



Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

---

# Sicheres und kontaminationsfreies Arbeiten mit Zellkulturen

Cord Uphoff

Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen  
Braunschweig



# Zuverlässigkeit wissenschaftlicher und präklinischer Daten

---



# Qualitätskriterien von Zelllinien

## Identität

- Authentizität
- Kreuzkontaminationen
- falsch bezeichnete Zelllinien
- falsch klassifizierte Zelllinien

**Database of Cross-Contaminated or Misidentified Cell Lines**  
 Amanda Capes-Davis and R. Ian Freshney  
[http://www.hpacultures.org.uk/media/E50/3B/Cell\\_Line\\_Cross\\_Contaminations\\_v6\\_0.pdf](http://www.hpacultures.org.uk/media/E50/3B/Cell_Line_Cross_Contaminations_v6_0.pdf)

Table 1. Cross-contaminated or Misidentified Cell Lines

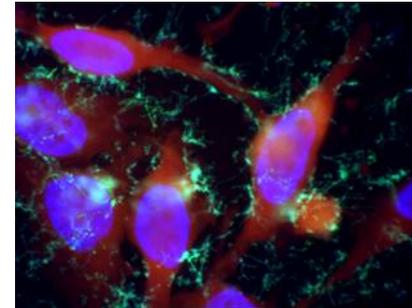
Cell Line	Claimed Species	Claimed Cell Type	Contaminating Cell Line	Actual Species	Actual Cell Type	Misidentification Reported By	Reference PubMed ID
2474/90	Human	Gastric carcinoma	HT-29	Human	Colon carcinoma	MacLeod et al, 1999	10508494
2563 (MAC-21)	Human	Lung carcinoma	HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	Nelson-Rees et al, 1981	8451928
2967/90	Human	Gastric carcinoma	HT-29	Human	Colon carcinoma	MacLeod et al, 1999	10508494
3051/80	Human	Gastric carcinoma	HT-29	Human	Colon carcinoma	MacLeod et al, 1999	10508494
41M	Human	Ovarian carcinoma	OAW 28	Human	Ovarian carcinoma	Wilson et al, 1996	8795574
ADLC-5M2	Human	Lung carcinoma	HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	MacLeod et al, 1999	10508494
<i>Aedes aegypti</i> , Saito's clone	Mosquito	Not specified	Unknown	Moth, <i>Antheraea eucalypti</i>	Not specified	Greene et al, 1972; Nelson-Rees et al, 1981	4402510, 8451928
<i>Aedes vexans</i> culture	Mosquito	Not specified	Unknown	Moth, <i>Antheraea eucalypti</i>	Not specified	Greene et al, 1972; Nelson-Rees et al, 1981	4402510, 8451928
AG-F	Human	Lymphoma, Hodgkin	CCRF-CEM	Human	Leukemia, acute lymphoblastic, T cell	Drexler et al, 2003	12592342
AKI	Human	Melanoma	HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	Yoshino et al, 2008	18643607
ALVA-31	Human	Prostate carcinoma	PC-3	Human	Prostate carcinoma	van Bokhoven et al, 2001; Varela-Garcia et al, 2001	11304728, 11433521
ALVA-41	Human	Prostate carcinoma	PC-3	Human	Prostate carcinoma	van Bokhoven et al, 2001; Pan et al, 2001; Varela-Garcia et al, 2001	11304728, 11135436, 11433521
ALVA-55	Human	Prostate carcinoma	PC-3	Human	Prostate carcinoma	van Bokhoven et al, 2003	14518029
ALVA-101	Human	Prostate carcinoma	PC-3	Human	Prostate carcinoma	van Bokhoven et al, 2003	14518029
AMDURII	Human	Skin	LLC-PK1	Pig	Kidney, normal renal cells	Milanesi et al, 2003	14505435
AO	Human	Amnion	HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	Nelson-Rees et al, 1981	8451928
AROS1-1	Human	Thyroid, anaplastic carcinoma	HT-29	Human	Colon carcinoma	Schweppe et al, 2008	18713817
AV3	Human	Amnion	HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	Nelson-Rees et al, 1981	8451928
BCC1/KMC	Human	Basal cell carcinoma	HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	MacLeod et al, 1999	10508494
BE-13	Human	Leukemia, acute lymphoblastic, T cell	PEER	Human	Leukemia, acute lymphoblastic, T cell	Drexler et al, 2003	12592342
BHP 10-3	Human	Thyroid, papillary carcinoma	TPC-1	Human	Thyroid, papillary carcinoma	Schweppe et al, 2008	18713817
BHP 14-9	Human	Thyroid, papillary carcinoma	M14	Human	Melanoma	Schweppe et al, 2008	18713817
BHP 17-10	Human	Thyroid, papillary carcinoma	M14	Human	Melanoma	Schweppe et al, 2008	18713817
BHP 2-7	Human	Thyroid, papillary carcinoma	TPC-1	Human	Thyroid, papillary carcinoma	Schweppe et al, 2008	18713817
BHP 5-16	Human	Thyroid, papillary carcinoma	M14	Human	Melanoma	Schweppe et al, 2008	18713817
BHP 7-13	Human	Thyroid, papillary carcinoma	TPC-1	Human	Thyroid, papillary carcinoma	Schweppe et al, 2008	18713817
BLIN-1 (also subclone 1E8)	Human	Leukemia, acute lymphoblastic, B cell precursor	NALM-6	Human	Leukemia, acute lymphoblastic, B cell precursor	Drexler et al, 2003	12592342
BM-16D4	Human	Prostate carcinoma	DU-145	Human	Prostate carcinoma	MacLeod et al, 1999	10508494
BrcA 5	Human	Breast carcinoma	HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	Nelson-Rees and Flandermeyer, 1977; Nelson-Rees et al, 1981	557237, 8451928



# Qualitätskriterien von Zelllinien

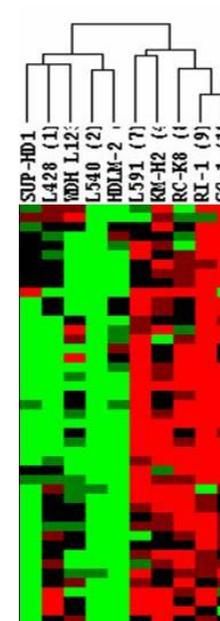
## Kontaminationen und Infektionen

- langsam wachsende Bakterien (z.B. Mykoplasmen)
- Viren



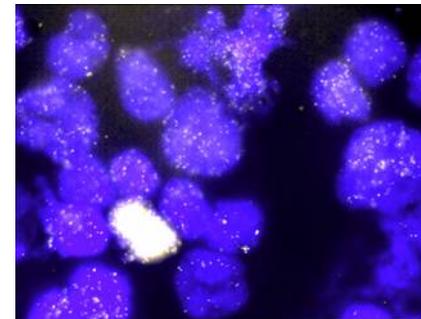
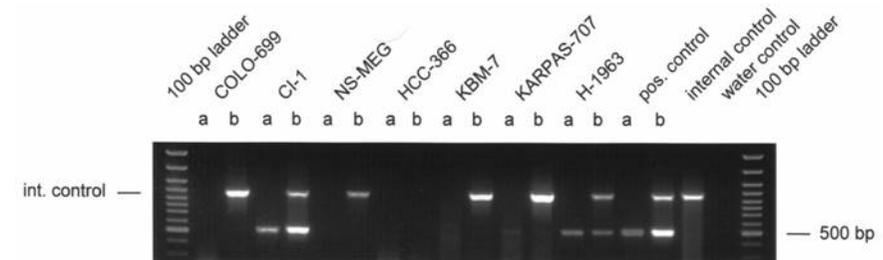
## Stabilität von Zelllinien

- genetische Stabilität
- epigenetische Stabilität



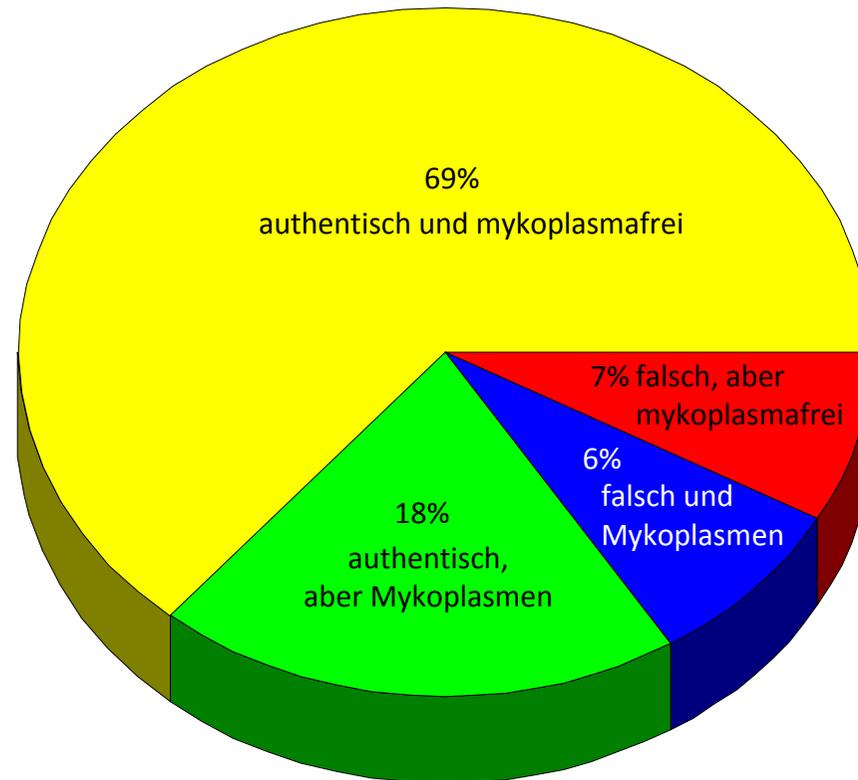
## Prävalenz von Zellkulturkontaminationen (DSMZ)

- Hefen und Pilze: ~ 2%
- „Konventionelle“ Bakterien: ~ 2%
- **Mykoplasmen: >20%**
- Viren in latenter Phase: ca. 8%  
(z.B. EBV, HBV)
- Aktive Viren: ca. 5%  
(z.B. EBV, HHV-8, HPV, C-Typ-Retroviren)
- **Kreuzkontaminationen: ca. 15%**



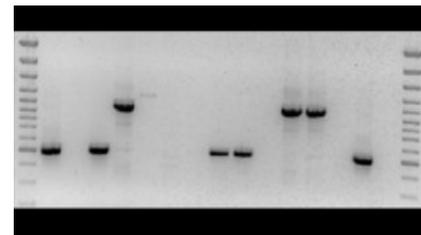
# Ausmaß von Kreuz- und Mykoplasma kontaminationen

607 Leukämie-Lymphom Zelllinien

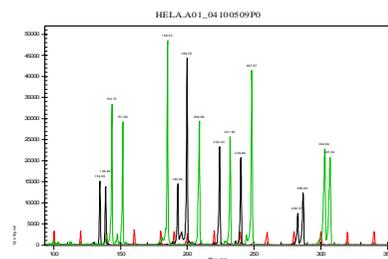


# Verifikation der Authentizität von Zelllinien

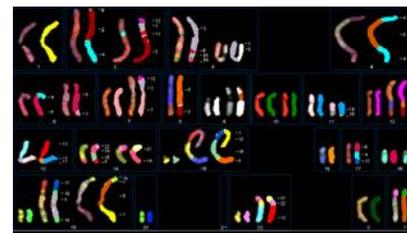
- Spezies: **PCR, Isoenzymanalyse**



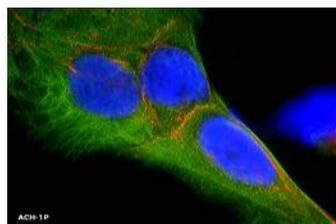
- Individuum: **DNA-Profil**



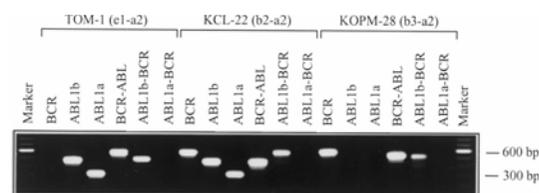
- Zytogenetik**



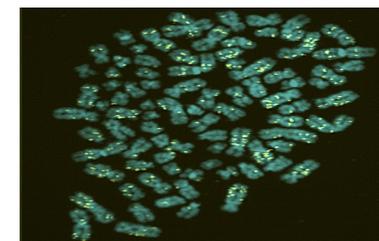
- Gewebe/Tumor: **Immunphänotypisierung**



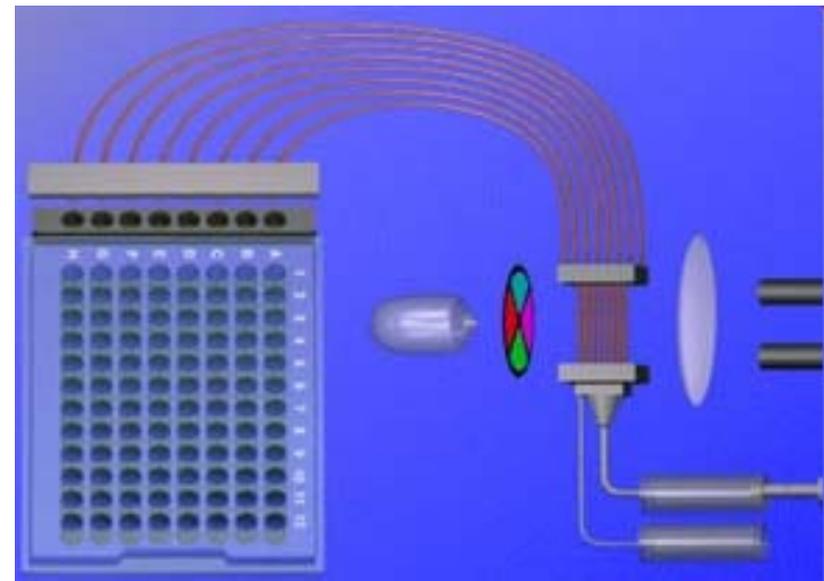
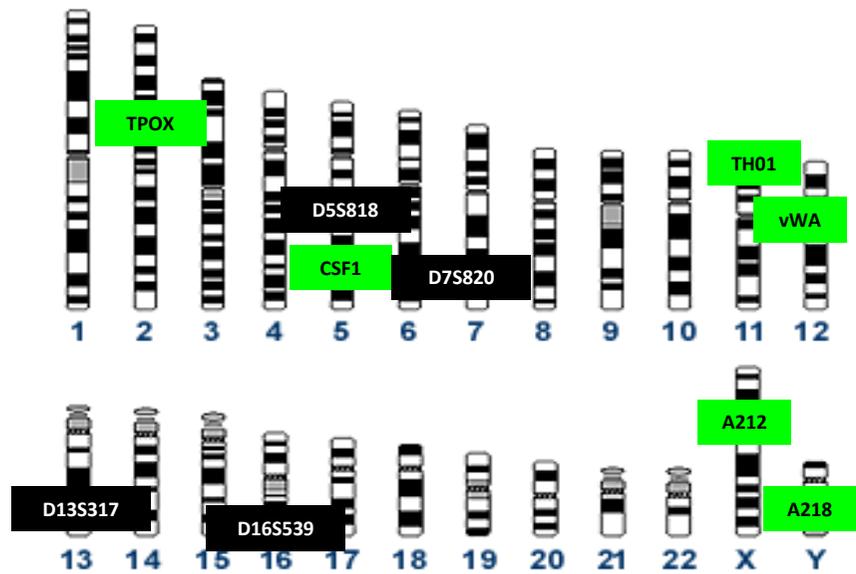
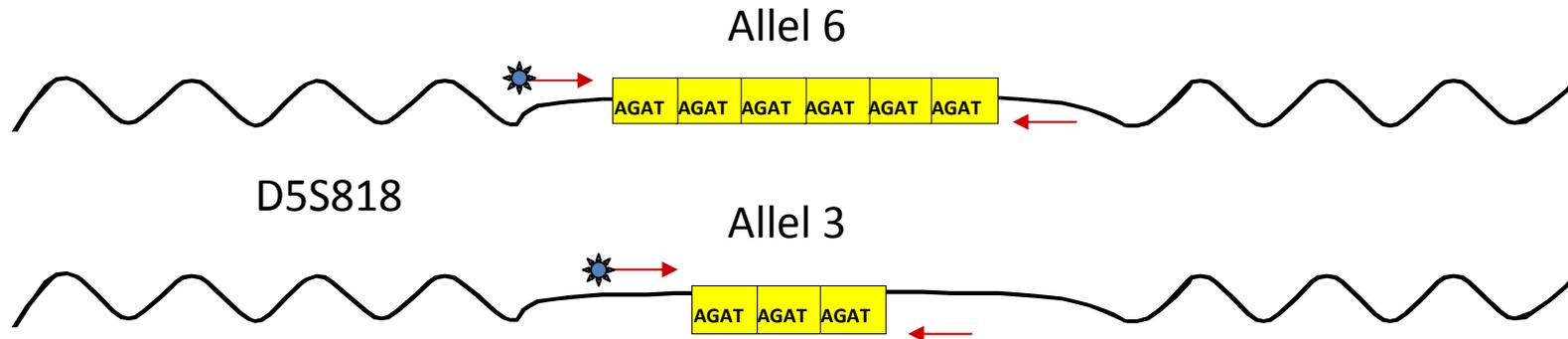
- Genexpression**



- Zytogenetik**

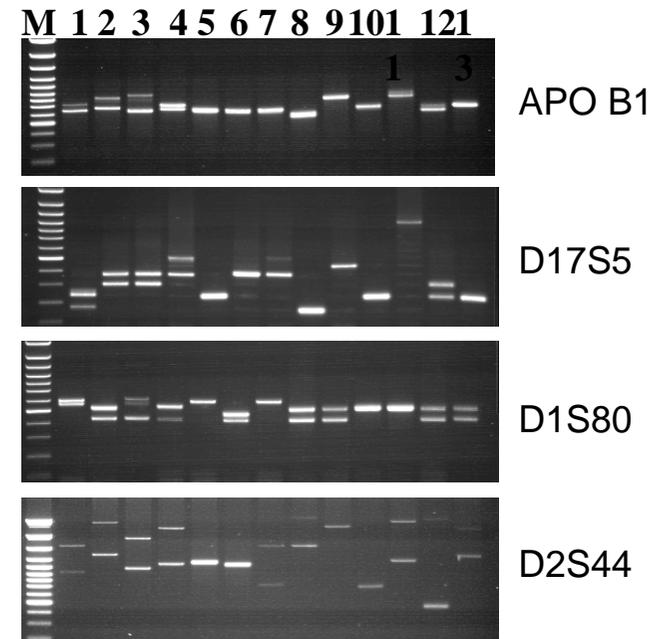
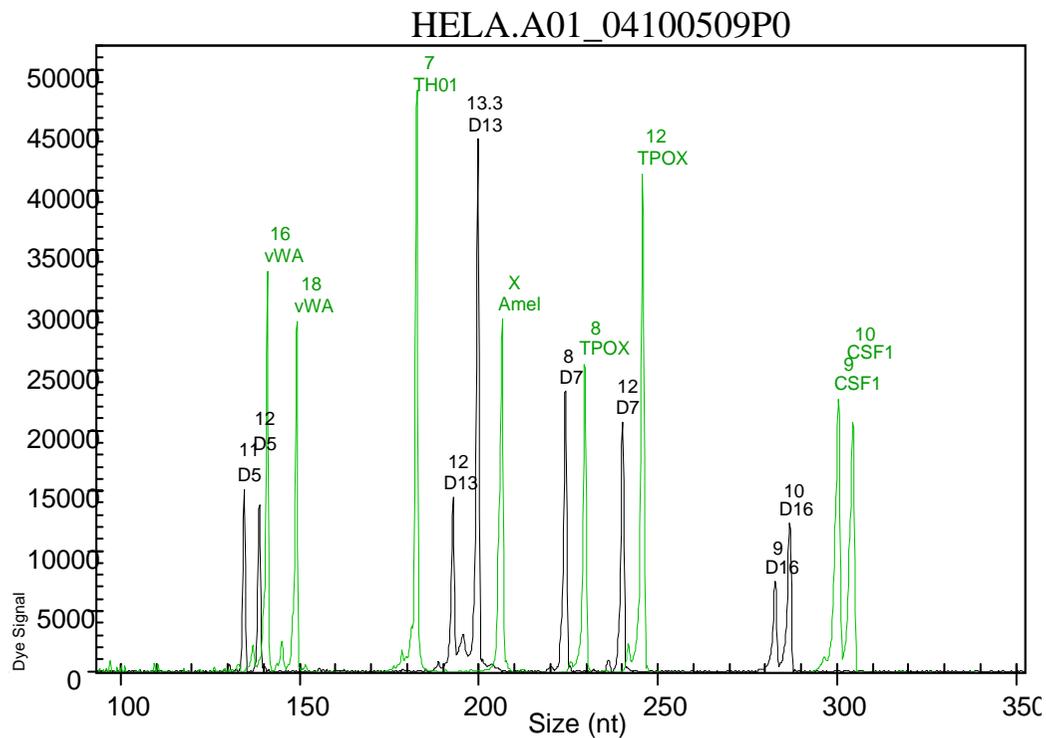


# Nonaplex Single-Locus DNA Typisierung von STRs



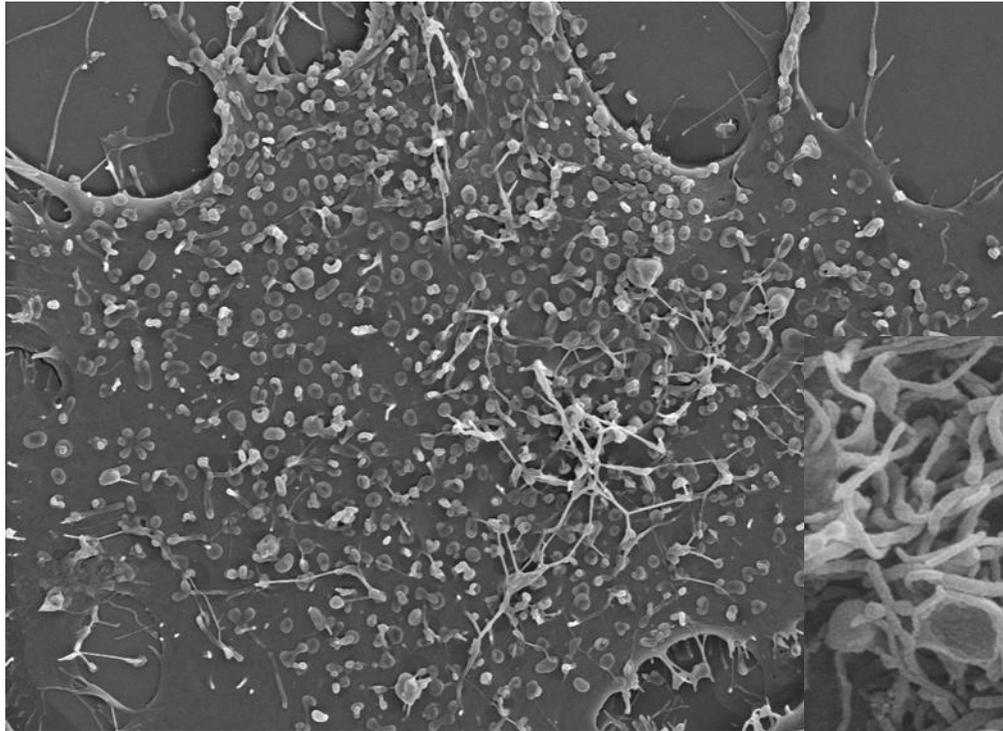
# Vom Signal zur Datenbank

ACC	Cell Line	Lot	Datum	D5	D5'	D13	D13	D7	D7'	D16	D16	vWA	vWA'	TH01	TH01'	TPOX	TPOX'	CSF1	CSF1'	Amel	Amel'
57	HELA	Referenz	11.1.2000	11	12	12	14	8	12	9	10	16	18	7	7	8	12	9	10	X	X
57	HELA	12	17.4.2005	11	12	12	14	8	12	9	10	16	18	7	7	8	12	9	10	X	X



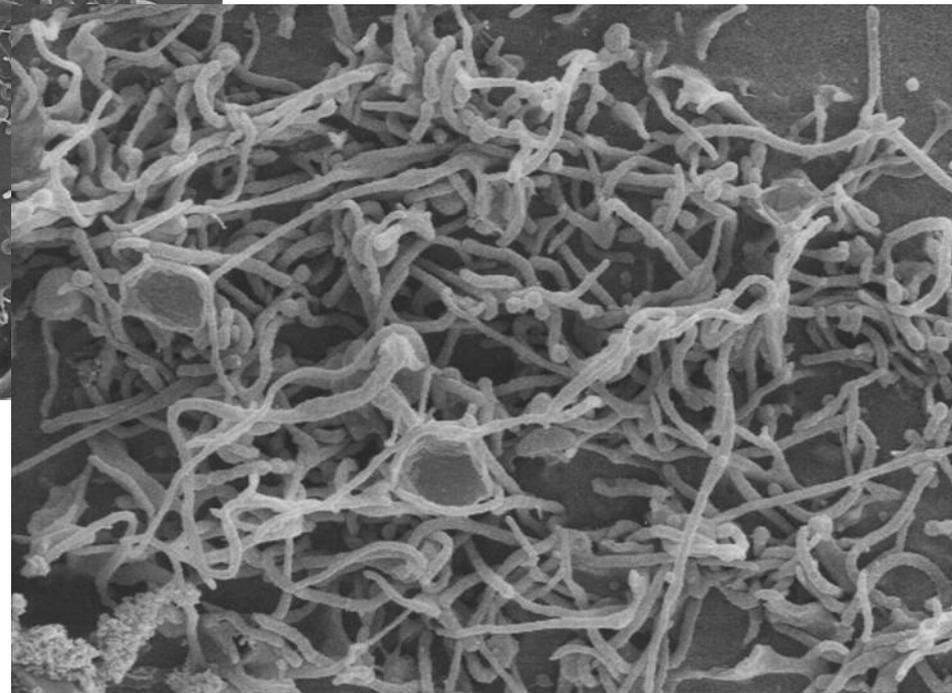
## Mykoplasmen auf HELA Zellen

---

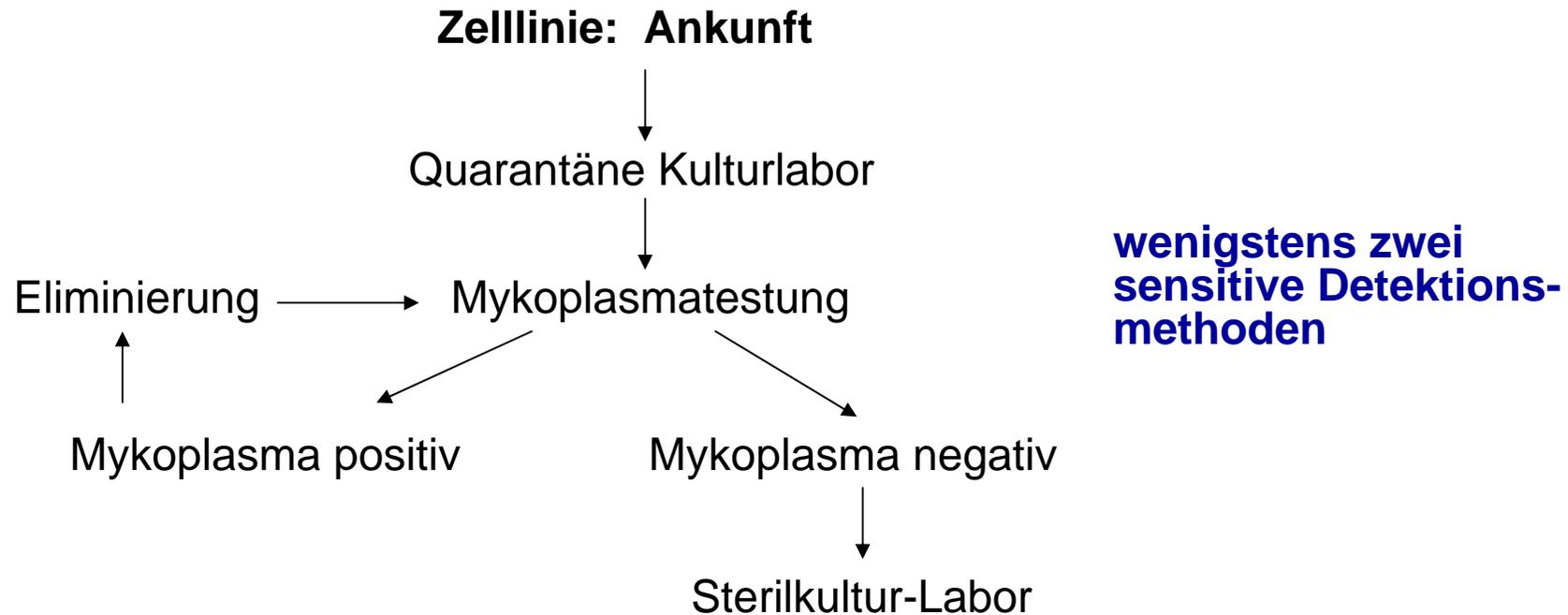


*Mycoplasma hyorhinis*

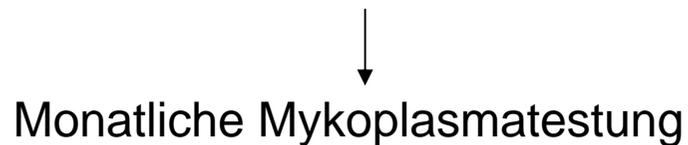
*Mycoplasma fermentans*



# Protokoll für die Detektion von Mykoplasma-Kontaminationen



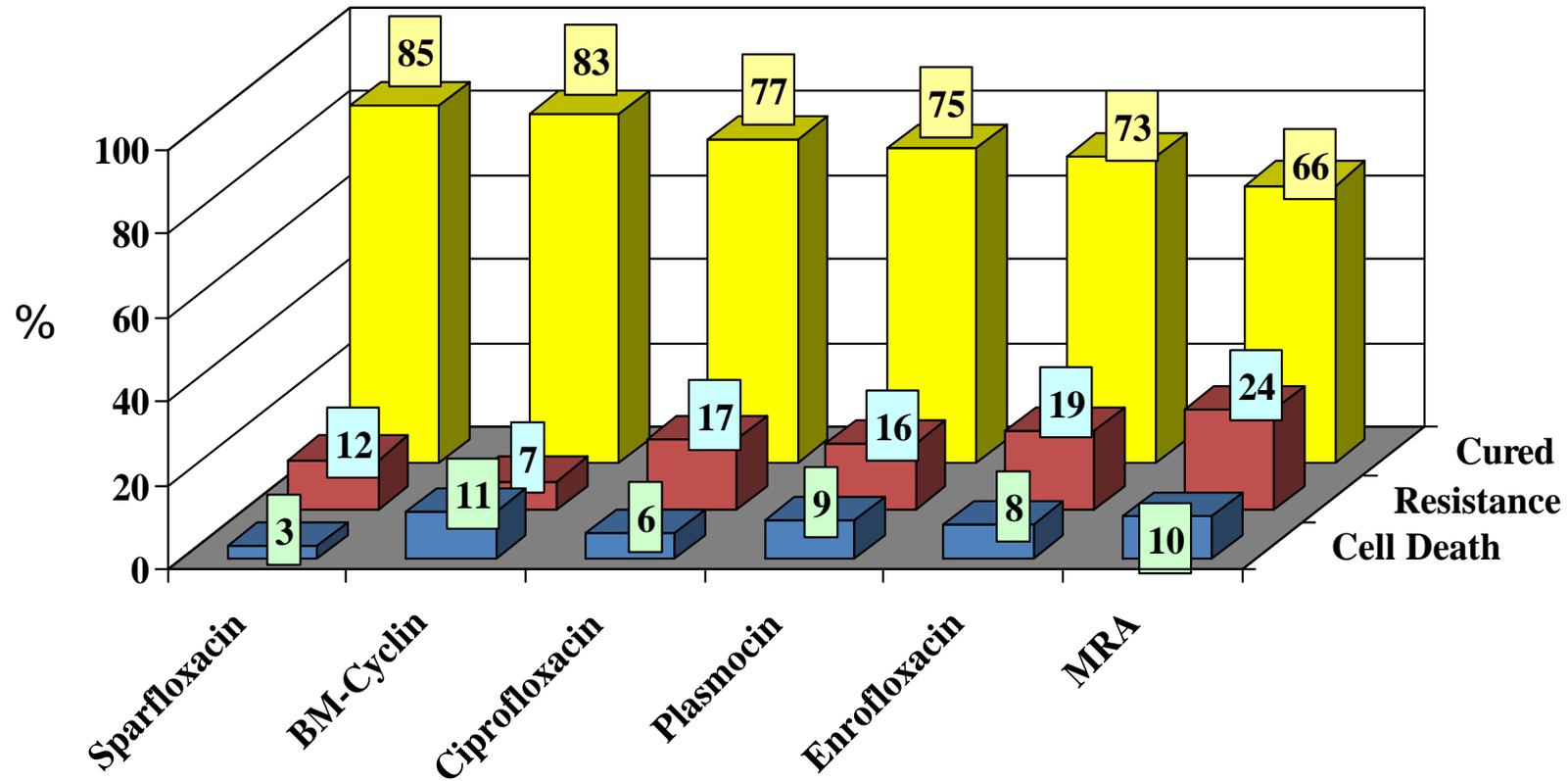
## **Zelllinie: kontinuierliche Kultur**



**eine schnelle und sensitive Detektionsmethode**



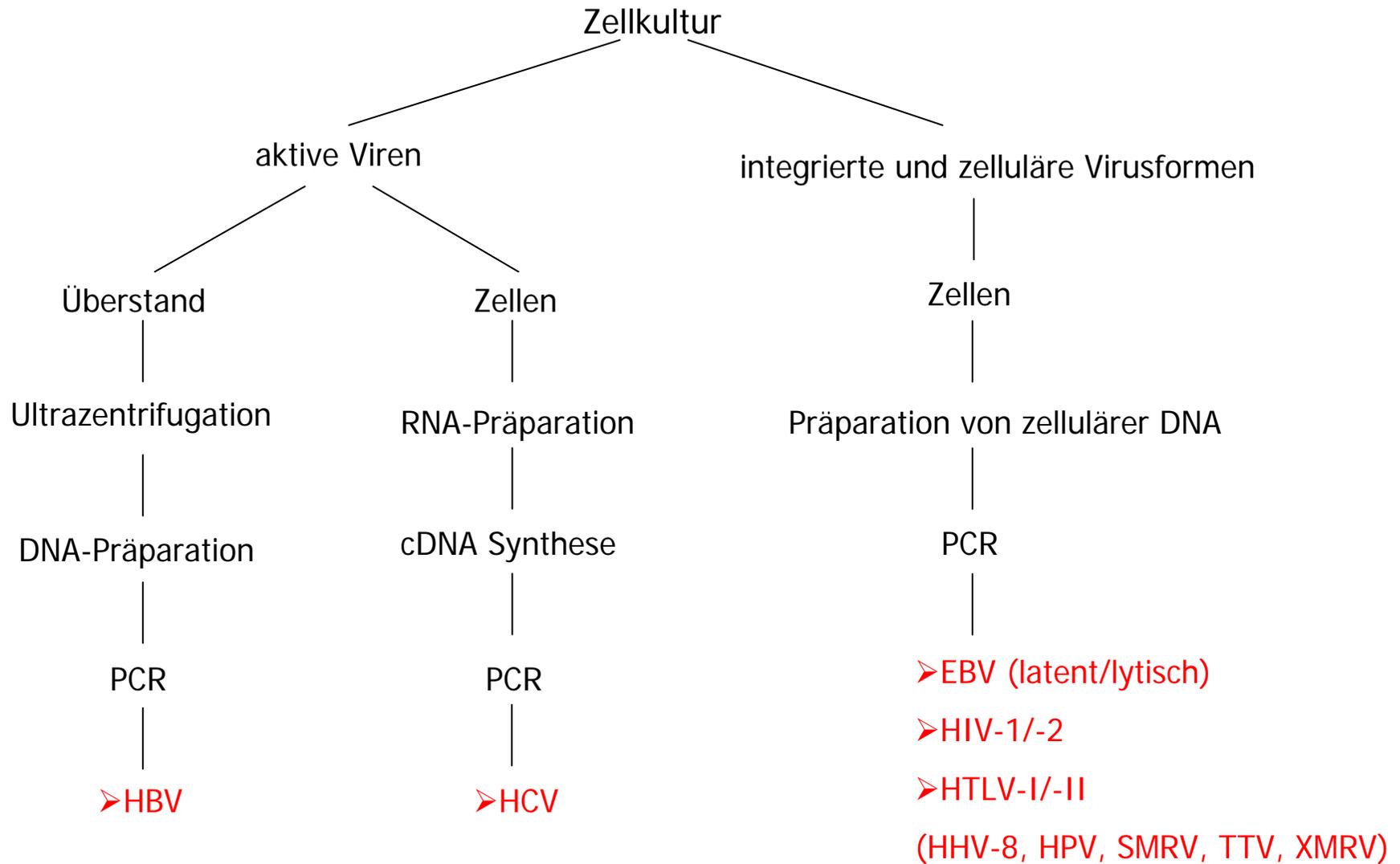
# Behandlung von Mykoplasmainfektionen



Uphoff & Drexler, *In Vitro Cell Dev Biol* 38: 86-89 (2002)  
Updated 2010



# Virusdiagnostik



# Zellkultureinrichtung

---

Ausstattung für aseptische Arbeiten in der entsprechenden biologischen Sicherheitsstufe

- zertifizierte mikrobiologische Sicherheitswerkbänke Klasse II
- Inkubatoren
- Wasserbäder, Zentrifugen, Glas- und Plastikwaren etc.
- monatliche Reinigung der Oberflächen

Zugangsbeschränkung: keine Versuchstierhaltung  
nicht autorisierte Personen



Sterilität: chemische Desinfektion vor und nach Benutzung  
zentrale Sterilisationseinrichtung

## Anwender

---

Befolgung strenger aseptischer Techniken und guter Laborpraxis  
(Grundregeln guter mikrobiologischer Technik)

Laborprotokolle für jede Zellkultur

Keine Gespräche während der Arbeit mit Zellkulturen



# Zellkulturen

---

Bezug von Zellkulturen von anerkannten Zellkultursammlungen

Expansion neuer Zellkulturen und Kryokonservierung (“master” und “working cell bank”)

Regelmäßige Überprüfung der Zellkultur auf Infektionen und Identität

Ausschließliche Nutzung von Medien und Reagenzien für jeweils eine Zelllinie

Vermeidung der Überpassagierung von Zellkulturen

Kein prophylaktischer Einsatz von Antibiotika



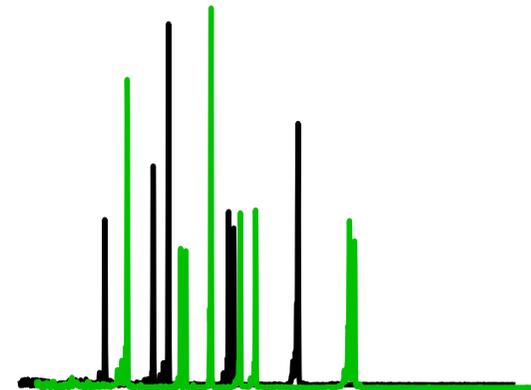
# Qualitätskontrolle

---

Zuverlässige Mykoplasma-Detektionsverfahren etablieren und regelmäßig durchführen

Identität von Zellkulturen sollte vor Projektbeginn bestätigt werden

Medienbestandteile sollten auf Sterilität getestet werden



## Zusammenfassung

---

- Kreuzkontaminationen und Kontaminationen mit Mykoplasmen gehören zu den häufigsten und hartnäckigsten Probleme in der Zellkulturtechnik
- Regelmäßige Testung der Zellkulturen ist von eminenter Bedeutung
- Bei Einhaltung der Regeln der guten Zellkulturtechnik lassen sich Kontaminationen zuverlässig vermeiden
- Viruskontaminationen und die Freisetzung der Viren sind im Allgemeinen risikobestimmend für die Zellkulturen



Review

## The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need?

Peyton Hughes<sup>1</sup>, Damian Marshall<sup>2</sup>, Yvonne Reid<sup>1</sup>, Helen Parkes<sup>2</sup>, and Cohava Gelber<sup>1</sup>

*BioTechniques* 43:575-586 (November 2007)  
doi 10.2144/000112598



# Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit

---



Kontakt: Dr. Cord Uphoff  
Bereich Menschliche und Tierische Zellkulturen  
Tel: 0531-2616156  
E-Mail: [cord.uphoff@dsmz.de](mailto:cord.uphoff@dsmz.de)



Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

---