



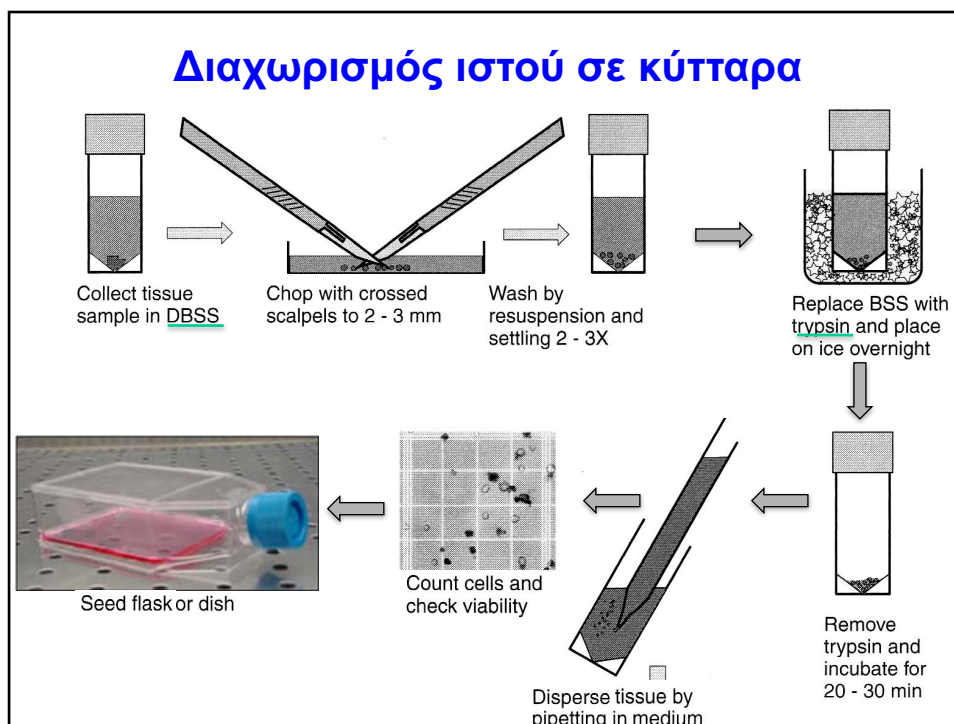
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



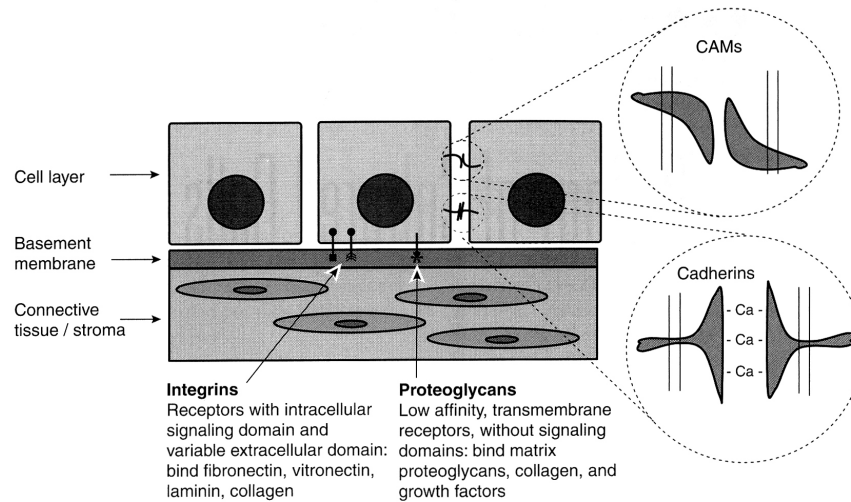
## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

### ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Νικόλαος Μπαλατσός



## Κυτταρική επικόλληση



*Fig. 3.1. Cell Adhesion.* Diagrammatic representation of a layer of epithelial cells above connective tissue containing fibrocytes and separated from it by a basal lamina. CAMs and cadherins are depicted between like cells, integrins and proteoglycans between the epithelial layer and the matrix of the basal lamina.

## Συγκράτηση κυττάρων σε καλλιέργεια

Τα κύτταρα σε μονόστιβες καλλιέργειες συγκρατώνται μεταξύ τους και με το υπόστρωμα (substratum) με μυκοπρωτεΐνες και με κολλαγόνο (μερικές φορές). Συχνά απαιτείται και η παρουσία δισθενών ιόντων ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ )

Φυσιολογικά κύτταρα σε μονόστιβη καλλιέργεια



## Τεχνικές διαχωρισμού κυττάρων (I)

Ο διαχωρισμός των κυττάρων από ιστό ή από μονόστιβη καλλιέργεια γίνεται με διαλύματα πρωτεασών:

- Θρυψίνη  
είτε καθαρή, είτε μίγμα με χυμοθρυψίνη και ελαστάση
- Προνάση  
κυρίως σε πρωτογενείς καλλιέργειες
- Κολλαγενάση  
κυρίως σε καλλιέργειες κλώνων
- Δισπάση  
Ουδέτερη πρωτεάση από *Bacillus polymyxa*.  
Χρήση κυρίως για διάσπαση ιστών. Απαιτεί παρουσία  $Ca^{2+}$ .
- EDTA.

ή...

## Τεχνικές διαχωρισμού κυττάρων (II)

...ή με μηχανικά μέσα

όταν η χρήση θρυψίνης δεν είναι επιθυμητή λόγω:

- α. Μελέτες στην κυτταρική μεμβράνη,  
λόγω απώλειας μεμβρανικών πρωτεϊνών  
(γλυκοπρωτεϊνών και αντιγόνων)
- β. Κινητικές δράσης φαρμάκων, ραδιοιχνηθετών, ορμονών, κ.λπ



## Βάση διαλυμάτων

- Ισότονο διάλυμα ανοργάνων αλάτων,
- υδατάνθρακας (πηγή άνθρακα),
- δείκτης (συνήθως ερυθρό της φαινόλης)

## Φυσικοχημικές ιδιότητες

- pH
- CO<sub>2</sub> και όξινο ανθρακικό Na
- Ρυθμιστική ικανότητα
- Οξυγόνο
- Ισοτονικότητα / Οσμωμοριακότητα
- Θερμοκρασία
- Ιξώδες
- Επιφανειακή τάση, άφριση

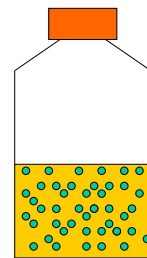
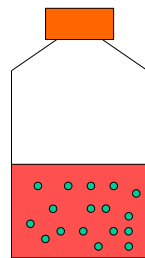
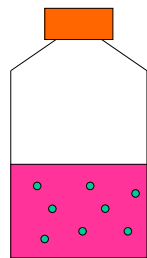
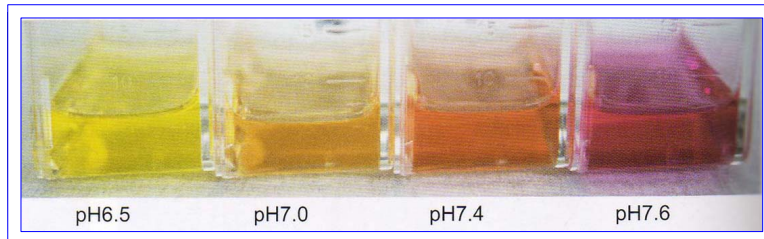


## pH

- pH 7.4
- Ινοβλάστες pH 7.4 - 7.7
- Μετασχηματισμένα pH 7.0 - 7.4
- Επιδερμικά pH 5.5

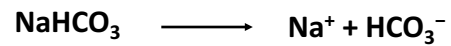
## Δείκτης

*Ερυθρό της φαινόλης*



## Ρυθμιστικό σύστημα pH

Κυρίως το σύστημα  $\text{H}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$  (pKa 6.3/37°C)



Εναλλακτικά:

- ⊗ Tris (Tris-hydroxymethyl aminomethane)
- ⊗  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  -  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- ⊗ HEPES (4,2-hydroxymethyl-1-piperazine ethanesulfonic acid)

**TABLE 9.1.** Relationship Between Bicarbonate, Carbon Dioxide, and HEPES

Compound	Eagle's MEM Hanks's salts	Low $\text{HCO}_3^-$ + buffer	Eagle's MEM Earle's salts	DMEM
$\text{NaHCO}_3$	4 mM	10 mM	26 mM	44 mM
$\text{CO}_2$	Atmospheric and evolved from culture	2%	5%	10%
HEPES* (if required)	10 mM	20 mM	50 mM	—

\*If HEPES is used, the equivalent molarity of NaCl must be omitted and osmolality must be checked.

## Ισοτονικότητα

Ωσμωτική συγκέντρωση υλικών για εξασφάλιση ισοτονικότητας και ρύθμισης μεταβολισμού κυττάρων

Ωσμωτική συγκέντρωση (osmolality),

σε 1000g διαλύτη, mOsm/kg H<sub>2</sub>O

Ωσμωτικότητα (osmolarity),

σε 1000ml διαλύματος, mOsm/l

mOmol: 6,023x10<sup>23</sup> ωσμωτικά ενεργά σωματίδια σε υδατικό δ/μα  
1mOsm/kg ελαττώνει το σημείο πήξεως κατά  
0,001858°C.  
Στους 38°C ισοδυναμεί με 19mmHg

## Ισοτονικότητα βασικών υλικών καλλιιεργειών

Πίνακας 5. Ωσμωτική συγκέντρωση\* των βασικών υλικών των κυτταροκαλλιιεργειών

Όνομασία υλικού (συντετημένη)	Ωσμωτική συγκέντρωση (mOsm/Kg)**
EBSS	281-289
HBSS	285-286
EBME	276-298
HBME	287-290
EMEM	289-300
HMEM	292-297

\*Η ωσμωτική συγκέντρωση (osmolality) κατ' αναλογία με τη μοριακή συγκέντρωση (molality) αναφέρεται σε βάρος 1000g διαλύτη (mOsm/kg H<sub>2</sub>O). Η ωσμωτικότητα (osmolarity) κατ' αναλογία με τη μοριακότητα (molarity) αναφέρεται σε όγκο 1000ml διαλύματος (mOsm/l).

\*\*Osmole: η μάζα 6,023x10<sup>23</sup> σωματιδίων, ωσμωτικά δραστικών, σ' υδατικό διάλυμα. 1mOsm ανά kg νερού ελαττώνει το σημείο πήξεως κατά 0,001858 °C και στους 38 °C ισοδυναμεί με ωσμωτική πίεση 19mmHg.

## Υλικά κυτταροκαλλιεργειών

### Ρυθμιστικά διαλύματα Earle's, Hanks'

Σύνθετα διαλύματα.	Φυσιολογικό περιβάλλον, διατήρηση οσσιωδών μεταβολικών λειτουργιών
Βάση διαλυμάτων:	Ισότονο διάλυμα ανοργάνων αλάτων, υδατάνθρακας (πηγή άνθρακα), δείκτης (συνήθως ερυθρό της φαινόλης)
Ρυθμιστικό σύστημα pH:	Κυρίως το σύστημα $\text{H}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ (pKa 6.3/37°C) $\text{NaHCO}_3 \longrightarrow \text{Na}^{2+} + \text{HCO}_3$ $\text{HCO}_3 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 + \text{HO}^- \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 + \text{HO}^-$
Ισοτονικότητα:	Οσμωτική συγκέντρωση υλικών για εξασφάλιση ισοτονικότητας και ρύθμισης μεταβολισμού κυττάρων

## Τα ισορροπημένα διαλύματα αλάτων (Balanced Salt Solutions, BSS) των Earle και Hanks

	To make 10 litres	
	Earle's	Hanks'
NaCl	680 g	800 g
KCl	40 g	40 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	20 g	20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-	9 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	6 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	14 g	-
CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O *	39.3 g	27.6 g
Phenol red (1%) — Table 7	150 ml	150 ml
Distilled water to	10 l	10 l

In some cases in Hanks' BSS half the MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O is replaced by MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O.

\* This is best dissolved separately and added last with stirring.

Add 10 ml chloroform and store at 4°C in polythene containers.

CMF (calcium- and magnesium-free BSS) is Earle's BSS made up without the calcium and magnesium.

BSS may be required as a saline solution, for example for washing tissue minces in which case 50 ml of the 10× concentrate is diluted with 450 ml distilled water. However, if the BSS is to be used as a basis for a cell culture medium (when further ingredients will be added later) 50 ml of the 10× concentrate is diluted with 350 or 400 ml distilled water. The dilution should be in 500 ml bottles which should be autoclaved at 15 lb pressure for 20 min. BSS may be stored at room temperature.

Before use add bicarbonate (20 ml 5.6% for Earle's BSS and 3 ml 5.6% for Hanks' BSS) or Hepes buffer (5 ml 1 M) to adjust the pH to 7.4; and glucose or other ingredients as desired.

**Πίνακας 3.** Σύνθεση ρυθμιστικών διαλυμάτων Earle's και Hanks'

Συστατικά*	Συγκέντρωση στο διάλυμα (g/l)	
	Earle's BSS	Hanks' BSS
NaCl	6.80	8.00
KCl	0.40	0.40
CaCl <sub>2</sub>	0.20	0.14
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.20	0.20
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	—	0.12
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.125	—
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	—	0.06
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	<b>2.20</b>	<b>0.35</b>
Γλυκόζη	1.00	1.00
Ερυθρό φαινόλης (διάλυμα 1%)**	1.60ml	1.60ml

\*Διαλύονται σε H<sub>2</sub>O (≈800 ml) με συνεχή ανάδευση και συμπλήρωση στο l.

\*\*Το διάλυμα του ερυθρού της φαινόλης παρασκευάζεται χωριστά: 10g της ουσίας (phenol red, alcohol soluble) διαλύονται σε 20ml NaOH, 1N. Το διάλυμα μεταφέρεται, και στην αδιάλυτη χρωστική που έχει παραμείνει, προστίθενται ακόμη 10ml NaOH, 1N που μετά την πλήρη διάλυση της χρωστικής μεταφέρονται στα προηγούμενα 20ml. Συμπληρώνεται στο l με νερό και διαμοιράζεται σε μικρές ποσότητες. Διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, σε μέρος σκοτεινό (και πέραν του έτους). Προστίθεται σε όλα σχεδόν τα ρυθμιστικά διαλύματα και υλικά σαν δείκτης pH γιατί οι εναλλαγές του χρώματος, ενδεικτικές της μεταβολικής κατάστασης των κυττάρων γίνονται αμέσως αντιληπτές.

## Σύνθετα υλικά, BME, MEM, M<sub>199</sub>

Είναι τα διαλύματα των Earle ή Hanks εμπλουτισμένα  
σε αμινοξέα, βιταμίνες και άλλα προϊόντα (ορός, αλβουμίνη, κ.α)

**Πίνακας 6.** Ενισχυμένα υλικά που πληρούν ειδικές απαιτήσεις των κυττάρων

Ονομασία υλικού	Πρόσθετα συστατικά	Κύτταρα για τα οποία συνιστάται
NCTC (109, 135)	διφωσφορικές και τριφωσφορικές πυριμιδίνες, νουκλεοτίδια, tween 80 κ.ά.	πολλές συνεχείς σειρές
RPMI (1603, 1634, 1640)	αυξημένα αμινοξέα και βιταμίνες	λευχαιμικά ανθρώπου και ποντικού
McCoy's medium	αυξημένα αμινοξέα και βιταμίνες	καρκινικά
Ham's (10, 12)	άλατα του Zn, Cu, Fe	ηπατικά
Trowell's medium	ινσουλίνη	καλλιέργειες τεμαχίων ιστού
Rappaport's basic medium	πλούσιο υλικό χωρίς ορό	HeLa
Leibovitz's medium	γαλακτόζη	διάφορα
Lactalbumin medium	λακταλβουμίνη	νεφρών πιθήκου
Fisher's medium	αλλαγές στα αμινοξέα	λευχαιμικά ποντικού
MEM-D-VAL	D-βαλίνη	επιθηλιακά (εκλεκτική αναστολή πολλαπλασιασμού ινοβλαστών)
ATCC-CRCM-30	συστατικά νουκλεϊνικών οξέων (αντικαθιστά την ανάγκη για CO <sub>2</sub> )	πολλές σειρές συνεχούς καλλιέργειας

Πίνακας 4. Τα βασικά υλικά των ιστοκαλλιιεργειών

Όνομασία υλικού	Καθιερωμένη σύντηψη	Βασική σύσταση*
1. Balanced Salt Solution Earle's (Earle, 1943) <sup>34</sup>	Earle's BSS ή EBSS**	Ισότονα ρυθμιστικά διαλύματα ανοργάνων αλάτων (K, Na, Ca, Mg)
2. Balanced Salt Solution Hanks <sup>7</sup> (Hanks & Wallace, 1949) <sup>35</sup>	Hanks' BSS ή HBSS	εμπλουτισμένα με γλυκόζη ή δεξτρόζη.
3. Synthetic Mixture No 199 (Morgan et al, 1950) <sup>38</sup>	Medium 199 ή M <sub>199</sub>	Σύνθετο διάλυμα με βάση το διάλυμα Earle's ή Hanks', εμπλουτισμένο με αμινοξέα, βιταμίνες, μεταβολίτες, αυξητικούς παράγοντες κλπ.
4. Basal Medium Eagle (Eagle, 1955) <sup>36</sup>	BME (EBME&HBME)	Σύνθετα διαλύματα με βάση διάλυμα Earle's ή Hanks', εμπλουτισμένο με αμινοξέα, βιταμίνες και άλλα βιολογικά προϊόντα στην
5. Minimum Essential Medium (Eagle, 1959) <sup>37</sup>	MEM (EMEM&HMEM)	αρίστη ποσότητα (MEM) ή την ελαχίστη (BME).

### Σύσταση και τροποποιήσεις υλικών του Eagle

TABLE 12  
Eagle's media formulations (amino acid and vitamin components)

	BME	MEM	Glasgow MEM	Dulbecco's MEM
<i>Amino acids (mg/l)</i>				
→ L-Arginine-HCl		126.0	42.0	84.0
→ L-Arginine	17.4			
→ L-Cystine	12.0	24.0	24.0	48.0
→ L-Glutamine	292.0	292.0	292.0	584.0
→ L-Glycine				30.0
→ L-Histidine HCl·H <sub>2</sub> O		42.0	21.0	42.0
→ L-Histidine	8.0			
→ L-Isoleucine	26.0	52.0	52.4	105.0
→ L-Leucine	26.0	52.0	52.4	105.0
→ L-Lysine-HCl		72.5	73.1	146.0
→ L-Lysine	29.2			
→ L-Methionine	7.5	15.0	15.0	30.0
→ L-Phenylalanine	16.5	33.0	33.0	66.0
→ L-Serine				42.0
→ L-Threonine	24.0	48.0	47.6	95.0
→ L-Tryptophan	4.0	10.0	8.0	16.0
→ L-Tyrosine	18.0	36.0	36.2	72.0
→ L-Valine	23.5	46.0	46.8	94.0
<i>Vitamins (mg/l)</i>				
Biotin	1.0			
D-Ca pantothenate	1.0	1.0	1.0	4.0
Choline chloride	1.0	1.0	1.0	4.0
Folic acid	1.0	1.0	1.0	4.0
<i>i</i> -Inositol	2.0	2.0	2.0	7.2
Nicotinamide	1.0	1.0	1.0	4.0
Pyridoxal-HCl	1.0	1.0	1.0	4.0
Riboflavin	0.1	0.1	0.1	0.4
Thiamin-HCl	1.0	1.0	1.0	4.0

The amino acids and vitamins are made up in either Earle's or Hanks' BSS. Dulbecco's modification is made up in Earle's BSS containing extra bicarbonate (3.7 g/l) and glucose (4.5 g/l) and supplemented with ferric nitrate (0.1 mg Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O/l).

The formulations are based on those originally prescribed by Eagle (1955a, 1959).

**Πίνακας 7. Τοξικότητα αντιβιοτικών σ' εναιώρημα L<sub>929</sub> κυττάρων <sup>42</sup>**

Αντιβιοτικό*	Φάσμα μικροοργανισμών που καλύπτει	Συγκέντρωση τοξική για το κύτταρο	Συγκέντρωση που χρησιμοποιείται στο υλικό
πενικιλίνη	Gram θετικοί	10.000	200 μονάδες/ml
στρεπτομυκίνη	Gram αρνητικοί	20.000	100 mg/ml
μυκοστατίνη (nystatin)	μύκητες	600	50 μονάδες/ml

## Ο ρόλος του ορού (serum), I

### Βασικό συστατικό των υλικών.

Ρόλος στη ρύθμιση λειτουργιών κυττάρου,  
εξουδετέρωση προσμίξεων υλικού

Κίνδυνος επιμόλυνσης από ορό.

Αποφυγή με αδρανοποίηση (45°C/30min ή 56°C/10min),  
όμως αδρανοποιούνται και αυξητικοί παράγοντες.

Οροί που χρησιμοποιούνται:

- ανθρώπινος (υγιείς αιμοδότες)
- προβάτου (υγιή νεαρά ζώα μέχρι 6 μηνών)
- αλόγου (νεαρά ζώα σε ελεγμένη δίαιτα)
- κότας (νεαρά υγιή κοτόπουλα)
- μοσχარიού (έμβρυα, Fetal Bovine Serum, FBS)  
νεογέννητα, Newborn Bovine Serum, NBS  
νεαρά ζώα μέχρι 8 μηνών, Donor Bovine Serum, DBS)

## Ο ρόλος του ορού, II

### Μειονεκτήματα:

1. Ελλιψη επαναληψιμότητας ποιότητας
2. Κίνδυνος επιμόλυνσης από ορό.  
Αποφυγή με αδρανοποίηση (45°C/30min ή 56°C/10min),  
όμως αδρανοποιούνται και αυξητικοί παράγοντες.

### Οροί που χρησιμοποιούνται:

- μοσχარიού (έμβρυα, Fetal Bovine Serum, FBS)  
νεογέννητα, Newborn Bovine Serum, NBS  
νεαρά ζώα μέχρι 8 μηνών, Donor Bovine Serum, DBS)
- προβάτου (υγιή νεαρά ζώα μέχρι 6 μηνών)
- αλόγου (νεαρά ζώα σε ελεγμένη διαίτα)
- κότας (νεαρά υγιή κοτόπουλα)
- ανθρώπινος (υγιείς αιμοδότες)

**Πίνακας 8.** Ποιοτικός έλεγχος υλικών κυτταροκαλλιιεργειών και ορών

Είδος ελέγχου	Ιδιότητα που ελέγχεται Υλικά	Οροί
I. Φυσικός	1. Ισοτονικότητα (Osmolality, 280-300mOsm/kg)	
II. Χημικός	2. Συγκέντρωση αλάτων (K, Na, Ca, Mg, P)	2. Υπολογισμός συνόλου πρωτεϊνών (Biuret method)
	3. Περιεκτικότητα σε γλυκόζη	3. Υπολογισμός συνόλου λιπών (Friedman gravimetric method)
	4. Προσδιορισμός αμινοξέων	4. Υπολογισμός αιμοσφαιρινών (κυανομεθαιμοσφαιρίνης)
	5. Έλεγχος βιταμινών (όχι πάντοτε)	5. Υπολογισμός αλβουμίνης και α,β,γ σφαιρινών (ηλεκτροφόρηση)
III. Βιολογικός	6. Ικανότητα εμφύτευσης κυττάρων	
	7. Ταχύτητα ανάπτυξης κυττάρων	
	8. Στεριρότητα (ανίχνευση μικροβίων, μυκήτων, μυκοπλασμάτων)*	

\*Στους ορούς ο έλεγχος επεκτείνεται σε βακτηριοφάγους (coliphage) και ιούς: σε ορούς από βοοειδή, στους ιούς bovine diarrhoea virus, infectious bovine rhinotracheitis virus, parainfluenza 3 virus, σε ορούς από άνθρωπο, στο αντιγόνο της ηπατίτιδας (hepatitis associated antigen).



### Ανακαλλιέργεια, subculture

The diagram illustrates the subculture process. On the left, two microscopy images show cell morphology at different stages, with a 20µm scale bar. An arrow labeled 'Χρόνος, ημέρες' (Time, days) points to the right. On the right, a series of four test tubes shows the progression of cells from a sparse suspension to a dense monolayer. The word 'CELLS' is written in pink above the tubes.

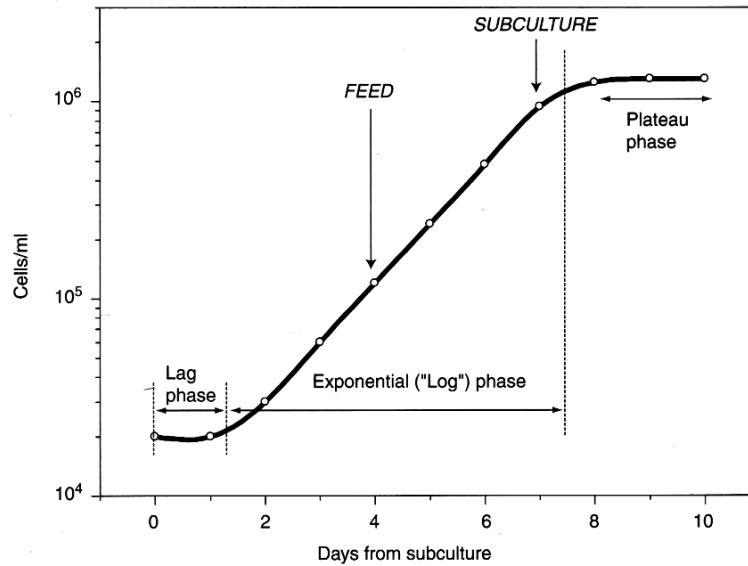
### Φάσεις ανάπτυξης

#### Κύτταρα NRK

Four microscopy images show the growth of NRK cells over time. The images are labeled with their respective time points and growth phases:

24h	48h	72h	168h
new monolayer	log phase	mid-log phase	late log phase

## Καμπύλη ανάπτυξης

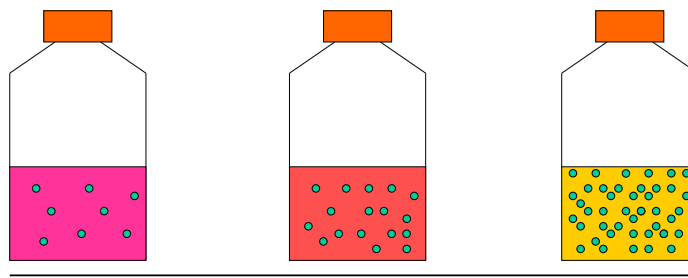


## Ανακαλλιέργεια (subculture)

Κύτταρα που αναπτύσσονται σε εναιώρημα (suspension)

Τα κύτταρα όταν πολλαπλασιασθούν αρκετά και ξεπεράσουν έναν αριθμό (κύτταρα/ml), ο οποίος μεταβάλλεται με τη σειρά, πρέπει να μοιραστούν σε περισσότερο χώρο.

Προσθήκη ερυθρού της φαινόλης, ως δείκτη.



Χρόνος, ημέρες

## Κριτήρια Ανακαλλιέργειας

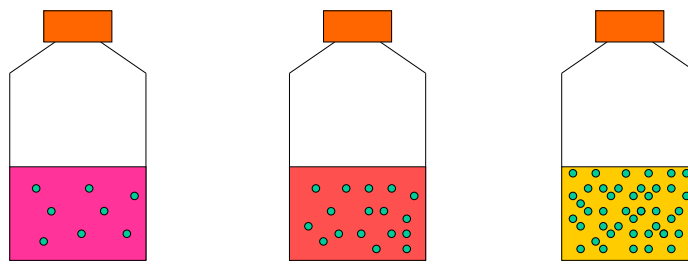
1. Πυκνότητα καλλιέργειας
2. Εξάντληση υλικού καλλιέργειας
3. Χρόνος από τελευταία ανακαλλιέργεια
4. Απαιτήσεις σε άλλες διεργασίες

## Ανακαλλιέργεια (subculture)

Κύτταρα που αναπτύσσονται σε εναιώρημα (suspension)

Τα κύτταρα όταν πολλαπλασιασθούν αρκετά και ξεπεράσουν έναν αριθμό (κύτταρα/ml), ο οποίος μεταβάλλεται με τη σειρά, πρέπει να μοιραστούν σε περισσότερο χώρο.

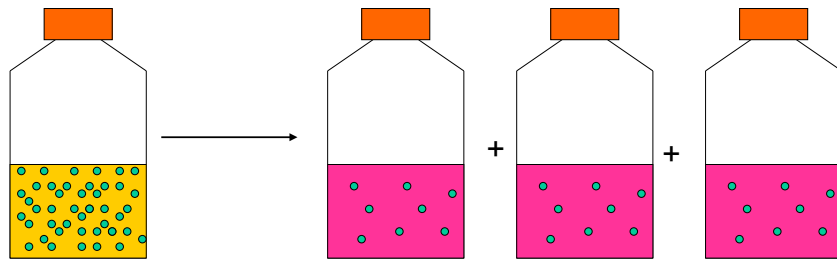
Προσθήκη ερυθρού της φαινόλης, ως δείκτη.



Χρόνος, ημέρες

## Ανακαλλιέργεια (subculture)

Κύτταρα που αναπτύσσονται  
σε εναιώρημα (suspension)

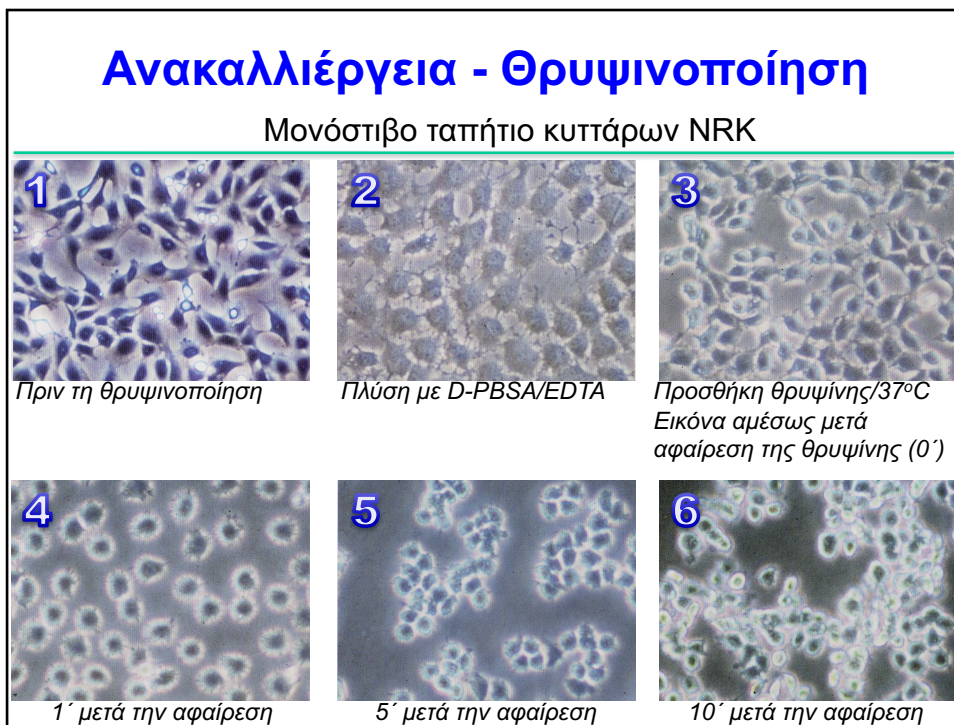
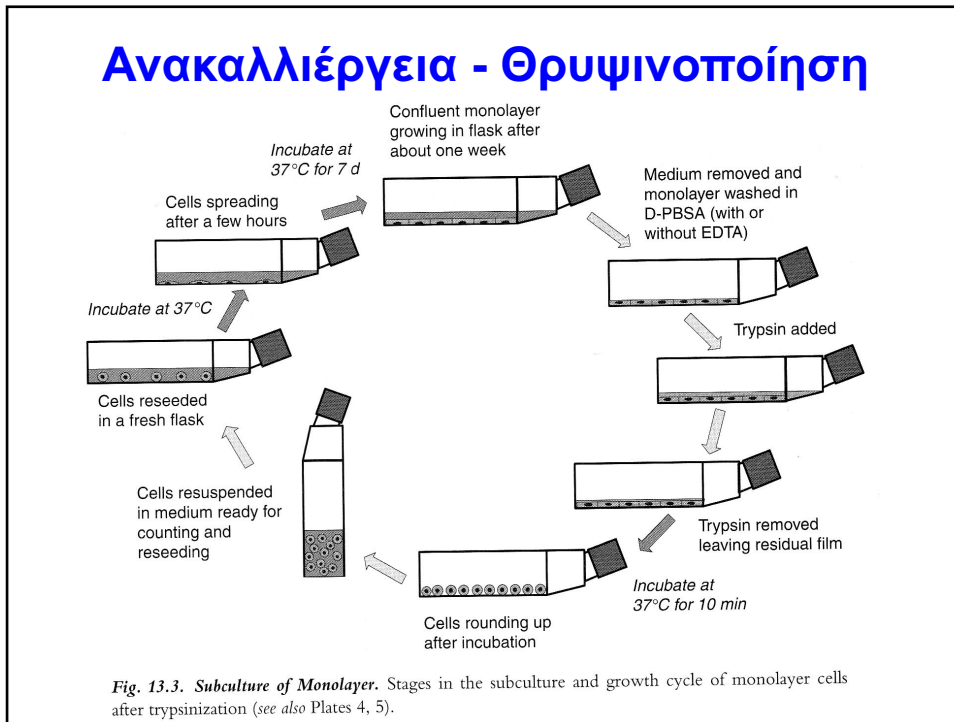


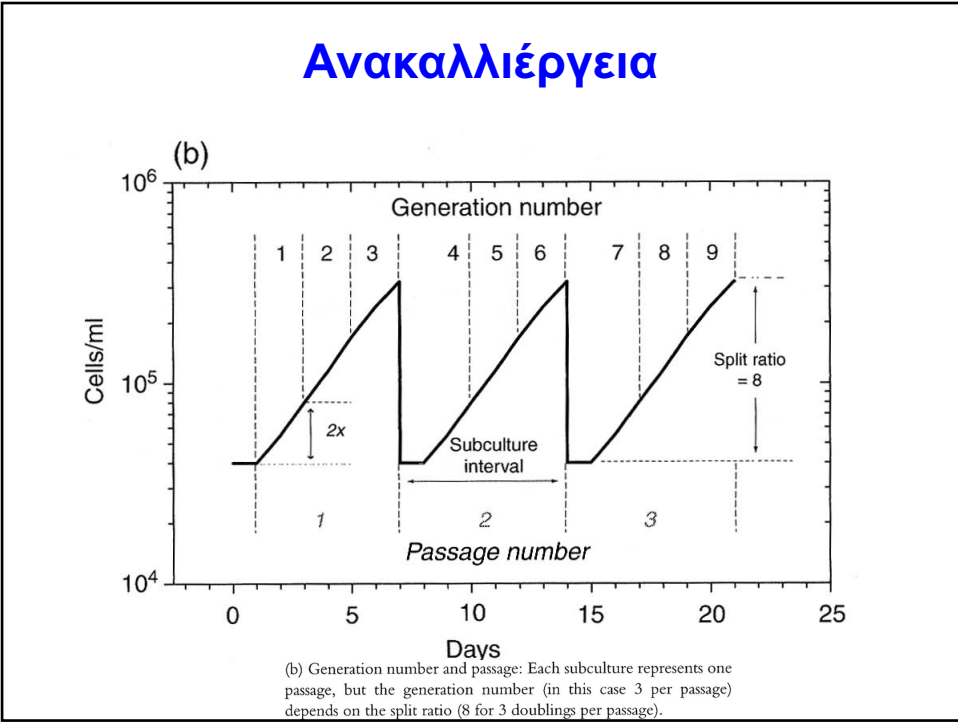
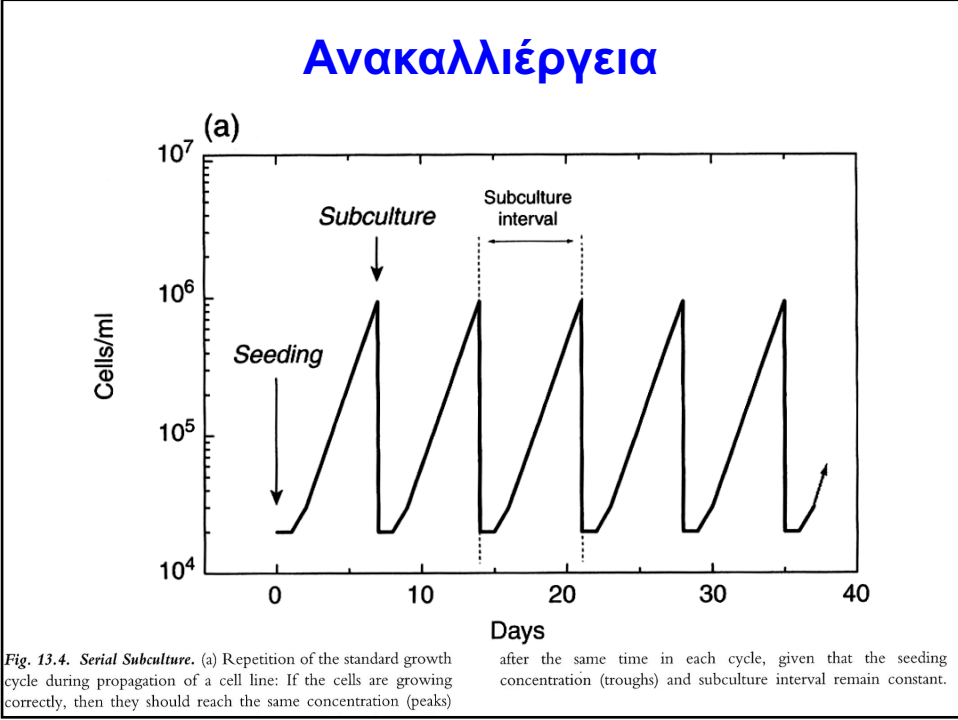
## Συγκράτηση κυττάρων σε καλλιέργεια

Τα κύτταρα σε μονόστιβες καλλιέργειες  
συγκρατώνται μεταξύ τους και με το υπόστρωμα (substratum)  
με μυκοπρωτεΐνες και με κολλαγόνο (μερικές φορές).  
Συχνά απαιτείται και η παρουσία δισθενών ιόντων ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ )

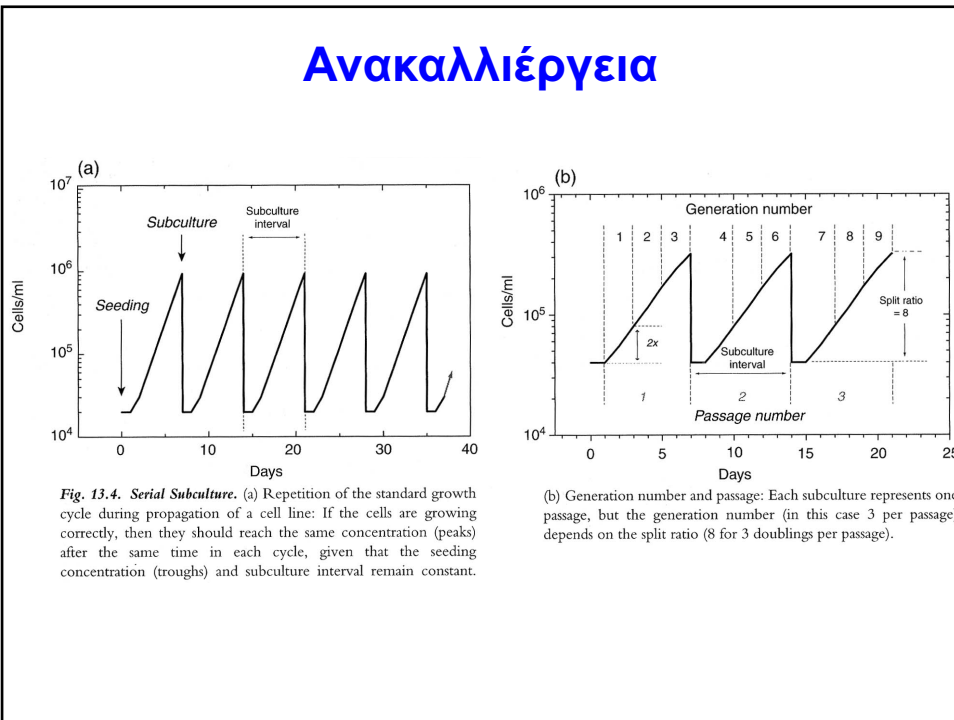
Φυσιολογικά κύτταρα σε μονόστιβη καλλιέργεια







## Ανακαλλιέργεια



## Συνεχής ανακαλλιέργεια (passage)

Ανακαλλιέργεια κυτταροκαλλιεργειών για απεριόριστο χρόνο

Οι καλλιέργειες αυτές είναι γνωστές και ως «**ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ**».

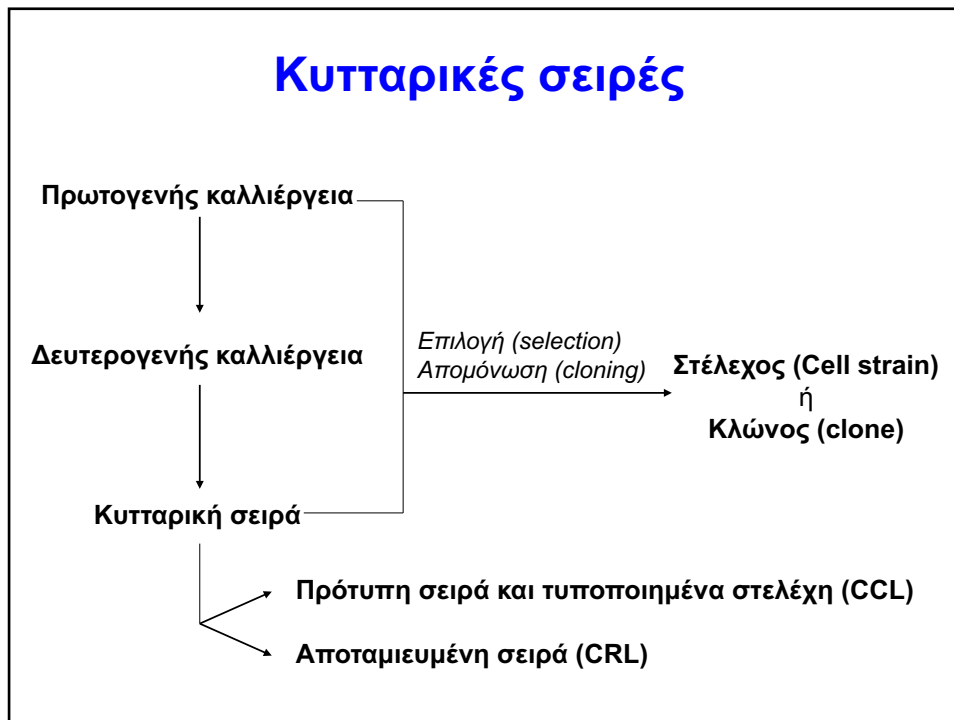
Οι σειρές εξασφαλίζουν σχετικά:

ομοιόμορφο κυτταρικό πλυθισμό  
επαναληπτικότητα βιολογικών πειραμάτων.

Δεν αντικαθιστούν τις πρωτογενείς καλλιέργειες

γιατί η απώλεια χρωμοσωμικού υλικού λόγω των συνεχών ανακαλλιεργειών οδηγεί σε εξαλλαγή (transformation) και αλλαγή συμπεριφοράς.

## Κυτταρικές σειρές



## Η Αμερικανική Εταιρεία Συλλογής και Τυποποίησης, American Type Culture Collection, ATCC

Η κύρια πηγή διάθεσης κυτταρικών σειρών.

Κριτήρια για να συμπεριληφθεί μια σειρά στην ATCC:

1. Τα κύτταρα να έχουν ένα χαρακτηριστικό που τα ξεχωρίζει από αυτά άλλων σειρών.
2. Η σειρά να έχει αναφερθεί και χρησιμοποιηθεί στη βιβλιογραφία.
3. Τα κύτταρα να έχουν κατάλληλη διάρκεια ζωής για διευκόλυνση των in vitro πειραμάτων.
4. Τα κύτταρα να μην μεταφέρουν μολυσματικούς παράγοντες.



**Πίνακας 3.** Στοιχεία που περιγράφουν μια κυτταρική σειρά (όπως έχουν θεσπισθεί και καθιερωθεί από την ATCC)

**Ιστορικό σειράς**

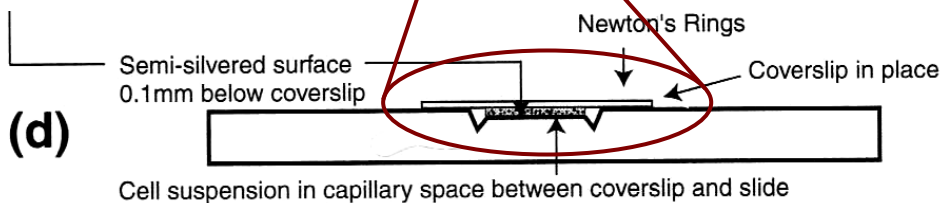
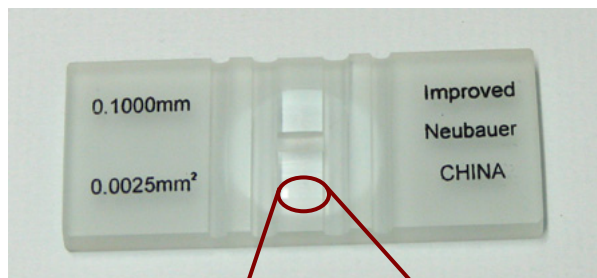
Ονομασία σειράς (καθιερωμένη συντετηγμένη ονομασία), προέλευση, σύντομη περιγραφή του αρχικού πρότυπου στελέχους και σχετική βιβλιογραφία.

**Περιγραφή των χαρακτηριστικών στοιχείων της πρότυπης σειράς**

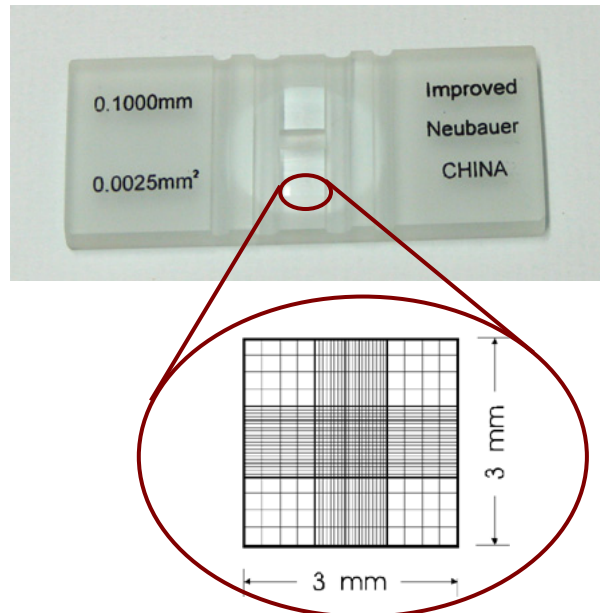
- Αριθμός ανακαλλιιεργειών από την απομόνωση των κυττάρων από τον ιστό (serial subcultures)
- Υλικό που χρησιμοποιείται κατά τη βαθμιαία ψύξη των κυττάρων (freeze medium)
- Ζωτικότητα κυττάρων\* και μέθοδος που χρησιμοποιείται στον υπολογισμό της (συνήθως η έκλυση χρωστικής - dye exclusion)
- Υλικό καλλιέργειας των κυττάρων (culture medium), που αναφέρεται στο υλικό ανάπτυξης των κυττάρων
- Χαρακτηριστικά ανάπτυξης των κυττάρων που αφορούν στην ταχύτητα ανάπτυξης, pH, ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub>, κλπ.
- Ικανότητα εμφύτευσης\*
- Μορφολογία\*
- Καρύοτυπος\*
- Έλεγχος στεριότητας για μυκοπλάσματα, μικρόβια και μύκητες
- Είδος ζώου (species) από το οποίο προέρχεται η σειρά και οι μέθοδοι με τις οποίες επιβεβαιώνεται η προέλευση της (mixed agglutination, hemmagglutination, immunofluorescence, cytotoxic antibodies, agar immunodiffusion)
- Ευαισθησία της σειράς σε ιούς
- Καρκινογόνος ικανότητα\*
- Εργαστήριο που παραχώρησε τη σειρά στην ATCC
- Εταιρεία από την οποία ελέγχεται και διατίθεται η σειρά.

\* (Πίνακας 2, σελ. 14, 15)

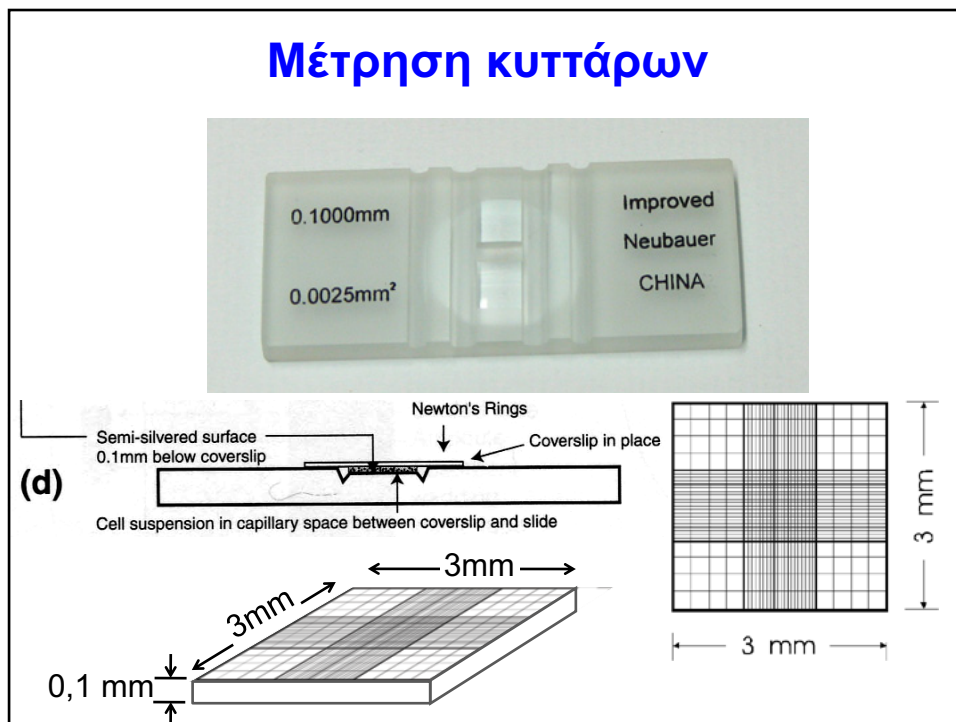
## Μέτρηση κυττάρων



## Μέτρηση κυττάρων



## Μέτρηση κυττάρων



## Μέτρηση κυττάρων

Αιμοκυττόμετρο, Πλακίδιο Neubauer

$V = 1\text{mm}^2 \times 0.1\text{mm} = 0.1\text{mm}^3 \Leftrightarrow$   
 $\Leftrightarrow V = 10^{-4}\text{cm}^3 \Leftrightarrow$   
 $\Leftrightarrow V = 10^{-4}\text{ml}$

Άρα,  $6 \text{ κύτταρα} \times 10^4 \text{ ml} =$   
 $= 6 \times 10^4 \text{ κύτταρα/ml}$

**FIGURE 2.1**  
 Standard hemocytometer chamber. The circle indicates the approximate area covered at 100x microscope magnification (10x ocular and 10x objective). Count cells on top and left touching middle line (open circle). Do not count cells touching middle line at bottom and right (closed circle). Count 4 corner squares and middle square in both chambers (one chamber represented here).

<http://www.dnatube.com/video/3902/Cell-Counting-Attached-cell>

## Μέτρηση κυττάρων

$$\text{Cell concentration (cells/ml)} = \frac{\text{total counts}}{4} \times \text{Dilution factor} \times 10^4$$