



Zellpassage und die Verwendung von Trypsin

In der Zellkultur werden nach **Zellpassage** die Tochterkolonien subkultiviert, um aus den Bestehenden eine große Anzahl von neuen Zellen zu erzeugen. Die Passage (auch bekannt als Zellsplitting oder Subkultivierung) besteht aus dem Aufteilen der Zellen in mehrere Aliquots und dem Überführen der Tochterzellen in neue Kulturgefäße. Zellen können bei regelmäßiger Passage über längere Zeit kultiviert werden, da dieser Prozess die Alterung der Zellen verhindert, die durch eine längere Zeit bei hoher Zelldichte einsetzt. Suspensionszellen können leicht subkultiviert werden, indem man eine kleine Menge der Mutterkultur mit einer größeren Menge frischen Mediums versetzt. Adhärenente Zellen müssen zunächst vom Kultursubstrat gelöst werden, was in aller Regel durch eine Mischung aus Trypsin und EDTA geschieht. Eine kleine Menge der abgelösten Zellen wird dann zur Aussaat der Tochterkultur verwendet, während der Rest verworfen wird. Die Menge kultivierter Zellen kann allerdings leicht vergrößert werden, indem man alle Zellen auf neue Kulturschalen verteilt.

In den meisten Laboren werden **adhärenente Zellen** in Petrischalen, Multi-Well-Platten oder Kulturflaschen in einem FCS-haltigen Kulturmedium bei 37 °C mit 5 % CO₂ kultiviert. Bei relativ schnell wachsenden Zellen wie z.B. HeLa erreicht eine frisch ausgesäte Platte in 2 - 3 Konfluenz. Unterbleibt nun die Zellpassage, werden kurze Zeit danach die Nährstoffe knapp und die Zellen sterben ab. In der Zellpassage wird zunächst das verbrauchte Medium entfernt und die Zellen in phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, dann wird 1 ml Trypsinlösung aufgetragen, um die Zellen vom Substrat zu lösen. Die Inkubation findet bei 37 °C statt, da Trypsin am besten unter Wärme arbeitet. Die Reaktion wird abgestoppt durch die Zugabe von 1 ml Trypsininhibitor (1 mg/ml in Wasser oder PBS). Dann gibt man 8 ml PBS zu, und die Zellen werden resuspendiert. Eine passende Menge der Zellsuspension wird in neue Platten transferiert, frisches Medium wird zugegeben und die Zellen werden für die nächste Wachstumsphase inkubiert.

Für beste Ergebnisse sollten die Zellen zwischen 10 % und 100 % (Wachstums-log-Phase) Konfluenz gehalten werden. Zellen sterben ebenso bei zu dichter Haltung (Tod durch Stoffwechselgifte), wie bei zu dünner Aussaat („apoptotischer Tod durch Vernachlässigung“).

Trypsin ist eine Endopeptidase, die im Gastrointestinaltrakt von Säugetieren produziert wird. Das pH-Optimum liegt bei 8 und die optimale Arbeitstemperatur ist 37 °C. *In vivo* wird Trypsin in der Pancreas in Form des inaktiven Zymogens Trypsinogen hergestellt. Nach Sekretion ins Duodenum aktiviert das Enzym Enteropeptidase eine kleine Anzahl der Enzymmoleküle durch Spaltung des Trypsinogens zu Trypsin; die

folgende Autokatalyse des Trypsins aktiviert die vollständige sekretierte Menge. Die funktionelle Aufgabe des Trypsins ist die Spaltung von Peptiden aus dem Pepsinverdau durch Hydrolyse der Peptidbindungen. Der Aspartatrest (Asp 189) im katalytischen Zentrum (S1) des Trypsins dient hier zur Verankerung und Stabilisierung positiv geladener Lysine und Arginine. Trypsin schneidet Proteine also hauptsächlich C-terminal der Aminosäuren Lysin und Arginin, Ausnahme sind hier die Sequenzen Lys-Pro und Arg-Pro, die nicht geschnitten werden.

Trypsin sollte gelagert werden bei sehr kalten Temperaturen (-20 °C bis -80 °C) oder bei pH 3, um Autolyse zu vermeiden.

Verwendung von Trypsin (Art. Nr. 2193) für die Zellpassage

Ansatz von 10 % Trypsinstocklösung

in 10 x Trypsinpuffer (z.B. 10 g Trypsin / 100 ml)

80 g NaCl (endotoxinfrei Art. Nr. HN00)

3 g KCl (endotoxinfrei Art. Nr. HN02)

0,73 g Na₂HPO₃ x 2 H₂O (Art. Nr. 4984)

0,2 g KH₂PO₃ (Art. Nr. 3904)

20 g Glucose (endotoxinfrei Art. Nr. HN06)

7 g EDTA (Art. Nr. 8043)

ad 1 Liter, pH 7,2 (NaOH, Art. Nr. K021)

Steril filtrieren (0,2 µm) und in Aliquots (z.B. je 10 ml) bei -20 °C aufbewahren. Haltbarkeit ca. 1 Jahr.

Ansatz der Arbeitslösung

Verdünnen der Stocklösung 1:10 mit sterilem destilliertem Wasser. Aufbewahrung bei +4 °C, Haltbarkeit ca. 1 Woche.

Wir empfehlen, für die Herstellung von Stock- und Arbeitslösung endotoxinfreies Wasser zu verwenden. Wasser aus herkömmlichen Destillen ist häufig bakterienbelastet. Diese Bakterien werden zwar durch die Sterilfiltration beseitigt, aber die freigesetzten Endotoxine können kultivierte Zellen empfindlich beeinträchtigen. Endotoxinfreies Wasser erhalten Sie bei Roth unter der Artikelnummer 3255.

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5

76185 Karlsruhe

Postfach 100121

76231 Karlsruhe

Telefon: +49 (0) 721/ 5606-0

Telefax: +49 (0) 721/ 5606-149

E-Mail: info@carlroth.de

Internet: www.carlroth.de

gk 10.2009