

# OBSAH

ÚVOD . . . . .	9
<b>1. LABORATOŘE BUNĚČNÝCH KULTUR A JEJICH VYBAVENÍ. . . . .</b>	<b>11</b>
1.1. Laminární box . . . . .	11
1.2. Inkubátor . . . . .	12
1.3. Inverzní mikroskop a další vybavení. . . . .	14
1.4. Vybavení ke sterilizaci roztoků . . . . .	14
1.4.1. Sterilizace roztoků filtrací . . . . .	15
1.4.2. Postupy pro sterilizaci roztoků filtrací . . . . .	15
1.5. Kultivační nádoby . . . . .	16
1.5.1. Povrchy kultivačních nádob . . . . .	17
1.5.2. Konstrukce kultivačních nádob . . . . .	17
1.6. Feeder layer. . . . .	20
1.7. Scaffoldy . . . . .	21
<b>2. TYPY BUNĚČNÝCH KULTUR . . . . .</b>	<b>23</b>
2.1. Morfologie kultur . . . . .	23
2.2. Způsob růstu kultur . . . . .	25
2.3. Typy kultur dle fenotypových vlastností. . . . .	26
2.3.1. Primární kultury . . . . .	26
2.3.2. Sekundární kultury . . . . .	27
<b>3. REPLIKATIVNÍ STÁRNUTÍ A BUNĚČNÉ LINIE . . . . .</b>	<b>29</b>
3.1. Replikativní stárnutí. . . . .	29
3.2. Buněčné linie. . . . .	30
3.2.1. Nestabilizované buněčné linie . . . . .	30
3.2.2. Imortalizované buněčné linie . . . . .	31
3.3. Imortalizace buněk . . . . .	31
3.3.1. Fyzikální a chemické způsoby imortalizace buněk . . . . .	32
3.3.2. Biologické způsoby imortalizace buněk . . . . .	33

<b>4. RŮSTOVÁ CHARAKTERISTIKA BUNĚČNÝCH KULTUR</b> . . . . .	35
4.1. Růstová křivka . . . . .	35
4.1.1. Fáze růstové křivky . . . . .	36
4.1.2. Sestrojení růstové křivky . . . . .	37
4.2. Přímo měřené parametry buněčných kultur . . . . .	38
4.2.1. Počítání buněk v Bürkerově komůrce. . . . .	38
4.2.2. Počítání buněk přístrojově . . . . .	39
4.3. Parametry kultur vypočítané dle koncentrace buněk . . . . .	40
4.4. Parametry kultur vypočítané dle adhezivity buněk . . . . .	41
4.5. Další parametry ke sledování kultur . . . . .	43
4.5.1. Měření permeability buněčných membrán a metabolismu buněk. . . . .	44
4.5.2. Měření činnosti mitochondrií . . . . .	45
4.5.3. Měření koncentrace proteinů a nukleových kyselin. . . . .	46
4.5.4. Měření buněčné migrace. . . . .	46
4.5.5. Detekce apoptózy . . . . .	48
<b>5. KULTIVAČNÍ MÉDIA</b> . . . . .	51
5.1. Složení médií . . . . .	51
5.1.1. Anorganické látky. . . . .	52
5.1.2. Anorganické pufry . . . . .	52
5.1.3. Další anorganické pufry . . . . .	54
5.1.4. Organické pufry. . . . .	55
5.1.5. Organické látky . . . . .	55
5.2. Sérové doplňky a jejich náhrady . . . . .	56
5.2.1. Výroba sérových doplňků . . . . .	58
5.2.2. Typy sérových doplňků. . . . .	59
5.2.3. Náhrady sérových doplňků . . . . .	60
5.3. Antibiotika a antimykotika . . . . .	60
5.4. Další doplňky médií . . . . .	62
5.5. Základní typy médií . . . . .	62
5.5.1. Klasická média . . . . .	62
5.5.2. Speciální média . . . . .	65
5.5.3. Další speciální média . . . . .	65
5.6. Příprava médií . . . . .	66
5.6.1. Příprava kompletních médií . . . . .	66
5.6.2. Příprava semisolidních a kondiciovaných médií . . . . .	67
5.7. Výměna médií . . . . .	67
<b>6. METODY A POSTUPY POUŽÍVANÉ PŘI KULTIVACI BUNĚK</b> . . . . .	69
6.1. Zakládání primárních kultur . . . . .	69
6.2. Mechanická a enzymatická dezintegrace tkání . . . . .	70



6.2.1. Postupy pro enzymatickou dezintegraci tkání . . . . .	71
6.2.2. Zpracování buněčného materiálu po dezintegraci . . . . .	72
6.3. Pasážování buněk a zakládání subkultur . . . . .	72
6.4. Použití selekčních kultivačních médií . . . . .	73
6.5. Centrifugace . . . . .	74
6.5.1. Centrifugace ve spojitém a nespojitém gradientu . . . . .	74
6.5.2. Další využití gradientové centrifugace . . . . .	75
6.6. Další způsoby izolace buněk . . . . .	75
6.7. Klonování buněk. . . . .	76
6.7.1. Klonování tečkováním a separačními kroužky . . . . .	77
6.7.2. Klonování limitním ředěním a na semisolidních médiích . . . . .	77
6.8. Adaptace buněk na odlišné prostředí . . . . .	78
6.8.1. Adaptace buněk na bezsérová média . . . . .	78
6.8.2. Adaptace buněk na odlišný způsob růstu . . . . .	79
6.9. Autentizace buněk a zkřížená kontaminace buněčných kultur . . . . .	79
6.9.1. Klasické metody autentizace buněk. . . . .	80
6.9.2. Genetické metody autentizace buněk. . . . .	81
<b>7. CHEMICKÁ A MIKROBIÁLNÍ KONTAMINACE BUNĚČNÝCH KULTUR . . . . .</b>	<b>83</b>
7.1. Chemická kontaminace kultur . . . . .	84
7.2. Mikrobiální kontaminace kultur . . . . .	84
7.2.1. Virová a mykotická kontaminace kultur . . . . .	85
7.2.2. Bakteriální kontaminace kultur . . . . .	85
7.2.3. Eradikace mikrobiální kontaminace . . . . .	87
<b>8. ZVYŠOVÁNÍ OBJEMU KULTIVOVANÝCH BUNĚK . . . . .</b>	<b>89</b>
8.1. Scale-up o malých objemech u adherentního způsobu kultivace . . . . .	89
8.2. Scale-up o malých objemech u suspenzního způsobu kultivace . . . . .	91
8.3. Scale-up o větších objemech a bioreaktory . . . . .	92
8.3.1. Míchací bioreaktory . . . . .	93
8.3.2. Perfuzní bioreaktory . . . . .	94
8.3.3. Pevné nosiče pro bioreaktory . . . . .	95
8.3.4. Kultivační objemy při biotechnologické výrobě . . . . .	97
<b>9. ZMRAZOVÁNÍ BUNĚK. . . . .</b>	<b>99</b>
9.1. Poškození buněk mrazem a kryoprotektivní látky . . . . .	99
9.1.1. Kryoprotektivní látky. . . . .	101
9.1.2. Příprava kryoprotektivních médií. . . . .	101
9.2. Průběh řízeného zmrazování a vitrifikace. . . . .	102
9.3. Rekonstituce buněk . . . . .	103

<b>10. PŘÍKLADY VYUŽITÍ BUNĚČNÝCH KULTUR . . . . .</b>	<b>105</b>
10.1. Kultivace virů . . . . .	105
10.1.1. Postup při kultivaci virů . . . . .	106
10.1.2. Cytopatický efekt . . . . .	106
10.2. Cytogenetika . . . . .	108
10.2.1. Postup kultivace při cytogenetickém vyšetření . . . . .	108
10.2.2. Barvení chromosomů. . . . .	109
10.3. Testování xenobiotik a sledování patogeneze chorob . . . . .	109
10.3.1. Výběr buněčného modelu . . . . .	110
10.3.2. Cíle testování . . . . .	110
10.3.3. Metody testování . . . . .	111
10.4. Biotechnologie. . . . .	112
10.4.1. Technologie rekombinantní . . . . .	113
10.4.2. Technologie buněčných hybridomů. . . . .	114
10.5. Další využití kultur . . . . .	115
<b>PŘÍLOHY . . . . .</b>	<b>117</b>
<b>LITERATURA . . . . .</b>	<b>140</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK . . . . .</b>	<b>142</b>
<b>REJSTRÍK. . . . .</b>	<b>145</b>