

Praktikum Zellkulturtechniken

Wintersemester 2008/2009

Georg Kretzschmar + Oliver Zierau

Institut für Zoologie

Lehrstuhl für Molekulare Zellphysiologie und Endokrinologie

TU Dresden

Einführung in die Zellkultur

1. Routinemethoden der Zellkultivierung	3
1.1 Ansetzen einer Zellkultur aus gefrorenen Zellen	3
1.2 Medienwechsel bei adhärenenten Zellen	3
1.3 Medienwechsel bei Suspensionskulturen	3
1.4 Trypsinieren	3
1.5 Ablösen der Zellen mit einem Zellschaber	3
1.6 Zellen zählen mit einer Neubauer-Zählkammer (Hämozytometer)	3
1.7 Zellen einfrieren	4
1.8 Überprüfung der Zellvitalität mit Trypanblau	4
2. Kontaminationen	5
3. Morphologie der Zellen bei verschiedenen Kulturbedingungen	6
4. Herstellung einer Primärzellkultur	7
4.1 Primärkultur aus Rattenleber und Rattenlunge	7
4.2 Primärkultur aus Rattenmilz	7
4.3 Primärkultur aus Rattenknochen	7
4.4 Primärkultur aus der Peritonealflüssigkeit	8
4.5 Primärkultur aus einer humanen Nabelschnur	8
5. Vergleich unterschiedlicher Zelllinien	9
6. Crystal Violet Assay zur Bestimmung der Zellproliferation	10
7. Rezepte für die benutzten Lösungen	11

1. Routinemethoden der Zellkultivierung

Zell- und Gewebekulturen wurden schon seit Anfang des 20igsten Jahrhunderts entwickelt, hauptsächlich in Form von Gewebestückchen, aus denen Zellen auswanderten. Ab den 40iger Jahren wurden Zelllinien aus Primärkulturen und später aus Tumoren entwickelt. Untersuchungen an Zellkulturen haben eine Reihe von Vorteilen gegenüber Tierversuchen, z.B. eine bessere Kontrolle des Kulturmilieus, die Homogenität der Probe und die geringeren Kosten. Natürlich kann die Zellkultur Tierversuche nicht vollständig ersetzen, da charakteristische zelluläre Wechselwirkungen der Gewebe verloren gehen und auch die Umweltbedingungen *in vitro* nicht vergleichbar sind mit den *in vivo*-Bedingungen.

Lösungen:

- DMEM mit 10% FKS
- Trypsin/EDTA-Lösung
- PBS
- Einfriermedium
- Trypanblau-Lösung

1.1 Ansetzen einer Zellkultur aus gefrorenen Zellen

In eine 75 cm² Kulturflasche werden 10 ml Kulturmedium vorgelegt. Das Cryoröhrchen mit den Zellen sollte möglichst schnell, d.h. unter fließendem warmem Wasser, aufgetaut werden und der Inhalt sofort in ein Zentrifugenröhrchen mit 5 ml Medium überführen. Danach zentrifugieren bei 900 U für 5 min und den Überstand abkippen. Dabei wird das im Einfriermedium enthaltene zytotoxische DMSO entfernt. Das Pellet in 5 ml Kulturmedium resuspendieren und in die Kulturflasche überführen. Nach Beschriften der Kulturflasche wird diese in den Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ gelegt.

1.2 Medienwechsel bei adhärenenten Zellen

Das verbrauchte Medium wird mit einer Pipette aus der Flasche abgezogen und verworfen. 15 ml neues Medium zugeben, dabei darauf achten, dass die Zellen nicht von der Flaschenwand abgespült werden.

Wenn sehr viele tote Zellen in der Flasche sind oder ein verändertes Medium verwendet werden soll, wird nach der Entnahme des verbrauchten Mediums zusätzlich mit 5 ml PBS gespült.

1.3 Medienwechsel bei Suspensionskulturen

Das verbrauchte Medium wird mit einer Pipette aus der Flasche abgezogen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Zentrifugieren bei 900 U für 5 min. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 15 ml frischem Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wieder in die Kulturflasche geben.

1.4 Trypsinieren

Zur Weitervermehrung adhärenenter Zellen müssen diese vom Boden der Flasche abgelöst werden. Üblicherweise wartet man mit der Vermehrung bis die Zellen subkonfluent gewachsen sind, d.h. es ist ein ca. 90% dichter Zellrasen unter dem Mikroskop sichtbar.

Das verbrauchte Medium in einer 75 cm² Kulturflasche wird abgenommen und die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen. Nach dem Abnehmen des PBS wird 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben und im Brutschrank einwirken lassen. Wenn sich die Zellen ablösen, d.h. eine kugelige Form annehmen, wird das Trypsin mit 2 ml Medium abgestoppt. Die Zellsuspension wird in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 900 U für 5 min zentrifugiert. Den Überstand verwerfen und mit frischem Medium resuspendieren.

1.5 Ablösen der Zellen mit einem Zellschaber

Eine weitere Methode, adhärenente Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen, ist sie mit dem Zellschaber abzukratzen. Dazu wird erst das verbrauchte Medium mit den darin schwimmenden toten Zellen entfernt und optional mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen vorsichtig mit einem Gummischaber vom Flaschenboden abgelöst und in 5 ml Medium aufgenommen.

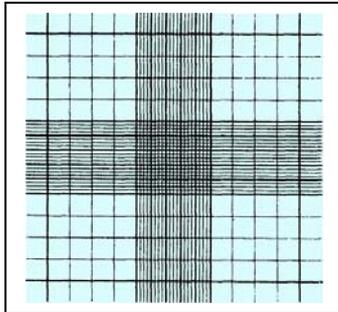
1.6 Zellen zählen mit einer Neubauer-Zählkammer (Hämozytometer)

Um die Zellen mit einer Neubauer-Kammer zu zählen, wird zuerst das Deckgläschen auf der Zählkammer durch Anhauchen befestigt (es müssen Newton'sche Ringe sichtbar sein) und auf beiden

Seiten des Mittelstegs 10 µl der gut durchmischten Zellsuspension luftblasenfrei aufgetragen, indem man die Spitze der Pipette direkt an den Rand des Deckgläschens setzt. Die Suspension verteilt sich automatisch gleichmäßig über das Zählfeld. Hier im Praktikum werden die äußeren vier 16er-Felder vollständig gezählt

Die Berechnung der Zellzahl erfolgt mit folgender Formel:

$$\text{(Zellzahl in allen 64 Feldern : 4) x 10.000 = Zellzahl pro ml}$$



1.7 Zellen einfrieren

Nach dem Trypsinieren der Zellen werden diese in 1ml Einfriermedium aufgenommen und so schnell wie möglich in einen -80°C Gefrierschrank gebracht. Falls vorhanden sollte eine Einfrierbox benutzt werden, die ein gleichmäßiges Abkühlen von 1°C pro Minute ermöglicht. Nach 24 Stunden können die Zellen dann in flüssigen Stickstoff überführt werden.

1.8 Überprüfung der Zellvitalität mit Trypanblau

Die Trypanblau-Färbung ist eine Routineuntersuchung zur Beurteilung der Lebensfähigkeit von Zellen und basiert auf dem Prinzip, dass bei lebenden Zellen bestimmte Farbstoffe nicht ins Zellinnere gelangen, während sich tote Zellen anfärben lassen.

0,1 ml Zellsuspension wird mit 3,6 ml PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) verdünnt und mit 2,7 ml vorgewärmter Trypanblaulösung (0,5%ig) vermischt. Den gesamten Ansatz mit der Pipette gut durchmischen und 2-5 min bei 37°C inkubieren. Nochmals durchmischen und sofort in der Zählkammer auszählen. Die lebenden Zellen sind ungefärbt, während die toten oder sterbenden Zellen angefärbt erscheinen.

Die Berechnung erfolgt nach der Formel:

$$\% \text{ lebende Zellen} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{ungefärbte Zellen} + \text{gefärbte Zellen}} \times 100$$

Da Trypanblau zytotoxisch ist, sollte zügig gearbeitet werden. Bei Mehrfachbestimmungen muss der Ansatz jeweils neu gemischt werden.

2. Kontaminationen

Bei unsterilem Arbeiten mit Zellkulturen können verschiedene Kontaminationen auftreten. Die häufigsten Kontaminationen sind Schimmelpilze, Hefen und Bakterien. Weiterhin gibt es Mykoplasmen, prokaryotische Organismen, die von einer dreilagigen Membran umgeben sind und keine Zellwand ausbilden. Die Zellen sind ultramikroskopisch klein (100-250 nm) und sehr schwer nachzuweisen. Da eine dauerhafte Beseitigung von Mykoplasmen aus der Zellkultur auch heute noch sehr schwierig ist, werden wir sie nicht freiwillig zu Demonstrationszwecken ins Labor holen...

Die meisten Kontaminationen werden durch den Menschen eingebracht, z.B. passiert es häufig, dass bei einer Erkältung Bakterien im Medium auftauchen. Da das Zellkulturmedium auch für Mikroorganismen einen optimalen Nährboden darstellt, kann eine Kontamination über Nacht die Kultur zerstören. Die Mikroorganismen verbrauchen die Nährstoffe des Mediums und schädigen die Zellen durch ausgeschiedene Metaboliten und Toxine.

Lösungen:

- DMEM ohne Antibiotika
- Hefen
- Bakterien
- Schimmel

Durchführung:

Wir werden die unterschiedlichen Kontaminationen in Antibiotika-freiem Medium durch Zugabe der entsprechenden Organismen heranziehen, sowie durch bewusst unsteriles Arbeiten erzeugen.

Aufgabe:

Fertigen Sie Zeichnungen von den drei Kontaminationsarten an und überlegen Sie, welche Möglichkeiten es gibt, Kontaminationen zu verhindern.

3. Morphologie der Zellen bei verschiedenen Kulturbedingungen

Adhärente Zellen haben unterschiedliche Ansprüche an die Oberfläche, auf der sie wachsen sollen. Die meisten Krebszelllinien sind wenig wählerisch und wachsen problemlos in normalen Zellkulturflaschen. Immortalisierte Zelllinien und Primärkulturen dagegen benötigen z.T. eine vorbehandelte Oberfläche, um zu überleben oder für Differenzierungsvorgänge.

Lösungen:

- Sterile Gelatine
- PBS
- Matrigel (Beck & Dickinson)
- Agarose
- PBS
- DMEM/F12 mit 10% FKS

Durchführung:

- a) Beschichtung des Kulturgefäß mit Gelatine
 1. 10 mg Gelatine werden in 1 ml Aqua bidest durch Erwärmen im Wasserbad auf 37°C aufgelöst und dann sterilfiltrieren.
 2. Je 200 µl der Lösung in **zwei Wells** geben, gleichmäßig verteilen und 30 min bei 37°C inkubiert.
 3. Die Lösung absaugen und die Fläche vorsichtig mit PBS spülen.
- b) Beschichtung des Kulturgefäß mit Matrigel (rekonstruierte extrazelluläre Matrix)
 1. Das Matrigel wird über Nacht im Kühlschrank aufgetaut, da die Substanz bei Erwärmung auf Raumtemperatur polymerisiert.
 2. In einer 24-well-Platte wird 200 µl Matrigel in **zwei Wells** durch leichtes Schwenken verteilt.
- c) Beschichtung des Kulturgefäß mit Agar
 1. 1 g Agarose wird in 100 ml PBS-Puffer aufgekocht und gelöst.
 2. Je 200 µl der heißen Lösung in **zwei Wells** geben und gleichmäßig verteilen. Nach dem Abkühlen mit PBS spülen.
- d) Im Praktikum verwenden wir für diesen Versuch RUCA-Zellen, eine endometriale Krebszelllinie. Die Zellen werden in einer Dichte von 20.000 Zellen pro cm² ausgesät. Insgesamt werden acht Wells mit Zellen bestückt, d.h. je zwei Wells direkt auf Plastik, zwei Mal Matrigel, zwei Mal Gelatine, zwei Mal Agarose.
Inkubieren der Zellen über 3 Tage.

Aufgabe:

Dokumentieren Sie jeden Tag das Wachstum und die Morphologie der Zellen.

4. Herstellung einer Primärzellkultur

Primärkulturen sind Zellen, Gewebe und Organe, die direkt aus dem Gewebe entnommen wurden. In der Regel stellen diese Zellkulturen höhere Ansprüche in der Versorgung und an die Handhabung, da sie an die Bedingungen der *in vitro*-Kultur nicht angepasst sind. Im Gegensatz zu Zelllinien und immortalisierten Zellen haben Primärzellen eine begrenzte Lebensdauer von ca. 50 Verdopplungszeiten, danach verändern sich die Zellen und/oder sterben ab.

4.1 Primärkultur aus Rattenleber und Rattenlunge

Lösungen:

- DMEM/F12 mit 10% FKS
- PBS
- 0,25% Trypsin/EDTA-Lösung in HBSS

Durchführung:

1. Das Gewebe wird mit einem sterilen Skalpell in möglichst kleine Stücke geschnitten und durch ein Sieb getrieben.
2. Trypsinlösung auf den Gewebebrei geben, mit einer Pipette mehrfach auf- und absaugen und ca. 15 min bei 37°C inkubieren.
3. Abstoppen des Trypsins mit Medium.
4. Zellen bei 900 U 5min zentrifugieren, Trypsinlösung verwerfen und mit frischem Medium re-suspendieren.
5. Aussähen der Zellen in eine Kulturflasche.
6. Nach ca. 24 h 3-4 Mal mit PBS waschen, um die Erythrozyten aus der Kultur zu entfernen und Mediumwechsel.

4.2 Primärkultur aus Rattenmilz

Lösungen:

- DMEM/F12 mit 10% FKS
- PBS
- 0,25% Trypsin/EDTA-Lösung in HBSS

Durchführung:

1. Das Gewebe wird mit einem sterilen Skalpell in möglichst kleine Stücke geschnitten und mit Trypsinlösung ca. 15 min bei 37°C inkubieren.
2. Abstoppen des Trypsins mit Medium.
3. Gewebe bei 900 U 5 min zentrifugieren, Trypsinlösung verwerfen und mit frischem Medium re-suspendieren.
4. Nur die Flüssigkeit ohne Gewebestücken in eine Kulturflasche überführen.
5. Nach ca. 24 h 3-4 Mal mit PBS waschen, um die Erythrozyten aus der Kultur zu entfernen und Mediumwechsel.

4.3 Primärkultur aus Rattenknochen

Lösungen:

- DMEM/F12 mit 10% FKS
- PBS

Durchführung:

1. Der Knochen wird in einem sterilen Mörser in möglichst kleine Stücke gerieben, in frischem Medium aufgenommen und in eine Kulturflasche überführt
2. Nach ca. 24 h 3-4 Mal mit PBS waschen, um die Erythrozyten aus der Kultur zu entfernen und Mediumwechsel.

4.4 Primärkultur aus der Peritonealflüssigkeit

Lösungen:

DMEM/F12 mit 10% FKS
PBS

Durchführung:

1. Die Bauchhöhle des Tieres wird mit 1-2 ml PBS gespült, die Flüssigkeit in eine Kulturflasche überführt und mit Medium aufgefüllt.
2. Nach ca. 24 h 3-4 Mal mit PBS waschen, um die Erythrozyten aus der Kultur zu entfernen und Mediumwechsel.

4.5 Primärkultur aus einer humanen Nabelschnur

Lösungen:

Endothelzellmedium mit 10% FKS
PBS
HBSS
0,25% Trypsin/EDTA-Lösung in HBSS

Durchführung:

1. Bei frischen menschlichen Nabelschnüren werden stumpfe Kanülen mit Gewebeklemmen auf beiden Seiten in der Vene fixiert.
2. Die Vene wird zuerst mit HBSS-Puffer, dann mit der Trypsin/EDTA-Lösung gespült.
3. Eine der Kanülen wird mit einem Stopfen verschlossen, die Trypsin/EDTA-Lösung wird eingefüllt, bis die Nabelschnur stramm gefüllt ist, und die andere Seite wird ebenfalls mit einem Stopfen verschlossen.
4. Nach 40minütiger Inkubation bei 37°C wird die Zellsuspension mit HBSS-Puffer ausgespült, das Trypsin mit Medium inaktiviert und 5 min bei 900 U zentrifugiert.
5. Das Zellpellet wird mit Medium aufgenommen und in eine Kulturflasche ausgesät.
6. Nach ca. 24 h 3-4 Mal mit PBS waschen, um die Erythrozyten aus der Kultur zu entfernen und Mediumwechsel.

Aufgaben:

1. Beobachten und zeichnen der Zellen
2. Welche Zellarten werden in der Kultur auftreten?

5. Vergleich unterschiedlicher Zelllinien

Jede Zelllinie hat charakteristische Eigenschaften, z.B. Größe, Aussehen, Stärke der Anheftung etc.. Aber auch die Vermehrungsgeschwindigkeit ist in allen Kulturen individuell unterschiedlich und muss bei der Arbeit mit Zellen beachtet werden.

In diesem Versuch können Sie die Unterschiede zwischen den Zelllinien Ishikawa, Colo 205, 3T3, HL60 in einer Wachstumskurve beobachten.

Ishikawa-Zellen: Humane endometriale Krebszellen (DMEM/F12 mit Insulin),

Colo 205-Zellen: Humane Kolonkrebiszellen (DMEM/F12),

3T3: Fibroblasten aus dem Mausembryo (DMEM),

HL60: Humane myeloide Leukämiezellen (RPMI 1640).

Lösungen :

PBS

Trypsin/EDTA

DMEM mit 10% FKS

DMEM/F12 mit 10% FKS

DMEM/F12 mit 10% FKS und Insulin

RPMI 1640 mit 10% FKS

Durchführung:

1. In eine 6-Well-Platte werden jeweils 150.000 Zellen pro Well ausgebracht.
2. Jeweils nach 24 h werden zwei Wells der Platte ausgezählt (adhärente Zellen mit Trypsin ablösen, die Suspensionskultur kann direkt entnommen werden) und die Ergebnisse in Abhängigkeit zur Zeit in ein Diagramm eingetragen.

Aufgabe:

Interpretieren Sie die Messergebnisse.

6. Crystal Violet Assay zur Bestimmung der Zellproliferation

In vielen Versuchen mit Zellkulturen wird die Proliferation der Zellen zur Beurteilung der Wirkung einer Substanz genutzt. Gängige Proliferationsassays sind der MTT-Test, der XTT-Test und der Crystal Violet-Assay, die alle auf einer colorimetrischen Messung der Absorption beruhen.

Lösungen:

PBS	DMEM mit 10% FKS
2% Glutaraldehyd in PBS	DMEM/F12 mit 10% FKS
0,1% Crystal violet in Aqua bidest	RPMI 1640 mit 10% FKS
0,2% Triton X-100 in Aqua bidest	IMDM mit 10% FKS

Pipettierschema:

DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM
DMEM/F12	DMEM/F12	DMEM/F12	DMEM/F12	DMEM/F12	DMEM/F12
RPMI 1640	RPMI 1640	RPMI 1640	RPMI 1640	RPMI 1640	RPMI 1640
IMDM	IMDM	IMDM	IMDM	IMDM	IMDM

Durchführung:

1. In eine 24-Well Platte werden 20.000 Zellen pro Well in den unterschiedlichen Kulturmedien ausgebracht.
2. Die Stimulation dauert drei Tage, in denen das Medium nicht gewechselt wird.
3. Am vierten Tag wird das Zellkulturmedium entfernt und die Platte vorsichtig auf Zellstoff abtropfen lassen.
4. Pro Well werden 400 µl Glutaraldehyd hinzugefügt.
5. Für 20 min bei Raumtemperatur inkubieren.
6. Entfernen der Glutaraldehyd-Lösung durch Ausschütten ins Waschbecken.
7. 400 µl Crystal Violet-Lösung pro Well zufügen.
8. Für 30 min bei Raumtemperatur inkubieren.
9. Entfernen der Crystal Violet-Lösung. Die Platten werden mit Aqua bidest. vorsichtig ausgespült (Pipette, mind. 3x), so dass die Zellen entfärbt werden.
10. Vorsichtiges Abgießen des restlichen Wassers und Trocknen der Platten auf Zellstoff für 1-2 h bei Raumtemperatur.
11. 200 µl Triton X-100-Lösung zufügen und bei Raumtemperatur 1 h unter leichtem Schütteln inkubieren.
12. Der Überstand wird in eine 96-Well Platte überführt und bei 595 nm Absorption gemessen.

Aufgabe:

Interpretieren Sie die Messergebnisse.

7. Rezepte für die benutzten Lösungen:

Medium (10%) (sterile Lösungen!)	PBS	Trypsin/EDTA- Lösung	Trypanblau-Lösung (steril filtrieren)
500 ml DMEM	8 g NaCl	330 µl Tryp- sin/EDTA	0,9 g NaCl
50 ml FKS	0,2 g KHPO ₄	3 ml PBS	0,5 g Trypanblau- farbstoff
5 ml Glutamin	1,15 g NaHPO ₄		ad. 100 ml aqua dest
10 ml Pyruvat (optional)	0,2 g KCl		
5 ml Pen/Strep (gram+)	ad. 1000 ml aqua dest.		
1,65 ml Gentamycin (gram-)			
Einfriermedium (sterile Lösungen)	TAE-Puffer (50x)	HBSS	0,25% Trypsin/EDTA in HBSS
50 ml DMEM	242 g Tris-HCl	0,185 g CaCl ₂	250 µl Trypsin/EDTA
5 ml FKS	57,1 ml Eisessig	0,098 g MgSO ₄	ad. 10 ml HBSS
5 ml DMSO	100 ml 0,5M EDTA	0,4 g KCl	
0,5 ml Pen/Strep	in 700 ml aqua dest. lösen	0,06 g KH ₂ PO ₄	
	mit Eisessig auf pH 7,6 ad. 1000 ml aqua dest.	0,35 g NaHCO ₃	
		8,0 g NaCl	
		0,048 g Na ₂ HPO ₄	
		1,0 g D-Glucose	
		0,011 g Phenolrot	
		ad. 1000 ml aqua dest	