

Erstellt:
22.12.2015 Melanie Uckert
Überarbeitet:
27.06.2019 Melanie Uckert
Gültig ab:
08.07.2019 Shabnam Hemmati-Sadeghi



Kryokonservieren von Zellen

Um Zellen langfristig zu lagern, wird die Kryokonservierung genutzt. Während der Kryokonservierung (ab $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$) werden die metabolischen Prozesse so stark verlangsamt, dass eine dauerhafte Lagerung möglich ist. Durch das Gefrierschutzmittel (Kryoprotektivum) DMSO wird die Eiskristallbildung im Inneren und die osmotische Dehydrierung der Zelle verhindert. Dies wird ermöglicht, indem das Gefrierschutzmittel einen Osmolaritätsunterschied verursacht. Durch diesen strömt Wasser aus und das Gefrieremittel in die Zelle ein. Dadurch können die Zellen unbeschadet eingefroren werden.

Benötigte Materialien:

- FBS (Fötales Kälber Serum) (Zellspezifisch)
- DMSO (Dimethylsulfoxid) (Sigma – Aldrich #D2438)
- Ggf. Zelltypspezifisches Medium
- Kryovial, 2 mL
- Sterile Pipetten: 5mL, 10 mL, 25 mL
- Pipettenspitzen: 10 μL , 200 μL , 1000 μL
- Sterile Pasteurpipetten
- Zentrifugenröhrchen: 15 mL, 50 mL
- Zählkammer (Einmalkammer für Luna-Cell Counter oder Neubauer-Kammer)
- Mr. Frosty-Einfriercontainer
- Ständer für Kryoröhrchen

Durchführung:

- ➔ Überprüfung des Mr. Frosty: dieser darf nicht mehr als 10 x mit demselben Isopropanol verwendet werden, jede Verwendung wird auf dem Etikett (Deckel) notiert.
- ➔ Nach der 10. Verwendung muss das Isopropanol ausgetauscht werden. Hierfür die Halterung und den Schaumstoff entfernen, den gebrauchten Isopropanol im halogenfreien Lösungsmittelabfall entsorgen und durch frisches Isopropanol (bis zur Markierung) ersetzen. Anschließend Schaumstoff und Halterung wieder heineinstecken.

Tabelle 1: ungefähre Zellzahl pro Zelltyp und Gefäß (Konfluenz 70 – 80%)

| Zelltyp | Einfriermedium | ZK- Flasche T-75 | ZK- Flasche T-175 |
|-------------------------------|--|-----------------------|-----------------------|
| NIH/3T3 | Komplettes Kulturmedium mit 5 % DMSO | 3 - 4 x 10^6 Zellen | 6 - 7 x 10^6 Zellen |
| Mikrovaskuläre Endothelzellen | FBS mit 10 % DMSO | 1 - 2 x 10^6 Zellen | 3 - 4 x 10^6 Zellen |
| Keratinocyten | FBS mit 10 % DMSO | 2 - 3 x 10^6 Zellen | 5 - 6 x 10^6 Zellen |
| Fibroblasten | FBS mit 10 % DMSO | 1 - 2 x 10^6 Zellen | 3 - 4 x 10^6 Zellen |
| CACO-2 | Komplettes Kulturmedium mit 5 % DMSO | 8 x 10^6 Zellen | 2 x 10^7 Zellen |
| Glatte Muskelzellen | Komplettes Kulturmedium mit 20 % FBS und 10 % DMSO | -- | Ca. 9 x 10^6 Zellen |

| Zelltyp | Einfriermedium | ZK- Flasche T-75 | ZK- Flasche T-175 |
|---------------------|--|---|--------------------------------|
| Perizyten | Komplettes Kulturmedium mit 20 % FBS und 10 % DMSO | Ca. 3×10^6 Zellen | - |
| HDMEC | Komplettes Kulturmedium mit 20 % FBS und 10 % DMSO | Ca. $2 - 3 \times 10^6$ Zellen | - |
| HUVEC | FBS mit 10 % DMSO | - | Ca. 6×10^6 Zellen |
| HT29-mtx | Komplettes Kulturmedium mit 10 % DMSO | Ca. 1×10^7 Zellen | Ca. $3 - 4 \times 10^7$ Zellen |
| Hepazellen (HepaRG) | Ibidi Freezing Medium Classic (#80022) | 6-8 Mio. Zellen (müssen konfluent sein) | - |

- Für den Einfrierprozess müssen die Zellen in FBS bzw. Medium vorliegen (SOP-ZK-001)
- *andernfalls* zentrifugieren, Überstand absaugen und Zellpellet in einem geringen Volumen FBS bzw. Medium resuspendieren (Orientierungshilfe, Tabelle 1)
- Anschließend Zellzahl und Vitalität mittels Neubauerzählkammer (manuell) oder Luna Cell Counter (automatisch) ermitteln (SOP-A-001)
- Wenn nicht anders angegeben, sollten die Zellen mit einer Zelldichte von 1×10^6 / mL eingefroren werden
- Kryovials beschriften: Zelltyp, hochgezählte Passage, Zellzahl, Datum, Kürzel
- Als Einfriermedium wird FBS bzw. Medium mit 5 % bzw. 10 % DMSO genutzt (siehe Tabelle 1). Die Zugabe des DMSO sollte nicht direkt zur Zellsuspension, sondern zuerst zum restlichen FBS erfolgen. Das Gemisch kann anschließend zu den Zellen gegeben werden
- **Ab diesem Schritt zügig arbeiten, da das DMSO bei Raumtemperatur zelltoxisch wirkt!**
- Anschließend jeweils 1 mL Zellsuspension auf die Kryoröhrchen verteilen
- Alle Kryovials in den vorbereiteten Mr. Frosty überführen
- Mr. Frosty in die -80 °C Truhe (Raum 21.13) überführen
- Nach frühestens zwei Stunden können die Kryovials in den Stickstofftank umgelagert werden
- Vorher den Lagerort im Stickstofftank- Ordner bestimmen und notieren (Raum 21.02, Büro). Die Übersicht für die Lage der Racks befindet sich auf dem Stickstofftank selbst
- Schutzkleidung anlegen (**Schutzbrille, Kälteschutzhandschuhe und Kittel**)
- Tank öffnen und das entsprechende Rack, mit der Box, entnehmen
- Ist das Vial an seiner vorbestimmten Position, Box und Rack zurück in den Tank überführen, Deckel schließen