



Eine neue und einfache Methode zur Bestimmung von Biomasse in der Zellkultur

Autoren: Florian Wurm, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, 1015 Lausanne, Schweiz, und ExcellGene SA, 1870 Monthey, Schweiz, Rolf Tanner, TPP Techno Plastic Products AG, 8219 Trasadingen, Schweiz, Martin Jordan Merck Serono AG, Vevey, Schweiz

Abstrakt/Einleitung

Eine Suspensionskulturprobe von Tierzellen wird in einem Präzisionsröhrchen (PCV-Zellmessröhrchen von TPP) für eine Minute zentrifugiert. Die Zellen sammeln sich dabei in der engen Kapillare, deren Füllhöhe mit Hilfe eines Ablesegerätes genau bestimmt werden kann. Der abgelesene Wert entspricht dem "gepackten totalen Zellvolumen" (packed cell volume), welches relativ zum eingefüllten Gesamtvolumen der Probe in % ausgedrückt wird.

Abstract/Introduction

Samples of suspension cultures of animal cells are centrifuged in a precision tube (PCV Packed Cell Volume Tube from TPP) for 1 minute. As a result the cells accumulate in the narrow capillary at the lower end of the tube. With the aid of a measuring scale, the filling height of the pellet (packed cells) can be easily read and thus provides the volume of cells versus the total sample volume as a % of the packed cell volume.

Wir stellen hier eine neue und einfache Methode zur Bestimmung der Zellmasse in einer Suspensionskultur vor, die nicht auf der Zählung von Zellen unter dem Mikroskop beruht, sondern der präzisen Bestimmung des Gesamtzellvolumens (in einer kleinen Probe). Hierbei wird eine Probe mit einem definierten Volumen, typischerweise 100 µl des Kulturvolumens, in das hier vorgestellte PCV-Zellmessröhrchen transferiert. In einer in jedem Labor vorhandenen Tischzentrifuge, z.B. für "Eppendorfröhrchen", wird das PCV-Zellmessröhrchen für eine Minute zentrifugiert.

Wie in der Abbildung 1 sichtbar, sammeln sich die Zellen nach dem Zentrifugieren in der Kapillare im unteren Teil des Röhrchens und bilden eine klar sichtbare und leicht ablesbare Säule. Da der Durchmesser der Kapillare bekannt ist, wird aus der Füllhöhe das gesuchte Volumen ersichtlich, das (fast) nur aus gepackten Zellen besteht (Ref. 1). Dieses gemessene Volumen, relativ zum Volumen der transferierten Zellsuspensionsprobe, wird in Prozent ausgedrückt und entspricht daher der Gesamtbiomasse der Zellkultur.

Zur genauen Ablesung der relativen Biomasse im Röhrchen steht ein Lesegerät „easy read“ mit "schief" angewinkelter Schiene und Leselupe zur Verfügung (Abb. 2). Dort wird das PCV-Zellmessröhrchen hineingestellt und solange nach rechts oder links verschoben, bis die Oberkante des Zellsedimentes im Röhrchen mit der Ziellinie im Okular des Lesegerätes auf einer gemeinsamen horizontalen Ebene eingerichtet ist.



Unterhalb des Okulars, auf der zum Beobachter hinggerichteten Ablesefläche, sieht man den Wert in μl , welcher das Volumen der Biomasse der Probe wiedergibt. Da es keine Verdünnungsschritte nach der Probeentnahme sondern nur ein einfaches Transferieren der Probe gibt, ist die Varianz von verschiedenen Proben des gleichen Ausgangsmaterials erstaunlich gering. Die Abweichungen von einem auf diese Weise zu ermittelnden Mittelwert liegen in der Regel unter 3 %. Dieser Wert steht im hohen Gegensatz zu den Fehlerabweichungen die üblicherweise durch mikroskopische Zellzählungen gefunden werden. Ob manuell oder automatisch erstellt – hier werden Abweichungen von bis zu 20 % festgestellt.

Zusätzlich besteht die Möglichkeit, die prozentuale Biomasse mit einer Zellzahl pro Milliliter zu korrelieren. Hierzu muss eine Eichkurve erstellt werden. Diese sollte man auf der Basis der gehandhabten Zelllinie erarbeiten, da Zellen unterschiedlicher Herkunft unterschiedliche Volumina besitzen. Ebenso muss berücksichtigt werden, dass das Medium, in welchem Tierzellen kultiviert werden, Einfluss auf das Zellvolumen hat. Eine Veränderung des Mediums, zum Beispiel durch Zugabe von Salzen oder anderen osmotisch aktiven Substanzen, kann zu einer sehr schnellen (Sekunden) Reduzierung des Volumens von Zellen führen. Ein Beispiel einer Eichkurve für die Korrelierung von Zellzahl/ml und totaler Biomasse/ml ist in der Abbildung 3 dargestellt.

Die hier vorgestellte Methode erlaubt nicht die Viabilität (d.h. den Prozentsatz „lebender Zellen“ gegenüber „toter Zellen“) der Zellkultur zu ermitteln. Gesunde Kulturen haben eine Viabilität von mehr als 95 %, d. h. der Anteil von „toter Zellen“ ist klein und spielt daher eine untergeordnete Rolle. Tote Zellen werden im Mikroskop erkannt, weil sie (noch) rund sind, etwa die gleiche Grösse von lebenden Zellen haben, aber einen zugegebenen Farbstoff (Trypan Blau) in das Zellinnere aufnehmen und daher leicht blau bis dunkelblau anfärben. Lebende Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf. Obwohl „Viabilität“ ein in der Zellkultur weitgehend akzeptierter Begriff ist, wird seine Bedeutung oft nicht genau verstanden. Z. Bsp. ist es nicht geklärt, ob Zellen, die blau anfärben tatsächlich tot sind (also wirklich keine metabolische Aktivität mehr haben) und ob alle Zellen, die nicht blau sind, tatsächlich „gesund“ sind. Letztlich sollte man auch wissen, dass die „Zahl“ der „toter Zellen“ in einer Kultur keine Indikation gibt, was in der Vergangenheit, d.h. in den letzten 24 Stunden passiert ist. Die Mikroskopische Zählung berücksichtigt lediglich komplette, blau gefärbte Zellen, nicht aber kleinere, in der Regel deutlich sichtbare Fragmente von zerfallenen Zellen. Es ist noch nicht klar, wie gross dieser Anteil an Zellmasse an der gesamten biologischen Produktivität einer wachsenden Zellkultur mitmacht, aber nach Einschätzung der Autoren können Zellfragmente durchaus 10 % der Gesamtbiomasse ausmachen. Hier ist noch weitere Forschung notwendig um diese Frage eindeutiger beantworten zu können.

Literatur

1) M. Stettler, N. Jaccard, D. Hacker, M. De Jesus, F. M. Wurm and M. Jordan: New Disposable Tubes for Rapid and Precise Biomass Assessment for Suspension Cultures of Mammalian Cells. Biotechnology and Bioengineering Vol. 95, Nr. 6, pp. 1228-33

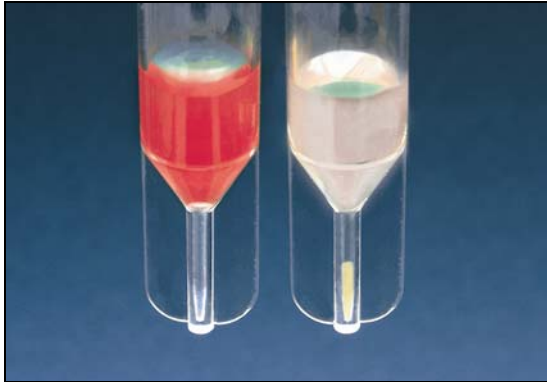


Abb. 1: PCV-Zellmessröhrchen vor (li Abb.) und nach (re Abb.) dem Zentrifugieren

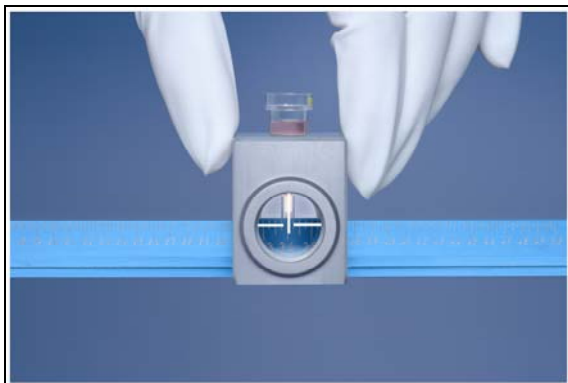


Abb. 2: Lesegerät „easy read“ für die Bestimmung der Biomasse/ml. Der auf der Skala abgelesene Wert entspricht der Biomasse/ml in Prozent. D. h. Ein Ablesewert von 0.3 sagt aus, dass 0.3 % des Gesamtvolumens in Form von Zellen und zentrifugierbaren Zellfragmenten sind.

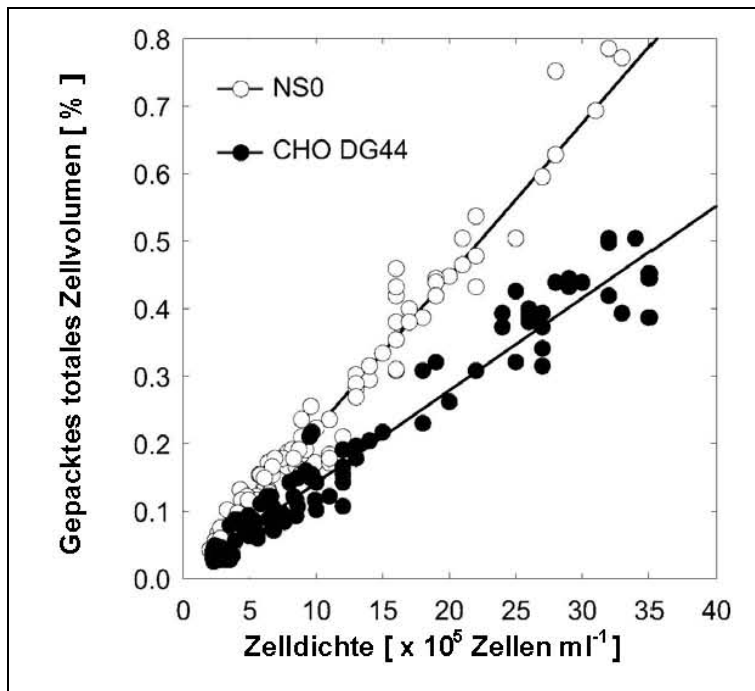


Abb. 3: Eine typische Eichkurve für zwei Zelllinien (CHO und NS0), welche die Zellzahl pro Milliliter (durch mikroskopische Zählung bestimmt) mit dem in % ausgedrückten Biomassewert der Probe korreliert.