

## FAQ zum Einfrieren und Auftauen von Zellkulturen in TPP-Kryoröhrchen

Information der Biochrom AG vom 23. Mai 2011

Zellkulturen können durch Kryokonservierung nahezu unbegrenzt gelagert werden. Das Einfrieren und Auftauen sind für die Zellen jedoch strapaziöse Vorgänge. Um die Zellen dabei zu schützen, werden sie normalerweise in Suspension eingefroren, zusammen mit schützenden Stoffen wie Serum, mit Kälteschutzmitteln wie Glycerin oder Dimethylsulfoxid (DMSO) oder mit speziellen Kryoschutzmedien. Die so behandelten Zellen werden in sterile Ampullen bzw. Kryoröhrchen überführt.

Kryoröhrchen von TPP sind zum Einfrieren und Lagern von Zellkulturen geeignet. Zum Einfrieren von unterschiedlichen Zellsuspensions-Volumina bietet TPP Kryoröhrchen in unterschiedlichen Größen an: 1,2 ml, 2,0 ml, 3,8 ml und 4,5 ml. Die Kryoröhrchen bestehen aus Polypropylen (kurz: PP). Das ist ein wärme- und kältebeständiger Kunststoff. Aufgrund dessen sind TPP-Kryoröhrchen für Arbeiten bis  $-190\text{ °C}$  zugelassen.

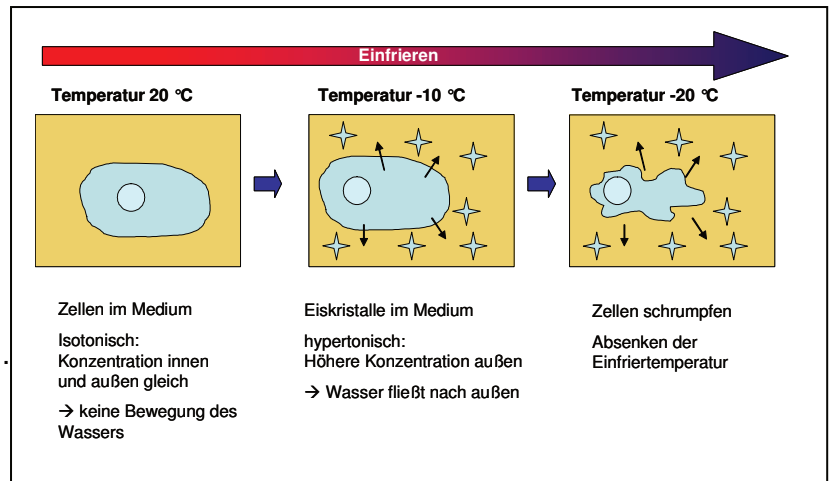
Die mit der Zellsuspension gefüllten TPP-Kryoröhrchen werden langsam abgekühlt bis zum Einfrieren und können dann in Tiefkühlschränken gelagert werden. Ist eine Lagerung in Flüssigstickstoff vorgesehen, müssen besondere Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden. Beim Umgang mit Flüssigstickstoff sind Schutzkleidung, Handschuhe und Schutzbrille zu tragen. TPP empfiehlt, die Proben nicht direkt in der Flüssigphase des Stickstoffs zu lagern, sondern in der Gasphase. Aus Sicherheitsgründen sollte immer darauf geachtet werden, dass die Röhrchen dicht verschlossen werden und dass die angegebenen Füllvolumina der Kryoröhrchen eingehalten werden.

Das wichtigste zum Einfrieren und Auftauen von Zellen finden Sie in diesen häufig gestellten Fragen mit Antworten (FAQ).

### 1. Was passiert in der Zelle beim Einfrieren?

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 kann auch Serum zugesetzt werden, da einige Bestandteile einen schützenden Effekt besitzen.

Im Einfrieremedium der Biochrom AG, Biofreeze, wurde bewusst auf tierische Komponenten wie Serum verzichtet, und Zellen können darin auch ohne DMSO eingefroren werden.



Der Einfriervorgang im Detail ist in der Abbildung dargestellt.

## **2. Was ist beim Einfrieren von Zellkulturen zu beachten?**

Die Zellsuspension sollte in geeignete Ampullen bzw. Kryoröhrchen überführt werden. Mit einer Temperatursenkung von 1 °C pro Minute sollten die Zellen auf -70 °C abgekühlt werden. In der Praxis kann das wie folgt geschehen: Die Kryoröhrchen werden in einer Styroporbox isoliert und in einen -80 °C Tiefkühlschrank gestellt. Nach 2 Stunden können die Proben zügig in den Stickstofftank überführt werden. Zum Abkühlen können alternativ auch Einfrierautomaten oder Tiefkühltruhen genutzt werden.

## **3. In welcher Wachstumsphase sollten sich die Zellen beim Einfrieren befinden?**

Die Zellen sollten sich am besten in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Vor dem Einfrieren die Zellkultur noch einmal auf Kontaminationsfreiheit prüfen.

## **4. Was muss bei der Auswahl von Kryoröhrchen beachtet werden?**

Es dürfen ausschließlich Gefäße verwendet werden, die zum Einfrieren geeignet sind. Die Röhrchen müssen aus temperaturbeständigem Material sein (am besten geeignet für die Zellkultur ist Polypropylen, kurz: PP). Die Kryoröhrchen müssen gut verschlossen werden, damit sie dicht gegenüber dem möglichen Eindringen von flüssigem Stickstoff sind.

Es gibt Röhrchen mit Außengewinde oder Innengewinde. Die Biochrom AG bietet Kryoröhrchen mit Außengewinde an (TPP). Das Außengewinde am Röhrchen und die Form des Deckels sorgen trotz Verzicht auf die Silikondichtung für einen sicheren, dichten Verschluss. Allerdings gibt es bei der Lagerung in flüssigem Stickstoff keine Garantie für jede Art von Schließmechanismen und die entsprechenden Schutzvorkehrungen sollten in jedem Fall beachtet werden.

## **5. Was ist beim Befüllen der Kryoröhrchen zu beachten?**

Wichtig ist, dass die Röhrchen nicht ganz voll gefüllt werden, da Flüssigkeit durch die Volumenausdehnung beim Einfrieren die Röhrchen zum Platzen bringen würde. In einigen Laboren gilt die Faustregel, das Röhrchen zu 2/3 zu befüllen. Das optimale Füllvolumen entspricht der oberen Graduierung auf den TPP-Röhrchen.

## **6. Was ist bei der Lagerung von Proben in Flüssigstickstoff zu beachten?**

Beim Umgang mit Flüssigstickstoff sind unbedingt Sicherheitsvorkehrungen zu beachten: Schutzkleidung tragen, dazu gehören auch Schutzbrille und Handschuhe.

Wurde das Röhrchen nicht dicht verschlossen, dringt flüssiger Stickstoff in das Röhrchen ein. Dadurch kann das Röhrchen beim Auftauen durch die schnelle Ausdehnung des Stickstoffs im Röhrchen explodieren. Um dies auszuschließen, sollten die Kulturen entweder in der Gasphase gelagert werden oder in einer zusätzlichen Schutzhülle eingefroren und aufgetaut werden. Sollen Röhrchen ohne Schutzhülle aus dem Flüssigstickstoff entnommen werden, können diese zunächst 24 h über der Flüssigphase, also in der Gasphase, gelagert und dann sicher entnommen werden.

## **7. Ist es möglich, Kryoröhrchen nur in der Gasphase zu lagern oder ist die Lagerung in der Flüssigphase von Flüssigstickstoff notwendig?**

Die Temperatur der Flüssigphase beträgt -196 °C, die der Gasphase -155 °C. Da ab -130 °C keine biochemischen Reaktionen in den Zellen mehr ablaufen, ist eine Lagerung in der Gasphase möglich und wird aus Gründen der Sicherheit empfohlen.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Mazur P.: *Am J Physiol*; 247 (3 Pt 1): C125-42 [1984]

### **8. Gibt es Alternativen zur Lagerung in Flüssigstickstoff?**

Zellkulturen können auch in Kryo-Gefriertruhen (ca. -140 °C) gelagert werden. Diese sind sicherer und preiswerter als Stickstoffbehälter.

### **9. Was muss beim Auftauen der Röhren beachtet werden?**

Vor Entnahme der Röhren Schutzkleidung anlegen.

Wenn die Kryoröhren bis zur Markierung befüllt und anschließend dicht verschlossen eingefroren wurden, können die Röhren, wie in den verschiedenen Einfrierprotokollen beschrieben, aufgetaut werden.

Wurden die TPP-Kryoröhren in der flüssigen Phase von Stickstoff gelagert, empfiehlt TPP den Gebrauch von Zusatzhüllen. Möglich ist auch eine Lagerung für 24 Stunden in der Gasphase von Flüssigstickstoff vor der Entnahme.

### **Weitere Informationen:**

- **Mehr zu Kryoröhren auf der Homepage:**  
<http://www.biochrom.de/produkte/zellkultur-plastik/kryoroehrchen/>
- **Alles über das Einfriermedium Biofreeze auf der Homepage:**  
<http://www.biochrom.de/produkte/medien/einfriermedium-biofreeze/>
- **Unser Tipp:**  
Prüfen Sie schnell und einfach die Zellzahl mit unserer neuen Einweg-Zählkammer C-Chip. Ein kostenloses Muster erhalten Sie unter [info@biochrom.de](mailto:info@biochrom.de)