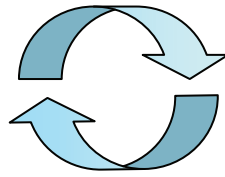


Zytotoxizitätstest mit der quantitativen Neutralrot - Methode

Betrieb

[Ausbildungsrahmenplan Nr. 23](#)



Berufsschule

[Rahmenlehrplan Lernfeld 11](#)

Prinzip:

Der Test basiert auf der Fähigkeit lebender Zellen den schwach kationischen Farbstoff Neutralrot aufzunehmen und an den anionischen Stellen der lysosomalen Matrix zu binden. Viele zellschädigende Substanzen führen zu irreversiblen Schäden an der Zellmembran und der lysosomalen Membran. Dadurch kommt es zunächst zu einer vermehrten Aufnahme des Farbstoffes; während eines anschl. Waschschr. jedoch zu einer verminderten Farbstoffretention bei geschädigten bzw. toten Zellen. Anhand der Farbstoffretention können somit lebende Zellen von toten Zellen unterschieden werden und mittels einer fotospektrometrischen Vergleichsmessung kann das Ausmaß der Zytotoxizität einer Substanz bestimmt werden.

Materialien:

- CHO-Zellen
- Testsubstanzen (z.B.: ASS, Paracetamol, Acrylamid, Antibiotika, Geschirrspülmittel ...)
- Zellkulturmedium (bestehend aus 9 Teilen DMEM/Nut.MixF12 mit GlutaMax, 1 Teil FKS, 1 g/100ml Pen./Strep)
- serumfreies Medium
- Neutralrot-Stammlösung (0,4g/100mL) (in Aqua bidest.)
- Waschlösung (bestehend aus 0,5 mL Formaldehydlösung, konz. + 1 g CaCl₂ in 100mL PBS)
- Elutionslösung (bestehend aus 50 mL Ethanol + 1 mL Essigsäure ad 100mL PBS)
- sterile 96well-Kulturschale, sterile Pipettenspitzen, sterile Pipetten, sterile Werkbank

Durchführung:

1.Tag:

- Aussaat von CHO-Zellen in eine 96well-Kulturschale mit einer Zelldichte von 2×10^4 lebenden Zellen pro well. Pro well 100 μ L Medium. Eventuell nicht benutzte wells sollten dennoch mit Medium oder PBS gefüllt werden, um eine übermäßige Verdunstung zu vermeiden.
- Kultivierung der frisch ausgesäten Zellen über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank.

2. Tag:

- Behandlung der CHO-Zellen bei 60-80 % Konfluenz mit verschiedenen Testsubstanzen unter Berücksichtigung folgender Kriterien:
 - die äußeren wells sollten für den Test nicht benutzt werden (zu starke Verdunstung sowie unscharfe spektrometrische Messung).
 - es muss mehrere wells geben, die unbehandelte Zellen enthalten (100%-Wert).
 - mindestens zwei verschiedene Substanzen im Vergleich.
 - wenigstens vier verschiedene Testkonzentrationen.
 - nicht mehr als 50 % des Mediumvolumens durch Testlösung ersetzen.
 - mindestens dreifach Bestimmung pro Konzentration.
 - notwendige Kontrollen berücksichtigen.
- Die Zellen werden über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert.
- Vorinkubation der Neutralrot-Färbelösung:
 - Die Neutralrot-Stammlösung (w=0,4%) wird 1:80 in sterilem serumfreien Medium verdünnt und über Nacht bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert.

3. Tag:

- Quantitative Bestimmung mit der Neutralrot-Methode
 - Die über Nacht vorinkubierte Neutralrot-Färbelösung wird unter der sterilen Werkbank steril filtriert (0,2 µm – Sterilfilter) und ist somit gebrauchsfertig.
 - Der Zustand der Zellen in den unterschiedlich behandelten Wells wird zunächst unter dem Mikroskop begutachtet und notiert.
 - Von den am Vortag behandelten Zellen wird das Medium abgesaugt und durch 100 µL/well Neutralrot-Färbelösung ersetzt.
 - Die Zellen werden für weitere 3 Std. bei 37°C im Brutschrank inkubiert.
 - Anschließend wird die Färbelösung durch Ausschlagen der 96well-Platte auf einen Stapel von Papiertüchern von den Zellen entfernt (steriles Arbeiten ist von hier an nicht mehr notwendig).
 - Um Farbstoffreste vollständig zu entfernen, werden die Zellen anschließend mit Waschlösung (100 µL/well) versetzt.
 - Die Waschlösung wird durch Ausschlagen der Platte (s.o.) unmittelbar wieder entfernt und der in den Zellen gebundene Farbstoff wird durch Zugabe der Elutionslösung (100 µL/well) eluiert.
 - Anschließend erfolgt die fotospektrometrische Auswertung an einem 96well-Plattenreader bei einer Anregungswellenlänge von 540 nm (Referenz: 690 nm).
- Die Auswertung der Messergebnisse erfolgt über das Tabellenkalkulationsprogramm Excel. Es wird für jede getestete Substanz eine Dosis-Wirkungskurve (Zellvitalität [%] über der Substanzkonzentration) erstellt und in einem Ergebnisprotokoll diskutiert.