

Erstellt:  
21.12.2015 Melanie Uckert  
Überarbeitet:  
27.06.2019 Melanie Uckert  
Gültig ab:  
08.07.2019 Shabnam Hemmati-Sadeghi



# Subkultivieren von adhärenenten Zellen

Um ein optimales Wachstum und die Vermehrung adhärenenten Zellen zu gewährleisten, ist ein regelmäßiges Subkultivieren nötig. Eine hohe Dichte brauchen Zellen schnell das Nährstoffangebot auf; durch entstehende Stoffwechselprodukte kann der pH- Wert des Mediums beeinflusst werden und eine hohe Zelldichte kann zu einer Kontaktinhibition führen. Der hierdurch entstandene Selektionsdruck könnte auf Dauer die Eigenschaften der Zellkultur verändern. Durch regelmäßiges Subkultivieren, d.h. Ablösen der Zellen und Neuaussaat in geringerer Zelldichte, soll dies verhindert und die Vermehrung der Zellen ermöglicht werden. Wenn nicht anders gefordert, sollten die Zellen bei einer Konfluenz von 70-80 % subkultiviert werden.

**Benötigte Materialien:**

- Trypsin-EDTA 0,05 % (Life Technologies, #15400-054; 1:10 in PBS<sup>-</sup>, siehe SOP-L-004);
- PBS<sup>-</sup> (Kalzium- und Magnesium-frei) (Life Technologies, #14190-169)
- Zelltypspezifisches Kulturmedium
- Trypanblau 0,4 %
- Sterile Pipetten: 5 mL, 10 mL, 25 mL
- Sterile Pipettenspitzen: 10 µL, 200 µL, 1000 µL
- Sterile Pasteurpipetten
- Zellkulturflaschen: 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>, 175 cm<sup>2</sup> (Greiner CellStar)
- Zellkulturplatten: 6- Well
- Zentrifugenröhrchen: 15 mL, 50 mL
- Zählkammer (Einmalkammer für Luna-Cell Counter oder Neubauer-Kammer)

➔ Entsprechend der Tabelle 1 die benötigten Lösungen im Wasserbad warmstellen und Sterilbank vorbereiten.

*Tabelle 1a: Übersicht Lösungen*

Zelltyp	Ablösen	Medium, ggf. + 1 % Penicillin/Streptomycin	Trypsin	Zentrifugation
NIH/3T3	Trypsin-EDTA 0,05 %	DMEM (4,5 g/l Glc) + 10 % FBS (PAN Biotech #P30-3306, Lot P150722)	3-5 min (RT)	140 g, 4 min
Mikrovaskuläre Endothelzellen	Trypsin-EDTA 0,05 %	Vasculife + VEGF-MV Supplemente	Bis 8 min (37 °C)	200 g, 4 min
Keratinocyten	Trypsin-EDTA 0,05 %	EpiLife + HKGS	3 min (37 °C)	200 g, 4 min
Fibroblasten	Trypsin-EDTA 0,05 %	DMEM (4,5 g/l Glc) + 10 % FBS (PAN Biotech #P30-3306, Lot P170206)	Bis 8 min (37 °C)	140 g, 4 min

**Tabelle 1b: Übersicht Lösungen**

Zelltyp	Ablösen	Medium, ggf. + 1 % Penicillin/Streptomycin	Trypsin	Zentrifugation
HUVEC	Trypsin-EDTA 0,05 %	VascuLife + VEGF Supplemente	3-5 min (37 °C)	220g, 3 min
CACO-2	Trypsin-EDTA 0,05 %	MEM + 20% FBS Superior (Biochrom # S 0615) + 1% MEM Non-essential Amino Acid Solution 100x (Sigma # M7145) + 1% Sodium Pyruvate (Gibco # 11-360-039)	Bis 8 min (37 °C)	200 g, 5 min
HAoSMC	Trypsin-EDTA 0,05 %	VascuLife + SMC- Supplemente	4-6 min (RT)	150 g, 4 min
HT29-mtx	Trypsin-EDTA 0,05 %	DMEM + 10% FBS Superior (Biochrom # S 0615) + 1% MEM Non-essential Amino Acid Solution 100x (Sigma # M7145)	Bis 8 min (37 °C)	200g 5 min
Perizyten	Trypsin-EDTA 0,05 %	PromoCell Pericyte Growth Medium + Supplement Mix	3 - 5 min (RT)	220 g, 3 min
HDMEC	Trypsin-EDTA 0,05 %	VascuLife Basalmedium + VascuLife VEGF-MV Supplemente	3 min (37 °C)	150 g, 5 min
Hepazellen	Trypsin-EDTA 0,05 %	Williams E Medium + 1%Glutamin + Insulin, FBS PAN 10% (Lot 170206)= Basismedium + Hydrocortison 50µM	5-7 Min	200g 7Min

- Zellen aus dem Brutschrank entnehmen
- Altes Medium komplett absaugen
- vor dem Ablösen die **Zellen kurz mit PBS<sup>-</sup> spülen**, anschließend den Ablösevorgang mit Trypsin starten (Tabelle 2)
- den Ablösevorgang zwischendurch unter dem Mikroskop beobachten
- sobald die Zellen abgelöst sind, zügig Medium (siehe Tabelle 2) dazugeben, um die Reaktion zu inhibieren (Tabelle 1)
- Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführen
- Zentrifugation entsprechend Tabelle 1
- Überstand absaugen
- Pellet in Medium (je nach Pelletgröße; für 1 T-75 z.B. 1-2 ml) resuspendieren

**Tabelle 2: Übersicht Volumina:**

Zellkulturgefäß	Waschen/ PBS <sup>-</sup> [mL]	Trypsin [mL]	Abstoppen Medium [mL]	Volumen Aussäen [mL]
35 mm Schale	1	0,5	0,5	2
6 Well Platte	2	2	2	5
T-25	3	1	1	5
T-75	5	2,5	2,5	10
T-175	10	5	5	20
T-175 (Tief für HAoSMC)	20	5	5	30

- 10 µl Zellsuspension für die Zellzählung entnehmen; Zellzahl und Vitalität mit Hilfe der Neubauerzählkammer (manuell) oder des Luna Cell Counter (automatisch) ermitteln (SOP-A-001)
- Anschließend können die Zellen für einen Versuch genutzt, eingefroren (SOP-ZK-002) oder weiter expandiert werden (Zelldichte siehe Tabelle 3, Medienvolumen siehe Tabelle 2)
- Beschriftung der Zellkulturflaschen: Zelltyp, Passagenzahl, ausgesäte Zellzahl, Datum, Namenskürze

**Tabelle 3: Übersicht Aussaatdichte und Dauer bis zur nächsten Passage**

<b>Zelllinie</b>	<b>Zellen/cm<sup>2</sup></b>	<b>70-80 % konfluent</b>
NIH/3T3	3500 - 4600	Nach 3 - 4 d
Mikrovaskuläre Endothelzellen	4000	Nach 6 - 7 d
Keratinocyten	5000	Nach 6 - 7 d
Fibroblasten	2000 - 3000	Nach 6 - 7 d
HUVEC	5000 - 6500	Nach 3 - 4 d
CACO-2	2300 - 5000	Nach 4 - 7 d
HAoSMC	3500 - 7000	Nach 3 - 7 d
HT29-mtx	3400 - 6000	Nach 5 - 7d
Perizyten	3000 - 4000	Nach 6 - 7 d
HDMEC	4000 - 5000	Nach 4 - 5 d
HepaRG	20000	7d, 100% konfluent

Die Kultur wird anschließend mikroskopisch kontrolliert, bevor Sie in den Brutschrank gestellt wird. Die Kultivierung erfolgt bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub>.