

Anwendungsempfehlung für die kalte Lagerung von Zellen in ChillProtec®

Information der Biochrom AG vom 09. Mai 2011

In dem neuen Schutzmedium ChillProtec® überdauern adhärenente Zellen, Zellsuspensionen oder kleine Gewebestücke eine kalte Lagerung funktionsfähig. Das Schutzmedium mindert durch Kälte verursachte Zellschädigungen. Ebenso bleiben Zellfunktionen nach Kaltlagerung in ChillProtec® deutlich besser erhalten als nach Kaltlagerung in alternativen Lösungen. Das neue Medium ist gebrauchsfertig, steril, frei von tierischen Komponenten und vollständig chemisch definiert. Die Rezeptur von ChillProtec® ist geschützt.

ChillProtec® ist zur kalten Lagerung aller Zellen, auch von Primärzellen, geeignet. Beispielsweise blieben primäre humane Hepatozyten mehrere Tage bei 2-8 °C funktionsfähig. In ChillProtec® können frische klinische Proben bis zur Zellisolation zwischengelagert werden. Es ist auch zur kurzzeitigen Lagerung restlicher oder isolierter Zellen geeignet sowie für den Versand von Zellen und Geweben.

Von ChillProtec® werden zwei Variationen angeboten: ChillProtec® und ChillProtec® plus. Ein makromolekularer Stoff in ChillProtec® plus wirkt zusätzlich schützend bei verschiedenen Zelltypen. Testen Sie daher Zellen auf jeden Fall mit beiden Varianten. Nachfolgend finden Sie die Empfehlungen zur Anwendung des neuen Schutzmediums.

1 Überblick und Anwendungsprinzip

ChillProtec® ist ein Medium zur kalten Lagerung von adhärenente Zellen, Zellsuspensionen oder kleinen Gewebestücken. Die Zellen überdauern die kalte Lagerung im Schutzmedium ohne Funktionsverlust.

Kälte (Hypothermie) ist ein weit verbreitetes Schutzprinzip zur Lagerung und zum Transport von Zellen. Durch die Kälte wird der Zellmetabolismus verlangsamt und schädigende Prozesse, welche durch den Mangel an Sauerstoff oder Substrat entstehen, werden reduziert. Doch die Kälte selbst bewirkt Schädigungen in den Zellen. Diese werden von ChillProtec® gehemmt und dadurch sind deutlich längere Kaltlagerungszeiten von Zellen möglich im Vergleich zu normalerweise verwendeten Flüssigkeiten wie Zellkulturmedien, physiologischen Salzlösungen oder Organprotektionslösungen.

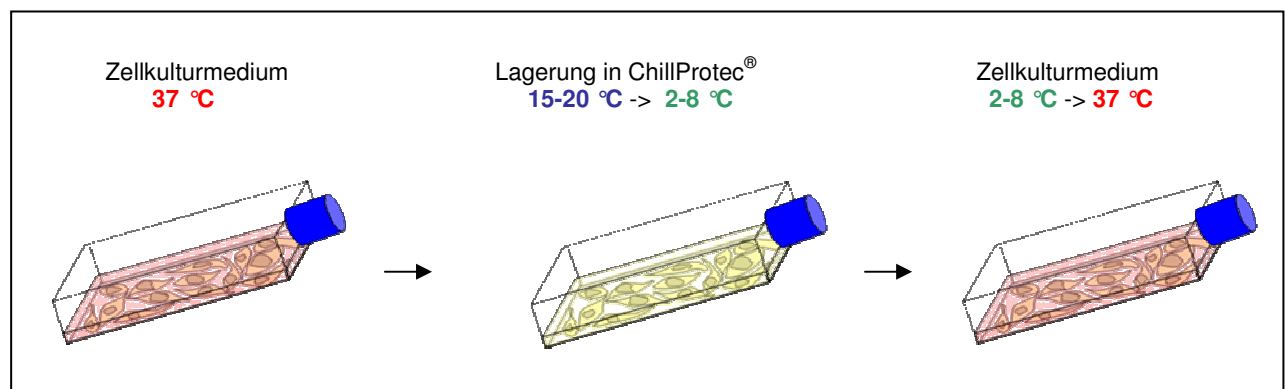


Abb. 1: Anwendungsprinzip

Das Schutzmedium wird in zwei Variationen angeboten: ChillProtec® und ChillProtec® plus. Die Varianten unterscheiden sich geringfügig in ihrer Zusammensetzung. ChillProtec® plus enthält einen makromolekularen Zusatz, der für einige Zelltypen eine zusätzliche Schutzwirkung hat.

Das Medium ist frei von tierischen Komponenten und vollständig chemisch definiert. Die Rezeptur des Mediums ist geschützt.

2 Anwendung

2.1 Generelle Hinweise

Das Kälteschutzmedium ChillProtec® ist steril und gebrauchsfertig.

Um häufige Temperaturschwankungen zu vermeiden, verwenden Sie zur Lagerung der Zellen und Gewebe am besten einen Kühlschrank, der selten frequentiert wird, oder einen Kühlraum.

Für den Transport von Zellen und Geweben „auf Eis“ sollte Eiswasser verwendet werden, um eine Gefrierschädigung zu vermeiden. Beim Einsatz von Kühlakkus für den Transport muss der direkte Kontakt der Kühlakkus mit der Zellkulturflasche oder dem Gefäß, welches das Gewebe enthält, vermieden werden. Zum Transportieren sollten die Zellkulturflaschen komplett mit ChillProtec® gefüllt sein.

Bei länger dauernden Transporten sollte die Einhaltung der Temperatur von 2-8 °C (Toleranzbereich: 0-10 °C) kontrolliert werden, beispielsweise mit einem Data-Logger.

2.2 Adhärenz Zellen

Für die Lagerung von adhärenz Zellen sollte ChillProtec® unmittelbar vor der Anwendung auf 15-20 °C gebracht werden.

Die Zellen sollten sich möglichst in der logarithmischen Wachstumsphase befinden, und ca. 24 h vor der Kaltlagerung sollte noch einmal ein Mediumwechsel durchgeführt werden. Für längere Kaltlagerungen sind Zellkulturflaschen als Kulturgefäß zu bevorzugen.

1. Kälteschutzmedium bei Raumtemperatur (RT) etwas warm werden lassen (auf 15°-20 °C).
2. Vor der Kaltlagerung Zellen unter der Laminar Flow mit (warmem) HBSS oder PBS waschen (2-3x), HBSS bzw. PBS absaugen.
3. Kälteschutzmedium (15-20 °C) auf die Zellen geben (das gleiche Volumen nutzen, welches normalerweise an Zellkulturmedium auf die Kultur gegeben wird, z. B. 5 ml für 25 cm²-Flasche, 15-20 ml für 75 cm²-Flasche, 2 ml pro Well einer 6-Well-Platte). Anschließend die Zellkulturflaschen verschließen. Gasdurchlässige Deckel mit Parafilm abdecken. Zellkulturgefäße in einen Kühlschrank oder Kühlraum stellen (2-8 °C).

Bei Verwendung von Wells oder Zellkulturschalen diese mit Deckel versehen und an den Rändern mit Parafilm oder Tesafilm abkleben (ein Streifen an der Öffnung entlang rundherum bzw. über alle 4 Seitenkanten). Wells oder Zellkulturschalen in einen Kühlschrank oder Kühlraum stellen (2-8 °C).

5. Am Ende der benötigten Lagerungsphase Zellen aus Kühlschrank/-raum nehmen und das Kälteschutzmedium unter der Laminar Flow absaugen.

6. Normales Zellkulturmedium (Komplettmedium mit Serum und den weiteren für den jeweiligen Zelltyp üblichen Zusätzen) frisch aus dem Kühlschrank (ca. 2-8 °C) auf die Zellen geben und die Zellen in den Brutschrank stellen.

7. Wechsel des Zellkulturmediums am nächsten Tag; falls sich nach längeren Kaltlagerungszeiten ein größerer Anteil der Zellen ablösen sollte, Medium ggf. 4-6 h nach Wiedererwärmung wechseln.

8. Die Zellkultur frühestens nach 24 h, besser erst 48 h nach Wiedererwärmung splitten.

➤ **Wichtige Hinweise:**

Ein Zusammenziehen und Abkugeln der Zellen am Ende der Kaltlagerungsphase kann auftreten, ist jedoch meist rasch reversibel. Lösen sich die Zellen während der Kaltlagerung von dem Zellkulturgefäß ab, sollten kollagen- oder fibronectinbeschichtete Kulturgefäße verwendet werden.

Reste von ChillProtec® auf den Zellen sind unbedenklich. Die Zellen sollten vor dem ersten Rückwechsel auf das Zellkulturmedium nicht gewaschen werden.

2.3 Zellsuspensionen

Zellsuspensionen sollten bei 2-8 °C aufbewahrt werden.

1. Zellen durch Zentrifugation pelletieren und Überstand absaugen, Zellen 1x mit PBS oder HBSS waschen.

2. Zellen in einer Dichte von ca. 10^6 Zellen/ml in der Kälteschutzlösung (2-8 °C) aufnehmen, Zellen sorgfältig resuspendieren, Zellsuspension in Zellkulturschale oder in steriles Zellkultur-Röhrchen geben (Zellkultur-Röhrchen sollte bei reiner Lagerung zu ca. 2/3, bei beabsichtigtem Transport komplett gefüllt sein), Schale bzw. Röhrchen verschließen.

3. Zellen bei 2-8 °C lagern (Röhrchen: liegend lagern).

4. Nach der Kaltlagerungsphase Zellen durch Zentrifugation pelletieren und ChillProtec® absaugen.

5. Pellet in normalem Zellkulturmedium (ca. 2-8 °C) resuspendieren, Zellen aussäen und im Brutschrank erwärmen bzw. Zellen anderweitig verwenden.

➤ **Wichtige Hinweise:**

Reste von ChillProtec® in dem zur Wiedererwärmung verwendeten Medium schaden

nicht. Je nach Anwendung können die Zellen auch für bis zu 2 h in dem Kälteschutzmedium wiedererwärmt werden (langsame Wiedererwärmung im Brutschrank). Mehrfaches Zentrifugieren oder Zentrifugieren bei hohen Geschwindigkeiten nach Kaltlagerung ist zu vermeiden.

2.4 Kleine Gewebepreparate

Kleine Gewebestücke sollten bei 2-8 °C aufbewahrt werden.

1. Gewebepreparat ggf. wie gewünscht präparieren und/oder mit HBSS, PBS oder Ringerlösung waschen.
2. Gewebepreparat in ein ausreichend hohes steriles Gefäß oder 50 ml-Zellkultur-Röhrchen (am besten mit Flachboden) mit kaltem (2-8 °C) ChillProtec[®] geben; die Menge des Kälteschutzmediums sollte ausreichen, um das Gewebestück komplett zu bedecken (bei beabsichtigtem Transport Gefäß komplett füllen).
3. Gefäß verschließen und in einen Kühlschrank/-raum (2-8 °C) stellen.
4. Am Ende der Kaltlagerungsphase Gewebestück im Kälteschutzmedium langsam auf RT erwärmen (über ca. 10-15 min, z. B. Zellkultur-Röhrchen in 20-25 °C warmes Wasser stellen), Gewebepreparat dann in das zur weiteren Verwendung gewünschte Medium überführen (je nach Anwendung ggf. mit HBSS, PBS oder Ringerlösung bei RT waschen; dies ist jedoch für die meisten Anwendungen nicht zwingend erforderlich).
5. Gewebepreparat wie gewohnt weiter verwenden.

3 Vorschläge zur Lagerung von Zellen in ChillProtec®

3.1 Auswahl des Mediums

ChillProtec® zeigt im Vergleich zu Zellkulturmedien, physiologischen Salzlösungen und Organprotektionslösungen eine deutlich niedrigere Zellschädigung nach Kaltlagerung von Zellen und Geweben (vgl. Tab. 1).

Tab. 1: Mit ChillProtec® getestete Zellen und Gewebe

ChillProtec®
Aortenendothelzellen (primär, Schwein)
Leberendothelzellen (Zelllinie, Ratte)
Vero B4 (Nierenepithelzelllinie, Affe)
LLC-PK1 (Nierenepithelzelllinie, Schwein)
Hepatozyten (primär, Human), adhären
Hepatozyten (primär, Human), Suspension
Hepatozyten (primär, Ratte), adhären
Hepatozyten (primär, Ratte), Suspension
Hepatozyten (primär, Maus)
Hepatozyten (primär, Schwein)
HepG2 (Hepatoma-Zelllinie, Human)
A549 (Lungenepithelzelllinie, Human)
L929 (Fibroblastenzelllinie, Maus)
RIN-m5f (Inselzelllinie, Ratte)
K-562 (Myeloma-Zelllinie, Human)
Muskel (Zwerchfell, Maus)

Da das Schutzmedium in zwei verschiedenen Varianten existiert, sollten Sie am besten beide Medien testen. Vergleichende Untersuchungen von ChillProtec® und ChillProtec® plus liegen derzeit für verschiedene Zelltypen vor und legen die Verwendung des jeweils angegebenen Mediums nahe (vgl. Tab. 2).

Tab. 2: Mit ChillProtec® und ChillProtec® plus getestete Zellen

ChillProtec®	ChillProtec® plus
Aortenendothelzellen (primär, Schwein)	L929 (Fibroblastenzelllinie, Maus)
Vero B4 (Nierenepithelzelllinie, Affe)	Hepatozyten (primär, Ratte)
Hepatozyten (primär, Human)	A549 (Lungenepithelzelllinie, Human)
Leberendothelzellen (Zelllinie, Ratte)	RIN-m5f (Inselzelllinie, Ratte)
Hepatozyten (primär, Maus)	
Hepatozyten (primär, Schwein)	
HepG2 (Hepatoma-Zelllinie, Human)	

3.2 Lagerdauer

Die mögliche Dauer der Kaltlagerung variiert je nach Zelltyp und Kultivierung bzw. Verwendung der Zellen sehr stark und schwankt zwischen 3 Tagen und mehr als 2 Wochen (bis zu 5 Wochen). Die Lagerdauer sollte für den jeweiligen Zelltyp bzw. für die jeweilige Anwendung ausgetestet werden.

4 Überblick ChillProtec®

Tab. 3: Produktdetails

Parameter	ChillProtec®		ChillProtec® plus	
Kat.-Nr.	F 2283	F 2285	F 2293	F 2295
Einheit	100 ml	500 ml	100 ml	500 ml
Lagerung	+2 – +8 °C			
Rohstoff	chemisch definiert, Rezeptur geschützt			
Verwendungszweck	kalte Lagerung von Zellen			
Hinweis	nur für den <i>in-vitro</i> -Gebrauch bestimmt			

**Bestellen Sie kostenlose Muster von ChillProtec® und ChillProtec® plus unter:
info@biochrom.de**