



## Uzgoj i transformacija mikrobnih i staničnih kultura

doc. dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček  
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju  
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

GMV2008

STERILNI UVJETI!!!

## STANIČNE I TKIVNE KULTURE

### MIKROBNE KULTURE

- bakterije, gljivice, kvasci, jednostanične i nitaste alge, protozoa
- bakterije: *E. coli*, *Bacillus subtilis*
- kvasci: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Pichia pastoris*
- alge: *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas dysosmos*

znanstvena istraživanja (modelni organizmi)  
i industrijske svrhe

GMV2008

STERILNI UVJETI!!!

## Uzgoj bakterijskih kultura

### 1. Uzgoj u tekućem mediju

- hranjivi sastojci potrebni za bakterijski rast
- minimalni medij
  - soli, izvor ugljika i energije (glukoza)
- potpuni ("bogat") medij
  - soli, aminokiseline, vitamini, nukleotidni prekursori itd.
  - LB-medij (Luria-Bertani: tripton, kvašćev ekstrakt, NaCl)

### 2. Uzgoj na tvrdoj podlozi

- Tekući medij uz dodatak agara
- Kontrolirani uvjeti rasta (temperatura, medij)
- Posude: netoksično, po mogućnosti prozirno i sterilizabilno

GMV2008



## Tip hranjivog medija

### Bogati

- Sastav
  - tripton
  - Ekstrakt kvasca
  - NaCl
  - pufer (u nekim tipovima)
- Primjeri
  - Luria-Bertani (LB)
  - 2xTY
  - TB (puferiran fosfatnim puferom)

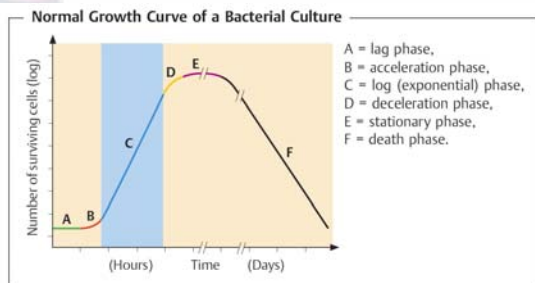
### Kemijski definirani

- Sastav
  - Fosfatni pufer
  - Izvor dušika (amonijev klorid ili amonijev sulfat)
  - Izvor ugljika (glukoza ili glicerol)
  - Metali u tragovima (Ca, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se and Zn)
  - vitamini (biotin, tiamin, folat, riboflavin, niacinamid, PABA, pantotemat i piridoksin)

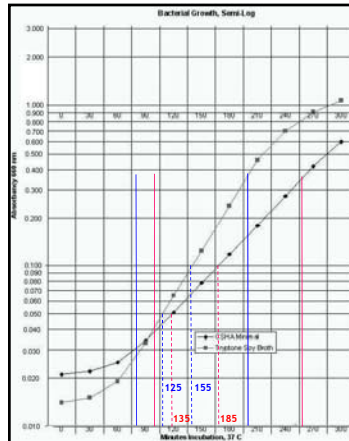
GMV2008



## Krivulja rasta bakterijskih stanica



GMV2008



## Zadatak

- Iz semi-logaritamskog prikaza odredite generacijsko vrijeme (vrijeme udvostručenja) za bakterijski soj u dva različita hranidbena medija.

- Minimalni medij: 50 min.
- Bogati medij: 30 min.

GMV2008

## Uzgoj u fermentoru ili u tikvici?



- Dobivanje vrlo velikih količina proteina - bioterapeutici, industrijski važni proteini
- Dobivanje proteina za znanstvena istraživanja

GMV2008

## Kvasac kao modelni eukariot

- jednostavan za uzgoj u laboratoriju - vrijeme diobe 1.5-2 h na 30 °C
- haploidni i diploidni životni ciklus
  - diploidnost omogućava mutacije esencijalnih gena koji bi bili letalni u haploidnom soju
  - geni iz različitih sojeva mogu se kombinirati križanjem
- može se uzgajati fermentacijom na glukozi ili respiracijom na izvoru ugljika kao što je glicerol ili etanol što nije moguće kod viših eukariota - idealan za studij mitohondrijskih proteina potrebnih za stanično disanje

GMV2008

## Animalne kulture

STERILNI UVJETI!!!

- PRIMARNE KULTURE
  - dobivene izravno od embrionalnih, odraslih ili tumorskih stanica
    - monoslojevi (kontaktna inhibicija)
    - sa i bez sposobnosti dijeljenja
    - humani fibroblasti - zadržavaju sposobnost dijeljenja, originalni diploidni kariotip, stupanj diferenciranosti, visoka pouzdanost *in vivo* stanja
  - modelni sustavi i industrijska primjena

GMV2008

## STANIČNE LINIJE

STERILNI UVJETI!!!

- STANIČNE LINIJE
  - nastaju diferencijacijom ili transformacijom 1° staničnih kultura
  - transformacija je fiziološka adaptacija i ne nastaje zbog mutacija (iako je aneuploidija česta pojava)
    - fiziološke promjene, neograničena sposobnost dijeljenja (nema kontaktne inhibicije), brži rast, fiziol. svojstva slična tumorskim st.
    - transformacija 1° SK može biti potaknuta kemikalijama (3,4-benzpiren, nitrozometil urea) ili virusima (Rous sarkoma virus)
  - modelni sustavi i industrijska primjena

GMV2008

## Uobičajene stanične linije

CHO	epitelne	St. jajnika kineskog hrčka
HeLa	epitelne	Ljudski karcinom cerviksa
MDCK	epitelne	Pseći bubreg
Vero	fibroblasti	Bubreg majmuna
WI-38	fibroblasti	Ljudske fetalne st. pluća
3T3	fibroblasti	mišji fibroblasti

GMV2008

## STANIČNE LINIJE

STERILNI UVJETI!!!

- adherirajuće kulture
  - stanice rastu adherirane na podlogu
  - primarne kulture, normalne diploidne stanične linije, tumorske st. linije
- stanične suspenzije
  - hibridoma stanice, HeLa, tumorske st. linije
  - male gustoća st. - st. na dnu posude
  - visoka gustoća st. - uz miješanje (areacija)
- kontrolirani uvjeti rasta (temp., medij, pCO<sub>2</sub>)
- posude: netoksično, po mogućnosti prozirno i sterilizabilno
- održavanje stalnog broja presađivanjem
- biljne stanične i tkivne linije

GMV2008

### Adherirajuće kulture i stanice u suspenziji



Nekonfluentne stanice

Konfluentne stanice

Stanice u suspenziji

GMV2008

### Temeljni sastav medija različit je za stanice sisavaca i stanice insekata

	St. sisavaca	St. insekata
Glukoza	4 g/l	2.5 g/l
Aminokiseline	0.01-0.15 g/l	0.1-1.5 g/l
Glutamin	1 g/l	1 g/l
HCO <sub>3</sub>	3.5 g/l	0.35 g/l
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 g/l	1 g/l
Soli	4.5 g/l NaCl	1g/l MgSO <sub>4</sub> , KCl
Vitamini	Više	Manje
pH	7.2	6.4
Osmolarnost	300 mOsm	350 mOsm

GMV2008

### Mediji za uzgoj animalnih stanica u kulturi



- PBS (phosphate buffer saline) - pufer za ispiranje
- RPMI 1640/MEM/DMEM - različiti mediji za različite tipove stanica
- Fetalni goveđi (teleći) serum (FBS/FCS)

GMV2008

### Što je serum?

0-20% Serum

Sadrži:


- Faktore rasta
- Transferin (Fe)
- Lipide
- Inzulini

Važan i za:

- Zaštitu od kidanja
- Detoksifikaciju

Problemi:

- Infektivne čestice (virusi, mikoplazme, prioni)
- Sastav seruma je slabo definiran i pakiranja (batch) se razlikuju
- Skup



GMV2008

### Posude za uzgoj animalnih stanica u kulturi



- Boce
- Petrijevke za stanične kulture
- Boca s magnetskom miješalicom
- Mikrotitratske pločice za st. kulture

GMV2008



## Presadivanje stanica

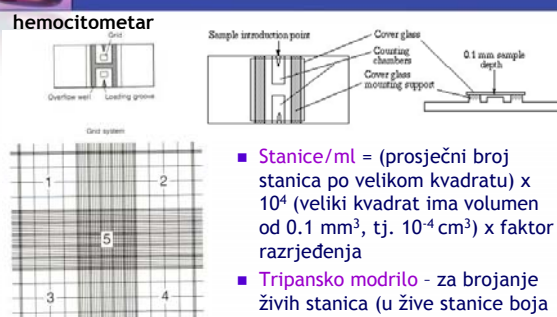
- Adherirajuće kulture - stanice prije unošenja u novi medij treba odvojiti od podloge
  - Tripsinizacija (FCS inhibira tripsin)
  - Struganje (može oštetiti staničnu membranu)
  - Razdvajanje stanica koje se drže zajedno (raspuhivanje)
- Kulture u suspenziji - prebacivanje manje količine stanica u svježi medij



GMV2008

## Brojanje stanica

### hemocitometar



- Stanice/ml = (prosječni broj stanica po velikom kvadratu)  $\times 10^4$  (veliki kvadrat ima volumen od  $0.1 \text{ mm}^3$ , tj.  $10^{-4} \text{ cm}^3$ )  $\times$  faktor razrjeđenja
- Tripanško modrilo - za brojanje živih stanica (u žive stanice boja ne ulazi, u mrtve da)

GMV2008

## Načini sterilizacije

- Suha sterilizacija:
  - $160^\circ \text{C}$  2 h ili  $180^\circ \text{C}$  30 min.
  - Stakleno posuđe
- Autoklaviranje:
  - tlak 1.3-1.4 bar;  $120^\circ \text{C}$ ; 15-20 min.
  - Mediji za rast bakterija i kvasaca
  - stakleno posuđe, laboratorijska plastika (nastavci za pipete, Eppendorf epruvete)

GMV2008

## Načini sterilizacije

- Zračenje:
  - Neionizirajuće - UV- sterilizacija prostora
  - Ionizirajuće -  $\gamma$  - sterilizacija plastičnih boca i Petrijevkvi za uzgoj staničnih kultura
- Filtracija
  - $0.22 \mu\text{m}$  filteri
  - Mediji i otopine koje nisu stabilne pod visokim tlakom i temperaturom

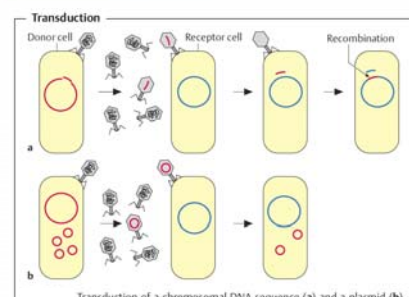
GMV2008

## Metode unosa DNA u stanicu domaćina

- Transformacija** - unos DNA u bakterije i kvasce
  - Metoda s  $\text{CaCl}_2$  - bakterije
  - Metoda s Li-acetatom; transformacija sferoplasta (enzimskim putem uklonjena stanična stijenka) - kvasac
- Transdukcija/Transfekcija** - unos DNA u bakterije putem virusa
- Konjugacija**
  - prijenos DNA iz jedne bakterije u drugu putem konjugativnih plazmida
  - unos DNA u sferoplaste kvasca putem konjugativnih plazmida
- Transfekcija/Transformacija** - unos DNA u animalne stanice
  - precipitacija s  $\text{CaPO}_4$
  - putem virusa
  - putem liposoma

GMV2008

## Transdukcija



Transduction of a chromosomal DNA sequence (a) and a plasmid (b).

GMV2008

## Konjugacija u bakterija

**Conjugation**

Transfer/replication process of a conjugative plasmid.

a) Conjugation: connection between two bacterial cells by means of sex pilus. This initial step alone does not necessarily always lead to effective conjugation.

b) Effective conjugation: formation of a specific conjugative bridge between donor cell and recipient cell.

c) Plasmid mobilization and transfer: an endonuclease cleaves one strand of the circular DNA double helix at a specific point (B). The single strand with the "leader region" enters the recipient cell.

d) Synthesis: the double-stranded structure of both the transferred single strand and the remaining DNA strand is restored by means of complementary DNA synthesis. The recipient cell, now plasmid positive, is called a transconjugant.

GMV2008

## Transformacija kompetentnih stanica ispranih s otopinom $\text{CaCl}_2$

**Log phase E. coli culture**

**Centrifuge**

**Resuspend bacterial pellet in  $\text{CaCl}_2$  solution**

**Chill on ice**

**Aliquot competent cells**

**Store at  $-80^\circ\text{C}$**

**amp<sup>r</sup> plasmid DNA**

**Chill on ice**

**90 seconds**

**42  $^\circ\text{C}$  H<sub>2</sub>O bath**

**Heat shock**

**Plate on LB + ampicillin**

**$10^8$ - $10^9$  amp<sup>r</sup> colonies /  $\mu\text{g}$  DNA**

GMV2008

## Transformacija bakterija elektroporacijom

**Log phase E. coli culture**

**Centrifuge**

**Resuspend bacterial pellet in sterile H<sub>2</sub>O**

**Chill on ice**

**Resuspend bacterial pellet in sterile H<sub>2</sub>O**

**Use competent cells immediately**

**amp<sup>r</sup> plasmid DNA**

**Electroporation**

**Electroporator**

**Plate on LB + ampicillin**

**LB broth**

**$10^8$ - $10^9$  amp<sup>r</sup> colonies /  $\mu\text{g}$  DNA**

GMV2008

## Učinkovitost transformacije

- Broj transformiranih stanica (transformanata) po 1  $\mu\text{g}$  plazmidne DNA
- Različite metode transformacije imaju različitu učinkovitost transformacije:
  - Metoda s kalcijem-kloridom:
    - $10^6$ - $10^8$  transformanata/ $\mu\text{g}$  plazmidne DNA
  - Elektroporacija (bakterije):
    - $10^9$ - $10^{10}$  transformanata/ $\mu\text{g}$  plazmidne DNA

GMV2008

## Zadatak

Za transformaciju bakterija u 250  $\mu\text{l}$  otopine  $\text{CaCl}_2$  koristili ste 2  $\mu\text{l}$  plazmidne DNA koncentracije 0.03  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Nakon toplinskog šoka dodali ste još 150  $\mu\text{l}$  LB medija i uzgajali 1 h na  $37^\circ\text{C}$ . Na Petrijevu ploču nanijeli ste 100  $\mu\text{l}$  transformacijske smjese. Na ploči je izraslo 100 kolonija. Izračunajte učinkovitost transformacije!

**Rješenje:**

Ukupna količina DNA za transformaciju:  $2 \mu\text{l} \times 0.03 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 0.06 \mu\text{g}$  (A)

Frakcija transformacijske smjese na ploči:  $100 \mu\text{l}/502 \mu\text{l} = 0.1992$  (B)

Količina DNA po ploči:  $A \times B = 0.012 \mu\text{g}$  (C)

Učinkovitost transformacije: broj kolonija/C =  $8333/\mu\text{g}$  DNA- $8 \times 10^7/\mu\text{g}$  DNA

GMV2008

## Metode unosa DNA u stanicu domaćina

- **Mikroinjektiranje** - unos DNA fizičkim putem u biljne i životinjske stanice
- **Biolistika** - unos DNA u biljne stanice putem mikroprojektila
- **Elektroporacija** - unos DNA pod utjecajem jakog električnog pulsa
  - prolazna reorganizacija membrane omogućava ulazak DNA (proteina, boja..)
  - bakterije, kvasci, životinjske i biljne stanice
  - biljne stanice - elektroporacija **protoplasta** (stanična stijenka se odstranjuje enzimskim putem)

GMV2008

## Mikroinjektiranje

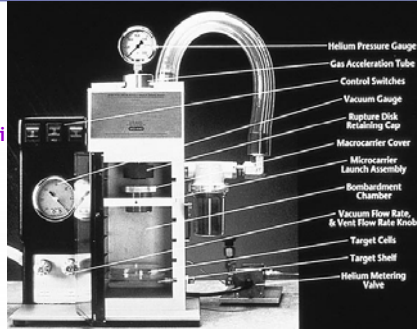
- DNA se ubacuje u jezgru oplođene jajne stanice i tako uvodi u budući organizam
- ubačena DNA se ugrađuje u kromosome, jajna stanica se implantira, a novonastala životinja nosi željene karakteristike
- biljne stanice - mikroinjektiranje u protoplaste



GMV2008

## Biolistika

- mikroskopske zlatne čestice obavijaju se s DNA - mikroprojektili
- mikroprojektili se upucavaju u biljne stanice velikim brzinama



## Unos strane DNA u biljke

- Infekcija bakterijom *A. tumefaciens*
- Elektroporacija protoplasta
- Biolistika ("genski pištolj")

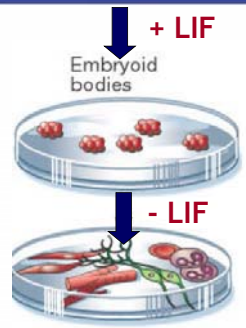




GMV2008

## Održavanje EMS u kulturi

- U kulturi se EMS održavaju u nediferenciranom stanju na sloju stanica hranilica (*feeder layer*) uz dodatak faktora inhibitora leukemije (*leukemia inhibitory factor*, LIF)
- Održavanje u kulturi u dugim vremenskim periodima
- Neograničena količina stanica
- Ne pokazuju znakove starenja ili scenescencije
- EMS spontano diferenciraju u različite stanične tipove u odsutnosti LIF



## Načini uvođenja transgena

- Izravna transfekcija ili retrovirusna transfekcija embrionalnih matičnih stanica i njihovo uvođenje u blastocistu
- Retroviralna infekcija ranih embrija
- Izravno mikroinjektiranje DNA u oocyte
- Prijenos putem spermija
- Elektroporacija
- Biolistika ili elektrofuzija

GMV2008

## Mikroinjektiranje

- Otopina DNA se injektira u rani embrij ili u gamete
- Miš - injektiranje u muški pronukleus nakon oplodnje, ali prije fuzije



GMV2008

## Elektroporacija

- Namakanje stanica u mediju koji sadrži otopinu DNA
- Izlaganje stanica električnom šoku
- Stvaranje sitnih lezija u staničnoj membrani omogućava ulazak DNA






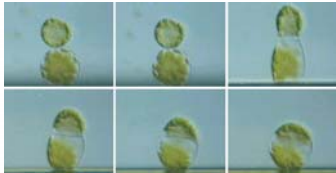
Električni puls (240V, 500μF)

GMV2008

## Elektrofuzija

Električni puls
Heterokarion
Fuzijski produkt



- Spajanje dviju stanica pod utjecajem električnog pulsa
- Jedna stanica služi za prijenos transgena u drugu
- Fuzija stanica kvasca i stanica sisavaca - kromosomi kvasca se gube
- Kvasac - za prijenos velikih odsječaka DNA na YAC-u

GMV2008

## Metode unosa terapeutskih konstrukata DNA

- **Unos gole DNA**
  - Jednostavnom iglom i špricom - tumorsko tkivo
  - Genskim pištoljem - epiderma, neprikladno za tumore
  - Unos liposomima - dopremanje do ciljnog tkiva intravaskularnim, intratrahealnim, intraperitonealnim, intrakolonoskim putem
- **Unos putem bioloških vektora**
  - Genetički modificirani virusi - ne mogu se replicirati u domaćinu
  - Trenutno najučinkovitija metoda prijenosa DNA u genskoj terapiji

GMV2008

## Unos gole DNA

- Intramuskularno, intravaskularno
- produžena *in vivo* ekspresija niskog stupnja
- Jednostavno i jeftino, ali ne i univerzalno
- DNA vakcine
  - Infektivne bolesti - tradicionalne vakcine još uvijek učinkovitije
  - Rak
    - Povećanje postojećeg imuno-odgovora
    - Poticaj imuno odgovora prema neprepoznom ili slabo antigenom tumoru
- Mišićna distrofija - biolistika
- Cistična fibroza - liposomi

GMV2008

## Biolistika - primjenjiva i na stanicama sisavaca





- Genski pištolj - plazmidna DNA se taloži na čestice zlata ili volframa promjera 1-3 μm
- Okidanje - pod tlakom helija ili pod visokim naponom

- Snimka pod svjetlosnim elektronskim mikroskopom:
- Čestice zlata obavijene s DNA nakon upucavanja u kožu

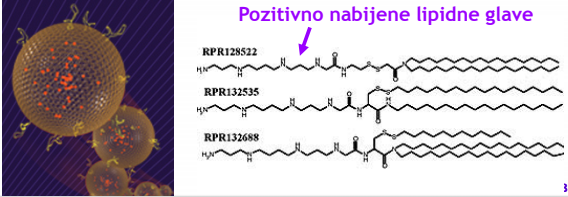


## Liposomi

- Nastaju spontanom agregacijom lipidnih molekula u vodenom okružju
- Kationski liposomi vežu negativno nabijenu DNA
- Tako omotana DNA zaštićena je od razgradnje
- Lipofektin, lipofektamin - služe i za transfekciju stanica u kulturi

Pozitivno nabijene lipidne glave



8