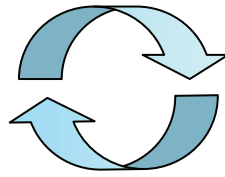


## Zellzählung und Vitalitätstest mit Trypanblau

### Betrieb

[Ausbildungsrahmenplan Nr. 8](#)



### Berufsschule

[Rahmenlehrplan Lernfeld 5](#)

### Testprinzip:

Vitalitätstests werden verwendet, um den Anteil vitaler Zellen innerhalb einer Zellsuspension angeben zu können. Die meisten Vitalitätstests stützen sich auf die veränderte Membrandurchlässigkeit abgestorbener Zellen, bei der Farbstoffe, für die die Zellmembran normalerweise nicht durchlässig ist, aufgenommen werden. Vitale Zellen nehmen derartige Farbstoffe, wie z.B. Trypanblau nicht auf.

### Substanzbeschreibung:

Trypanblau ist ein saurer Farbstoff mit einer molaren Masse von 960,83 g/mol. Trypanblau kann sich als Anion mit vier Sulfonatgruppen leicht an Proteine binden; eine Anlagerung an Cellulose und Proteine kann aber ebenso durch Van der Waals-Kräfte sowie durch Wasserstoffbrückenbindungen erfolgen. Dass Trypanblau durch phagozytierende Zellen wie Makrophagen und Fibrozyten auch aktiv aufgenommen werden kann, sei am Rande erwähnt, hat jedoch für die tägliche Routine in der Zellkultur keine Bedeutung.

### Testbedingungen:

Die Farbstoffaufnahme ist stark pH-abhängig. Am besten eignet sich ein Bereich von pH 6,6-7,6. Die maximale Farbstoffaufnahme findet bei einem pH-Wert von 7,5 statt. Von großer praktischer Bedeutung ist zudem die Tatsache, dass sich Trypanblau sehr leicht an lösliche Proteine, z.B. an die Proteine des Serums anlagert. Aus diesem Grunde sollte im Testansatz möglichst kein Serum enthalten sein. Die übrigen Bedingungen sind sorgfältig zu standardisieren, wenn reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden sollen. Dies betrifft insbesondere die Farbstoffkonzentration, den pH-Wert, die Temperatur und die Färbedauer.

### Produktbeschreibung:

Trypanblau-Lösung (0,5g/100mL) in Natriumchlorid-Lösung (0,9g/100mL) steril filtriert. Lagerung bei Raumtemperatur (RT).

**Durchführung:**

- Die Zellen nach dem Ablösen mit Trypsin-EDTA für 5 min bei 900 rpm abzentrifugieren.
- Das serumhaltige Medium durch vorsichtiges Absaugen entfernen.
- Die Zellen in PBS-Puffer resuspendieren (das Resuspensionsvolumen richtet sich nach der Zelldichte: mindestens  $2 \times 10^5$  – höchstens  $4 \times 10^7$  Zellen/mL).
- Ein sauberes, fettfreies Hämozytometer (Neubauer Zählkammer) wird mit einem sauberen, fettfreien Deckglas versehen. Das Erscheinen der sogenannten Newton'schen Ringe zeigt an, dass das Deckglas richtig angebracht ist.
- 20  $\mu$ L der Zellsuspension werden mit 80  $\mu$ L einer Trypanblaulösung (w=0,5%) zusammengegeben, gemischt und bei RT für 2-3 min (nicht länger!) inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen nochmals vorsichtig resuspendiert.
- Mit einer 20  $\mu$ L Pipette wird die angefärbte Suspension in die Zählkammer gegeben bis diese vollständig gefüllt ist. Ein Über- bzw. Unterfüllen sollte vermieden werden.
- Bis zur Auszählung 1-2 min warten, damit sich die Zellen am Boden absetzen können.
- Zur Auszählung wird die Zählkammer unter ein Mikroskop mit 10-40fach vergrößerndem Objektiv gelegt und die Einteilungslinien der Kammer ins Blickfeld geschoben.
- Es wird die Gesamtzahl der Zellen sowie die Anzahl der blau gefärbten (toten) Zellen bestimmt. Alle Zellen, deren Kern bzw. Cytoplasma eine Blaufärbung zeigen, werden als angefärbt und damit als tot oder defekt betrachtet. Auch diejenigen Zellen, die nur eine schwache Blaufärbung des Zellkerns aufweisen werden als tot gezählt.
- Die Neubauerzählkammer besteht aus neun großen Quadraten. Jedes Quadrat hat eine Fläche von  $1 \text{ mm}^2$ . Da die Höhe zwischen dem Deckglas und dem Objektträger genau 0,1mm beträgt, befindet sich ein Volumen von  $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm}$ , das heißt  $0,1 \text{ mm}^3$  (oder 0,1  $\mu$ L) über jedem dieser Quadrate. Es sollten immer die vier großen Eckquadrate ausgezählt und der Mittelwert errechnet werden (bei einer Gesamtzellzahl kleiner als 100, das zentrale fünfte Quadrat mit zählen und entsprechend den Mittelwert bestimmen!). Die ermittelte Zellzahl wird mit  $10^4$  sowie mit dem Verdünnungsfaktor der Zellsuspension multipliziert. Dies ergibt die Zellzahl pro ml.
- Es muss darauf geachtet werden, dass Zellen, die auf den Linien liegen, nicht zweimal gezählt werden. Das kann vermieden werden, indem man z.B. nur solche Zellen zählt, die oben und links auf den Linien liegen.
- Den prozentualen Anteil der lebenden Zellen in einem Ansatz kann man nach folgender Gleichung errechnen:

$$\% \text{lebende Zellen} = \frac{\text{ungefärbte Zellen} \cdot 100}{\text{gefärbte} + \text{ungefärbte Zellen}}$$

- Soll eine Zellzählung wiederholt werden, muss der Testansatz neu gemischt werden, da sich bei mehr als 5 min Inkubationsdauer die Zahl der angefärbten Zellen stark erhöhen kann (Trypanblau ist auf Dauer cytotoxisch).