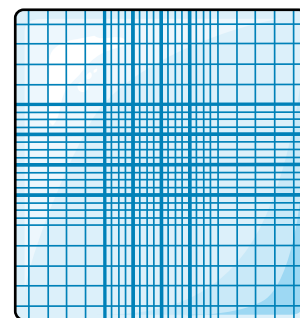
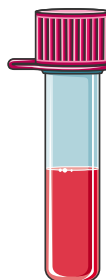
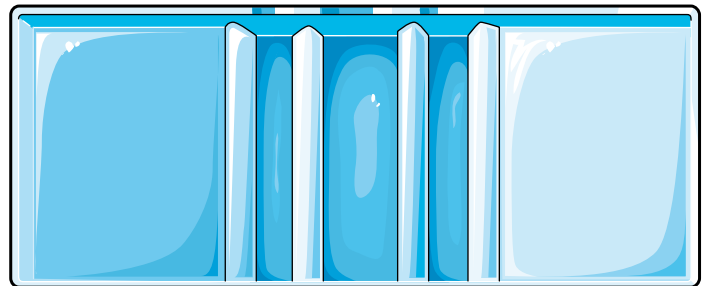
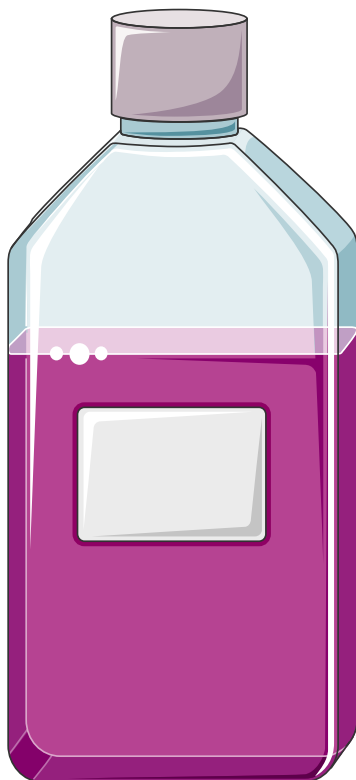


BIOTECHNOLOGIE – BACHELOR

ZELLEN IN KULTUR NEHMEN MEDIEN, AUFTAUEN, ZELLZAHL

PRAKTIKUM ZELLKULTUR



VERSUCH – ZELLEN IN KULTUR NEHMEN

- » Herstellung von Zellkulturmedien: DMEM für epitheliale Zellen
- » Auftauen der epithelialen Tumorzelllinie HeLa
- » Zellzahlbestimmung mittels Hämazytometer (Neubauer Zählkammer)

Ziel:	<ul style="list-style-type: none">- Herstellung von Zellkulturmedien- Auftauen von Zellen- Zellzahlbestimmung
-------	---

HERSTELLUNG VON ZELLKULTURMEDIEN

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ist eines der meist verwendeten Zellkulturmedien geworden. Es handelt sich dabei um eine Modifizierung des Basal- und Minimalmediums nach Eagle (BME), wobei eine bis zu vierfache Konzentration von Aminosäuren und Vitaminen sowie noch andere Zusatzkomponenten darin enthalten sind. Der NaHCO_3 -Gehalt ist 1,7-fach höher, sodass für dieses Medium mit hoher Pufferkapazität ein CO_2 -Inkubator auf jeden Fall notwendig ist. Es wird hauptsächlich für epitheliale Zellen eingesetzt.

Die Anpassung an den individuellen Nährstoffbedarf muss flexibel gehandhabt und optimiert werden.

Für optimale Ergebnisse der im Praktikum verwendeten Zelllinien ergänzen Sie das Basalmedium mit L-Glutamin, Na-Pyruvat, nicht essentiellen Aminosäuren sowie fötalem Kälberserum (FBS). FBS ist ein weit verbreiteter Zusatz in Zellkulturmedien, bringt jedoch ethische, wirtschaftliche und anwendungsbezogene Probleme mit sich. Daher werden zunehmend Serumalternativen, wie humanes Serum, eingesetzt, welches durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen von plättchenreichem humanem Blutplasma hergestellt wird. Dadurch werden thrombozytäre Wachstumsfaktoren wie EGF, IGF-1, PDGF (engl. platelet-derived growth factor) u.a. aus den Blutplättchen freigesetzt, die ähnlich wie die in FBS enthaltenen Faktoren eine stark proliferationsfördernde Wirkung besitzen. Humanes Plättchenlysat zeigt ein ähnlich gutes Wachstumsverhalten bei HeLa-Zellen und wird daher auch als FBS-Alternative im Praktikum eingesetzt.

GERÄTE

- » Medienbehältnis (leere Glasflasche 250 ml), steril
- » Pipettierhilfe
- » Serologische Pipetten
- » Sterile Werkbänke
- » Zentrifuge
- » Mikroskop
- » Kühlschrank, 4 °C
- » Wasserbad, 37 °C

REAGENZIEN

- » DMEM Flüssigmedium high Glucose, steril
- » FBS (*fetal bovine serum*), steril bzw. humanes Plättchenlysat (Endkonzentration 2%)
- » L-Glutamin (200 mM), steril
- » 2,5 ml NEA (nicht essentielle Aminosäuren, 100 ×), steril
- » 2,5 ml Na-Pyruvat (100 mM), steril

Medienzusatz	Volumen	Endkonzentration ca.
DMEM	230 ml	
FBS	12,5 ml	5 Vol.-%
L-Glut	2,5 ml	2 mM
NEA	2,5 ml	1 ×
NaPyr	2,5 ml	1 mM

DURCHFÜHRUNG

1. Medium und Zusätze im Wasserbad bei 37 °C auftauen/vorwärmen
2. Sterile Werkbank vorbereiten, steriles Medienbehältnis bereitstellen
3. Medium und Zusätze mit Isopropanol abwischen
Zusätze werden dem Basalmedium zupipettiert und danach vorsichtig mit der Pipette vermischt
4. Flasche mit Namenskürzel, Datum und den Zusatzstoffen oder „komplett“ beschriften.
Dokumentation der Einsatzstoffe (z. B. FBS Hersteller, Charge und Lot; RPMI Hersteller, Charge und Lot etc.). Siehe Aufschrift der Röhren und Laborbuch
5. Medium-/Sterilkontrolle:
5 ml fertiges und homogenisiertes Medium in eine T25-Flasche überführen und bei 37 °C im Inkubator inkubieren

6. Das Medium vor Gebrauch immer auf 37 °C im Wasserbad temperieren
Lagerung bei 4 °C im Kühlschrank

AUFTAUEN VON ZELLEN

Beispiel: adhärenente epitheliale Tumorzelllinie HeLa

Werden Zelllinien nicht permanent benutzt, so kann man diese auch über längere Zeit in flüssigem Stickstoff bei – 196 °C lagern. Diese Lagerung bewahrt die Zellen vor Variabilität durch Subkultivierung. Die Kryobiologie hat herausgefunden, dass unterhalb von – 130 °C keinerlei biochemische Reaktionen mehr stattfinden. Eine Zwischenlagerung der Zellen bei – 80 °C soll nur für kurze Zeit durchgeführt werden.

Bei der Kryokonservierung dienen Glycerin und vor allem DMSO (Dimethylsulfoxid) als Schutzsubstanzen (Kryoprotektiva). Sie reduzieren die Eiskristallbildung innerhalb und außerhalb der Zelle, sowie die partielle Dehydratation des Zytoplasmas, indem sie das Zellwasser verdrängen und binden. Serum kann ebenfalls einen günstigen und schützenden Effekt auf die Zellen haben.

Beim Auftauen ist es nun wichtig, die Zellen an die Kulturbedingungen zu adaptieren. Neben dem Temperaturschock ändern sich hierbei auch innerhalb kürzester Zeit die osmotischen Verhältnisse. Zudem sind die Schutzsubstanzen Glycerin und DMSO in den eingesetzten Konzentrationen bei Temperaturen über dem Gefrierpunkt toxisch für die Zellen. Daher ist es notwendig, die Zellen zügig aufzutauen und das Gefrierschutzmedium gegen frisches Medium auszutauschen.

GERÄTE

- » Wasserbad, 37 °C
- » Sterile serologische Pipetten
- » Sterile 15 ml Zentrifugenröhrchen („Falkon“)
- » Sterile Kulturgefäße (T75-Flasche)
- » Pipettierhilfe
- » Neubauer Zählkammer
- » 1,5 ml Reaktionsgefäß („Eppi“), unsteril
- » Mikroskop
- » Zentrifuge

REAGENZIEN

- » Zellen in Kryoröhrchen aus – 150 °C Gefriertruhe
- » Komplettiertes Kulturmedium, vorgewärmt

DURCHFÜHRUNG

1. Werkbank vorbereiten und alle Gebrauchsgegenstände zurechtlegen
2. 10 ml Kulturmedium in 15 ml-Zentrifugenröhrchen vorlegen
3. Kryokulturen aus der – 150 °C Gefriertruhe geben lassen
4. Kryoröhrchen unter Schwenken nur solange ins 37 °C Wasserbad halten, bis gerade das letzte kleine Eisklumpchen noch zu sehen ist
5. Den gesamten Ansatz der aufgetauten Zellen (~ 1 ml) ins Medium pipettieren
6. Zentrifugieren bei 1000 rpm, 5 Minuten
7. Überstand mit Vakuumpumpe absaugen, dazu eine Glaspasteurpipette verwenden
8. Zellpellet in 1 ml Kulturmedium resuspendieren und einen kleinen Tropfen in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml Eppi) für die Zellzählung überführen
9. Zellen zählen: Zählkammer zusammenbauen und die Zellen mit Trypanblau verdünnen
Bsp.: 10 µL Zellen + 50 µL Trypanblau (1:6)

Eine T75-Flaschen mit den Zellen ansetzen. Dazu jeweils 15 ml Medium in die T75 Flaschen vorlegen und die errechnete Menge der Zellsuspension dazugeben.

Zelldichte: HeLa 2×10^4 Zellen/cm²

10. Zellen mischen und im Inkubator bei 5 % CO₂ und 37 °C kultivieren

ZELLZAHLBESTIMMUNG MITTELS HÄMAZYTOMETER NACH NEUBAUER

Für eine gute Zellkulturpraxis ist es erforderlich, dass beim Auftauen sowie beim Passagieren von Zellen eine direkte lichtmikroskopische Bestimmung der Zellzahl mit einer Zählkammer durchgeführt und protokolliert wird. Dadurch wird zum einen verhindert, dass die Zellen zu dicht bzw. zu dünn ausgesät werden, zudem erkennt man sehr schnell, ob die Zellen im üblichen Rahmen proliferieren.

Außerdem ist es möglich, die Viabilität der Zellen durch den Einsatz eines Vitalfarbstoffes (z. B. Trypanblau) zu bestimmen. Trypanblau ist ein nicht membrangängiger Vitalfarbstoff. Nur Zellen mit zerstörter Zellmembran (tote Zellen) nehmen den Farbstoff auf, d. h. tote Zellen erscheinen unter dem Mikroskop blau (Zellproteine sind gefärbt).

GERÄTE

- » Kolbenhubpipette und Spitzen
- » Hämazytometer (Zählkammer) nach Neubauer
- » Mikroskop
- » Handzähler
- » Pipettierhilfe
- » 1,5 ml Reaktionsgefäße und/oder 96-Well-Platte

REAGENZIEN

- » Trypanblau-Lösung
- » Aliquot einer Zellsuspension
- » evtl. PBS

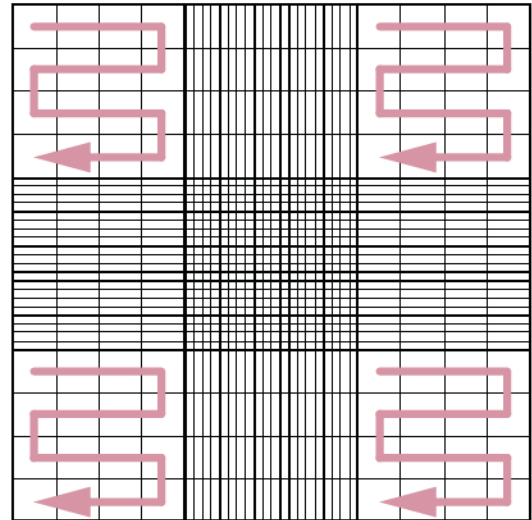
DURCHFÜHRUNG

- 1.** Zellsuspension mit Trypanblau verdünnen und gut resuspendieren
z. B. 1 Teil Zellsuspension + 1 Teil Trypanblau = Verdünnung 1 : 2
Die Verdünnung sollte so gewählt werden, dass zwischen 20 und 100 Zellen pro Großquadrat, also pro $0,1 \mu\text{l}$ zu zählen sind.
- 2.** Die Oberfläche sowie das dazugehörige Deckglas der Zählkammer mit Isopropanol gut reinigen und trocknen.
(Sind alle Zellen tot, war noch Isopropanol in der Zählkammer.)
- 3.** Deckglas leicht anfeuchten und auf die beiden Stege des Hämazytometers andrücken, bis auf den Stegen die Newton´schen Ringe sichtbar sind
Vorsicht: Bruchgefahr des Deckglases !!!
- 4.** „Gefärbte“ Zellsuspension in die Zählkammer füllen (Pipette auf $10 \mu\text{l}$ stellen).
Dies geschieht durch Ansetzen der Pipette an die Kante der Zählkammer, wobei die Kapillarkraft die Suspension selbst in den Zwischenraum zwischen Deckglas und Kammer saugt. Die Kammer auf keinen Fall über- bzw. unterfüllen, da die Oberflächenspannung das Volumen der Zählkammer verändern kann.
- 5.** Sind Luftblasen sichtbar oder ist die Flüssigkeit über die Ränder der Rinnen übergequollen, so muss die Kammer gereinigt und erneut beschickt werden
- 6.** Die befüllte Kammer unter das Mikroskop legen und fokussieren
- 7.** Die Neubauerkammer besteht aus neun großen Quadraten. Ein Großquadrat sollte im Sichtfeld des $10\times$ Objektivs komplett zu sehen sein (siehe nächste Seite).
- 8.** Unter dem Mikroskop Zellen im Hämazytometer auszählen (10–100 Zellen pro Großquadrat), am besten alle 16 Kleinquadrate (siehe nächste Seite). Zählkammer und Deckgläschen (nicht wegwerfen) nach Gebrauch mit Leitungswasser spülen.
- 9.** Berechnung der Zellzahl pro ml:
$$\text{Zellzahl in 16 Kleinquadraten} \times \text{Verdünnung mit Trypanblau} \times 10^4 \text{ Zellen/ml}$$

AUSZÄHLSHEMA

Es sollten alle 64 Kleinquadrate (4 Großquadrate mit je 16 Kleinquadraten) nach dem rechts mit Pfeilen markierten Schema ausgezählt werden.

Zu achten ist dabei, dass Zellen, die auf den Linien liegen nicht zweimal gezählt werden. Dies kann verhindert werden, indem nur Zellen mitgezählt werden, die oben und links vom Betrachter auf den Linien liegen (siehe unten).



Sichtfeld unter dem Inversmikroskop mit 10x Objektiv

- grau Zählfeld (1 Großquadrat)
- orange lebende Zellen
- blau tote Zellen

