



UNIVERSITA'  
DEGLI STUDI  
DI **TERAMO**

*Corso di laurea BIOTECNOLOGIE*

# **Fisiologia cellulare e Laboratorio di Colture cellulari**

*Prof.ssa Luisa Gioia*



*Corso di laurea BIOTECNOLOGIE*

# Fisiologia cellulare e Laboratorio di Colture cellulari

UNIVERSITA'  
DEGLI STUDI  
DI TERAMO

**IL MATERIALE CONTENUTO IN QUESTE  
DIAPOSITIVE E' AD ESCLUSIVO USO DIDATTICO PER  
L'UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TERAMO.**

ALCUNE IMMAGINI CONTENUTE SONO STATE TRATTE DAI  
SEGUENTI LIBRI:

“Biologia molecolare della cellula” – Bruce Alberts *et al.* (Ed. Zanichelli)

“FISIOLOGIA Molecole, cellule e sistemi” – Egidio D'Angelo e Antonio Peres (Edi-ermes)

“Introduzione alle colture cellulari” - G.L. Mariottini *et al.* (Ed. Tecniche nuove)

“Cell Biology: a short course” – S.R. Bolsover *et al.*  
(Ed. Wiley-Blackwell)

# Richieste di crescita da parte delle cellule in coltura

## **RICHIESTE FISIOLOGICHE:**

- temperatura
- umidità
- pH (atmosfera gassosa)

## **RICHIESTE QUALITATIVE:**

- **Elementi nutritivi** del terreno di coltura
  
- Presenza del **SIERO** nel terreno di coltura

Soluzioni saline e medium di coltura:  
caratteristiche e modalità di  
preparazione

# Caratteristiche delle soluzioni/terreni

- **Concentrazione (Molarità)**

- **Osmolarità**

- **pH**

- **STERILITA'**

- *Colore*

- *Limpidezza*

- *Odore*

- La più semplice soluzione utilizzata nel laboratorio di colture cellulari è la cosiddetta “**soluzione fisiologica**”

**0,9% NaCl**

*Come si prepara in laboratorio?*

➤ Cosa vuol dire **0,9% (w/v) NaCl**?

0,9g NaCl in 100ml di acqua

*Sapendo che NaCl ha MW=58,44*

➤ Quale è la **molarità** della soluzione fisiologica?

➤ Quale è l'**osmolarità** della soluzione fisiologica?

## ***ATTIVITA' IN LAB***

**Preparare una soluzione composta da  
0,9 g di NaCl in 100 ml di acqua**

*Sapendo che NaCl ha MW=58,44:*

**Quale MOLARITA' ha questa soluzione?  
Quale OSMOLARITA' ha questa soluzione?**



## Mole/Molarità

Si chiama **mole** una quantità di sostanza che contiene la stessa quantità di particelle contenute in 12g di  $^{12}\text{C}$  (isotopo 12 del carbonio, il consueto *isotopo di riferimento*).

Il numero di unità contenute in una mole si chiama *numero o costante di Avogadro* ( $N_A$  o  $N$ ).

$$N_A = 6,022169 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$$

**Quindi una mole di sostanza contiene  $6.022 \times 10^{23}$  molecole di quella sostanza**

**Molarità ( M ): indica il numero di moli di soluto presenti in 1 litro (1 L) di soluzione**

$$M = \text{nmoli} / V$$

$$\text{nmoli} = g / \text{PM}$$

Per  $V=1$

$$M = g/\text{PM}$$

$$M = g/PM$$

Qual è il valore di concentrazione espresso come **mM**?

$$xM = ? \text{ mM}$$

Quale è l'**osmolarità** della soluzione fisiologica, se la molarità è 0,154M?

## Multipli e sottomultipli di unità di misura applicabili ai liquidi.

Sigla o simbolo	Nome	Valore decimale	Fattore moltiplicativo
l	litro	1 litro	
dl	decilitro	0,1(un decimo di litro)	$10^{-1}$ litri
cl	centilitro	0,01(un centesimo di litro)	$10^{-2}$ litri
ml	millilitro	0.001(un millesimo di litro)	$10^{-3} = 1\text{cm}^3$
$\mu\text{l}$	microlitro	0,000001(un milionesimo di litro)	$10^{-6} = 1\text{mm}^3$
nl	nanolitro	0,000000001(un miliardesimo di litro)	$10^{-9}$ litri
fl	fentolitro	0,0000000000000001 litri	$10^{-15}$ litri

## Multipli e sottomultipli di unità di misura applicabile ai solidi

Sigla o simbolo	Nome	Valore decimale	Fattore moltiplicativo
g	grammo	1	
dg	decigrammo	0,1(un decimo di grammo)	$10^{-1}$ grammi
cg	centigrammo	0,01( un centesimo di grammo)	$10^{-2}$ grammi
mg	milligrammo	0,001(un millesimo di grammo)	$10^{-3}$ grammi
mcg o $\mu$ g	microgrammo	0,000001(un milionesimo di grammo)	$10^{-6}$ grammi
ng	nanogrammo	0,000000001(un miliardesimo di grammo)	$10^{-9}$ grammi
pg	picogrammo	0,0000000000001 g	$10^{-12}$ grammi
fg	fentogrammo	0,0000000000000001 g	$10^{-15}$ grammi
ag	attogrammo	0,0000000000000000001 g	$10^{-18}$ grammi

<b>ordine di grandezza</b>	<b>prefisso</b>	<b>simbolo</b>
$10^{12}$	tera	<b>T</b>
$10^9$	giga	<b>G</b>
$10^6$	mega	<b>M</b>
$10^3$	chilo	<b>k</b>
$10^2$	etto	<b>h</b>
$10^1$	deca	<b>da</b>
$10^{-1}$	deci	<b>d</b>
$10^{-2}$	centi	<b>c</b>
$10^{-3}$	milli	<b>m</b>
$10^{-6}$	micro	<b>μ</b>
$10^{-9}$	nano	<b>n</b>
$10^{-12}$	pico	<b>p</b>
$10^{-15}$	femto	<b>f</b>
$10^{-18}$	atto	<b>a</b>

## Soluzioni saline bilanciate

### D-PBS (DULBECCO'S PHOSPHATE BUFFERED SALINE)

Componenti	molarità
NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.1 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 mM
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0.9 mM
MgCl <sub>2</sub> anidro	0.5 mM
Na-piruvato	0.33mM
D-glucosio	5.5 mM
pH= 7.2-7.4	

NOTA: al Dulbecco-PBS è possibile aggiungere alcuni componenti utili le per fasi di utilizzo, quali:

Kanamicina: [70 mg/L]

(Bovine serum albumin) BSA 0.4%

## Primary Functions of ALBUMIN in Cell Culture Systems

Many molecules found *in vitro* are unstable or destructive when they exist in non-complexed forms.

**A primary function of albumin is to bind, sequester and stabilize a range of important small molecules and ions.**

*In vitro*, **albumin acts as a multifaceted antioxidant.**

Its total antioxidant activity is a composite of many individual antioxidant activities. Albumin binds fatty acids and protects them from oxidation; binds copper and keeps it from participating in oxidation reactions; binds cysteine and glutathione and protects them from oxidation, binds bilirubin and pyridoxal-5'-phosphate and protects them from oxidation, and is a sacrificial antioxidant.

Quale quantità di una sostanza devo sciogliere in 1L di acqua, conoscendo la sua MOLARITA' in soluzione? E in 100 ml? ....

## DULBECCO-PBS

Componenti	molarità	Pesata g/L	Pesata g/100ml	Pesata g/250ml
NaCl	137 mM			
KCl	2.7 mM			
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.1 mM			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 mM			
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0.9 mM			
MgCl <sub>2</sub> anidro	0.5 mM			
Na-piruvato	0.33mM			
D-glucosio	5.5 mM			
pH= 7.2-7.4				

Kanamicina: Uso = [70 mg/L]

BSA 0.4%

$$M = g/PM \rightarrow g = M \times PM$$



# Soluzioni saline bilanciate

◆◆◆ TABELLA 3.2 - COMPOSIZIONE DI ALCUNE SOLUZIONI SALINE DI USO CORRENTE (DA DE ANGELIS, 1994, MODIFICATO). ◆◆◆

Componente	Soluzione salina			
	Earle (g/l)	Hank (g/l)	Dulbecco (g/l)	Puck (g/l)
NaCl	6,80	8,00	8,00	8,00
KCl	0,40	0,40	0,20	0,40
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,20	0,10	-	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,16	-	-	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anidro)	-	0,48	1,15	-
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,20	0,19	0,13	-
NaHCO <sub>3</sub>	2,20	0,35	-	0,35
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	0,06	0,20	-
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	-	0,10	0,10	-
glucosio	1,00	1,00	-	1,00
rosso fenolo	0,01	0,01	-	0,005

**CARATTERISTICHE E  
COMPOSIZIONE DEI  
TERRENI DI COLTURA**

# Colture cellulari

La crescita *in vitro* delle cellule viene assicurata dall'apporto di tre tipologie di 3 fattori:

1. **elementi nutritivi di base** (glucosio, aminoacidi, sali minerali, ecc.) contenuti **nel mezzo di coltura**
2. **fattori di crescita** (presenti **nel siero**)
3. **fattori di adesione** (presenti **nel siero**)

# TERRENI DI COLTURA

Tutti i terreni per le colture cellulari sono preparati in  
**ACQUA**  
bi/tri-distillata, deionizzata, sterile, apirogena

# STERILITA' DEI TERRENI DI COLTURA

Contaminazione microbiologica dei terreni di coltura

batteri muffe e lieviti  
sono rimossi tramite  
**FILTRAZIONE**

Virus e pirogeni possono  
essere rimossi mediante  
**osmosi inversa,**  
**adsorbimento su carboni**  
**attivi e ultrafiltrazione**

I **microrganismi** (batteri, muffe e alghe e virus) oltre a moltiplicarsi a velocità logaritmica, producono pirogeni (endotossine), secernono enzimi che degradano le proteine ed anche gli acidi nucleici.

I **pirogeni sono frammenti di parete cellulare batterica**  
Causano febbre nei mammiferi ed ostacolano la crescita di cellule e tessuti in coltura.

**STERILITA' DURANTE  
LA COLTURA**

Manutenzione incubatore

Antibiotici

Uso eccessivo= **selezione di ceppi batterici  
antibiotico-resistenti**

# Contaminazione microbiologica dei terreni di coltura

## **Batteri:** le contaminazioni batteriche sono di gran lunga le più frequenti

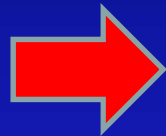
*Al microscopio appaiono come dei granellini neri che si agitano intensamente*

## **Lieviti e muffe:** meno frequenti delle contaminazioni batteriche.

*I lieviti appaiono al microscopio ottico come particelle isolate e rotondeggianti;  
Le muffe appaiono come miceli filamentosi.*

Penicillina/streptomina → **batteri**

Anfotericina B → **funghi/lieviti**



La presenza di batteri, funghi e lieviti è in genere evidenziabile anche ad occhio nudo perché provocano un **aumento dell'acidità del mezzo**

## ➤ aggiunta di **antibiotici**

- devono essere preferibilmente battericidi
- non devono inibire le cellule in coltura**
- devono essere compatibili con gli altri componenti del terreno di coltura

# I micoplasmi

Non sono visibili al microscopio ottico

Non modificano la morfologia delle cellule contaminate né inducono alterazioni nell'aspetto del mezzo di coltura.

La presenza di micoplasmi può essere evidenziata al microscopio elettronico o mediante colorazione con fluorocromo specifico per il DNA.

In genere, quando una coltura viene contaminata da micoplasmi sarebbe **consigliabile l'eliminazione**

# Composizione dei Terreni di coltura

Soluzioni fisiologiche (ISOTONICHE E TAMPONATE)  
complesse, contenenti:

**sali inorganici e  
sistema tampone**

+

**miscela di nutrienti a basso PM** essenziali  
per la crescita e la moltiplicazione delle cellule

**ioni:** sodio, potassio,  
calcio, magnesio, fosfato,  
**bicarbonato**

- **Elementi inorganici in tracce:** zinco, ferro e selenio
- **Zuccheri (FONTE ENERGETICA):** glucosio o galattosio
- **Aminoacidi:** 13 aa “essenziali” (arginina, cisteina, glutamina, istidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, tirosina e valina)
- **Vitamine:** idrosolubili del gruppo B biotina, acido folico, acido pantotenico, riboflavina, tiamina, piridossina, niacinamide
- **Colina e inositolo**

**Indicatore di pH**



# Caratteristiche dei terreni di coltura

- **Concentrazione (Molarità)**
  - **Osmolarità**
  - **pH**
  - **STERILITA'**
- *Colore*
  - *Limpidezza*
  - *Odore*

**Il pH ottimale per la crescita cellulare è normalmente 7.4**

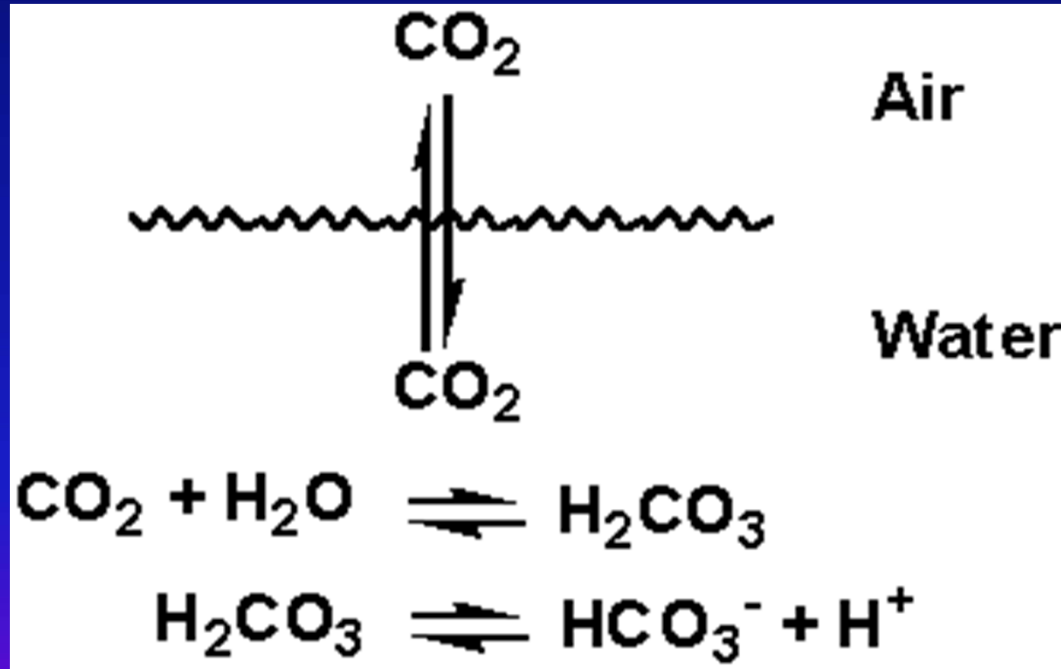
*ECCEZIONI:*

alcune linee di fibroblasti normali proliferano meglio ad un valore di pH tra 7.4- 7.7

le cellule trasformate crescono meglio a pH leggermente più acidi (tra 7.0 e 7.4).

# Sistema tampone dei Terreni di coltura

Cultures using natural **bicarbonate/CO<sub>2</sub> buffering systems** need to be maintained in an **atmosphere of 5-10% CO<sub>2</sub> in air usually supplied in a CO<sub>2</sub> incubator.**



Hepes → Incubatori senza CO<sub>2</sub>

Sistema tampone Fosfato o Sistema misto con Hepes

↳ Fasi fuori dall'incubatore



Sebbene tutte le cellule abbiano le stesse richieste basilari per crescere, esse possono richiedere terreni differenti, contenenti anche diversi additivi.

**Table 2. Some commonly used cell culture media with the amounts of sodium bicarbonate used for buffering. Higher levels of sodium bicarbonate usually require higher levels of CO<sub>2</sub> added to the incubator.**

Cell culture media	Sodium bicarbonato levels (g/L)	Extra CO <sub>2</sub> needed
<b>Leibovitz's L-15 Medium</b>	<b>None</b>	<b>No</b>
Eagle's MEM with Hanks' salts	0.35	No
Medium 199 with Hanks' salts	0.35	No
Ham's F12	1.176	Yes
DMEM/F12	1.2 to 2.438	Yes
RPMI 1640	2.0	Yes
Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) with Earle's salts	2.2	Yes
McCoy's 5A	2.2	Yes
<b>Medium 199 with Earle's salts</b>	<b>2.2</b>	<b>Yes</b>
MEM Medium with Earle's salts	2.2	Yes
CMRL 1066 Medium with Earle's salts	2.2	Yes
Iscove's Modified Dulbecco's medium	3.024	Yes
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	3.7	Yes

## Composizione di un tipico terreno di coltura per cellule di Mammifero

Aminoacidi	Vitamine	Sali	Componenti vari	Proteine (necessarie nei mezzi privi di siero chimicamente definiti)
arginina cisteina fenilalanina glutammina isoleucina istidina leucina lisina metionina tirosina treonina triptofano valina	biotina colina acido folico inositolo nicotinamide pantotenato piridossale riboflavina tiamina	NaCl KCl $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ $\text{NaHCO}_3$ $\text{CaCl}_2$ $\text{MgCl}_2$	glucosio penicillina streptomina rosso fenolo siero intero	insulina transferrina fattori di crescita

- Il **glucosio** è usato in concentrazioni da 5 a 10 mM
- Gli **aa sono tutti in forma L** e di solito a concentrazione 0,1-0,2 mM
- Le vitamine usate a concentrazione di circa 1uM
- Il siero (spesso di vitello o cavallo) da 2 a 10%
- Antibiotici (penicillina, streptomina)
- Rosso fenolo (indicatore pH)

(Alberts, 1991)

# L-glutamina (L-glu)

La **GLUTAMINA** è una delle **fonti principali di carbonio** per molte cellule in coltura, dato che non solo fornisce precursori per le biosintesi e per la sintesi proteica, ma, insieme al glucosio e al piruvato, è una **fonte energetica** attraverso il ciclo di Krebs.

**E' assolutamente necessaria alla crescita cellulare, ma non è stabile:** a 4°C si degrada completamente in breve tempo

**Viene addizionata al terreno poco prima dell'uso in modo da avere una concentrazione finale [2mM], conservando il terreno a +4°C fino al momento dell'uso**

-Soluzione sterile già pronta [200 mM].

-Si può preparare dalla polvere e stoccare in aliquote a -20°C

**Esistono oggi in commercio terreni contenenti glutamina stabilizzata, sotto forma di un tripeptide.**

# Basic Constituents of media

- Inorganic salts
- Carbohydrates
- Amino Acids
- Vitamins
  
- Phenol red
  
- Fatty acids and lipids
- Proteins and peptides

**SERUM (10%)\***



\*(range 2-10%)

# Inorganic Salts

## ***Functions:***

- ***retain the osmotic balance of the cells***
- ***buffer***
- ***help regulate membrane potential by provision of sodium, potassium and calcium ions.***
- ***are required in the cell matrix for cell attachment ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ) and as enzyme cofactors.***

# Carbohydrates

- ***The main source of energy***
- The major sugars used are **glucose** and galactose however some media contain maltose or fructose.
- The **concentration of sugar** varies from basal media containing **1g/l to 4.5g/l** in some more complex media.
- Media containing the ***higher concentration of sugars are able to support the growth of a wider range of cell types.***



# Vitamins

- Many media are enriched with vitamins
- Vitamins are precursors for numerous co-factors.
- Many vitamins ***especially B group vitamins*** are ***necessary for cell growth and proliferation*** and for some lines the presence of B12 is essential.
- Some media also have increased levels of *vitamins A and E*.
- The vitamins commonly used in media include **riboflavin, thiamine and biotin**.

***SERUM is an important source of vitamins in cell culture***

# Proteins and Peptides

- Particularly **important in serum free media**
- The most common proteins and peptides include **albumin, transferrin, fibronectin and fetuin** and are used to replace those added with serum

***PROTEIN are normally present in culture media through the addition of SERUM to the medium***

# Fatty Acids and Lipids

- Like proteins and peptides these are **important in serum free media**

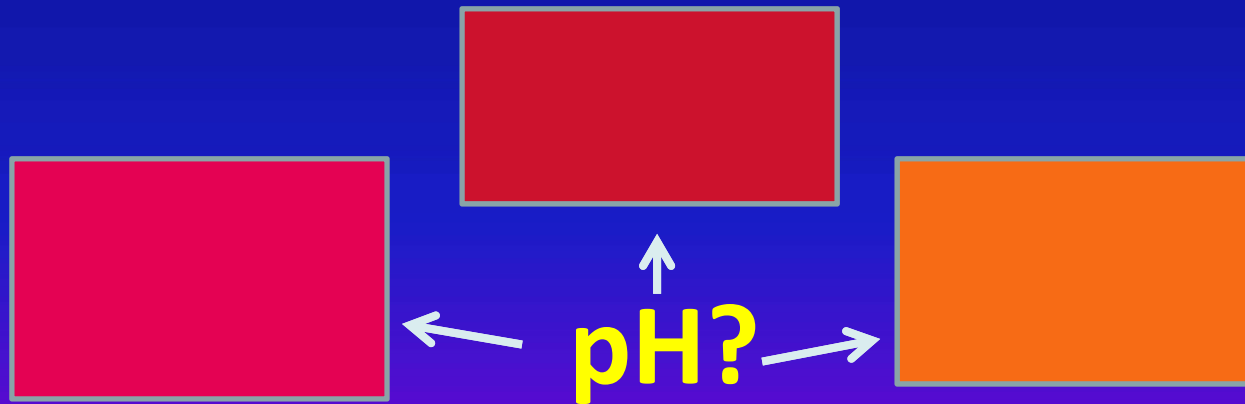
*e.g. cholesterol and steroids essential for specialized cells.*

***Fatty acids and lipids are normally present in serum***

# Trace Elements

- Such as **zinc, copper, selenium and tricarboxylic acid intermediates**
- ***Selenium*** is a detoxifier and helps remove oxygen free radicals.

Most commercial culture media include **PHENOL RED** as a pH indicator so that the pH status of the medium is constantly indicated by the colour.



# Rosso fenolo

Per avere un **indicazione visiva del pH**, i terreni vengono addizionati di rosso fenolo, un **indicatore di pH** che ha:

- colore rosso a pH 7.2÷7.4
- vira al giallo-arancio a pH acido
- vira al rosso-viola a pH alcalino.

***Whilst all media may be made from the basic ingredients this is time consuming and may predispose to contamination***

➤ For convenience most media are available as ready mixed **powders** or as 10x and 1x **liquid media**.

*If powder or 10x media are purchased it is essential that the **water** used to reconstitute the powder or dilute the concentrated liquid is **free from mineral, organic and microbial contaminants** (also **pyrogen free**)*

*In most cases water prepared by reverse osmosis and resin cartridge purification with a final resistance of 16-18Mx is suitable.*

➤ **Once prepared the media should be **filter sterilized before use**.** Obviously purchasing 1x liquid media eliminates the need for this.

# Serum

**Complex mix of: growth factors and adhesion factors, hormones, transporters (i.e. albumin), trace elements.**

## **ADVANTAGES**

- **ONE OF THE MOST IMPORTANT COMPONENTS OF CELL CULTURE MEDIUM: (5-20%)**
- **The most commonly used serum is foetal bovine serum**  
(others: newborn calf serum, horse serum, human serum)
- **Serum is also able to increase the buffering capacity of cultures**
- **It also helps to protect against mechanical damage**
- **A further advantage of serum is the wide range cell types with serum is able to bind and neutralize toxins**

**Possible heat inactivation of serum**  
(at 56°C for 30 minutes)



# Serum

## DISADVANTAGES

- Serum is subject to **batch-batch variation** that makes standardization of production protocols difficult!!!!
- There is also a **risk of contamination** associated with the use of serum.
- **Cost** implication

*You must screen **BATCHES OF SERUM** for their ability to support the growth of cells!*

# *Origin of Serum*

- **USA/Canada, New Zealand, Finland and Denmark** - No safety testing required.
- **Australia, Mexico, Central America** - Safety testing may be required, depending on the geographical region where the serum was collected.

Terreni di coltura che non richiedono  
l'aggiunta di siero sono detti  
**DEFINITI** o **SINTETICI**



**CONTENGONO  
FATTORI DI CRESCITA  
PURIFICATI**

# Esempi di terreni di coltura a cui viene aggiunto il siero

- **MEM** (Eagle's Minimum Essential Medium):  
per coltura in monostrato di molti tipi cellulari
- **DMEM** (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)  
per colture primarie di cellule di topo e pollo
- **F10 e F12 di Ham**  
per colture primarie di cellule differenziate di varie specie (ratti, conigli, polli)
- **Terreno di Fischer**  
per la crescita di cellule leucemiche di topo in sospensione
- **L-15 di Leibovitz**  
per la crescita di cellule senza immissione di CO<sub>2</sub> nell'incubatore
- **Terreni MCDB**  
per la crescita clonale di fibroblasti o cellule simili a fibroblasti di diverse specie di mammiferi; ottimizzati minore aggiunta di siero

## Different types of culture medium and their uses

Media type	<i>Examples</i>	Uses
<b>Basal media</b>	MEM	<b>Primary cultures.</b>
	DMEM	Modification of MEM containing increased level of amino acids and vitamins. Supports a wide range of cell types including hybridomas.
	GMEM	Glasgows modified MEM was defined for BHK-21 cells
<b>Complex media</b>		Originally derived for human leukaemic cells.
	RPMI 1640	It supports a wide range of mammalian cells including hybridomas
	Iscoves DMEM	Further enriched modification of DMEM which supports high density growth
	Leibovitz L-15	<b>Designed for CO<sub>2</sub> free environments</b>
	TCM 199	Oocytes culture and IVF

# Different types of culture medium and their uses

## Serum Free Media

CHO

For use in serum free applications.

Ham F10 and derivatives

Ham F12  
DMEM/F12

NOTE: These media must be supplemented with other factors such as insulin, transferrin and epidermal growth factor.  
These media are usually HEPES buffered

## Insect cells

Sf-900 II SFM, SF Insect-Medium-2

Specifically designed for use with Sf9 insect cells

## Alcuni esempi di linee cellulari e il terreno indicato per la loro coltura

Mammalian Cell Culture				
Cell Line	Cell Type	Species	Tissue	Medium*
293	fibroblast	human	embryonic kidney	MEM and 10% FBS
3T6	fibroblast	mouse	embryo	DMEM, 10% FBS
A549	epithelial	human	lung carcinoma	F-12K, 10% FBS
A9	fibroblast	mouse	connective tissue	DMEM, 10% FBS
AtT-20	epithelial	mouse	pituitary tumor	F-10, 15% horse serum, and 2.5% FBS
BALB/3T3	fibroblast	mouse	embryo	DMEM, 10% FBS
BHK-21	fibroblast	hamster	kidney	GMEM, 10% FBS, or MEM, 10% FBS, and NEAA
BHL-100	epithelial	human	breast	McCoy's 5A, 10% FBS
BT	fibroblast	bovine	turbinate cells	MEM, 10% FBS, and NEAA
Caco-2	epithelial	human	colon adeno carcinoma	MEM, 20% FBS, and NEAA
Chang	epithelial	human	liver	BME, 10% calf serum
CHO-K1	epithelial	hamster	ovary	F-12, 10% FBS
Clone 9	epithelial	rat	liver	F-12K, 10% FBS
Clone M-3	epithelial	mouse	melanoma	F-10, 15% horse serum, and 2.5% FBS
COS-1, COS-3, COS-7	fibroblast	monkey	kidney	DMEM, 10% FBS
CRFK	epithelial	cat	kidney	MEM, 10% FBS, and NEAA
CV-1	fibroblast	monkey	kidney	MEM, 10% FBS
D-17	epithelial	dog	osteosarcoma	MEM, 10% FBS, and NEAA
Daudi	lymphoblast	human	blood from a lymphoma patient	RPMI-1640, 10% FBS
GH1, GH3	epithelial	rat	pituitary tumor	F-10, 15% horse serum, and 2.5% FBS

\* **BME:** Basal Medium Eagle; **DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium; **FBS:** Fetal Bovine Serum; **GMEM:** Glasgow Minimum Essential Medium; **IMDM:** Iscove's Modified Dulbecco's Medium; **MEM:** Minimum Essential Medium; **NEAA:** Non-Essential Amino Acids Solution.