



Application Note: Zellwachstum

Analyse des Zellwachstums mit dem 24-Kanal-Mikroskop zenCELL owl

Regina Kleinhans², Martin Woywod², Marieluise Schmidtbauer², Walter Wirths², Eike Kottkamp¹

¹InnoME GmbH - Espelkamp, ²InnoME GmbH - Munich

Einleitung

Die Sicherstellung einer gleichbleibenden Qualität von Zellkulturen ist die unabdingbare Voraussetzung für reproduzierbare, aussagekräftige und objektive Experimente. Definierte und gleichbleibende Umgebungsbedingungen für die Zellkultur bilden die Grundlage für standardisierbare Analysen. Hierzu zählen v.a. die Umgebungstemperatur, die CO₂-Versorgung sowie die Feuchtigkeit im Zellinkubator.

Jedoch nicht nur die definierten äußeren Wachstumsbedingungen, sondern auch die objektive Bestimmung, wann eine Zellkultur eine geeignete, vorher definierte Konfluenz erreicht hat, spielen eine entscheidende Rolle für die Reproduzierbarkeit und Aussagekraft der darauf basierenden Experimente.



Abb. 1: zenCell owl. 24-Kanal Mikroskop mit 24-Well Standardzellkulturplatte und magnetischem Adapterrahmen.

Die Entscheidung, ob eine Zelldichte für Experimente geeignet ist, wird bisher vom Anwender selbst übernommen und unterliegt somit der subjektiven Einschätzung des Users. Weiterhin stellt die regelmäßige, manuelle Überprüfung der Qualität von Zellkulturen einen nicht zu unterschätzenden Zeitaufwand für den Anwender dar. Nicht zuletzt ist nicht kalkulierbar, welchen Einfluss eine häufige Entnahme der Zellkulturen aus den standardisierten Umgebungsbedingungen des Inkubators, auf die Qualität der Zellkulturen zur Folge hat.

Mithilfe des neuen Mikroskops zenCELL owl (Abb. 1) können diese Faktoren, die einen Einfluss auf die Qualität der Zellkultur und somit auf die folgenden Experimente haben können, umgangen werden.

Das zenCELL owl gewährleistet als ein 24-Kanal Mikroskop eine schnelle und automatisierte Mikroskopie von Zellkulturen. Durch den

kompakten Aufbau und Stabilität ist es für den unkomplizierten Einsatz im Inkubator konzipiert. Der geringe Platzanspruch lässt im Inkubator genug Platz für weitere Zellkulturen oder auch zenCELL owl Systeme.

Die in der Software integrierten Bildverarbeitungsalgorithmen erlauben eine kontinuierlichen Langzeitüberwachungen und liefern schnelle und eindeutige Aussagen über den aktuellen Zustand der zu analysierenden Zellkultur.

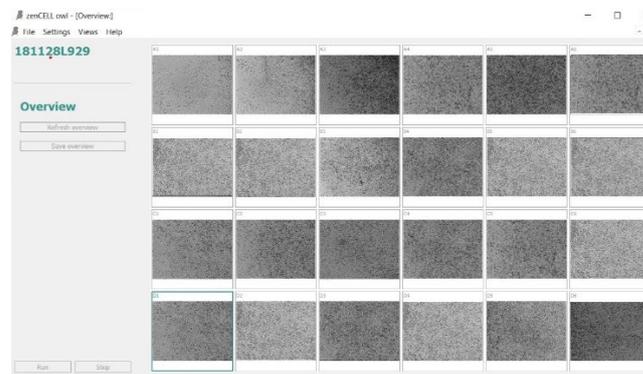


Abb. 2: Bild-Dokumentation der Zellkulturqualität. In festgelegten Intervallen werden gleichzeitig Bildaufnahmen jedes der 24 Wells gemacht.

Datenerzeugung

Das speziell für diese Anwendung entwickelte Software des zenCELL owl (Abb. 1) bestimmt in einer Echtzeit-Datenanalyse die aktuelle Zellzahl und den Bedeckungsgrad der Substratoberfläche des Bildausschnitts (1,2 mm x 0,9 mm) mit Zellen (Abb. 3). Das Intervall der Datenaufzeichnung lässt sich zwischen minimal 10 min und maximal mehreren Stunden variieren. Angegeben werden hierbei die Anzahl der am Substrat angehefteten (adherenten) Zellen und die Anzahl der vom Substrat abgelösten Zellen. Parallel dazu wird die Qualität jeder dieser einzelnen Zellkulturen in Form von Bildaufnahmen dokumentiert. Die Analyse geschieht zeitgleich in allen 24 Wells einer Standardzellkulturplatte (Abb. 2).

Die Zunahme der Zellzahl ist in der Regel proportional zum Bedeckungsgrad der Substratoberfläche. Auf der Basis dieser Daten können Rückschlüsse auf die Konfluenz der Zellkultur zu jedem Messzeitpunkt gezogen werden (Abb. 4).

Die simultane Analyse von 24 Zellkulturen ermöglicht es, unterschiedliche Messbedingungen parallel zu untersuchen und direkt miteinander zu vergleichen. Dies erlaubt eine statistische Auswertung der Messdaten (Abb. 5).

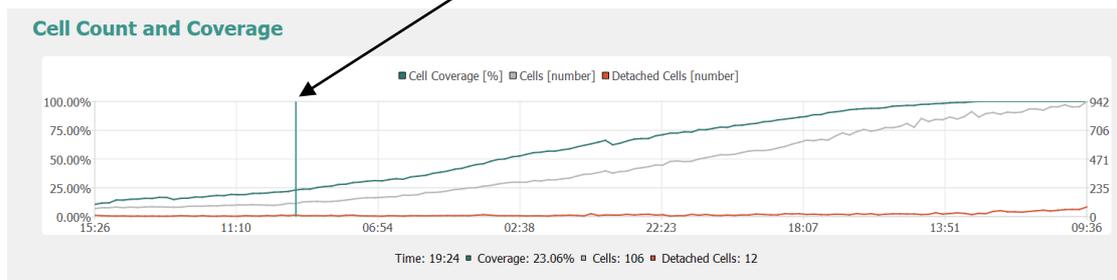
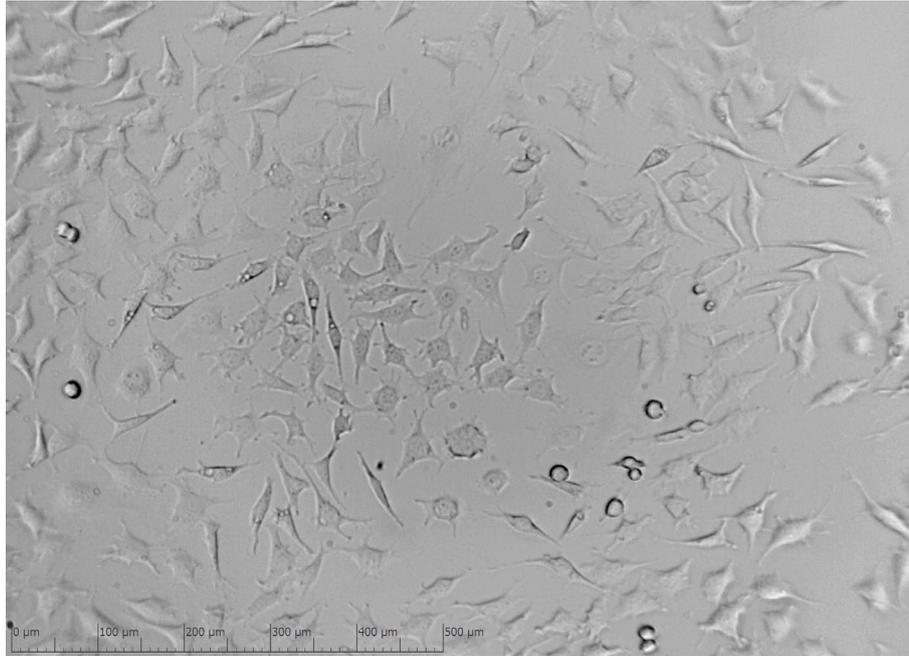


Abb. 3: Einzel-Well-Analyse. Bildaufnahme zu einem ausgewählten Zeitpunkt (oben) im Vergleich zu Cell Count und Coverage (unten).

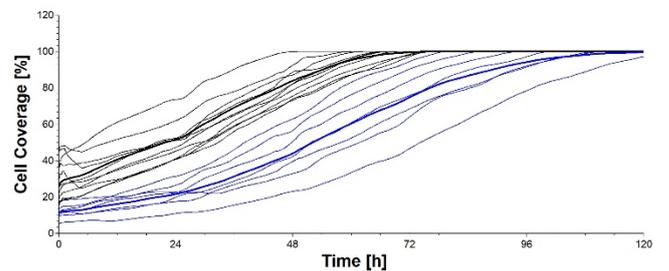
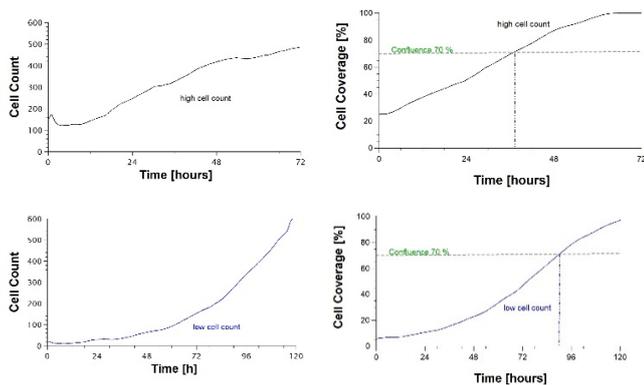


Abb. 4: Korrelation von Zellzahl und Konfluenz. Zwei Zellkulturen mit unterschiedlich hohen ausgesäten Zellzahlen verdeutlichen den Zusammenhang zwischen Zellzahl und Konfluenzwert.

Abb. 5: Growth vs. Time. Bedeckungsgrad von Kulturen mit unterschiedlichen ausgesäten Zellzahlen. schwarz: hohe Zellzahl, blau: niedrige Zellzahl. Die dickere Linie entspricht dem Mittelwert der jeweiligen Bedingung.

Analyse des Zellwachstums und Bestimmung der Konfluenz

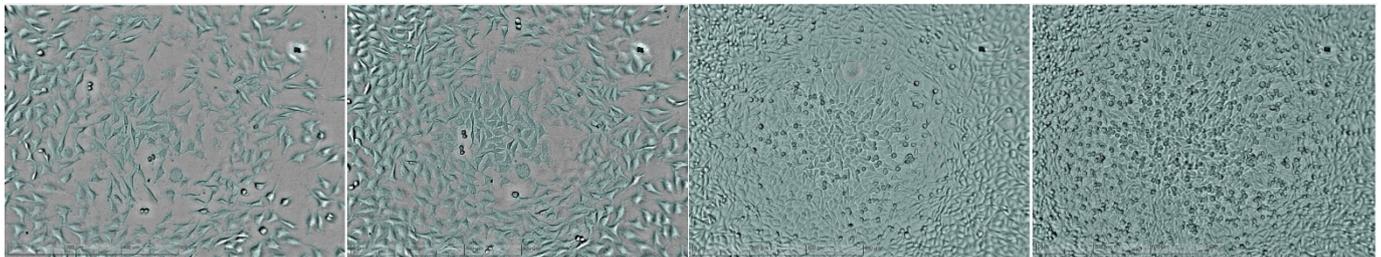
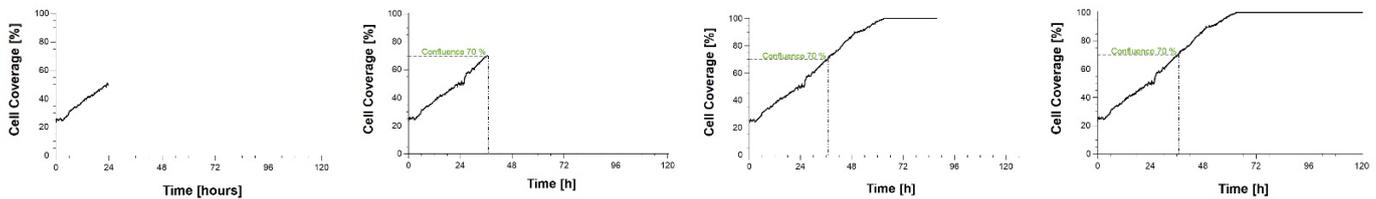
Unter geeigneten Bedingungen zeigen Zelllinien ihr typisches Wachstumsverhalten, hier dargestellt am Beispiel von L929-Mausfibroblasten. Nach der Aussaat werden die Zellen 24 Stunden im Inkubator vorinkubiert, um ein Anheften der Einzelzellen an das Substrat zu ermöglichen. Das weitere Wachstumsverhalten wird über den Verlauf von 120 Stunden mit dem 24-Kanalmikroskop zenCELL owl beobachtet.

Zu Beginn der Messung zeigen die Zellen die typische Proliferationsphase, die durch einen stetigen Anstieg der Zellzahl gekennzeichnet ist (Abb. 6a). Die höhere Zellzahl zeigt eine lineare Zunahme des Bedeckungsgrads des Substrats. Ein Konfluenzwert von 70% wird nach ca. 37 Stunden erreicht (Abb. 6b), eine komplette Bedeckung des Substrats nach 60 Stunden (Abb. 6c).

Die niedrigere ausgesäte Zellzahl zeigt vergleichsweise eine Verzögerung in Zunahme von Bedeckungsgrad und Zellzahl. Ein Konfluenzwert von 70% wird nach 90 Stunden erreicht (Abb. 6c), die komplette Bedeckung des Substrats nach ca. 120 Stunden (Abb. 6d). Nach Erreichen eines konfluenten Monolayers verringert sich aufgrund der Kontakt-Inhibition die Proliferationsaktivität der Zellen. In der folgenden Plateau-Phase stehen Zellteilung und Zelltod im Gleichgewicht, resultierend in einer nicht weiter ansteigenden Zellzahl der Kultur.

Wie aus den Abbildungen hervorgeht, ist mithilfe des zenCELL owl eine eindeutige Bestimmung des Zeitpunkts möglich, an dem ein definierter Konfluenzwert in den einzelnen Wells erreicht wird (Abb. 6, Abb. 7).

High cell count:



Low cell count:

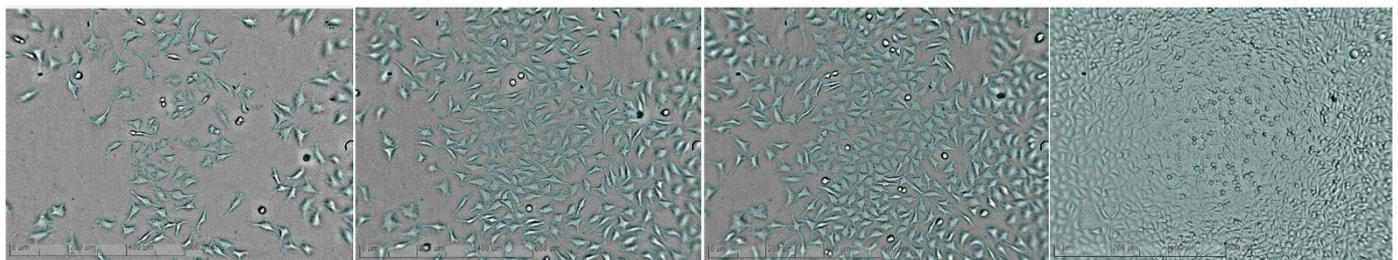
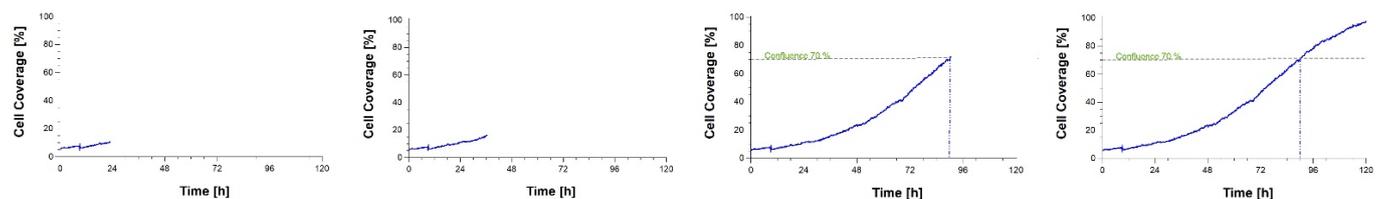


Abb. 6: Wachstumskurven von Kulturen mit unterschiedlichen Zellzahlen. a) Proliferationsphase beider Zellkulturen. b) Erreichen eines Konfluenzwertes von 70% durch die Kultur mit der höheren Zellzahl (oben). Der Konfluenzwert der Kultur mit der niedrigeren Zellzahl liegt bei ca. 20% (unten). c) Erreichen eines Konfluenzwertes von 70% durch die Kultur mit der niedrigeren Zellzahl (unten). Die Kultur mit der höheren Zellzahl erreicht die Plateau-Phase (oben). d) Die Kultur mit der geringeren Zellzahl erreicht einen Konfluenzwert von 100% (unten). Die Kultur mit der höheren Zellzahl zeigt einen Konfluenzwert von 100% (oben).

Zusammenfassung

Das zenCELL owl liefert mit Hilfe kontinuierlicher, nicht invasiver Langzeitüberwachungen schnelle, genaue und zuverlässige Aussagen über den momentanen Zustand der zu beobachtenden Zellkultur. Daten über die aktuelle Zellzahl und Konfluenz werden vollautomatisch, objektiv und reproduzierbar gewonnen (Abb. 7). Dabei ist für Qualitätsanalysen kein Eingreifen des Anwenders mehr erforderlich, wodurch nicht nur der Arbeitsaufwand deutlich reduziert wird, sondern auch Aussagen über den Konfluenzstatus objektivierbar und eindeutiger möglich sind. Die Bewertung des aktuellen Zustands der Zellkulturen ist jederzeit in unkomplizierter Weise, auch online von außerhalb des Labors, möglich.

Mögliche Anwendungsbereiche des zenCELL owl sind:

- Dokumentation des Zellwachstums
- Bestimmung der Zellkonfluenz
- Analyse von Wirkstoffeffekten auf die Zellkultur (z.B. Zytotoxizitätstests)
- Beobachtung von Stammzellen
- Migrationsassays

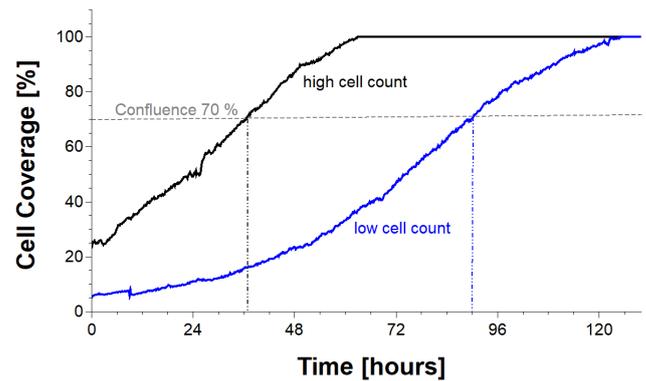


Abb. 7: Konfluenz-Analyse durch das zenCELL owl. Das zenCELL owl ermöglicht die automatisierte, objektive und reproduzierbare Bestimmung des Zeitpunkts, an dem ein bestimmter Konfluenzwert erreicht wird.

zenCELL owl Live-Cell Imaging System

Das zenCELL owl von der InnoME ist ein kompaktes Mikroskop mit 24 Objektiven zur automatisierten Zellkulturüberwachung. Das zenCELL owl passt in jeden Inkubator und ermöglicht eine kontinuierliche Beobachtung direkt an den Zellkulturgefäßen. Das System eignet sich zur automatisierten, objektiven und reproduzierbaren Langzeitüberwachung.

Weitere Informationen zum zenCELL owl finden Sie unter:

www.zencellowl.com