

Cutting edge Zellkultur - Grundkurs



**Dir. DD. Heger Experimentelle Neurologie,
Leiter: Prof. Dr. U. Wang**

Zellkultur - Grundkurs



1. Arten der Zellkulturen
 - a) Einteilung nach Ursprung
 - b) Einteilung nach Art des Wachstums
2. Zellkulturmedium
 - 2.1. Grundmedien
 - 2.2. Zusätze
3. Zellkultur - Protokolle
 - 3.1. Füttern/Mediumwechsel
 - 3.2. Passagieren
 - 3.3. Kryokonservierung
4. Kontaminationen

1. Arten der Zellkulturen

a) Einteilung nach Ursprung

Zelllinien

ZB. RAW 267.4; L929; HeLa; PC12

Transformiert

spontan (Tumor) oder
durch Transfektion mit Virus
bzw. Virus DNA

Hohe Anzahl von Passagen (>70)

Charakterisierung meist konstant

Differenzierung meist niedrig

Vorteile: keine Präparationen

konstante Merkmale und
Qualität

grosse Mengen möglich

Primäre Zellkulturen

z.B. Endothel (HUVEC), Glia,
Fibroblasten, Makrophagen,
Präparation aus frischem Gewebe
(Tierverbrauch)

Wenig oder gar keine Passagen

Charakterisierung erforderlich

Differenzierung hoch

viele Präparationen notwendig

Qualität von Präp. zu Präp.

Möglicherweise verschieden, aber **gutes
Protokoll sichert konstante Qualität**

1. Arten der Zellkulturen

b) Einteilung nach Art des Wachstums

adherent

Monolayer

Kulturgefäss oder beads

Meist ectodermal od. endodermal
Ursprungs

Morphologie – Beurteilung

Hybridisierungstechniken

Funktionelle assays

Adhäsionsfaktoren

Suspension

Als Suspension im Medium

Blutzellen, Knochenmark, unreife Zellen
(Stammzellen)

Grosse Zellzahl

Leicht zu ernten

Morphologie nicht od. nur eingeschränkt
möglich

**abhängig vom: Ursprung
Kulturbedingungen**

2. Zellkulturmedium

2.1. Grundmedien

MEM, DMEM, RPMI, HAM's

Bicarbonat gepufferte Salzlösung mit Vitaminen und Aminosäuren

Kommerziell als Lösung (1 x Lösung, 10 x Konzentrat, Pulver)

Genaue Zusammensetzung: www.seraglob.com

Bicarbonat

Phenolrot

Glucose

Endotoxin

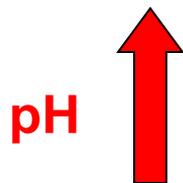


2. Zellkulturmedium

2.1. Grundmedien

Bicarbonat: Verhältnis von Bicarbonat und CO₂ bestimmt den pH-Wert des Mediums – Nomogramm

NaHCO ₃	CO ₂	pH	CO ₂	pH
2,0 mg/ml	5%	7,4		
3,7 mg/ml	10%	7,4	5%	7,7
1,2 mg/ml	3,1%	7,4	5%	7,2



Bearbeitung der Zellkultur an der Raumluft (>> 8)
häufiges Öffnen des Inkubators
altes Medium

Zugabe von HEPES (10mM) stabilisiert im sauren Bereich

2. Zellkulturmedium

2.1. Grundmedien

Phenolrot: pH - Indikator

Zitronengelb	< 6,5
Gelb	6,5
Orange	7,0
Rot	7,4
Pink	7,6
Violett	7,8

Gelbes Medium:

Kultur ist überwachsen
Bakterielle Kontamination
Zuviel CO₂ im Inkubator

Violettes Medium:

Kultur wächst nicht
Kontamination mit Pilzen oder Hefen
Zuwenig CO₂ im Inkubator

2. Zellkulturmedium



2.1. Grundmedien

Glucose: meist 1g/l (= 5,5 mM)
high Glucose Varianten 4,5 g/l (= 25 mM)

Zellen kommen mit 0,2 mM lange aus!

Na-Pyruvat z.T. als zusätzliche Energiequelle

Galactose: langsamer verstoffwechselt verhindert Akkumulation von Milchsäure und damit Veränderung des pH

2. Zellkulturmedium



2.1. Grundmedien

Endotoxin: wichtig für immunologische Untersuchungen
Grundaktivierung
VLE (very low endotoxin) Medien

2. Zellkulturmedien

2.2. Zusätze

Serum



- ✦ Fötales bovines Serum (FBS); Synonyme: FCS, FKS)
(aber auch Pferd, Schwein, Kaninchen, Mensch...)
- ✦ Supplement als Mischung aus: Serumproteinen
Wachstumsfaktoren, Hormonen usw.
- ✦ Variationen in Zusammensetzung nach Spezies, Herkunft,
Ernährungssituation, Entnahmebedingungen
standardisiertes Serum (FCS Gold) von Seraglob.com
synthetische Supplemente (SES, B27)
- ✦ Hitzeinaktivierung (56°C oder 65°C, 30 min)
- ✦ Chargentestung (entfällt bei Produkt S 0615)

2. Zellkulturmedien

2.2. Zusätze

Serum



Chargentestung

Testung immer gegen die gerade verwendete Charge

Medium mit unterschiedlichen Chargen Serum

Zelllinien ca. 1 Woche adaptieren,

Primäre Zellkulturpräparation

Proliferationsassays oder eigene Standardassays

2. Zellkulturmedien

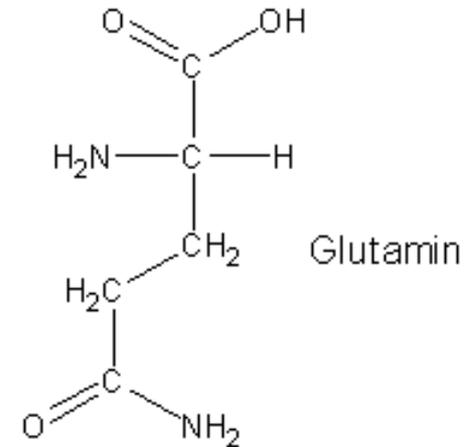
2.2. Zusätze

L-Glutamin

Instabil in wässrigen Lösungen

Zyklisierung \longrightarrow Ammoniak

Ersatz: Glutaminhaltige Dipeptide
aber nicht für alle Zellen möglich



2. Zellkulturmedien

2.2. Zusätze

Antibiotika

kurze Halbwertszeit (2-3 Tage)

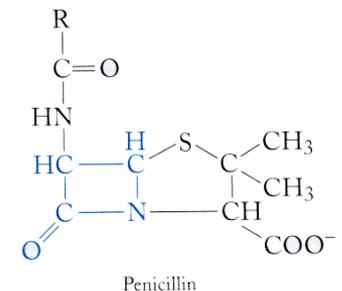
Toxisch in hohen Konzentrationen

Wirkungsweise:

- ✘ Hemmung der Zellwandsynthese, Auflösen der Zellwand
- ✘ Störung der Permeabilität der Zellwand
- ✘ Proteinsynthese Hemmung
- ✘ Nukleinsäuresynthesehemmung

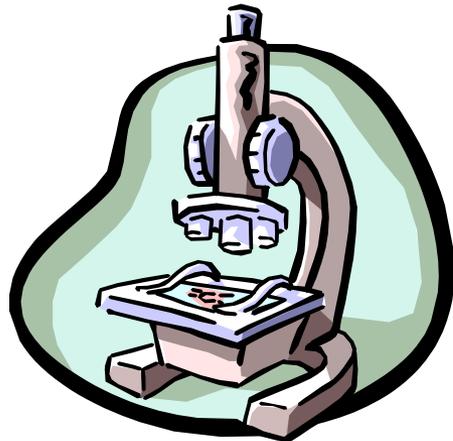
Penicillin (100u/ml) / Streptomycin (100 µg/ml)

Gentamycin (50 µg/ml)



3. Zellkultur - Protokolle

- 3.1. Füttern
- 3.2. Passagieren
- 3.3. Einfrieren

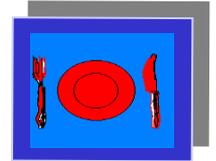


Prüfe die Zellen – immer!

Zelldichte
Morphologie
Adhärens
Kontamination

3. Zellkultur - Protokolle

3.1. Füttern/Mediumwechsel

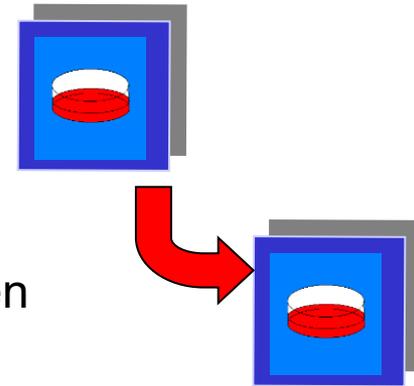


- Warum?:** Verbrauch der Nährstoffe
Stoffwechselendprodukte
Halbwertszeit Antibiotika
- Wann?:** 1 - 2 x pro Woche
24 h – 48 h nach Präparation bzw. Auftauen
konstanter Zeitabstand zum Experiment!
- Wie?:** Medium erwärmen - **nicht zu lang!!!!**
Kompletter Mediumwechsel, ggf. Waschen
(insbesondere nach Auftauen, Präparation)

Konditionierung des Mediums → Teilmediumwechsel

3. Zellkultur - Protokolle

3.2. Passagieren/Splitten/Trypsinieren



Warum?: 24 h Verdopplungsrate für die meisten Linien
Kulturgefäß „voll“, Monolayer
Wachstumsstopp, bzw. Ablösen und Zelltod

Wann?: 1 - 2 x pro Woche
konstanter Zeitabstand zum Experiment!

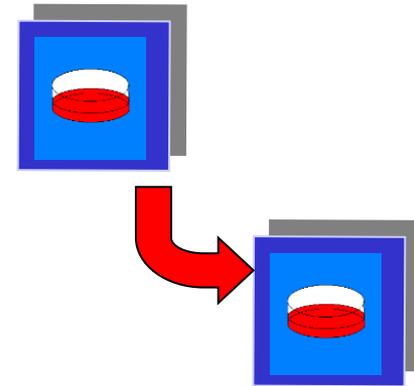
Wie?:

3. Zellkultur-Protokolle

3.2. Passagieren/Splitten/Trypsinieren

Wie?

1. Medium absaugen
2. Waschen mit PBS ohne Ca^{++} Mg^{++}
3. Trypsin EDTA Lösung zugeben
Temperatur, Volumen, Viralex-Trypsin/EDTA
ggf. vorher mit PBS w/o inkubieren (5-10 min)
4. 5 min im Inkubator
5. Zugabe von Medium, Vereinzeln der Zellen durch Pipettieren und Überführen in Zentrifugationsgefäß
6. Zentrifugation (Zellen im Pellet hypoxisch)
7. Pellet in definiertem Volumen Medium resuspendieren
8. Entsprechende Menge der Zellsuspension in neues Kulturgefäß überführen , ggf. Zellzählung



3. Zellkultur - Protokolle

3.3. Kryokonservierung in flüssigem N₂



nur für Zelllinien

Passage so niedrig wie möglich

nur in Kryotubes!

Zellkultur in Logphase - nur gesunde Zellen

4×10^6 – 2×10^7 Zellen in 1ml / Röhrchen

Medium: Wachstumsmedium
 + 20% FKS
 + 10% DMSO (Glycerol)
 (90 % FKS, 10 % DMSO)

DMSO toxisch – Zellen erst in Medium bzw. FKS resuspendieren dann
DMSO dazu. Oder als Alternative DMSO Frei **L 1204**
SeraFreeze freezing reagent for cell culture, w/o: DMSO

3. Zellkultur-Protokolle

3.3. Kryokonservierung in flüssigem N₂



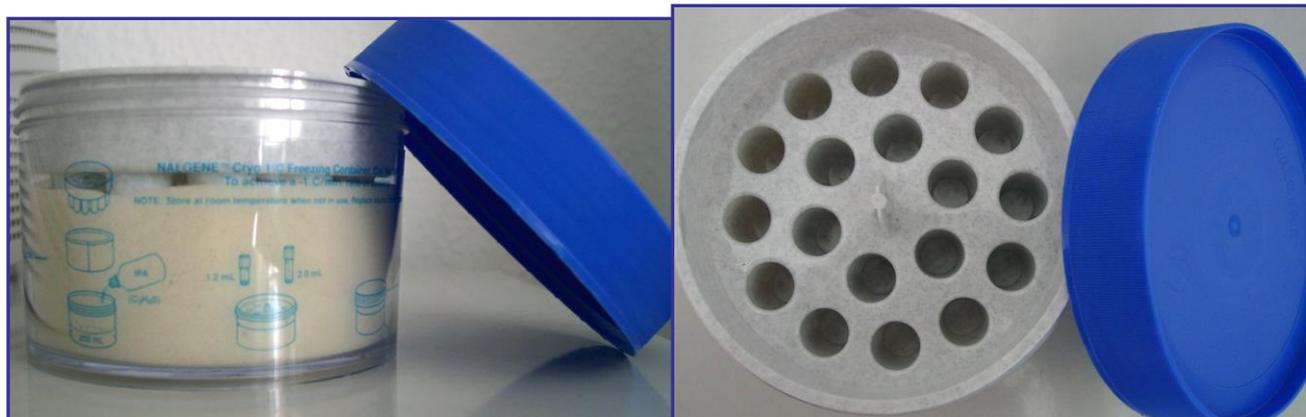
[1 h -20°C]

Über Nacht -80°C

N₂ (-176°C)

Transport auf Trockeneis – 78.5°C!

Optimal Einfrierautomat (-1° - -3° / h)



Cryo freezing
Container

-1°C/h

3. Zellkultur - Protokolle

3.3. Kryokonservierung in flüssigem N₂



Auftauen

rasch erwärmen

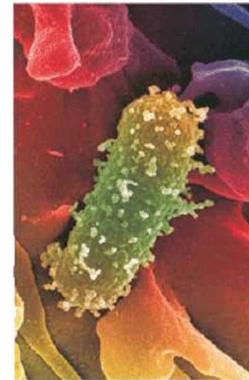
Überführen der Suspension in 20 ml Wachstumsmedium

Zentrifugation

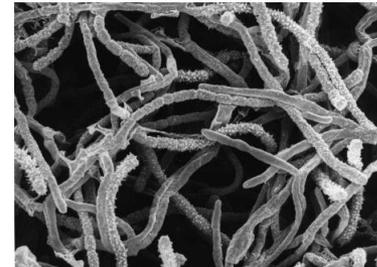
Aussaat – etwa doppelte Dichte

4. Kontaminationen

Mit .
Bakterien
Hefen
Pilzen
Mykoplasmen
anderen Zellen



Möglichst frühzeitig entdecken



4. Kontaminationen

4.1. Detektion

Makroskopisch

Trübung des Mediums
Farbe des Mediums
Geruch

Mikroskopisch

Hefen, Pilze, Bakterien
Regelmässige Struktur
Bewegung – (Ausschluss
Brownschen Molekularbewegung)
Zustand der Zellen

Mikrobiologisch

Aliquot des Mediums:

- ▶ inkubieren oder
- ▶ abzentrifugieren
 - auf Agar austreichen
 - auf Objektträger austreichen, lufttrocknen/fixieren, Färbung

4. Kontaminationen



4.2. Mykoplasmenkontaminationen

Erkennen

Extrem schwierig

Grösse ca. 0,3 μm – Mikroskopisch nicht detektierbar

Keine Zellwand – Antibiotika meist nicht wirksam

Entdeckung meist erst

- wenn Zellen nicht mehr gut wachsen

- wenn Experimente nicht mehr funktionieren

Fluoreszenzfärbung ZB mit Hoechst etc. (1 $\mu\text{g/ml}$), interkaliert mit doppelsträngiger DNA, Färbung ausserhalb der Zellen

DNA apoptotischer Zellen färbt sich auch!

PCR mit mykoplasmenspezifischen Primern

4. Kontaminationen



4.2. Mykoplasmenkontaminationen

Vermeiden

mykoplasmenfreie Medien und Zusätze

Zelllinien kaufen

Vorsicht bei Zellkulturen aus anderen Laboren

Neue Zelllinien

- Mykoplasmascreening

- strikte Trennung des Handlings

- nur mykoplasmenfreie Kulturen einfrieren

Kontaminierte Kulturen entfernen

Alle dafür benutzten Lösungen entfernen