

Cell Culture Basic

종합연구원 **R&D**지원실 비임상평가팀 정지은 박사

2020. 06. 20

Cell cycle

동영상

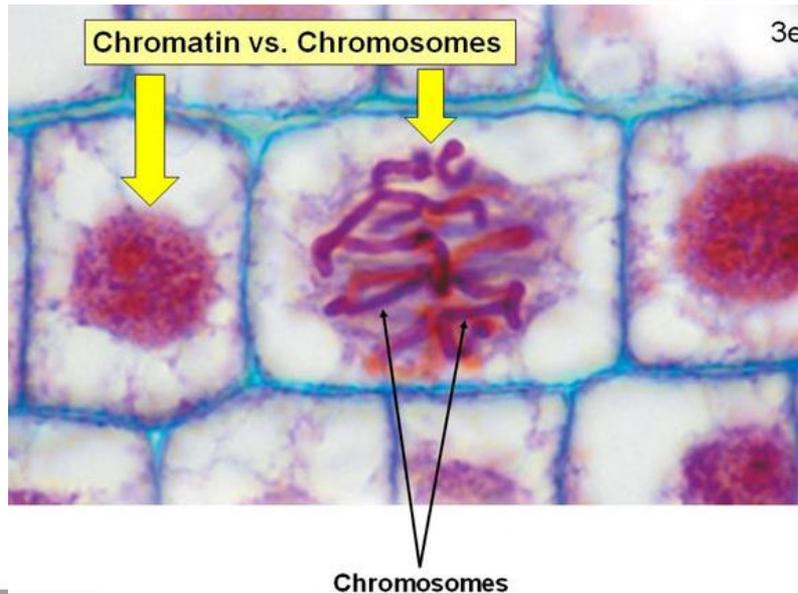
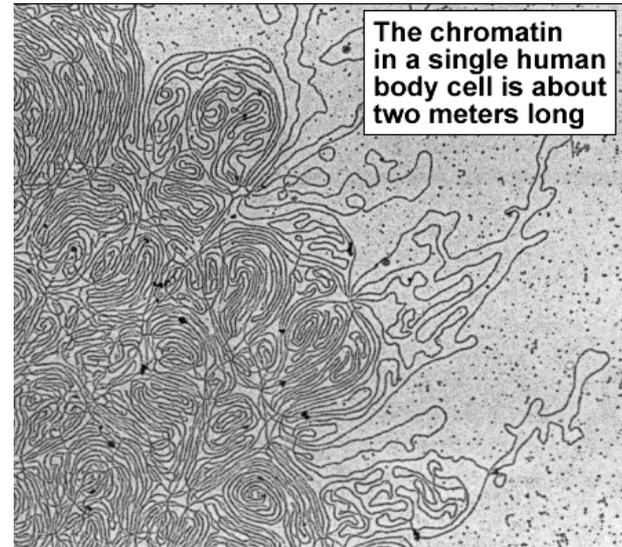
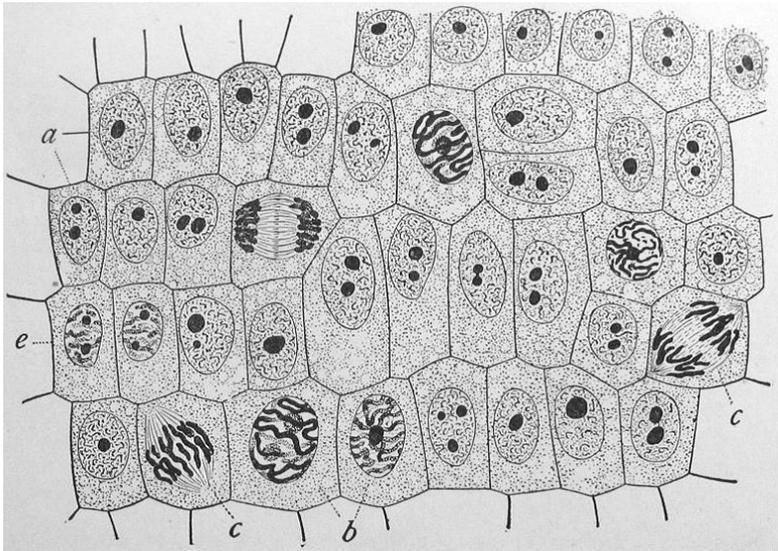
Cell cycle

Cancer therapy strategies

- **Cell cycle inhibition (mitogen inhibition)**
- Cancer cell targeting & killing (antibody & drug delivery)
- Genetic recovery (mutated gene restoring etc.)
- Blocking of angiogenesis (only solid tumor)
- Blocking of metastasis (invasion)
- Receptor regulation (specific cancer type)

* 각종 암 환자에서 cell cycle-related genes 유전자의 이상이 발견되면서, 암세포의 세포주기 진행을 억제 할 수 있다면, 암을 정복 할 수 있지 않을까? 로부터 연구가 더욱 활발해 지기 시작

Cell cycle



Cell cycle

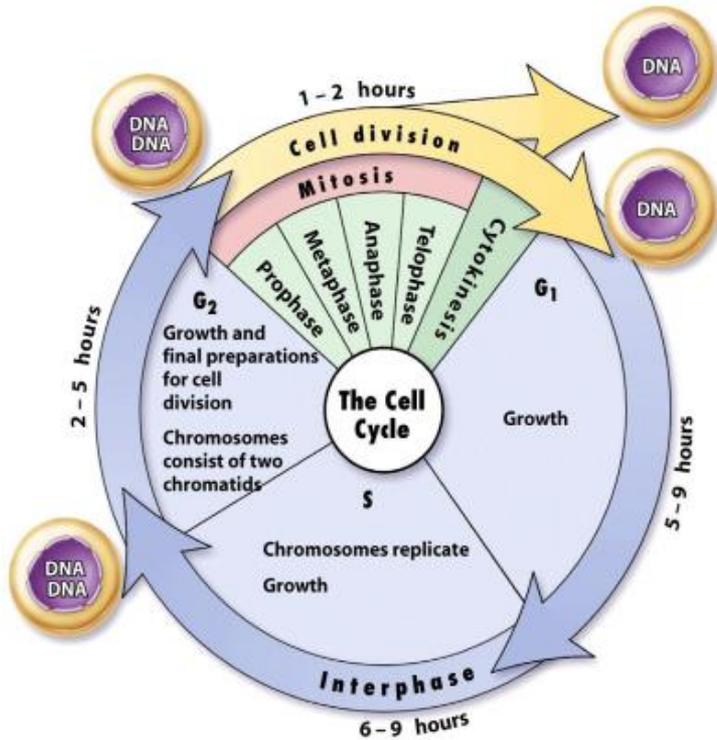
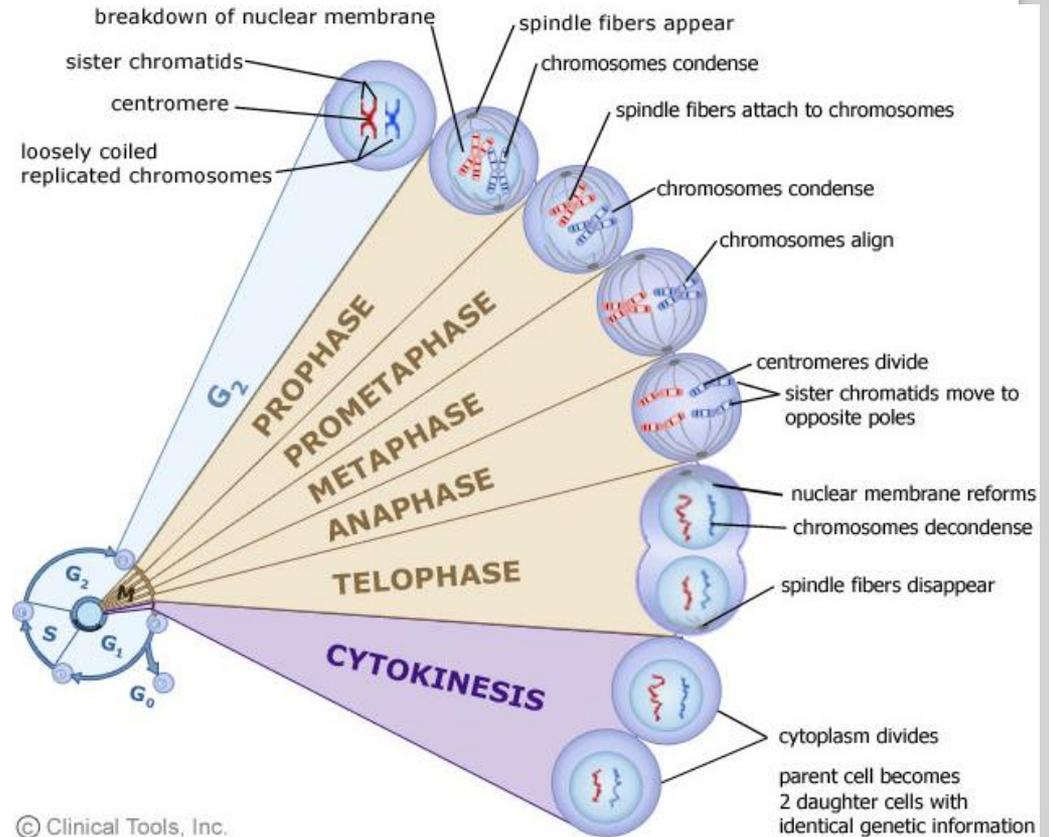


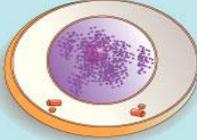
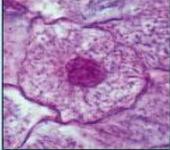
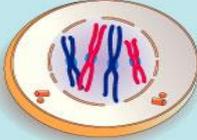
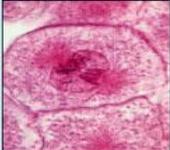
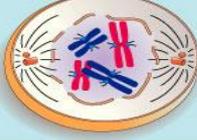
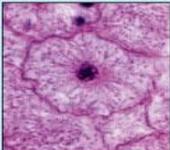
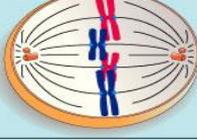
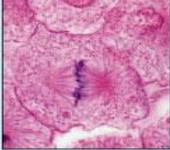
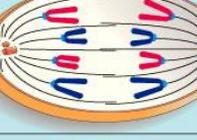
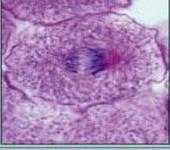
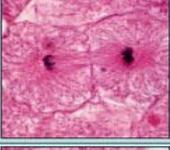
Figure 19-2 Biology of Humans, 2/e
© 2007 Pearson Prentice Hall, Inc.



© Clinical Tools, Inc.

Cyclins & Cyclin dependent Kinases (CDKs) are systemically regulated.

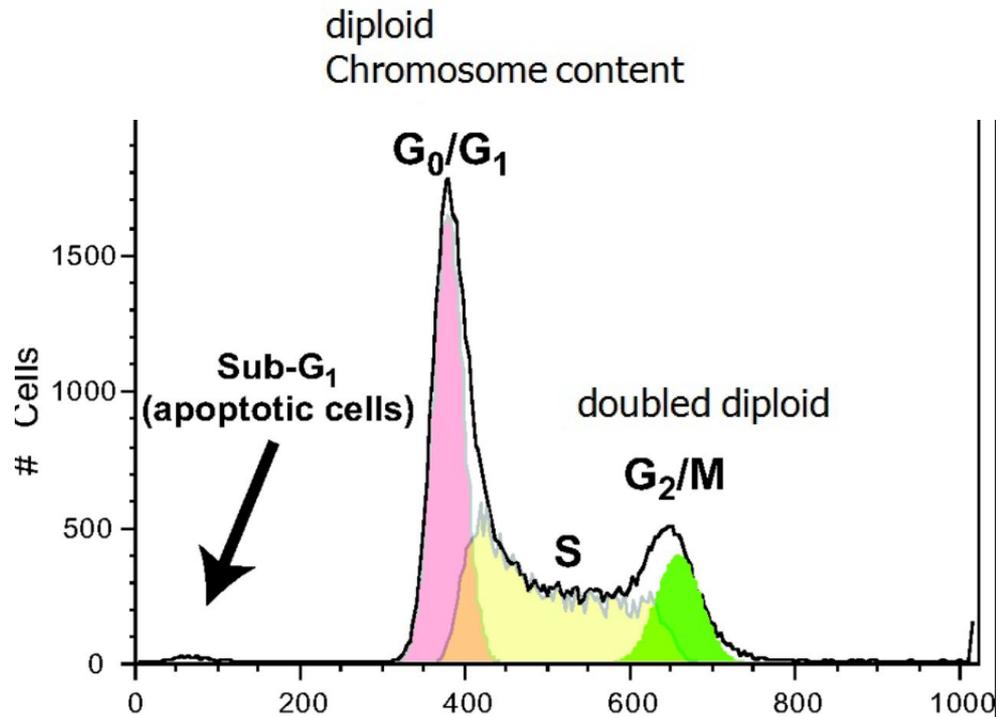
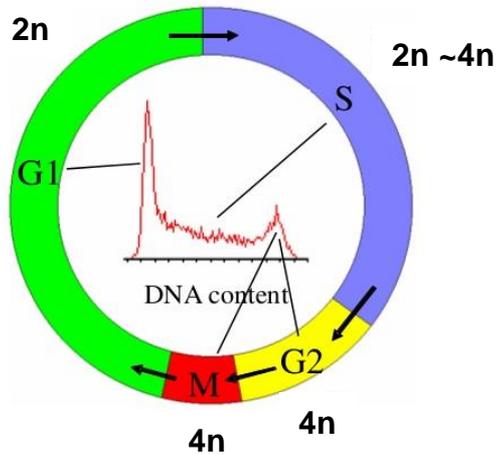
Cell cycle - metaphase

		Animal	Plant
	<p>INTERPHASE Cell is carrying out its normal life activities. Chromosomes become duplicated.</p>		
	<p>EARLY PROPHASE Nuclear envelope begins to disappear. Nucleolus disappears. Long fibers of chromatin become evident and begin to condense as visible chromosomes.</p>		
	<p>LATE PROPHASE Chromosomes continue to shorten and thicken. Spindle forms between centrioles, which have moved to the poles of the cell. Kinetochores begin attaching to microtubules.</p>		
	<p>METAPHASE Spindle fibers attach to the kinetochores of the chromosomes, which line up along the cell's midplane.</p>		
	<p>ANAPHASE Chromatids separate at centromeres, and one group of chromosomes moves toward each pole.</p>		
	<p>TELOPHASE Chromosomes have arrived at the poles, and the nuclear envelopes begin to form. Cytokinesis produces two daughter cells.</p>		
	<p>INTERPHASE Daughter cells formed are genetically identical to the parent cell.</p>		

Cell cycle – analysis tools

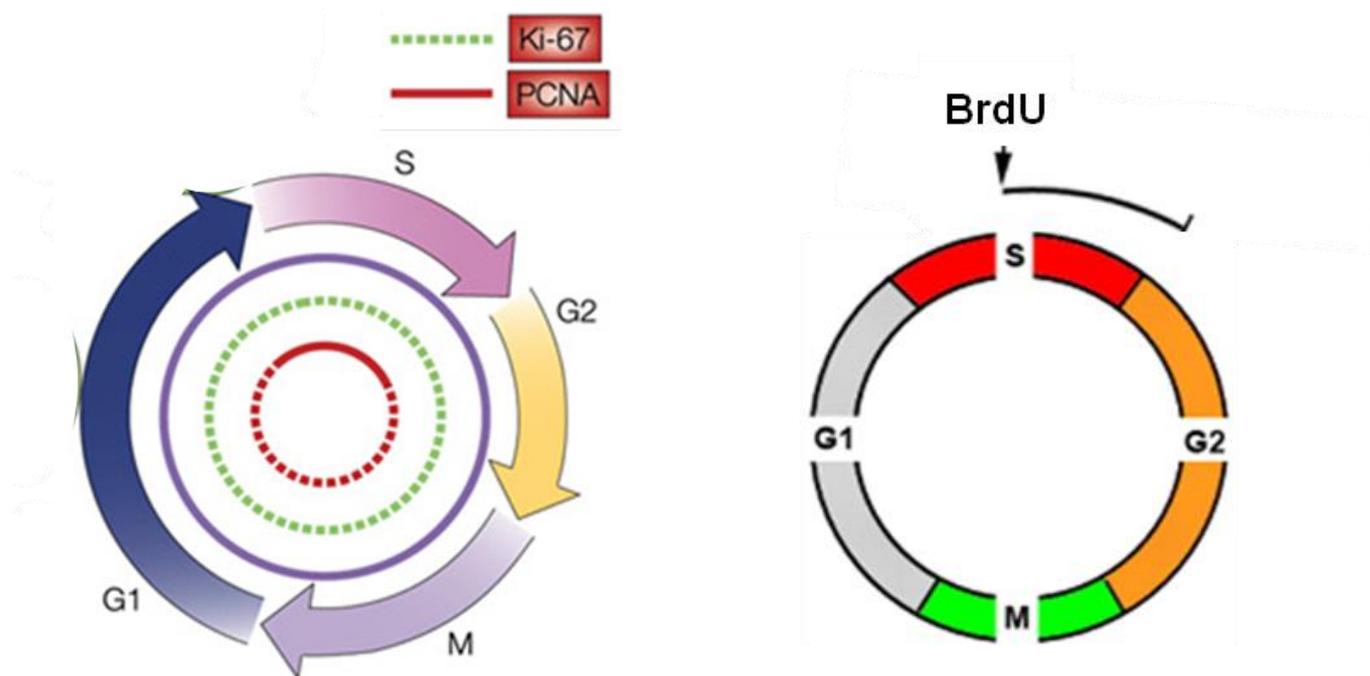
FACS analysis (Fluorescence Assisted Cell Sorting, flow cytometry) :

DNA staining with PI (Propidium Iodide, red dye) → Cell counting via DNA contents



Cell cycle – analysis tools

Immunostaining with Ki-67, PCNA & BrdU (integration & staining)



Cell cycle – analysis tools

Indirect analysis of cell cycle

- Cyclins / CDKs expression level check
- Cell cycle regulatory proteins level check
- Growth kinetics check (proliferation analysis)

Cell culture introduction

What is Cell Culture?

The removal of cells from an animal or plant and their subsequent growth in a favorable artificial environment

- Primary culture / Cell line

What you need for Cell Culture

- Laminar flow hood (Cell Culture hood, biological safety cabinet)
- CO₂ incubator: gas (O₂, CO₂), temperature
- Flasks or dishes for growing cells
- Media; Essential nutrients (amino acids, carbohydrates, vitamins, minerals, growth factor, hormones), pH
- Microscopes
- Cryopreservation equipment
- Others: Water bath, Refrigerator, Pipette aid, Centrifuge, Autoclave

Cell culture introduction

Biosafety Levels



Biosafety Level 1 (BSL-1)

; Basic level of protection common to most research & Clinical laboratories.

특별한 격리 불필요.

Biosafety Level 2 (BSL-2)

; Moderate-risk agents. Most cell culture labs should be at least BSL-2.

허가된 인원만 입실, 경고표시 및 작업복 착용. 고효율 미세 필터를 설치한 설비.

Biosafety Level 3 (BSL-3)

; Agents that may cause serious and potentially lethal infections.

완전 봉쇄가 필요하고 복도 출입이 제한, 고성능 필터 필요.

Biosafety Level 4 (BSL-4)

; Agents that pose a high individual risk of life-threatening.

방호복 없이 입실 불가능. 공기 잠금 시스템 필요.

Cell culture introduction

Biosafety Levels

Biosafety Level 3 (BSL-3)

; Agents that may cause serious and potentially lethal infections.

완전 봉쇄가 필요하고 복도 출입이 제한,
고성능 필터 필요.



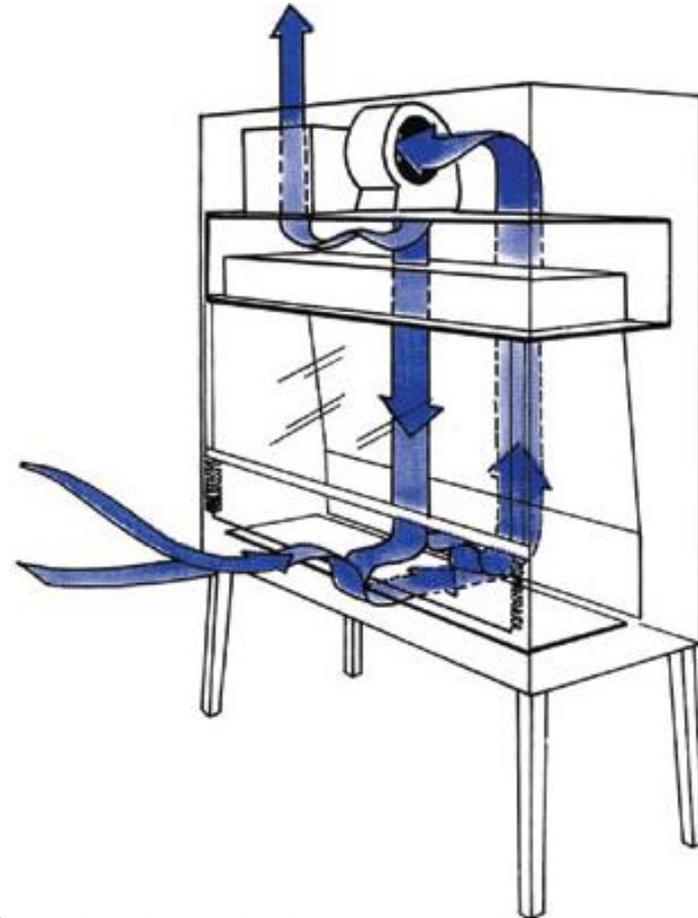
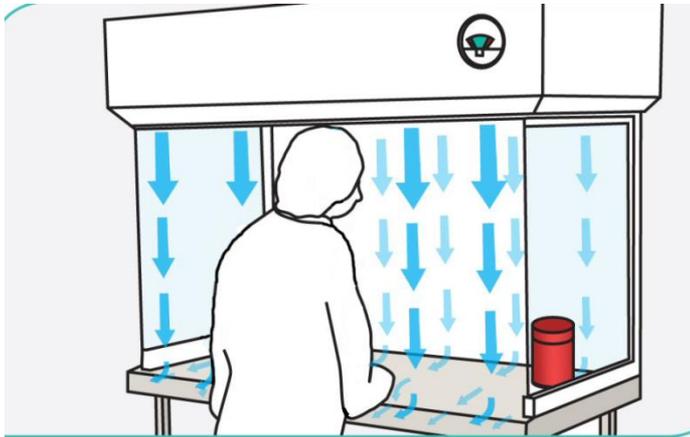
Biosafety Level 4 (BSL-4)

; Agents that pose a high individual risk of life-threatening.

방호복 없이 입실 불가능. 공기 잠금 시스템 필요.



Cell culture introduction



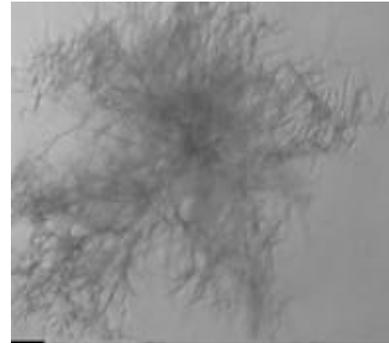
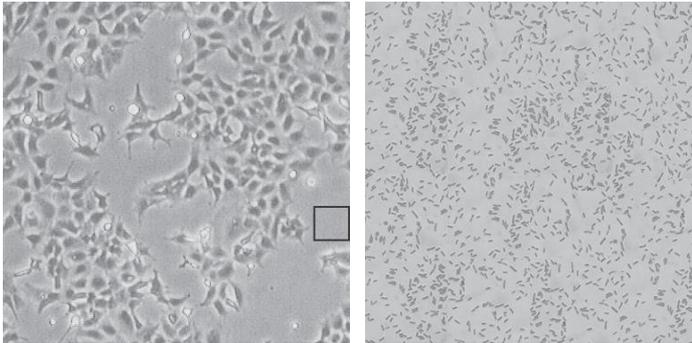
Sterile Work Area:

- Wipe the work surface with 70% ethanol
- Turn on Ultraviolet light

Cell culture introduction

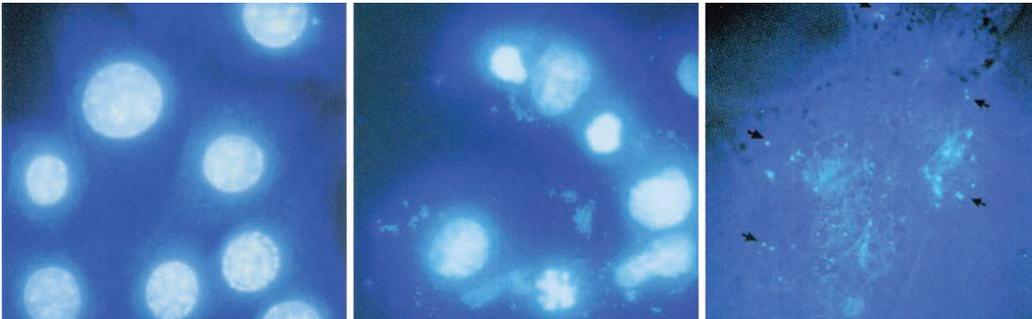
- Contamination**
- **Biological contaminants**
 - i. bacteria, yeast, mold, mycoplasma,
 - ii. cross contamination by other cell lines

Bacteria: most common contamination



Molds (fungi): grow unattached to the cell or flask, infect via airborne (heating and air-conditioning system)

Mycoplasma



- the smallest ($0.2 - 0.3\mu\text{m}$) wall-less bacteria (cannot be detected by light microscopy)
- associated with the mammalian cell membranes
- can cause changes in cell growth, inhibition cell metabolism, and can alter transfection rates and virus susceptibility

Cell culture introduction

History

- Ross Harrison (1907)- **frog embryo** nerve fiber outgrowth in vitro
- Carrel (1912)- chick connective tissue, heart muscle contractile for **2-3 months**
- Rous & Jones (1916)- **trypsinization and subculture** of explants
- Keilova (1948)- use of **antibiotics** in tissue culture.
- **Gey et al. (1952)- First Human cell line HeLa** established
- Eagle (1955)- development of **defined media**
- Sorieul & Ephrussi (1961)- Cell fusion; somatic cell hybridization
- Kleinsmith & Pierce (1964)- **Pluripotency of embryonal stem cells**
- Raham & Van der Eb (1973)- DNA transfer-calcium phosphate
- Rheinwald & Green (1975)- Skin culture
- Ham & McKeehan (1978) -Serum free media
- Butler (1991)- Industrial scale culture of transfected cells for biopharmaceuticals
- Freshney (2004)- Exploitation of **tissue engineering**

Cell culture introduction

Types of Tissue Culture

- Cell Culture – primary culture, cell line culture
- Histotypic Culture (3D culture)
- Organotypic Culture – explant culture

Primary culture

- Cells placed in culture directly from the tissue of origin
- Called primary cultures until the first subculture
- Isolation of tissues - mechanical / enzymatic, combination
 - Mechanical methods : chopping, pipetting
 - Enzymatic methods : trypsin, collagenase, elastase, dispase, DNAase & combinations via tissue specific hardness & components

Cell culture introduction

Isolation of tissues

- Must comply with local legislation and medical ethical rules.
- Sterilize the site with 70% alcohol or other sterilization methods
- Remove tissue aseptically.
- Transfer to the laboratory in transport medium on ice.
- If delay in transporting to lab, keep at 4°C for up to 72hours generally, but immediate transporting is the best.

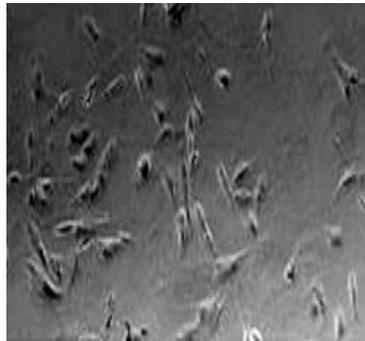
Cell culture introduction

Primary culture procedure

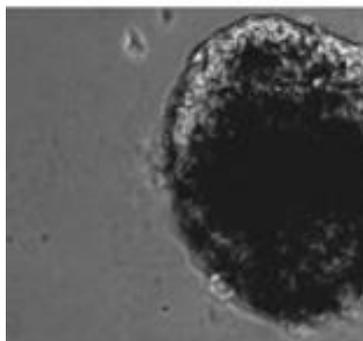
4 stages of the culture after first isolation of the cells, but before the first subculture :

- 1) acquisition of samples,
- 2) isolation of tissues,
- 3) disaggregation,
- 4) culture seeding into culture vessel.

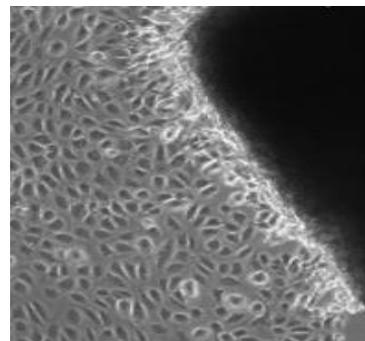
Enzymetic



Mechanic day 0



Mechanic day 10



Cell culture introduction

Established Cell Lines

- Primary culture → Trypsinization & first subculture: called secondary culture → if continued passage is possible: called 'cell line'
- Cell line: established or immortalized cells has the ability to proliferate
- Cell line examples below

Cell line	Organism	Origin Tissue
HeLa	Human	Cervical cancer
293-T	Human	Kidney (embryonic)
A-549	Human	Lung carcinoma
ALC	Murine	Bone marrow
CHO	Hamster	Ovary
HB54	Hybridoma	Hybridoma
FM3	Human	Metastatic lymph node



Home ▶ Products ▶ All Products ▶ CCL-2™

HeLa (ATCC® CCL-2™)

Organism: [Homo sapiens, human](#) / Cell Type: [epithelial](#) / Tissue: [cervix](#) / Disease: [adenocarcinoma](#)

GENERAL INFORMATION CHARACTERISTICS CULTURE METHOD SPECIFICATIONS HISTORY DOCUMENTATION

[SHARE](#) [EMAIL](#) [PRINT](#)

Organism	Homo sapiens, human
Tissue	cervix
Cell Type	epithelial
Product Format	frozen
Morphology	epithelial
Culture Properties	adherent
Biosafety Level	2 [Cells contain human papilloma virus]
Disease	adenocarcinoma
Age	31 years adult
Gender	female
Ethnicity	Black
Applications	These cells are a suitable transfection host. This cell line can be used to screen for <i>Escherichia coli</i> strains with invasive potential.
Storage Conditions	liquid nitrogen vapor phase

HeLa ATCC® CCL-2™

frozen

For-Profit: \$431.00

Non-Profit: \$359.17

Qty:

[Add to Cart](#)

RECOMMENDED FOR THIS PRODUCT

[Eagle's Minimum Essential Medium \(EMEM\) \(ATCC® 30-2003™\)](#)

Qty [Add to Cart](#)

500 mL

For-Profit: \$19.00

Non-Profit: \$19.00

[Fetal Bovine Serum \(FBS\) \(ATCC® 30-2020™\)](#)

Qty [Add to Cart](#)

frozen 500 mL

For-Profit: \$324.00

Non-Profit: \$324.00

[Trypsin-EDTA Solution, 1X \(ATCC® 30-2101™\)](#)

Qty [Add to Cart](#)

frozen 100 mL

For-Profit: \$13.00

Non-Profit: \$13.00

[Dimethylsulfoxide \(DMSO\) \(ATCC® 4-X™\)](#)

Qty [Add to Cart](#)

5 x 5 mL vials

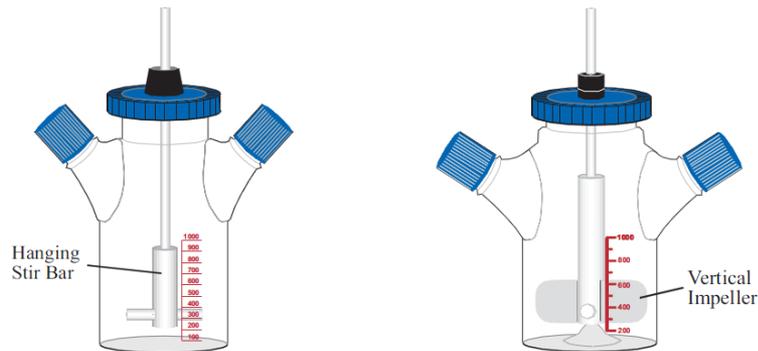
For-Profit: \$47.00

Non-Profit: \$47.00

Cell culture introduction

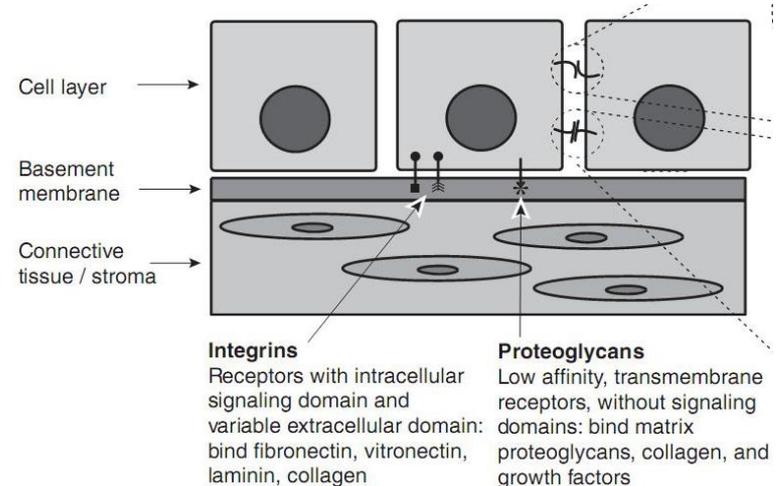
Suspension cells

- ✓ **Grow floating** in culture medium
- ✓ Cells survive and proliferate without the attachment to culture container
- ✓ blood, some neural stem cells



Adherent cells

- ✓ **Grow as a monolayer attached** to the surface of culture container
- ✓ Fibroblasts, epithelial cells, neurons
- ✓ Most of the time require the specialized surface



Cell culture introduction

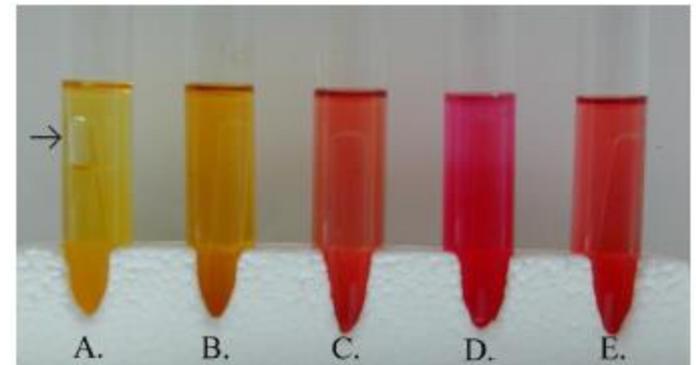
Basic Constituents of Media

Media type	Examples	Uses
Balanced salt solutions	PBS, Hanks BSS, Earles salts DPBS HBSS EBSS	Form the basis of many complex media
Basal media	MEM	Primary and diploid cultures.
	DMEM	Modification of MEM containing
	GMEM	
Complex media	RPMI	
	Iscove	
	Leibov	
Serum Free Media	CHO	
	Ham F	
	Ham F DMEM	



- ✓ Inorganic salts
- ✓ Carbohydrates
- ✓ **Amino Acids**

Color reflects buffering capacity
And quality medium!



Cell culture introduction

How to culture?

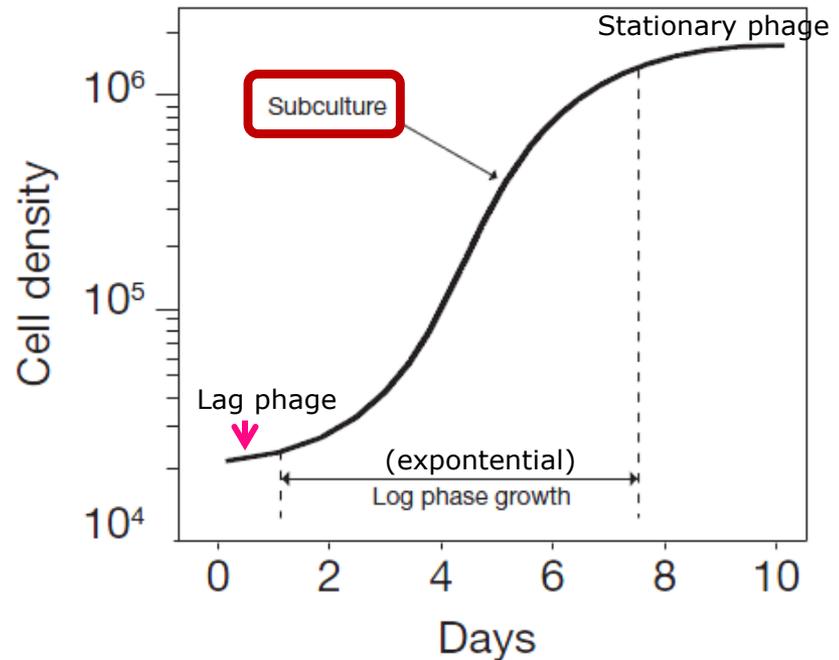
➤ Cell Maintenance

Media Exchange

Subculturing = Passaging

➤ Cell Freezing

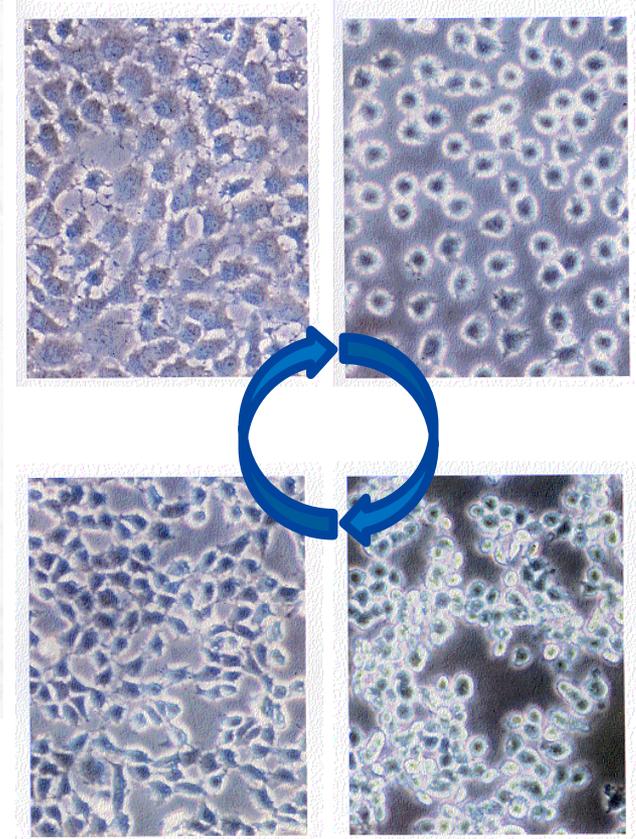
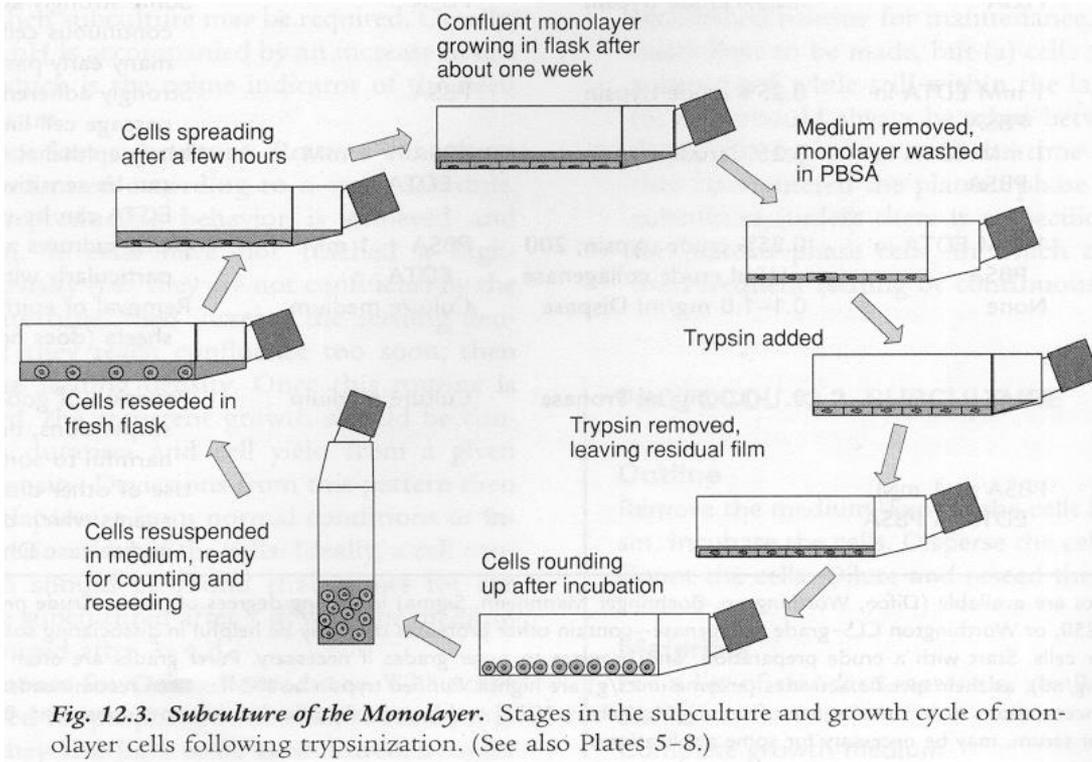
➤ Cell Thawing



<Growth Pattern of Cultured Cells>

Cell culture introduction

How to Subculture? -Adherent Cells



Labeled with the

- **Name of cell line**
- **Passage Number**
- **Additives**
- **Date made**

Cell culture introduction

How to Cell Freezing? -Adherent Cells

➤ Cryopreservation

- ✓ Genetic drift, Senescence, Contamination
- ✓ To maintain best cells
- ✓ Seed stock (earlier passages)
- ✓ Working stock

; Optimal freezing conditions depend on the cell line in use

➤ Requirements

- ✓ **Cryoprotective agent: DMSO or glycerol**
- ✓ Cryovials
- ✓ Cryo-freezing container, Liquid nitrogen (tank)



➔
-80°C



➔
-196°C



Cell culture introduction

How to Cell Thawing?

➤ Guideline

- ✓ Thawing is stressful to frozen cells
- ✓ **Working quickly ensures high cell survival**

➤ Procedures

- ✓ Quickly thaw the cells (<1min) by gently swirling the vial in the 37°C
- ✓ Before opening in laminar flow, wipe the outside of the vial with 70% EtOH
- ✓ Transfer the thawed cells into the pre-warmed complete growth medium
- ✓ Centrifuge the cells
- ✓ Discard the supernatant
- ✓ Add the new culture media
- ✓ Transfer them into the prepared culture vessel

History of Stem Cells Research

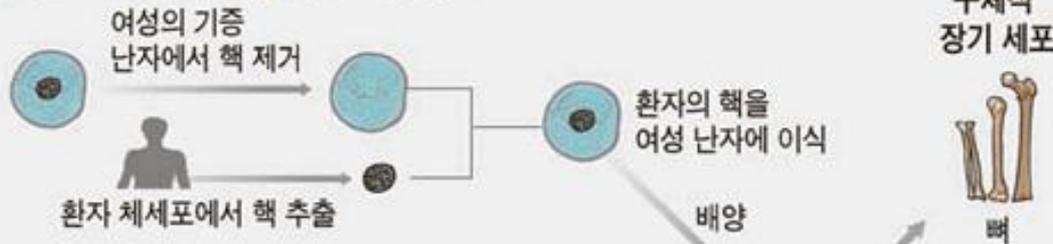
- 1800년대 중반 배아 연구가 시작되면서 특정 세포가 다른 세포를 만들 수 있다는 사실이 알려짐.
- 20세기 초, 과학자들은 골수 세포가 혈액을 생산하는 역할을 하는 것을 확인, (뼈 세포가 혈액이라는 다른 형질의 세포로 변형됨) 바로 여기에서 "**줄기세포**"의 개념 창출.
- 1958년, 프랑스 과학자들이 방사능에 의해 신체가 손상된 환자들을 위해 장기 이식을 시도. 이때 **Jean Dausset** 박사가 항원을 활용해 환자와 기증자의 장기를 혈액형으로 "매칭"시켜주는 **HLA** 시스템을 개발 → HLA 시스템의 개발로, 골수 이식이 가능해 짐. 1973년 5살짜리 아이에게 **골수이식** 수술 성공. 골수 세포를 배양해 서로 다른 유전자 간에 골수를 이식하는 것은 사실상 줄기세포 연구의 시작.
- 1900년대 초반 생체 밖에서 포유동물의 난자를 만드는 과정 중에 특정 세포가 혈액 세포를 만드는 능력이 있다는 사실이 알려짐.
- 1908년 베를린 혈액학회에서 러시아의 **Alexander Maksimov**가 ‘줄기세포’라는 용어 사용을 제안함.
- 1963년 **Mcculloch & Till**은 쥐의 골수에서 자가 증식하는 세포를 발견.
- 1970년, **Friedenstein**은 중간엽 줄기세포(**MSC, mesenchymal stem cells**)가 성체의 골수에 존재한다는 사실을 밝힘 (**BM-MSC, bone marrow derived stem cells**).
- 1978년, 인간 탯줄에서 혈액 줄기세포 (**HSC, hematopoietic stem cells**)가 발견됨.
- 1981년 쥐의 내부 세포괴 (**ICM, inner cell mass**)로부터 분리한 배아 줄기세포를 발견하여 **Matin Evans** 및 **Matthew H. Kaufman**이 배아 줄기세포(**ESC, embryonic stem cells**)이라고 명명 → 1999년 이 줄기세포를 특정 신체 일부의 세포로 자라게 함 (2001년엔 쥐의 줄기세포를 혈액세포로 키우는데 성공).

History of Stem Cells Research

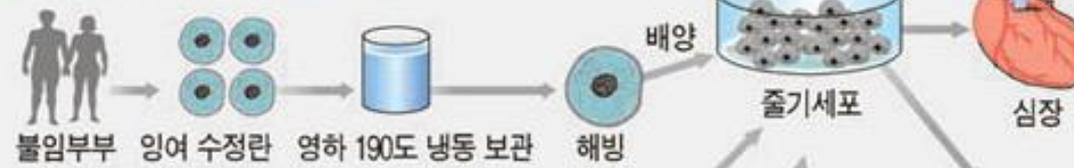
- 1997년 영국의 과학자 이언 윌머트가 복제양 "돌리" 생산. 체세포를 이용한 배아복제가 가능하다는 것을 입증함.
- 1998년, James Thomson 등(Wisconsin univ.)이 불임 클리닉에서 제공받은 폐기용 인간 수정란을 이용해 **사람의 배아줄기세포를 확립**, 2001년 처음으로 배아 줄기세포를 만들기 위해 인간 배아가 복제됨.
- 인간의 미수정 난자와 체세포를 사용, 환자의 맞춤형 복제 배아줄기세포를 만들어냈다고 발표한 2004년 **Science**에 게재했던 황우석박사의 논문이 조작으로 취소됨 → 2013, 2014년에 타 연구팀에서 입증함.
- 1999년 Pittinger 등은 골수와 지방조직 등에 존재하는 **BM-MSC**가 배아 줄기세포처럼 인체를 구성하는 **다양한 조직** 즉 신경, 골, 연골, 지방, 근육 등으로 **분화**한다는 사실을 밝혀냄에 따라 **MSC**의 세포 치료제로서의 가능성을 제안.
- 인간의 배에서 얻은 지방 중간엽 줄기세포(**adipos-MS**C)의 분리 배양법을 표준화하는데 성공함. → **Adipose-MS**C는 **BM-MS**C에 비해 **1,000배** 정도 다량 존재한다는 사실을 알게됨.
- 중간엽(**mesenchyme**)이란. 태아의 성근(**loose**) 중배엽에서 유래된 결합조직으로, 형태적으로 망상 섬유와 비특이적 세포의 성긴 집합체를 포함한 기질이 특징임. 여기에서 결합조직, 뼈, 연골, 림프관, 혈관 이 발생됨. 중간엽 세포는 성인 유기체에 잔존함 → **MSC** 배양법의 표준화 및 성체 줄기세포 은행을 구축하여 상용화의 기반이 마련됨.
- 2006년 야마나카 신야교수팀이 4개의 유전자(**OCT4, SOX2, KLF4, C-MYC**)를 이용해 쥐의 체세포를 이용한 **유도만능줄기세포 (iPSC, induced pluripotent stem cells)** 만들 → 이후로, 여러 연구팀에서 유전자 조합을 이용하여 신경세포 등 여러 세포로 **직접분화유도 (direct reprogramming)** 성공.
- 2013년 슈크리트 미탈리포프 연구팀이 **사람 체세포 복제 배아줄기세포 만들** (2004년 황우석 연구팀에서 만들었다고 했던 것과 동일한 개념임).

Types of Stem Cells

■ 사람 난자와 핵이식을 통한 줄기세포



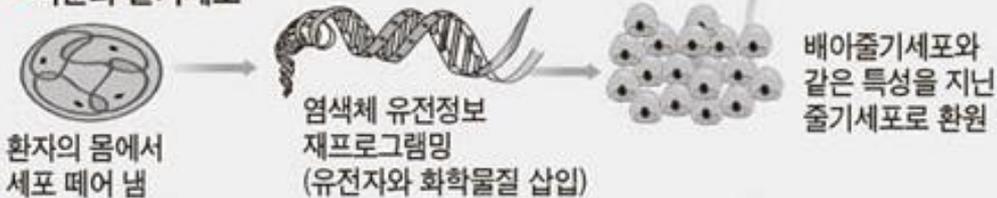
■ 냉동 수정란을 이용한 줄기세포



■ 피부 등 체세포를 이용한 줄기세포



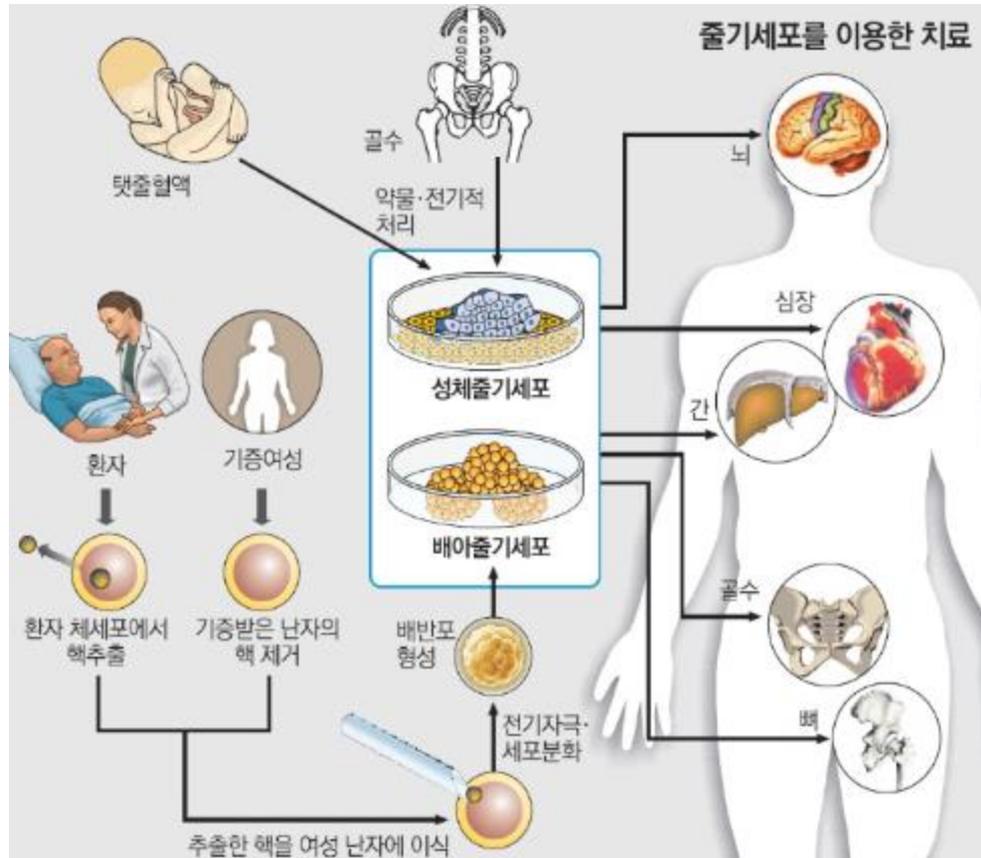
■ 역분화 줄기세포



Stem Cells 종류에 따른 장단점

종류	장점	단점
체세포복제 배아줄기세포	·이식거부반응 없음 ·이론상 환자맞춤형 이식 가능 ·활우석 박사가 시도했던 방법	·아직 성공사례 없음 ·난자가 대량으로 필요해 윤리문제 발생 ·인간복제 가능
수정란 배아줄기세포	·다양한 세포로 분화 가능 ·다양한 연구성과 축적 ·줄기세포 은행을 만들면 면역거부 반응 어느 정도 해결 가능	·수정란 사용으로 생명윤리문제 상존 ·면역거부반응 ·암이 발생할 수 있어 현재 임상 적용 불가능
유도만능 줄기세포	·수정란을 사용하지 않아 윤리적 문제 없음 ·다양한 세포로 분화 가능	·암이 발생할 수 있어 임상적용 어려움 ·분화과정에서 조기 노화가 나타나 분화 및 증식능력 제한
성체줄기세포	·수정란줄기세포 다음으로 연구 활발 ·다양한 연구 성과 축적 ·면역거부반응 없음 ·안전성 입증돼 임상적용 중	·배아줄기세포에 비해 분화성능 낮으나 ·최근 다분화능이 입증 ·채취 부위에 따라 줄기세포 능력 제한

Concept of Stem Cells Therapy



Thanks!

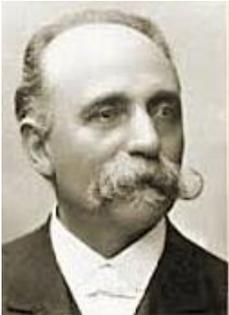
노벨상 Nobel Prize

세포생물학에서의 노벨상



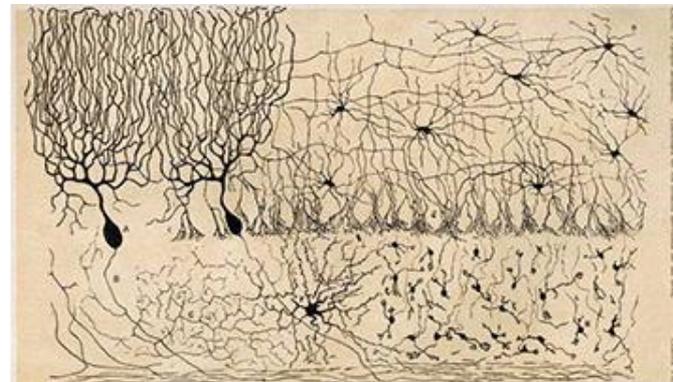
Robert Koch, 1905년 노벨 의학상

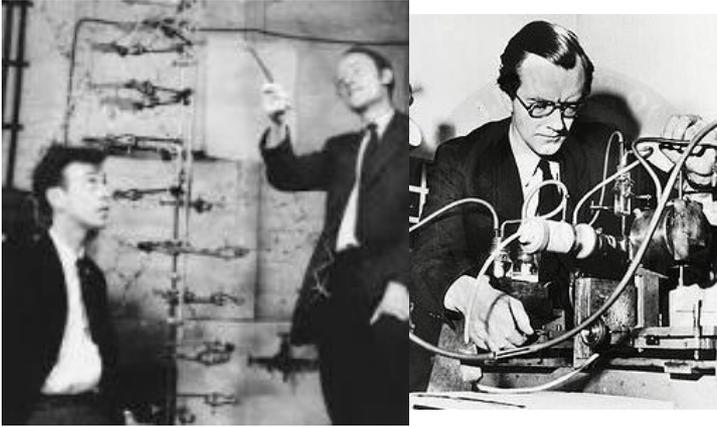
이 시골 의사는 결핵과 콜레라를 일으키는 바실루스(bacillus)를 발견



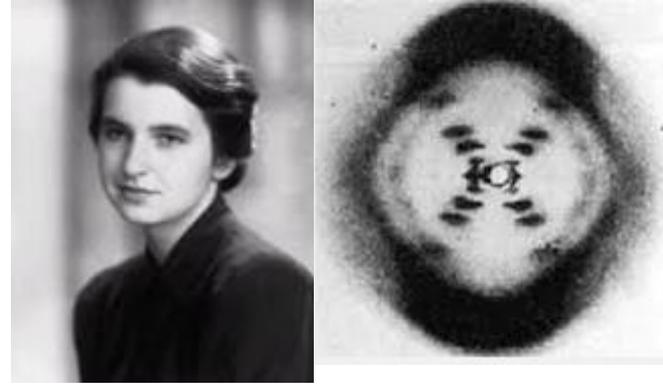
Santiago Ramón y Cajal & Camillo Golgi, 1906년 노벨 생리·의학상

신경계의 구조 연구의 선구자





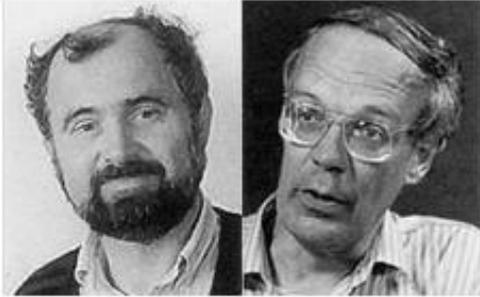
James Dewey Watson & Francis Harry Compton Crick & Maurice Hugh Frederick Wilkins 1962년 노벨 생리·의학상



DNA 이중나선구조는, Rosalind Elsie Franklin의 x 선 회절사진에 근거하여 구조를 밝혔으나, 허락없이 사진을 분석하였으며 1962년 수상당시 타계하신 이유로 노벨상 수상은 하지 못하였다.



Peter Mitchell 1978년 노벨 화학상, 미토콘드리아에서 ATP synthase 과정 밝힘



Erwin Neher와 Bert Sakmann, 1991년 노벨 의학상
패치 고정법을 이용한 이온 채널의 전기 생리학 검사를
포함하여, 세포 간 정보 교류의 근본적 메커니즘을 밝힘



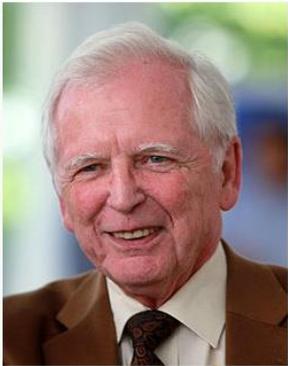
Paul M. Nurse 경, Leland H. Hartwell, Timothy Hunt, 2001년
노벨 생리·의학상
세포의 성장부터 증식까지 세포 주기를 제어하는 중요 성분과
process의 근본적 mechanism을 선구적으로 밝힘



Sydney Brenner, H. Robert Horvitz, John E.
Sulston, 2002년 노벨 화학상
예쁜꼬마선충에서 기관 발생과 programmed
cell death (apoptosis)를 조절하는 역할을
하는 유전자 발견



Craig Mello, Andrew Fire, 2006년 노벨 생리·의학상
RNA interference를 발견



Harald zur Hausen, 2008년 노벨 생리·의학상 수상

당시 지배적이었던 학설 (herpes simplex type 2 virus에 의하여 발병된다)과는 달리, 유두종 바이러스(HPV)가 자궁경부암을 유발할 수 있다는 이론을 입증하여 의학계의 교조주의를 철폐한 공로를 인정 받아 노벨 의학상 수상



Osamu Shimomura, Martin Chalfie, Roger Tsien, 2008년 노벨 화학상

해파리로부터 녹색 형광 단백질(GFP)을 발견하고 세포 생물학에 응용하기 위해 추가 개발한 공로로 수상. GFP 형광을 이용하여 살아 있는 세포, 조직 또는 유기체에서 다른 단백질의 공간 및 시간적 분포를 직접 관찰할 수 있어 첨단 형광 현미경 검사의 기초가 됨



Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider,
Jack W. Szostak 2009년 노벨 생리·의학상
DNA 말단에서 염기서열이 반복되는 부위인
telomere와 이와 관련된 효소인 telomerase를
발견해 세포의 노화, 질병 발생 메커니즘에 대
한 이해를 돕고 새로운 치료법 개발을 촉진한
공로



John B. Gurdon 경과 Shinya Yamanaka, 2012년 노벨
생리·의학상
성숙한 세포가 다능성을 갖도록 reprogramming될 수
있다는 사실을 발견한 공로로 공동 수상



James E. Rothman, Randy Wayne Schekman, Thomas Christian Südhof 2013
노벨 생리·의학상

세포 안에 담긴 단백질·호르몬 등의 물질이 어떤 이동 과정을 거쳐 최종 분비되는지를 밝힘



John O'Keefe, May-Britt Moser, Edvard I. Moser, 2014년 노벨 생리·의학상

신경계의 "격자세포"라는 것을 발견하고 이를 토대로 뇌가 주변 공간의 지도를 만드는 방법과 복잡한 환경에서 사람이 길을 찾아가는 방법에 대해 이해하는 방식을 제공

Thanks!