

## **Empfehlungen zum sicheren 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 °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.

Die optimalen Füllvolumina der TPP-Kryoröhrchen finden Sie nachfolgend in einer Tabelle. Wir stellen Ihnen auch ein exemplarisches Protokoll für das Einfrieren und Auftauen von Zellen vor und geben weitere Tipps dazu unter Punkt 4 „Häufig gestellte Fragen mit Antworten (FAQ)“.

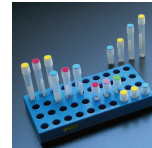
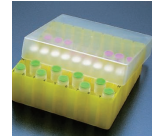
### **1 Eigenschaften der TPP-Kryoröhrchen**

Die TPP-Kryoröhrchen besitzen ein Außengewinde. Dadurch bleibt die Innenfläche des Röhrchens glatt. Das Außengewinde und der Deckel mit Dichtlippe sorgen zusammen für einen überdrehsicheren, dichten Verschluss.

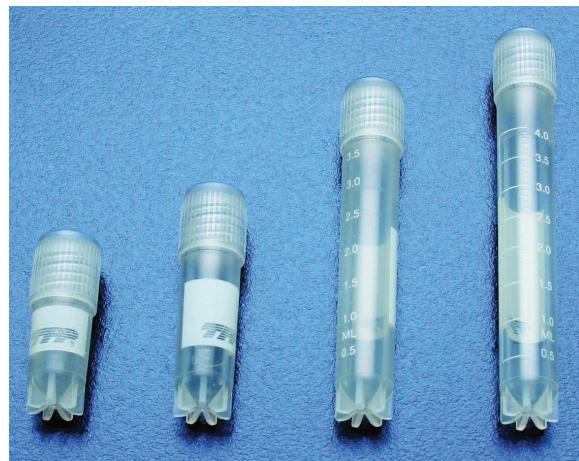
Die Röhrchen sind freistehend. Der Stern-Fuß des Röhrchens rastet wie ein Zahnrad im Kryoröhrchengestell (Kat.-Nr. P 99016) ein. So ist ein Arbeiten mit einer Hand möglich, da durch diese Fixierung die Röhrchen leicht mit einer Hand auf- und zuge dreht werden können. Zur leichten Identifizierung können in die Deckel der Röhrchen farblich unterschiedliche Einsätze eingeklickt werden. Alle TPP-Kryoröhrchen werden in wieder verschließbaren Beuteln geliefert.

### Zusatzrüstung für den Gebrauch der TPP-Kryoröhrchen:

- Lagerboxen (Material: PP) mit niedrigem Deckel (für Kat.-Nr. P 89040 und Kat.-Nr. P 89050) und mit hohem Deckel (für Kat.-Nr. P 89012 und Kat.-Nr. P 89020) für jeweils 81 Kryoröhrchen
- Ständer bzw. Kryoröhrchengestell (Kat.-Nr. P 99016; Material: Polycarbonat, PC): für jeweils 40 Kryoröhrchen, passend für alle Größen
- Farbeinsätze für die Deckel zur leichteren Identifizierung in grün, weiß, lila, rot, blau und gelb



### Die TPP-Kryoröhrchen-Familie:



↑  
P 89012  
1,2 ml

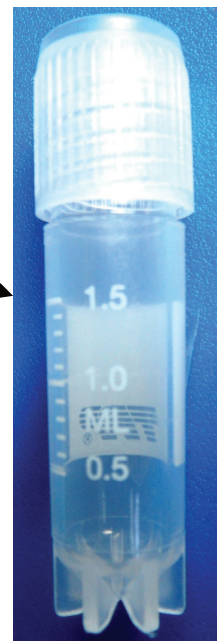
↑  
P 89020  
2,0 ml

↑  
P 89040  
3,8 ml

↑  
P89050  
4,5 ml

## 2 Optimales Füllvolumen der TPP-Kryoröhrchen

Die maximale Graduierung an den Röhrchen entspricht dem optimalen Füllvolumen.  
(dargestellt P 89020, optimales Füllvolumen = 1,5 ml)



Tab.: Empfohlene Volumina für die TPP-Kryoröhrchen und weitere Produktdetails

Kat.-Nr.	P 89012	P 89020	P 89040	P 89050
Volumen der Röhrchen	1,20 ml	2,00 ml	3,80 ml	4,50 ml
<b>optimales Füllvolumen</b>	<b>0,90 ml</b>	<b>1,50 ml</b>	<b>3,50 ml</b>	<b>4,00 ml</b>
Durchmesser	12 mm	12 mm	12 mm	12 mm
Länge	36 mm	48 mm	75 mm	90 mm
Material	PP	PP	PP	PP
Stück/Beutel	100	100	100	100
Stück/Karton	800	800	400	400

## 3 Protokoll zum Einfrieren und Auftauen von Zellkulturen in TPP-Kryoröhrchen

Exemplarisch wird das Einfrieren und Auftauen von Zellkulturen mit dem Einfriermedium Biofreeze beschrieben. Biofreeze ist ein chemisch definiertes, serum- und DMSO-freies Einfriermedium der Biochrom AG zur Kryokonservierung von Zellkulturen. Es kann zum Einfrieren vieler Zelllinien verwendet werden und ersetzt dadurch auch herkömmliche Einfriermedien.

### 3.1 Einfrieren von adhärennten Zellen ( $1 \times 10^6$ Zellen/ml)

1. Nährmedium aus der Zellkulturflasche (z. B. 75 cm<sup>2</sup>) entfernen
2. Zellrasen vorsichtig mit PBS (10 ml) ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> (Kat.-Nr. L1825) waschen
3. Zellen mit geeigneter Protease z. B. Trypsin/EDTA (Kat.-Nr. L 2143) vereinzeln
4. Die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführen, in das entweder Medium mit

FBS oder Medium mit Trypsininhibitor zur Inaktivierung der Protease vorgelegt wurde.

5. Zentrifugation (300 g)

6. Zellen in Einfriermedium (z. B. Biofreeze) resuspendieren (1 Teil Zellpellet + 9 Teile Einfriermedium)

7. Zellen in Portionen von 1,5 ml in vorher beschriftete Kryoröhrchen (Kat.-Nr. P 89020) füllen und einfrieren (Temperatursenkung 1 °C pro Minute auf -70 °C) und anschließend zügig in den Stickstofftank überführen.

### **3.2 Einfrieren von Suspensionszellen ( $5 \times 10^6$ Zellen/ml)**

1. Suspension zentrifugieren, Zellpellets in Einfriermedium (z. B. Biofreeze) resuspendieren (1 Teil Pellet + 9 Teile Einfriermedium).

2. Zellen in Portionen von 1,5 ml einfrieren (Temperatursenkung 1 °C pro Minute auf -70 °C) und anschließend zügig in den Stickstofftank überführen.

### **3.3 Auftauen der Zellen**

Das Auftauen von Zellen sollte möglichst schnell erfolgen:

1. Die gefrorene Kultur aus dem Stickstofftank entnehmen und in einem Wasserbad oder im Brutschrank bei 37 °C erwärmen.

2. Die aufgetaute Zellsuspension in 10 ml Kulturmedium aufnehmen.

3. Anschließend die Zellen zentrifugieren (300 g) und das Pellet im Kulturmedium aufnehmen.

4. Die Zellsuspension in Kulturgefäße überführen und nach 24 h einen Mediumwechsel vornehmen.

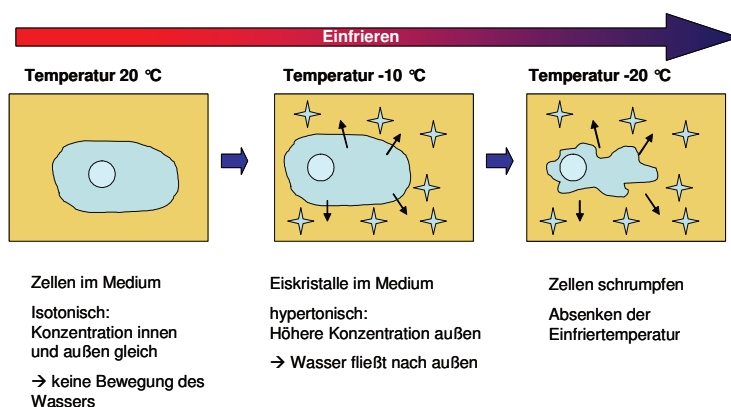
## 4 Häufig gestellte Fragen und Antworten zum Einfrieren und Auftauen

### 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 Einfriermedium 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>

#### **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 Röhrchen beachtet werden?**

Vor Entnahme der Röhrchen Schutzkleidung anlegen.

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

Wurden die TPP-Kryoröhrchen 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.

---

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

**Weitere Informationen:**

- **Mehr zu Kryoröhrchen 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)