

Einfrieren von Zellen: Überzeugende Ergebnisse aus der Praxis

Information der Biochrom AG vom 20. Mai 2010

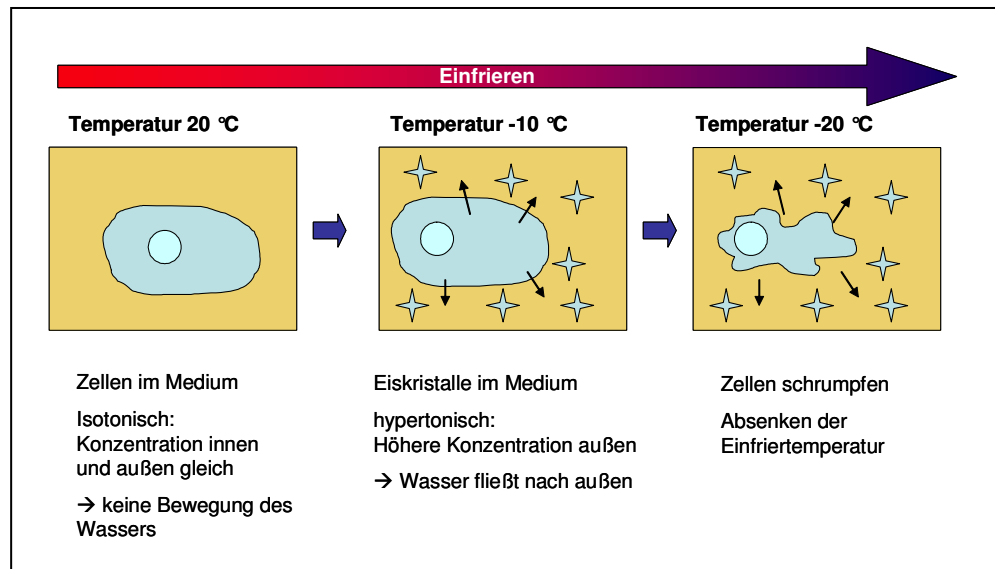
Biofreeze, hergestellt von der Biochrom AG, ist ein chemisch definiertes, serum- und DMSO-freies Einfriermedium zur Kryokonservierung von Zellkulturen in flüssigem Stickstoff. Biofreeze kann für das Einfrieren vieler Zelllinien verwendet werden und ersetzt dadurch herkömmliche Kryokonservierungsmedien. Klassische Einfriermedien setzen sich aus Medium, Serum und DMSO oder Glycerin zusammen. Biofreeze enthält nachweislich weder Serum noch DMSO und ist zusätzlich frei von Substanzen tierischen Ursprungs.

Die Biochrom AG vertreibt Biofreeze seit über einem Jahr. Mittlerweile haben Kunden Biofreeze erfolgreich getestet und empfehlen es für DMSO- und serumfreies Einfrieren von Zellen. Nachfolgend sind diese Ergebnisse dargestellt.

1 Kryokonservierung von Zellen

Die Kryokonservierung ist für jede Zelle ein strapaziöser Vorgang. Beim Einfrieren bilden sich zunächst Eiskristalle sowohl im umgebenden Medium als auch in den Zellen. Um diese schädigende Kristallbildung zu verhindern, werden Frostschutzmittel wie Glycerin oder DMSO eingesetzt. Zusätzlich wird Serum zugesetzt, da einige Bestandteile einen schützenden Effekt besitzen. Für Biofreeze wurde bewusst auf tierische Komponenten verzichtet und Alternativen verwendet, die vergleichbare Resultate erzielen.

Abb. 1: Einfriervorgang im Überblick



2 Toxizitätstest und Ergebnisse

Substanzen können mit einem Toxizitätstest auf ihre Toxizität hin untersucht werden. Dafür werden Zellen *in vitro* mit gelbem Tetrazoliumsalz, einem Farbstoff, behandelt

(MTT-Test, benannt nach dem verwendeten Farbstoff). Danach wird die Lebensfähigkeit beziehungsweise der Anteil lebender Zellen im Vergleich zu einer Kontrollprobe gemessen.

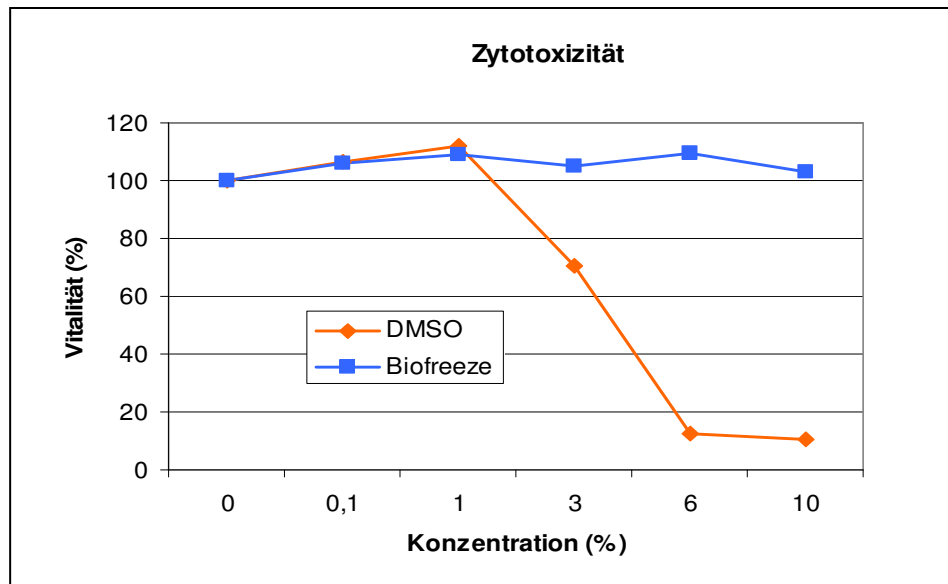
In einem solchen Toxizitätstest konnte gezeigt werden, dass Biofreeze in Konzentrationen von 0-10 % nicht toxisch auf die Zellen wirkt. Verwendet wurden 3T6 Mausfibroblasten, die in DMEM/F-12 (1:1) + 10 % FBS und verschiedenen Konzentration Biofreeze für 48 h kultiviert wurden. In Tabelle 1 sind die jeweiligen Verdünnungsstufen von Biofreeze und die Zellvitalität, gemessen im MTT-Test, angegeben. Es wurde kein Unterschied in der Vitalität bezogen auf die Kontrolle festgestellt (siehe Abb. 2), Biofreeze wirkt somit nicht zytotoxisch.

Tab. 1: Verdünnungsstufen und Vitalität von 3T6 Mausfibroblasten nach MTT-Test. Die Absorption ergibt sich aus dem Mittelwert von drei Messergebnissen.

Verdünnung (%)	Biofreeze (µl)	Medium (µl)	Zellsuspension (ml)	Absorption (570 nm)	Lebendzellzahl/ml nach MTT
0	0	500	2	0,74	$3,3 \times 10^4$
0,1	2,5	497,5	2	0,77	$3,4 \times 10^4$
1	25	475	2	0,8	$3,5 \times 10^4$
3	75	425	2	0,77	$3,4 \times 10^4$
6	150	350	2	0,8	$3,6 \times 10^4$
10	250	250	2	0,76	$3,4 \times 10^4$

Im Vergleich dazu wurden PAEC (procine aortic endothelial cells) mit einer aufsteigenden Konzentration an DMSO verwendet. Hier zeigte sich schon nach 22 h bei einer Konzentration von 3 % DMSO ein erheblicher zytotoxischer Effekt. Bei einer 6 und 10 %igen DMSO-Konzentration sank die Vitalität der Schweinezellen sogar auf etwa 10 % ab.

Abb. 2: Vergleich der Zytotoxizität von DMSO und Biofreeze in aufsteigender Konzentration. 3T6 Fibroblasten wurden in DMEM/F-12 (1:1) + 10 % FBS für 48h inkubiert. Im Vergleich wurden PAEC 22 h mit DMSO kultiviert.



3 Biofreeze im Vergleich

Biofreeze ist einfach zu handhaben. Es kann mit allen gängigen Methoden zur Kryokonservierung von Zellen angewendet werden. Biofreeze wird einfach unverdünnt eingesetzt, weitere Supplemente sind nicht nötig: Die Zellpellets werden direkt in Biofreeze aufgenommen und eingefroren.

Mit Biofreeze lassen sich viele Zellen einfrieren, auch sensitive Zellen wie JURKAT (immortalisierte T-Lymphozytenzelllinie, Tab. 2).

Tab.2: Vergleich von Biofreeze mit herkömmlichen Einfriermedien. Verwendet wurden JURKAT-Zellen.

Parameter	Einfriermedium			
	RPMI + FBS + DMSO	RPMI + FBS	Biofreeze	Biofreeze
Lebendzellzahl/ml	7,98x10 ⁵	8,31x10 ⁵	2,3x10 ⁶	4,47x10 ⁶
Vitalität (%) vor Einfrieren	100	98,6	97,8	97,4
Vitalität (%) nach Auftauen	95,9	7,6	97,1	93,0

Die Vitalität der JURKAT-Zellen nach dem Einfrieren mit Biofreeze lag bei 93 % bei einer Zelldichte von 4,47x10⁶ und bei 97 % bei einer Zelldichte von 2,3x10⁶. Zellen die mit DMSO und FBS eingefroren wurden, besitzen nach Auftauen eine vergleichbare Vitalität von 96 %. Die Überprüfung von weiteren Zelllinien wie beispielsweise BHK-21, Vero, WISH und CHO führten zu vergleichbaren Ergebnissen. Nach dem Auftauen zeigen die Zellen eine gute Anheftung; eine ausgezeichnete Viabilität sowie eine gute Wachstumsbereitschaft.

Biofreeze eignet sich daher besonders für alle Säugerzellen, die frei von tierischen Bestandteilen bleiben sollen, wie es bei der Herstellung von Arzneimitteln aus Zellkulturen oder zur Gewinnung von Gewebeersatz erforderlich ist.

4 Details zu Biofreeze

Parameter	Biofreeze
Kat. Nr.	F 2270
Einheit	25 ml
Lagertemperatur	+2 - +8 °C
Rohstoff	Ohne DMSO, ohne Serum
Verwendungszweck	Zum Einfrieren von Zellen
Hinweis	Nur für den <i>in vitro</i> -Gebrauch bestimmt



Ein kostenloses Muster erhalten Sie hier: info@biochrom.de

Unsere Empfehlung zur Anwendung finden Sie auf unserer Webseite unter:

http://www.biochrom.de/fileadmin/user_upload/service/Tipps_und_Hinweise/deutsch/100519_hintergrundinformation_biofreeze.pdf

Danksagung:

Die Biochrom AG bedankt sich bei Frau A. Amtmann vom Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik (BVT), Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg für die Durchführung der Vitalitäts- und Zytotoxizitätsstudien.