

OBSAH

ÚVOD	9
1. LABORATOŘE BUNĚČNÝCH KULTUR A JEJICH VYBAVENÍ.	11
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
2. TYPY BUNĚČNÝCH KULTUR	23
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
3. REPLIKATIVNÍ STÁRNUTÍ A BUNĚČNÉ LINIE.	29
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

4. RŮSTOVÁ CHARAKTERISTIKA BUNĚČNÝCH KULTUR	35
4.1. Růstová křivka	35
4.1.1. Fáze růstové křivky	36
4.1.2. Sestrojení růstové křivky	37
4.2. Přímé 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
5. KULTIVAČNÍ MÉDIA	51
5.1. Složení médií	51
5.1.1. Anorganické látky.	52
5.1.2. Anorganické pufrы	52
5.1.3. Další anorganické pufrы	54
5.1.4. Organické pufrы.	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
6. METODY A POSTUPY POUŽÍVANÉ PŘI KULTIVACI BUNĚK	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
7. CHEMICKÁ A MIKROBIÁLNÍ KONTAMINACE BUNĚČNÝCH KULTUR	83
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
8. ZVYŠOVÁNÍ OBJEMU KULTIVOVANÝCH BUNĚK	89
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
9. ZMRAZOVÁNÍ BUNĚK.	99
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

10. PŘÍKLADY VYUŽITÍ BUNĚČNÝCH KULTUR.	105
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
PŘÍLOHY	117
LITERATURA	140
SEZNAM ZKRATEK	142
REJSTŘÍK.	145