasztási lépés szükségtelen.

Fontos, hogy minden flaskán, fagyasztócsövön tüntessük fel az adatainkat (név, dátum, sejtípus, passzálások száma).

Munkavégzés végeztével fertőtlenítsük ki a steril fülkét 70%-os alkohollal, pakoljuk el a nem használatos eszközöket, kapcsoljuk ki a fülkét és kapcsoljuk be az UV-lámpát.

## Források

<http://www.etox.eu/%C3%BAj-Sejtkult%C3%BAr%C3%A1k-%C3%A9s-preparat%C3%ADv-technik%C3%A1k-jegyzet-%C3%B6sszes-ea.pdf>

<http://labtutorials.org/2013/10/09/sejtszamosas/>

<http://enfo.agt.bme.hu/drupal/node/11932>

<http://europepmc.org/abstract/med/25458483>

[http://physiology.elte.hu/gyakorlat/BSc\\_30h/Cell\\_cultivation.pdf](http://physiology.elte.hu/gyakorlat/BSc_30h/Cell_cultivation.pdf)

<http://www.muszeroldal.hu/measurenotes/sejtenyesztes.pdf>

sotepedia.hu/\_media/aok/immunologia/aok/5sejtenyesztesaok13ppt.ppt

[http://www.olkda.med.unideb.hu/sites/default/files/sejtenyesztes\\_ea.pdf](http://www.olkda.med.unideb.hu/sites/default/files/sejtenyesztes_ea.pdf)