

Inhaltsverzeichnis

1	Geschichte und Bedeutung der Zellkultur	1
1.1	Das biologische Zeitalter	1
1.2	Die mühseligen Anfänge	2
1.3	Die zukünftige Schlüsseltechnologie	3
2	Das Zellkulturlabor und seine Einrichtung	5
2.1	Was ist ein Laboratorium?	5
2.2	Allgemeine Ausstattung eines Zellkulturlabors	5
2.3	Die Arbeitsbereiche eines Zellkulturlabors	8
2.3.1	Der Reinigungsbereich	8
	Reinigung	9
2.3.2	Der Sterilisationsbereich	10
	Dampfsterilisation im Autoklaven	10
	Sterilisation durch trockene Hitze	13
2.3.3	Der Präparationsbereich	14
2.3.4	Der sterile Arbeitsbereich	15
2.4	Die technische Ausstattung im Zellkulturlabor	15
	Eine kleine Gerätekunde	15
2.4.1	Der sterile Arbeitsplatz	16
	Sicherheitswerkbank der Klasse I	16
	Sicherheitswerkbank der Klasse II	17
	Sicherheitswerkbank der Klasse III	18
	Reine Werkbänke	18
	Reine Werkbänke mit horizontaler und vertikaler Luftführung	18
	Zubehör für sterile Sicherheitswerkbänke	18
	Allgemeine Regeln zum Betrieb von reinen Werkbänken und Sicherheitswerkbänken der Klassen I und II	19
2.4.2	Feucht- bzw. Begasungsbrutschränke	21
	Temperatur	22
	Heizungssysteme	22
	Luftfeuchtigkeit	23
	Begasung mit CO ₂ und anderen Gasen	24

CO ₂ -Mess- und Regelsysteme	25
Ausstattung und Wartung von Feucht- bzw. Begasungsbrutschränken	26
Manuelle Brutraumdesinfektion	27
Zusätzlicher Kontaminationsschutz	28
2.4.3	Das Lichtmikroskop 29
	Funktionsprinzip des Durchlichtmikroskops 30
	Das inverse Lichtmikroskop 30
	Das Phasenkontrastverfahren 31
	Einstellung und Wartung eines Phasenkontrastmikroskops 33
	Das Fluoreszenzmikroskop 34
2.4.4	Zentrifugieren 35
	Festwinkelrotor 36
	Ausschwingrotor 37
	Ausstattung und Wartung 38
2.4.5	Kühlgeräte 39
	Laborkühlschrank 39
	Tiefkühltruhen 39
	Ausstattung und Wartung 41
2.4.6	Heizsysteme 42
	Wasserbad 42
	Heizplatte 42
2.4.7	Laborwaage 44
2.4.8	pH-Meter 45
2.4.9	Reinstwasserversorgung 45
2.4.10	Literatur 47
2.4.11	Informationen im Internet 48
3	Sicheres Arbeiten im Zellkulturlabor 49
3.1	Gefährdungen im Zellkulturlabor 49
3.1.1	Allgemeine Gefährdungen 49
	Brand- und explosionsgefährliche Stoffe 50
	Elektrische Anlagen 50
	Mechanische Gefährdung 51
	Hitze und Kälte 51
	Allgemeine Gefahrstoffe 51
3.1.2	Gefährdung durch biologische Agenzien 52
3.1.3	Gefährdungspotenziale und Risikogruppen 53
3.1.4	Sicherheitsstufen 54
3.1.5	Persönliche Laborhygiene 57
	Schutzkleidung 57
	Händedesinfektion 58
	Arbeiten im sterilen Bereich der Werkbank 59
3.2	Allgemeine Regeln für das sterile Arbeiten im Zellkulturlabor 61
3.2.1	Pipettieren 62

3.2.1	Serologische Pipetten	63
3.2.1	Pasteurpipetten	65
3.2.1	Mikropipetten	65
3.2.2	Gießen	68
3.2.3	Flambieren	69
3.2.4	Ultraviolettes Licht	69
3.2.5	Arbeiten mit Schutzhandschuhen	70
3.2.6	Sterilfiltration	71
3.2.7	Verbrauchsmaterial aus Glas und Kunststoff	72
	Zellkulturartikel aus Glas	72
	Zellkulturartikel aus Kunststoff	74
	Zell- und Gewebekulturflaschen	75
	Petrischalen	77
	Testplatten	78
3.2.8	Chemische Desinfektionsmittel	78
3.3	Literatur	80
3.4	Informationen im Internet	81
4	Nährmedien für die Zellkultur	83
4.1	Zusammensetzung von Standardmedien	84
	Einfache Medien	88
	Komplexe Medien für serumarme Applikation	89
4.2	Medienzusätze	91
	L-Glutamin	91
	Natriumpyruvat	93
	Nichtessentielle Aminosäuren (NEA)	93
	Natriumhydrogencarbonat (Natriumbicarbonat)	93
	HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure)	96
	Phenolrot	97
4.3	Serum	97
	Die Herkunft des Serums und seine industrielle Fertigung	97
	Die Inhaltsstoffe des Serums	99
	Nachteile von fetalem Kälberserum (FKS)	99
4.3.1	Alternative Seren	101
4.3.2	Serumfreie Zellkultur	101
4.3.3	Adaption von Zellen an serumfreie Kulturbedingungen	102
4.3.4	Handhabung von Serum	103
	Der Einkauf	103
	Lagerung und Handhabung	104
	Hitzeinaktivierung	105
4.4	Zubereitung eines gebrauchsfertigen Zellkulturmediums	106
4.4.1	Flüssigmedium	107
4.4.2	Medienkonzentrat	108
4.4.3	Pulvermedium	109
4.4.4	Hitzestabile Medien	110

x | **Inhaltsverzeichnis**

4.5	Was man sonst noch beachten sollte	111
4.6	Literatur	111
4.7	Informationen im Internet	112
5	Routinemethoden in der Zellkultur etablierter Zelllinien	113
5.1	Auftauen tiefgefrorener Zellkonserven	118
	Direkte Aussaat der aufgetauten Zellen	118
	Aussaat der Zellen nach Zentrifugation	119
5.2	Optische Kontrolle der Zellkultur	120
5.3	Mediumwechsel	124
5.3.1	Mediumaustausch bei adhärenten Kulturen	126
5.3.2	Mediumaustausch bei Suspensionskulturen	127
5.4	Subkultivierung (Passagieren)	128
5.4.1	Subkultivierung adhärenter Zellen	128
	Ablösen adhärenter Zellen mit Trypsin/EDTA	132
5.4.2	Subkultivierung von Suspensionszellen	135
5.5	Zellzahlbestimmung	136
5.6	Vitalitätstest	140
5.7	Qualitätskontrolle	141
	Färbemethode nach Giemsa (für adhärente Zellen)	142
	Färbemethode mit Kristallviolett (für adhärente Zellen)	142
5.8	Kryokonservierung	143
5.9	Literatur	147
5.10	Informationen im Internet	147
6	Umgang mit kontaminierten Zellkulturen	149
6.1	Die feindlichen Bataillone: Bakterien, Pilze und Viren	149
6.1.1	Kurzer Abriss der Mikrobiologie	150
6.1.2	Evolution und Systematik der Mikroorganismen	151
6.1.3	Winzige Zellen – gigantische Stoffwechselleistungen	152
6.2	Bakterien	153
6.2.1	Gestalt, Funktion und Aufbau der Bakterienzelle	153
6.2.2	Die Hauptgruppen der Eubacteria	154
6.2.3	Wachstum und Differenzierung der Eubacteria	154
6.3	Die optische Identifizierung einer bakteriellen Kontamination	155
6.4	Antibiotika und ihre Wirkungsweise	160
6.4.1	Die Zellwandsynthese hemmende Antibiotika	161
6.4.2	Die Proteinbiosynthese hemmende Antibiotika	161
6.5	Auswahl und Dosierung von Antibiotika in der Zellkultur	162
6.6	Antibiotika – notwendig oder überflüssig?	165
6.7	Mycoplasmen	166
6.7.1	Gestalt, Funktion und Aufbau der Mycoplasmenzelle	167
6.7.2	Mycoplasmen in der Zellkultur	168
6.7.3	Auswirkungen eines Mycoplasmenbefalls auf Zellkulturen	169

Auswirkungen auf die Zellen	169	
Auswirkungen auf die Zellkerne	170	
Chromosomenveränderungen	170	
6.7.4	Wichtige Indizien für einen Mycoplasmenbefall	170
6.7.5	Diagnose durch Mycoplasmentests	171
	Mikrobiologische Kulturmethode	171
	Fluoreszenznachweismethode	171
	Lichtmikroskopie	171
	Elektronenmikroskopie	172
	Autoradiographie	172
	Mycoplasmennachweis mit MycoTect® von Invitrogen	172
	Nachweis mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	172
	Kontaminationsquellen	173
6.7.6	Behandlung befallener Zellkulturen	173
6.8	Gestalt, Funktion und Aufbau der eukaryotischen Mikrobenzelle	175
6.8.1	Zellkulturrelevante Pilze (Fungi) und Hefen	177
6.8.2	Wachstum von Hefen und Pilzen	177
6.8.3	Die optische Identifizierung einer Pilzinfektion	178
6.8.4	Antimycotika	179
6.8.5	Sporen – ein stetiger Anlass zur Sorge	179
6.9	Virale Kontamination	180
6.10	Prionen	181
6.11	Kreuzkontaminationen	182
6.12	Literatur	183
6.13	Informationen im Internet	184
7	Spezielle Methoden in der Zellkultur	185
7.1	Klonierung von Zellen	185
7.2	Synchronisierung einer Zellkultur	186
7.2.1	Synchronisieren durch Abkühlen	187
7.2.2	Synchronisieren durch Mangelmedium	187
7.2.3	Synchronisation durch Abklopfen mitotischer Zellen	187
7.2.4	Zellsynchronisation durch chemische Blockierung	188
7.3	Zellkultur auf Filtermembranen	188
7.4	Zellkultur auf biologischen Membranen	191
7.5	Zellkultur auf extrazellulärer Matrix	192
7.6	Dreidimensionale Zellkulturen	195
7.7	Sphäroide	196
7.8	Perfundierte Zellkultur	199
7.9	Ein Wort zum Schluss	201
7.10	Literatur	201
7.11	Informationen im Internet	202

	Anhänge	203
I	Glossar	205
II	Arbeitsvolumina für Zellkulturgefäße	218
III	MUSTER: Hautschutzplan und Händedesinfektion	220
IV	MUSTER: Hygieneplan Nach BioStoffV § 11	221
V	Hygieneplan, Beispiel 2	222
VI	Nützliche Internetadressen	223
VII	Schlechtes Zellwachstum in der Kultur: Fehlerursachenanalyse und -beseitigung	226

Sachverzeichnis 227