

Izolace buněk

První podmínkou pro založení tkáňové kultury je izolace buněk, které se budou pěstovat. Výchozím materiálem přitom bývá orgán sterilně odebraný z pokusného zvířete, vzácněji biotický vzorek či např. punktát kostní dřeně nebo vzorek periferní krve.

Je-li výchozím materiálem solidní orgán, jsou v zásadě dvě možnosti, jak z něj vytvořit buněčnou kulturu:

1. tkáň se rozřeže na malé částičky, které se ponoří do kultivačního média. Buňky pak z částiček vyrůstají a šíří se po povrchu kultivační nádoby
2. tkáň se rozvolní na jednotlivé buňky, ať už mechanicky homogenizátorem, nebo – šetrněji – např. enzymatickým natrávením (trypsinem, kolagenázou, pronázou, dispázou, elastázou apod.).

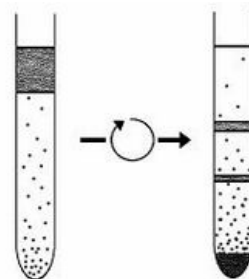
Oběma způsoby však vzniká směs mnoha buněčných typů, ze které je nutné žádanou subpopulaci izolovat. Buď lze využít různé odolnosti jednotlivých typů buněk vůči různým podmínkám, jejich náročnosti na složení kultivačního média, citlivosti vůči toxickým látkám apod., nebo lze buňky rozdělit podle jejich fyzikálních vlastností, nejčastěji podle **hustoty** nebo rychlosti **sedimentace**.

K izolaci buněk podle hustoty (**izopyknická sedimentace**) se používá **centrifugace** buněčné suspenze ve zkumavce naplněné médiem, které má v různých vzdálenostech ode dna různou hustotu – tzv. **dělení na gradientu hustoty**. Hustota gradientu se může měnit:

- buď plynule (**spojité gradienty**)
- skokem (**nespojité gradienty**).

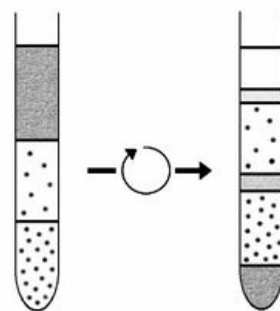
Tvorba spojitých gradientů

K vytvoření **spojitého gradientu** se dnes nejčastěji používá částice oxidu křemičitého potažených polyvinyl – pyrrolidonem (obchodní název **Percoll®**). Pokud se směs částic o různé velikosti centrifuguje při vysokých otáčkách, rozdělí se podle **density**. Médium u dna zkumavky má pak vyšší hustotu než médium u hladiny. Na povrch gradientu se nanese **buněčná suspenze** a celý sloupec se znovu centrifuguje, tentokrát při podstatně nižších otáčkách. Buňky klesnou až na úroveň, kde mají stejnou hustotu jako médium. Odebráním vhodné části sloupce lze izolovat jeden určitý buněčný typ. Jinou možností, jak připravit spojitý gradient, je postupné **míšení dvou roztoků**, jednoho s vyšší a druhého s nižší hustotou, přičemž poměr obou roztoků se plynule mění a výslednou směsí se plní **centrifugační zkumavka**.



Tvorba nespojitých gradientů

Technicky jednodušší je příprava **nespojitého gradientu**. V tomto případě se na sebe jednoduše navrství roztoky o různých hustotách. Další vrstvu opět tvoří buněčná suspenze. Po centrifugaci se buňky rozdělí mezi jednotlivá rozhraní roztoků tak, že každý buněčný typ zůstane mezi roztokem s vyšší a nižší hustotou, než je hustota buněk. K přípravě diskontinuálních gradientů se používá celá řada chemikálií. Nejčastěji jde o sacharidy, od snadno dostupné **sacharózy** až po polysacharidy (např. mnohočetně rozvětvený kopolymer sacharózy a epichlorhydrinu s přesně definovanou molekulární hmotností, obchodní název **Ficoll®**).



Odkazy

Zdroj

- VEJRAŽKA, Martin. *Základní techniky práce s tkáňovými kulturami* [přednáška k předmětu Biochemie, obor Všeobecné lékařství, 1. LF UK]. Praha. 2004.