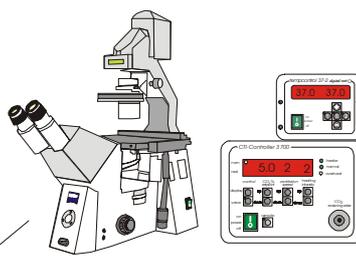


Cell Culture + Microscopy

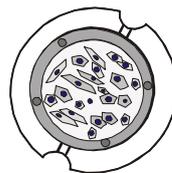
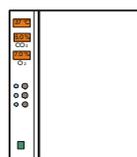
POC-R

Cell Cultivation System for Microscopy

Manual



Stabilization of the "in vitro environment"



PeCon GmbH
Fon +49 7305 95666 0
Fax +49 7305 95666 90
e-mail info@pecon.biz
www.pecon.biz

Die Kenntnis dieses Manuals ist notwendig zum Betrieb des Gerätes. Machen sie sich daher bitte mit dem Inhalt dieses Manuals vertraut und achten sie besonders auf Hinweise, die der sicheren Bedienung des Gerätes dienen.

Änderungen, die dem technischen Fortschritt dienen, bleiben vorbehalten. Das Manual unterliegt keinem "Update-Service".

Solange keine ausdrückliche Genehmigung vorliegt, ist die Weitergabe und Vervielfältigung dieses Dokuments und die Benutzung und Verbreitung seiner Inhalte nicht gestattet. Verstöße verpflichten zur Zahlung von Entschädigung.

Alle Rechte vorbehalten, die im Falle der Gewährung von Patenten und Gebrauchsmustern entstehen.

Alle in diesem Handbuch erwähnten Produktnamen können Warenzeichen oder eingetragene Warenzeichen der jeweiligen Eigentümer sein und sind nicht überall ausdrücklich durch "TM" und "®" gekennzeichnet.

© 2001

Knowledge of this manual is required for the operation of the device. Would you therefore please make yourself familiar with the contents of this manual and pay special attention to hints concerning the safe operation of the device.

Design and specifications are subject to change without notice. The manual is not covered by an update service.

Unless expressly authorized, forwarding and duplication of this document, and the utilization and communication of its contents are not permitted. Violations will entail an obligation to pay compensation.

All rights reserved in the event of granting of patents or registration of a utility model.

All product names mentioned herein may be the trademarks or registered trademarks of their respective companies and "TM" and "®" are not mentioned in each case in this manual.

© 2001

POC-R Cell Cultivation System for Microscopy

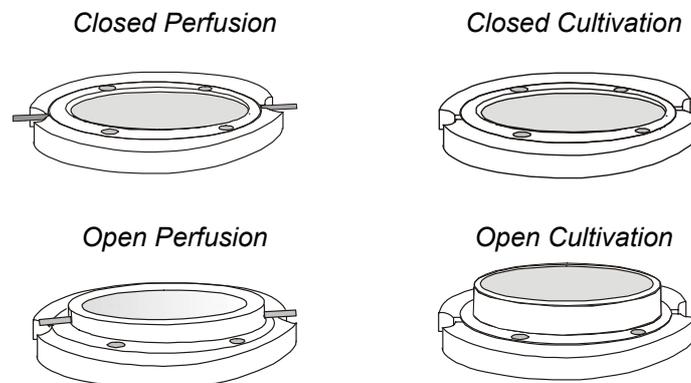
A Chamber - System for cells in vitro - for

[Perfusion](#), [Open](#) and [Closed](#) cultivation.

Improved microscopes, their objectives and optical techniques now allow higher standards in microscopic analysis of living cells. In addition, heated microscope stages and climate boxes are available which allow observation of cells under stabilized temperature. The climate box is capable to hold the correct temperature and the pH-value of the medium in which the cells are being cultured by regulation of the CO₂. (Carl Zeiss, Göttingen). This is an important step in stabilizing specific parameters for the standardization of in vitro tests.

The [POC-R Chamber System](#) satisfies conditions for the use of different microscopic methods for observation and analysis of living cells.

The System with a round base plate provides 4 different applications possibilities



External Dimensions: Base plate 58 Ø x 5:5 mm (Aluminium, black anodized)

Microscope: The different Heating Mounting Frames A-H, K-H, M-H, the Universal Mounting Frame M and K or the Heating Frame, Heating-Cooling Frame and the Heating Insert P can be used

Cultivation area

- Cultivation on glass: Cover slip 0.17 mm (ideal refractive index) or foil (e.g. CultFoil, 0.025 mm, gas permeabel).

Observation area (29-32 mm Ø)

- High resolution oil immersion objectives can be used.

Variable height of the chamber

- Using the *closed* chamber version the distance between the upper and lower glass is variable (1 or 2 mm). Cells can also be cultivated on both cover slips.

Perfusion

- In the case of perfusion in the *closed* version the inner height of the chamber is 0.7 mm or less.

The chamber is alterable

- The chamber can be modified between open and closed cultivation, as well as the perfusion in the open and closed version of the same cells.
- The cells can be precultivated on cover slips (42 mm Ø) in Petri dishes (60 mm Ø).

Advantage

- easy to use, rapid to assemble
- produced of non-toxic materials
- sterilization of the mounted chamber

Pictures of the POC-R System:
(original size)



Closed Perfusion

observation area: 6.6 cm², Ø 29 mm
weight (approx): 34 g



Closed Cultivation

observation area: 8 cm², Ø 32 mm
weight (approx): 27 g



Open Cultivation

observation area: 6.6 cm², Ø 29 mm
weight (approx): 39 g

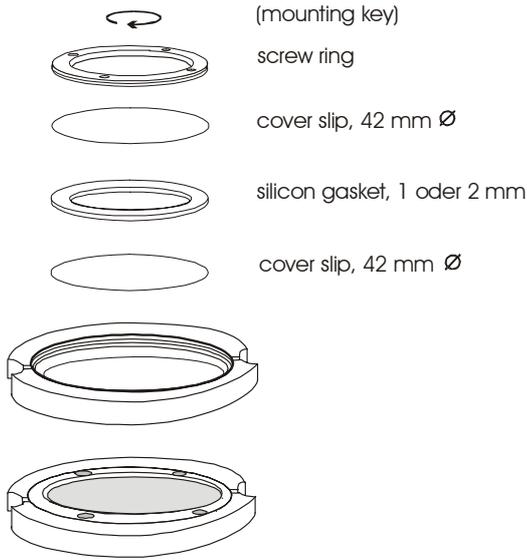


Open Perfusion

observation area: 6.6 cm², Ø 29 mm
weight (approx): 68 g

POC-R "Closed" Cultivation System

Assembly



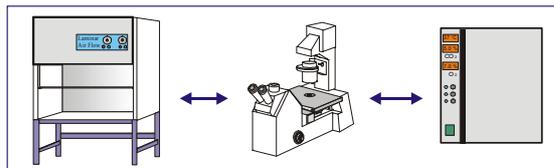
Dimensions: 58 x 5,5 mm
Observation area: 8 cm², 32 mm Ø
Volume: 1 mm gasket approx. 0.9 ml
 2 mm gasket approx. 1.8 ml
Material: Base plate: Aluminium, black anodized
 Screw ring: stainless steel
 Gasket: Silicon
 Cover slip: 42.0Ø x 0.17 mm
 Mounting key: Aluminium with stainless steel-pins

Characteristics: *Silicon*: gas permeable, dry sterilization, non-toxic and "closed" again when the needle is removed.
Aluminium is an extremely good heat conductor
Cover slip hydrolytic class 1, borosilicate glass, preferable for all microscopic procedures

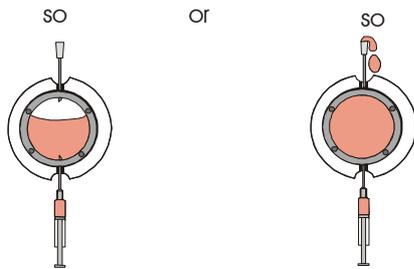
Feature:

- * Optimum conditions for the microscopic observation - plane surfaces - no meniscus.
- * *The chamber can be turned:* Cultivation of cells on one or both cover slips.
- * The cells can be observed on a "upright" microscope using a long-distance condenser. The chamber must be turned.

Sterilization: 165°C for 2 hrs. - After sterilization the screw ring should again be tightened



changing of medium



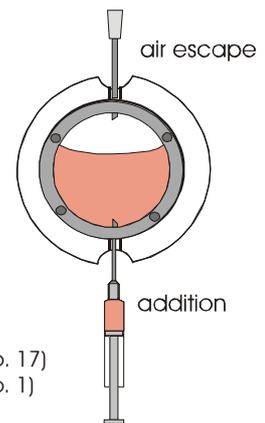
remove the medium and introduce fresh medium **slowly** (the better method)

introduce fresh medium **slowly**, displacing the "old" medium

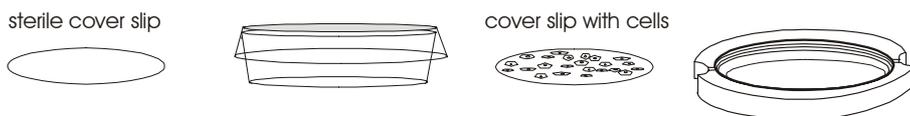
Recommendation

using 1 mm silicon : addition with 25 G (No. 18), exit 24 G (No. 17)
 using 2 mm silicon : addition with 23 G (No. 14), exit 20 G (No. 1)

addition of nutrition medium + cells



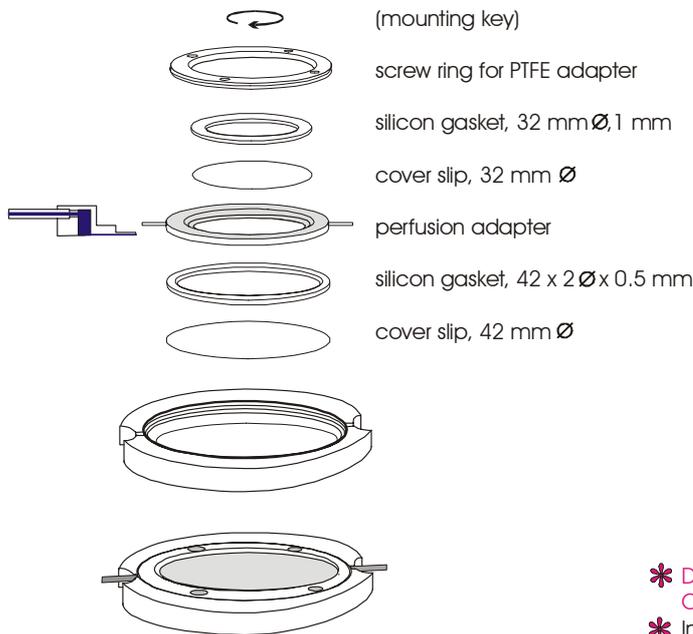
A precultivation of cells on cover slips in Petri dishes ("60er") is possible!



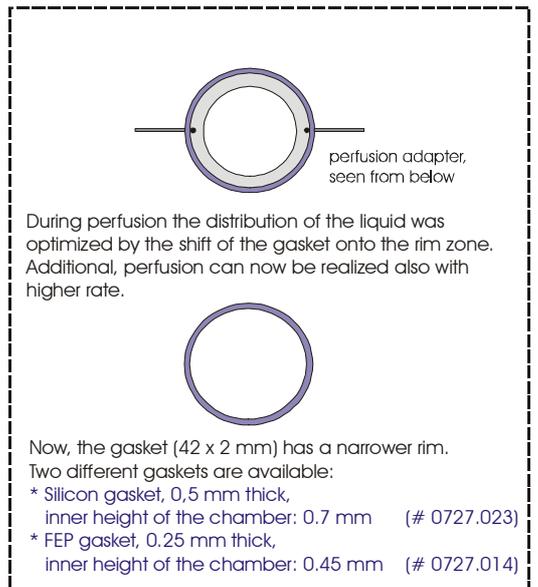
the different components of the POC-R Chamber must be sterilized beforehand

Perfusion in the "closed" cultivation chamber

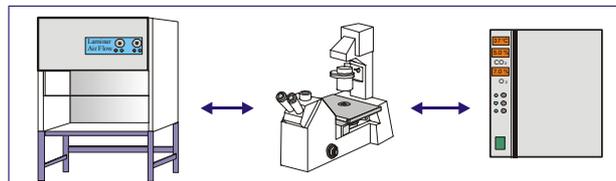
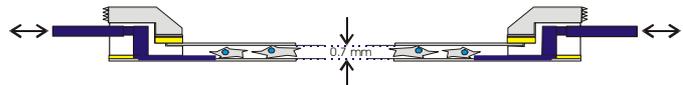
Assembly



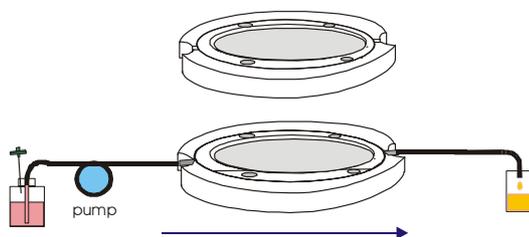
Sterilization:
 +165°C for 2 hrs. - After sterilization
 the screw ring should again be tightened



- * **Dimensions:** 58 Ø x 5,5 mm
- * **Observation area:** 6,6 cm², 29 mm Ø
- * **Inner height of the chamber:**
 Silicon gasket 0,5 mm = 0,7 mm
 FEP gasket 0,2 mm = 0,4 mm



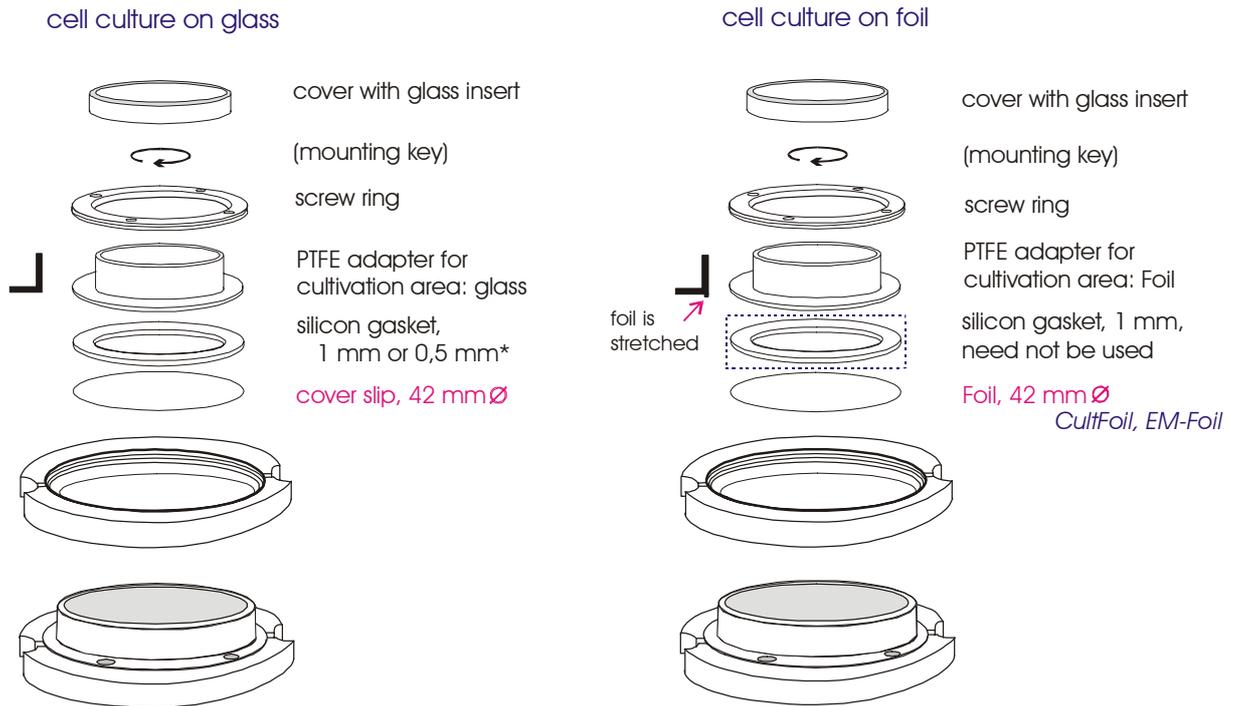
Example of a perfusion



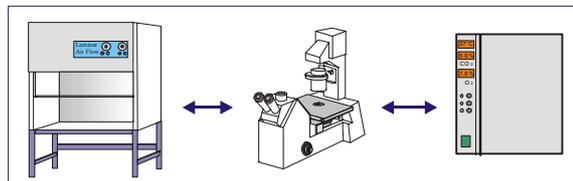
- * Draw the sterilized tubes (e.g. silicon tube, inner Ø 0.9 - 1.0 mm) over the canal tubes (stainless steel tube, inner Ø 0.6 mm) at the perfusion adapter..
- * Normally, the perfusion is realized by pressure:
 syringe (1 ml) by hand
 automatic syringe pump
 peristaltic pump
- * **Flow-rate:** For optimal physiological conditions in cell culture with a middle density a flow rate of 0.1 - 0.25 ml/hr. is used.

"Open" Cultivation System

Assembly

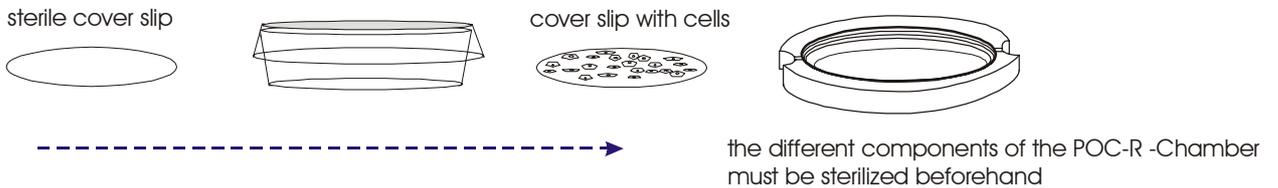


Dimensions: 58Ø x 5,5 mm
 Observation area: 6,6 cm², 29 mm Ø
 Sterilization of the mounted chamber with cover at +165°C approx. 2hrs.



Introduce or displace nutrition medium, cells etc. as a Petri dishes.

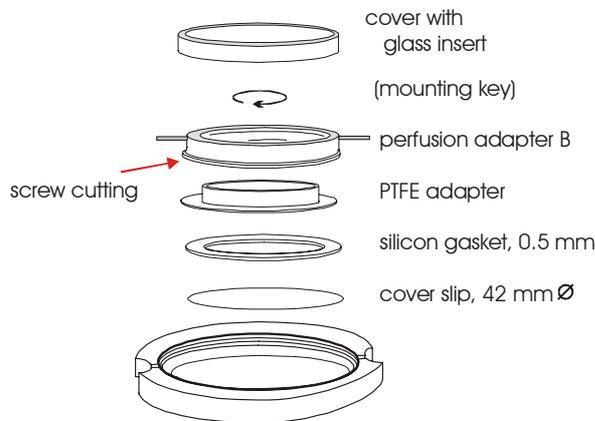
A precultivation of cells on cover slips in Petri dishes ("60") is possible!



* Changing from "open" cultivation chamber (glass) to the "closed" perfusion system under the laminar air flow is possible using the 0.5 mm silicon gasket:
 sterilize mounting key - remove the PTFE adapter - place the sterile perfusion adapter with the 32 mmØ cover slip and the silicon gasket, fix this with the mounting key

Perfusion in the "open" cell cultivation system

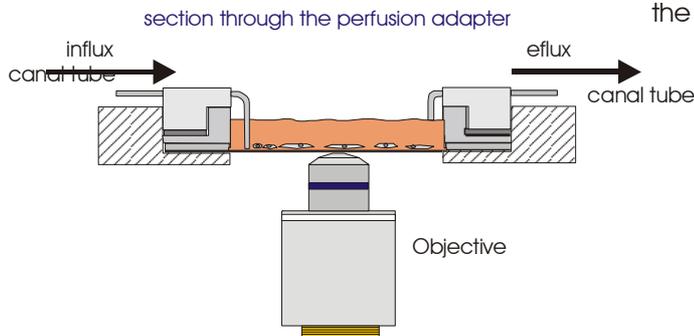
Perfusion adapter
 screw-in, with a special flat PTFE adapter
 (micromanipulation, injection of cells)



The distance between the growth surface and the top of the adapter = 7.5 mm

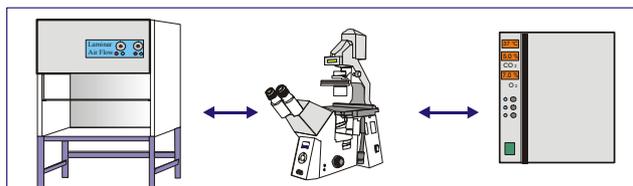
Sterilization:

+165°C for 2 hrs.. - After sterilization the screw ring should again be tightened

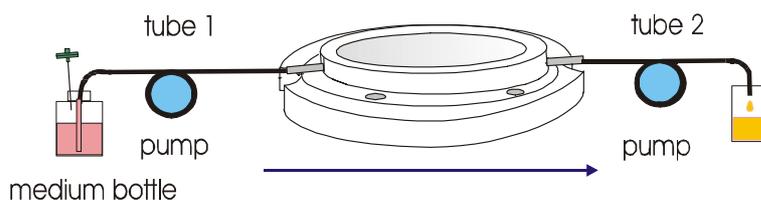


Advantage of the perfusion adapter

- * observation area: 29 mm
- * a special flat PTFE adapter, micromanipulation, injection of cells
- * open access to the cell culture (cover)
- * the medium changes can be performed either slowly or rapidly using two tubes of different length
- * the height of the tubes within the PTFE adapter can be varied for a distinct amount of medium



Example of a perfusion system



Peristaltic pump

If a multicanal peristaltic pump is used, the *influx* and *efflux* of the culture fluid can be performed by using the same pump. In this case the tube through which the fluid is removed has a slightly greater diameter than that through which it is enters.

Syringe pump

Instead of a peristaltic pump, a syringe can be used to introduce medium into the chamber.

Medium bottle

A 25 mm diameter hole is bored into the top of the medium bottle lid. A 4 mm thick silicon plate is used for sealing. A needle, for example an injection needle (1.2 mm external dia., 15 mm long) is inserted through the silicon seal and bent slightly. The needle is inserted not through the top, but through the bottom of the seal so that it will be immersed in the medium when the lid is put on the bottle. So that the pressure is equalized, a second needle is pierced through the seal. This needle is attached to a hydrophobic sterile filter. The unit without the filter must be sterilized.

Silicon tubing 1

Tubing with an *internal diameter* of 0.7 mm for medium influx.

Silicon tubing 2

Tubing with an *internal diameter* of 1.0 mm for medium efflux.

The outer diameter of the perfusion adapter tubes is 1.4 mm, the inner diameter is 1.0 mm.

Different types of tubing can be used;

e.g. silicon, Norprene[®], Tygon[®], Teflon[®]. See *Material Description!*

All components can be dry-heat sterilized (2-3 hrs. at +165°C) or autoclaved at +121°C

Perfusion Procedure

slow perfusion

Medium is passed from the medium reservoir bottle through the tubing via the pump into the POC-Chamber through the longer of the two adapter tubes. The medium is withdrawn through the shorter adapter tube.

The perfusion speed can be varied widely, but an optimal flow rate for a cell culture would be between 0.1 and 0.25 ml/hr.

For *long-time observations*, an inverse microscope with a constant temperature stage with the possibility for constant pH-values must be used. For these studies a *climate box*, in which the temperature and CO₂ is controlled, is used in conjunction with the heated microscope stage (Carl Zeiss, Leica)

The medium container can then be outside of this box. The slow perfusion allows the medium to be warmed as well as the pH to be controlled via the gas permeable silicon tubing, before it reaches the cells.

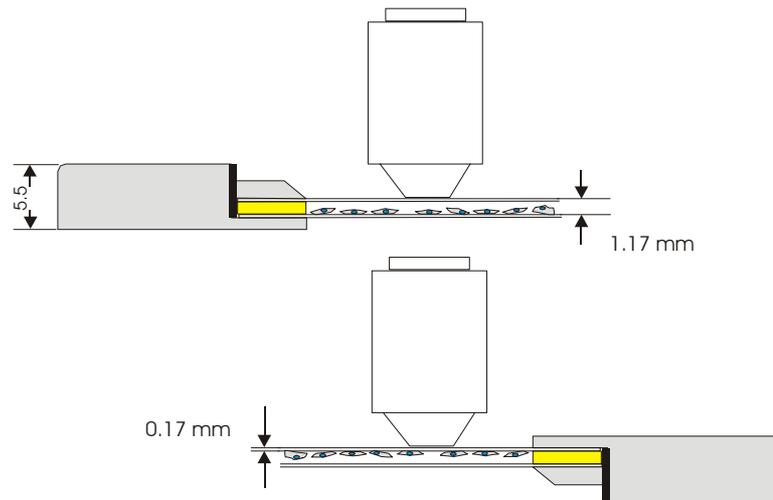
fast perfusion

To achieve a fast perfusion, the medium enters through the longer perfusion adapter tubes and exits via the shorter tube. A syringe can be used for this procedure. In this way, a medium change can occur in about 8 sec: addition of 2.5 ml in 4 sec and removal under vacuum in 4 sec. In this case, silicon tubing with an internal diameter of 0.7 mm is used. Since the internal diameter of the tubes of the perfusion ring is 1.2 mm, this allows the flow rate to be increased with a reduction in time of between 2.5 and 3 sec.

POC-R Cell Cultivation System on "upright" microscopes

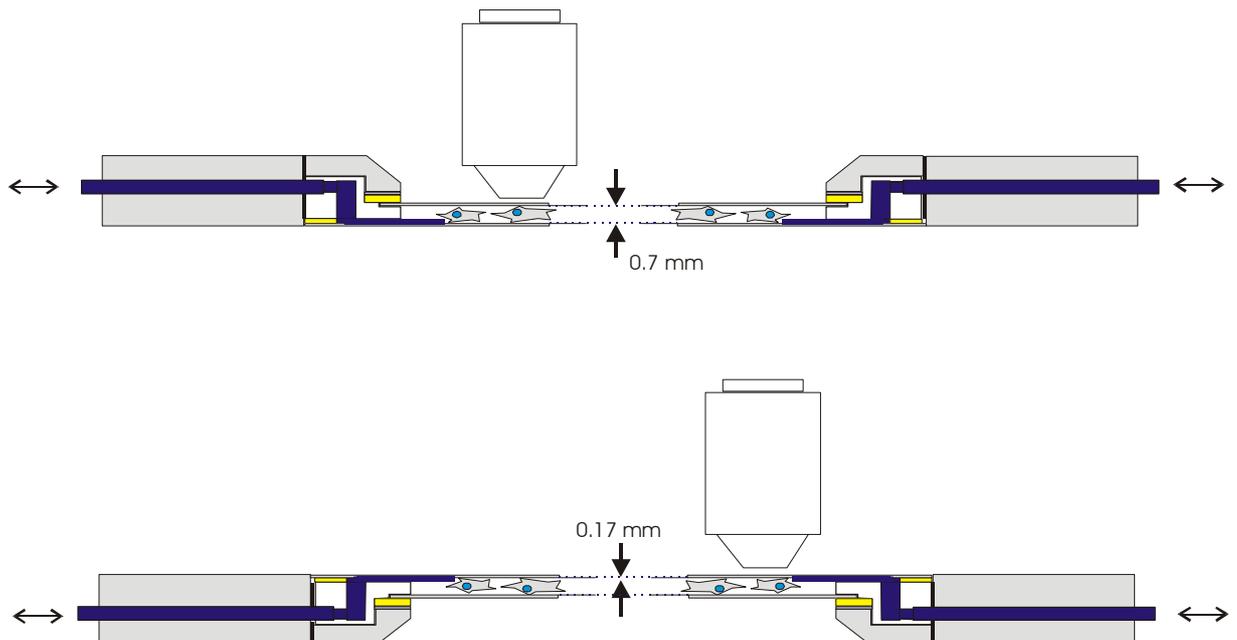
The POC-R Chamber System can also be used on "upright" microscopes. In this application the working-distance of the objectives and condensers is important.

Closed cultivation



The POC-R Chamber can be turned

Perfusion in the *closed* system



Use of foils for the preparation of a monolayer cell culture for electron microscopy

Beside the FEP foil, there is a special polyester foil, called "EM foil" which is especially suitable for the preparation of monolayer cell cultures for electron microscopy, since it can be removed easily from the embedding resin. During sterilization, the 23 µm thick foil becomes a partially crystallized amorphous material on the surface. But this does not have any effect on cell growth and can be removed using sterile medium.

If the foil is handled carefully, extra cleaning of the foil is not necessary. Dust can be removed with filtered air. Dirty foils can be cleaned using a detergent and pure ethanol and then washed in double distilled water.

Cell Culture

The 42 mm diameter foil is placed in the base plate of the POC-Chamber. The PTFE adapter (without the silicon seal) is depressed onto the foil by screwing the screw ring in the base plate using the mounting key. The EM foil is thereby stretched and simultaneously sealed. The cover is added and the POC-Chamber sterilized using dry heat for 2 h at +165°C or autoclaved at +121°C. When the chamber has cooled down, the cells with medium can be introduced into the chamber and incubated in a CO₂-incubator.

Preparation for electron microscopy

- Displace the cover from the PTFE-adapter of the POC and suck off the medium.
- Wash the cells twice with medium without serum, cautiously (temperature of the medium 37°C).
- Fix the cells with 2 % glutaraldehyde dissolved in 0.05 M Na-cacodylate buffer, pH 7.2, for 1.5 hrs at room temperature.
- Wash twice with Na-cacodylate buffer (0.05 M, pH 7.2).
- Postfix in 1 % osmium tetroxide in 0.05 M Na-cacodylate buffer, pH 7.2 + 8 % sucrose for 1.5 hrs at room temperature.
- Dehydration in pure ethanol: 50 % for 2 x 7 min, 70 % over night, 90 % for 2 x 7 min, methacrylic acid-2-hydroxypropylester for 3 x 15 min.
- Embedding: mixture of methacrylic acid-2-hydroxypropylester with epoxy resin at times for 30 min - 2:1, 1:1, 1:2 at room temperature; epoxy resin twice for 1 h.
- Polymerize the resin at 65°C for 48 hrs.

Important:

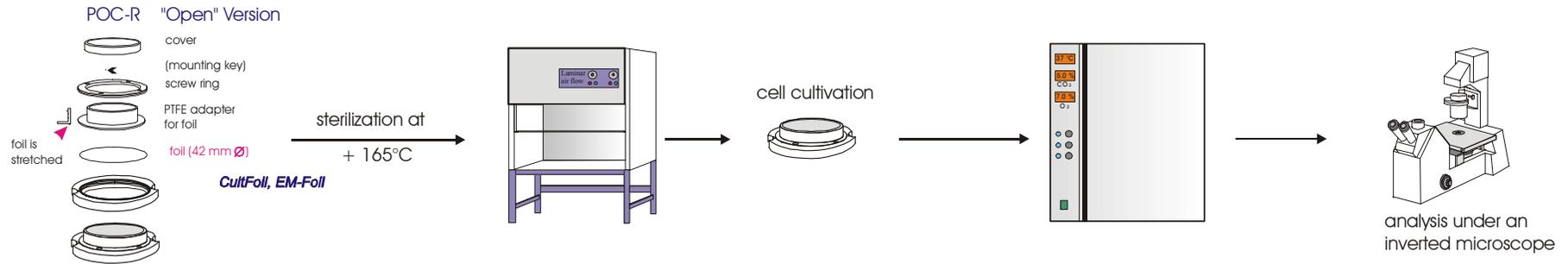
- During polymerization the cover of the adapter should not be in place, since during this process, components of the resin could collect on the cover and flow down the side into the screw thread of the base plate or screw ring.

After polymerization, the screw ring is removed using the key and the PTFE-adapter with the resin and foil attached taken out of the base plate.

The foil is peeled off and the resin block removed from the PTFE-adapter.

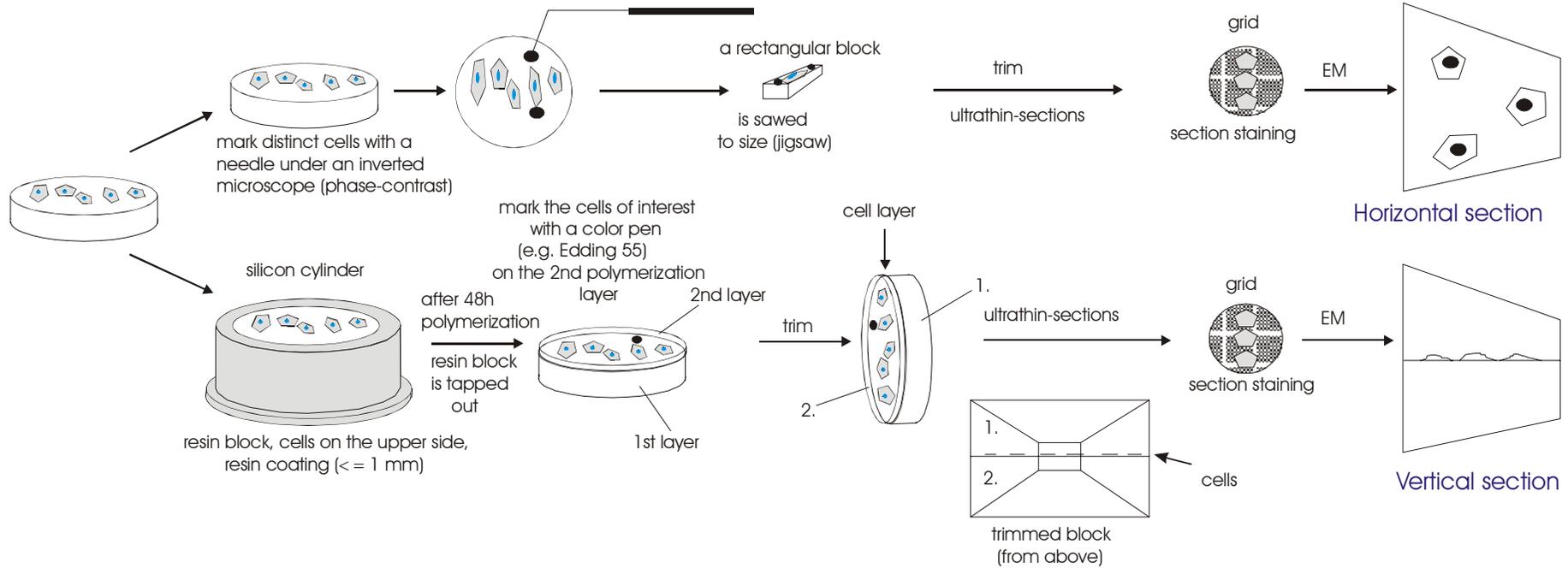
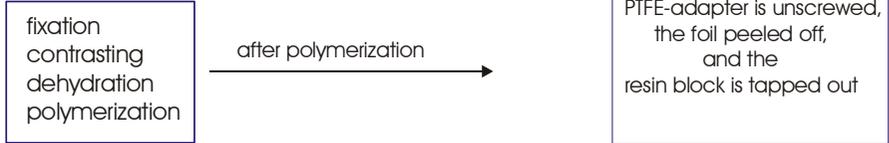
The embedded cells can now be viewed under an inverted light microscope (phase contrast) and, if necessary, marked.

Vertical sections without the "sandwich" method (see Fig.: cells between two resin layers) would be disadvantageous because under the electron microscope, in most cases, the slices bend from the influence of the electron beam.



Preparation of cultivated anchorage-dependent cells in the POC-R Chamber

-- wax embedding, staining of slices and light microscopy
-- preparation of cells for EM studies ⇒ ⇒



Material Description

Aluminium: Base plate and mounting key

- Aluminium is an extremely good heat conductor. The surface of these parts are heat-treated and strengthened due to an anodized coating. However, this procedure does not compatible with strong alkali cleaning materials. For this reason, these parts should only be cleaned with distilled water or 70 % ethanol.
- The black anodized base plate should not be placed into a CO₂-incubator with copper trays since this will cause "electrolysis" and damage the surface of the chamber. In this case place the chamber on a glass, plastic or stainless steel base.

V2A-Steel: Perfusion adapter, Perfusion adapter **A**, Perfusion adapter **B**, screw ring, cover frame and canal tube

- The Perfusion adapter for closed cultivation should be handled with care because the rim which supports the cover slip (0.2 mm, on the outer area, 0.1 mm) can easily be bent. The canal tube can be cleaned with 70 % ethanol or other cleaning fluids and well rinsed with distilled water.

PTFE und FEP: Registered name Teflon® (DuPont), Hostaflon® (Hoechst)

- *PTFE adapter*: This is a very inert material which is insensitive to most cleaning materials. It is best cleaned with 70 % ethanol or other laboratory cleaning fluids and then rinsed well with distilled water. temperature: PTFE more than 200°C
- *FEP-Foil (CultFoil, PeCon)*: This foil has a treated (hydrophilic) and smooth (hydrophobic) surface. The thickness of the foil is 25 µm.

To distinguish between the two surfaces

- a.) The hydrophilic side demonstrates an adhesion to paper.
- b.) It is not possible to write on the hydrophobic side using a felt tip pen

Characteristics and uses

- high gas permeability
- permeable to ionizing radiation even below 300 nm
- non-toxic
- inert to most cleaning materials
- hydrophilic surface*:
 - excellent cell adhesion
- hydrophobe surface*:
 - suspension culture
 - colony formation in agar or methyl cellulose
 - can be easily removed from resin after embedding for electron microscopy
 - temperature: +170/180°C

Silicon: Gaskets: non-toxic, gas permeable with a hardness of 40 and 60 Shore

- After use, wash immediately under running water and rinse in distilled water. If necessary, boil for 10 min in distilled water or autoclave at +121°C.
Do not use cleaning liquids, although ethanol can be employed.
temperature: + 180°C

Tubing material for perfusion: non-toxic

- *Silicone* is very elastic, gas permeable, can be sterilized by autoclaving as well as by dry heat (165-180°C).
- *Norprene*® is much less gas permeable, but has a longer life than silicon in a peristaltic pump. It can also be autoclaved (121°C).
- *Tygon*® tubing is crystal clear, does not oxidized, has very smooth surfaces, is elastic and ideal for peristaltic pumps. It is not particularly gas permeable and can be autoclaved (121°C).
- *Teflon*® (PTFE, TFE, FEP) is extremely inert to almost all solvents: If thin tubing is used, it can be gas permeable but is not particularly elastic. It must be connected to steel tubes of the perfusion adapters by silicon tubing and cannot be used in peristaltic pumps. It can be sterilized by dry heat or autoclaving.

Glass: cover slips, 0.17 mm

- Hydrolytic class 1, borosilicate glass. Cleaning is not usually necessary. However, normal laboratory cleaning liquids can be used followed by rinsing in distilled water. Always use a pair of tweezers to handle the cover slips and grip them only on the rim.
- Recommended cleaning in a laminar air-flow bench: Dip the cover glass in ethanol and let the latter drip into a beaker. Then pass the cover slip through a flame to burn off rest of the ethanol. Keep the cover slip in a horizontal position until it has cooled.

Sterilization: Either the whole chamber or parts of the chamber can be sterilized.

- Dry sterilization at +165°C to 170°C for 2 h
- Autoclaving at +121°C

After sterilization of the perfusion or "closed" chamber, the screw ring should again be tightened.

Trouble-shooting

Observation	Possible cause	Correction
Glass breaks when putting chamber together or by sterilization	Bad quality glass	New or different glass
	"Closed" culture: Too much pressure within the chamber during sterilization	Insert a needle trough the silicon walls to release pressure inside the chamber
	"Open" culture: Instead of the PTFE adapter for "glass", the adapter for the FEP-Foil has been used	Change the adapter
Chamber leaks	Screw ring not tight enough	Tighten ring with key
	Silicon ring not properly cleaned, so that dust is present on the surfaces	Clean silicon ring again, if necessary with ethanol
	PTFE adapters: Deep scratches or indentations in the surface connecting with the silicon ring	Use a new adapter

References

- Pentz, S. and Hörler, H. (1992) A variable cell culture chamber for "open" and "closed" cultivation, perfusion and high microscopic resolution of living cells. *J. Microsc.* **167**, 97-103.
- Pentz, S. and Hörler, H. (1990) Beating heart cells in vitro - a cells system for drugs and toxins. *Eur. J. Cell Biol.* **30**, 51.
- Freimann, R. Pentz, S. and Hörler, H. (1997) Development of a standing-wave fluorescence microscope with high nodal plane flatness. *J. Microsc.* **187**, 193-200.

POC-R Cell Cultivation System

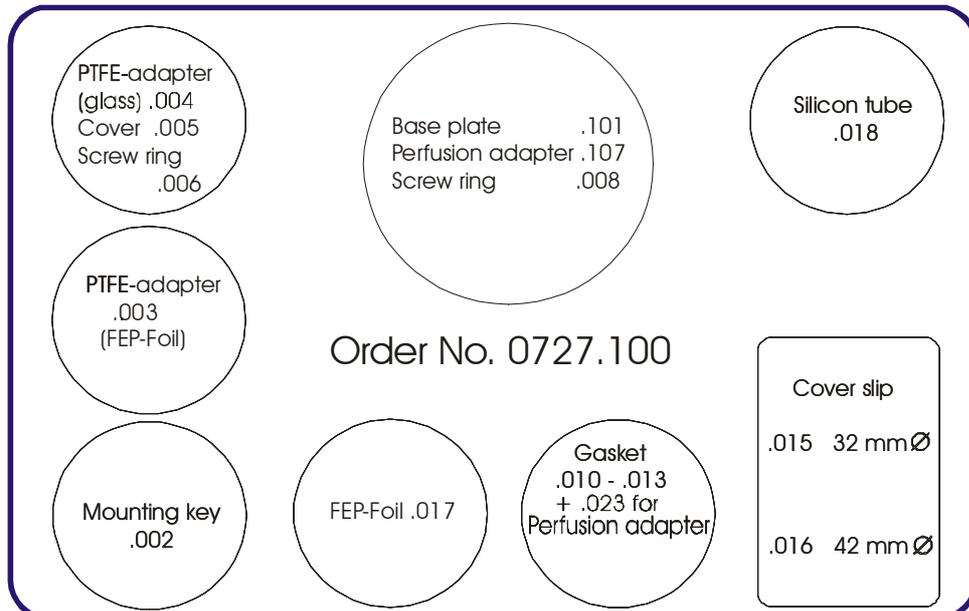
(Perfusion, Open, Closed)

Order of accessories:

PeCon GmbH
Fon 0049 7305 95666 0
Fax 0049 7305 95666 90
e-mail info@pecon.biz

Pieces	Article	Order Number
	POC-R Set in case	0727.100
	Parts of the POC-Set:	
1	Chamber, base plate	0727.101
1	Mounting key	0727.002
1	PTFE adapter for foil	0727.003
1	PTFE adapter for glass	0727.004
1	Cover for PTFE adapter	0727.005
1	Screw ring for PTFE adapter and closed culture system	0727.006
1	Perfusion adapter	0727.107
2	Gasket, silicon 42 x 2 x 0.5 mm	0727.023
1	Screw ring for perfusion adapter	0727.008
3	Gasket, silicon 35 x 1.0 mm	0727.010
2	ditto 42 x 0.5 mm	0727.011
5	ditto 42 x 1.0 mm	0727.012
4	ditto 42 x 2.0 mm	0727.013
1	Silicon tube 1.0 x 2.4 mm, 1 m	0727.018
100	Cover slip 32 x 0.17 mm	0727.015
100	Cover slip 42 x 0.17 mm	0727.016
25	FEP foil, (CultFoil) 42 x 0.025 mm	0727.017
Accessories (not included in the set)		
Pieces	Article	Order Number
1	Perfusion adapter, flat, screw-in with a PTFE adapter, <i>open</i> cultivation and cover	0727.121
1	FoilCover for POC-R chamber (<i>open</i> cultivation) consisting of tension ring and base ring	0727.025
25	CultFoil (25µm) for FoilCover	0727.026
25	EM foil 42 x 0.023 mm	0727.024

POC-R Set in case



FoilCover for POC-R Chamber / POCmini Chamber ("open cultivation") and Petri dishes

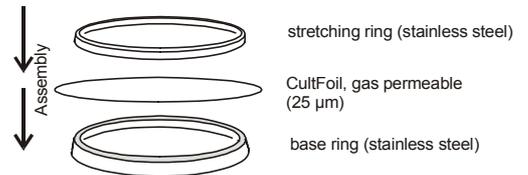
Reduction of evaporation of water out of nutrition media, agar and methylcellulose.

Petri dishes used for cell and tissue culture are generally disposable dishes (polystyrene) with a cover which rests loosely and slightly prone on the top of the dish. This guarantees the exchange of the gas phase between ambient air and dish atmosphere.

The *disadvantage* of this construction is a relatively *high rate of evaporation* leading to a higher concentration of ions in the medium and thus damage to cultivated cells. Therefore, most of the incubators have a relative humidity of more than 90% at 37°C.

Cells, which are cultivated in Petri dishes in incubators with a low relative humidity (e.g. microscope incubators, Zeiss), should be better protected against evaporation of water.

The rate of evaporation in Petri dishes can be reduced by a special cover. The cover has an optically clear foil (CultFoil), which is *permeable* for gasses like CO₂, O₂, N₂; in contrast, water molecules can pass this foil only at higher temperature and pressure (i.e. during autoclaving). The foil rests directly on the rim of the dish.

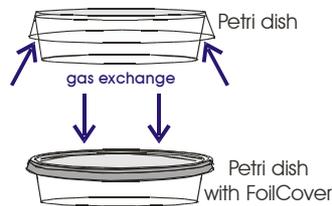


The cover consists of: base ring, foil and stretching ring and can be assembled very easily. The sterilization is realized after assembly in an autoclav (+121°C) or by dry heating at approx. +165°C. If after use the foil in the cover is not cracked, it can be used again after sterilization.

Comparison of the rate of evaporation:

CO₂-incubator versus microscope incubator.

Evaporation of water out of "60" Petri dishes (5 ml Hank's buffer) in the incubation system of an inverted microscope compared to Petri dishes in a conventional CO₂-incubator:



	normal cover	FoilCover	relative humidity of ambient air
microscope incubator	40 µl/h	4 µl/h	20% at 37°C
CO ₂ -incubator	3 µl/h		95% at 37°C

Incubation system on the inverse microscope:

CTI-Controller 3700, Tempcontrol 37-2, Incubator S, Heating Insert P

The measured values demonstrate a distinct advantage of the FoilCover, especially if cultivated cells are investigated in Petri dishes or the POC-R Chamber / POCmini Chamber ("open cultivation") under the microscope. There are four different types of FoilCover

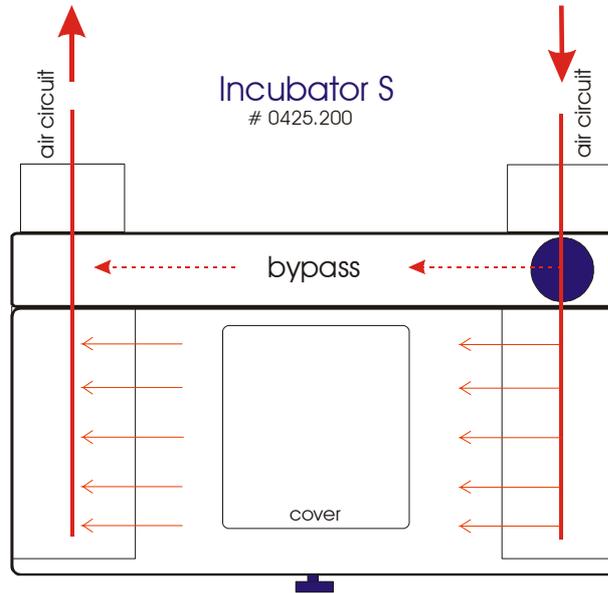
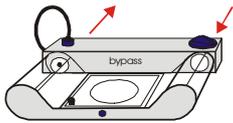
Description	Order No.
1 Cover for POC-R Chamber ("open cultivation") consisting of stretching ring and base ring 1 package à 25 pcs CultFoil, 25 µm	0727026 0727.026
1 Cover for POCmini Chamber ("open cultivation") consisting of stretching ring and base ring 1 package à 25 pcs CultFoil, 25 µm	0730.020 0730.021
1 Cover for 35 mm Petri dishes consisting of stretching ring and base ring 1 package à 25 pcs CultFoil, 25 µm	0701.000 0701.001
1 Cover for 60 mm Petri dishes consisting of stretching ring and base ring 1 package à 25 pcs CultFoil, 25 µm	0702.000 0702.001

Perfusion of Cell Culture in the POC-R

Regulation of °C and pH-value using the incubation system on the inverted microscope (Axiovert 100, 135, 200) with scanning stage or mechanical stage

Components:

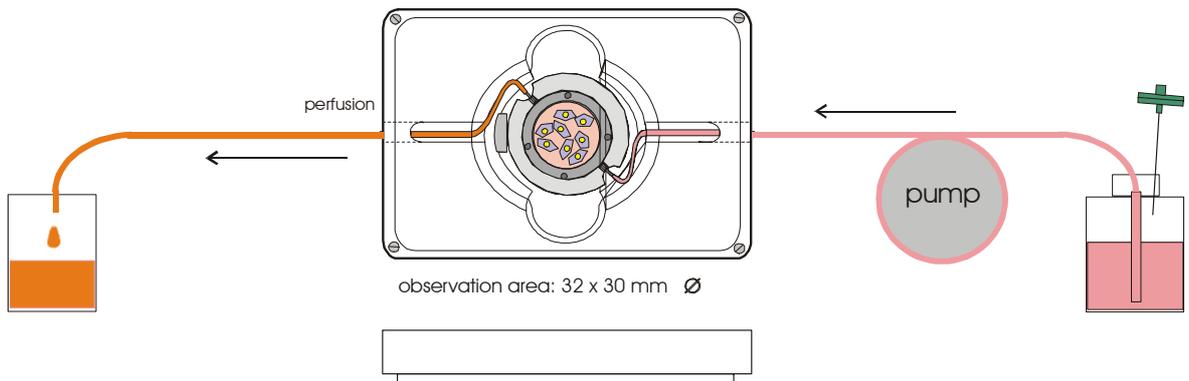
Incubator S, Heating Insert P,
CTI-Controller 3700,
Tempcontrol 37-2 digital



Special feature:

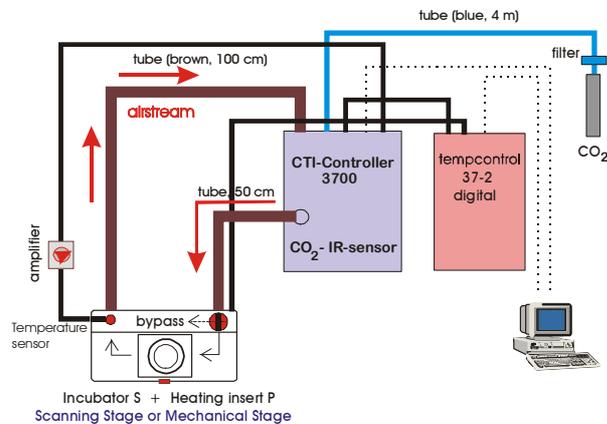
- * Bypass System, in which the conditioned air stream may be diverted through a channel before the cover is removed.
- * The LD-condenser 0.55 may be used.

POC-R, perfusion, observation area: 29 mm Ø



Heating Insert P

0426.100



POC-R Zellkultivierungssystem für die Mikroskopie

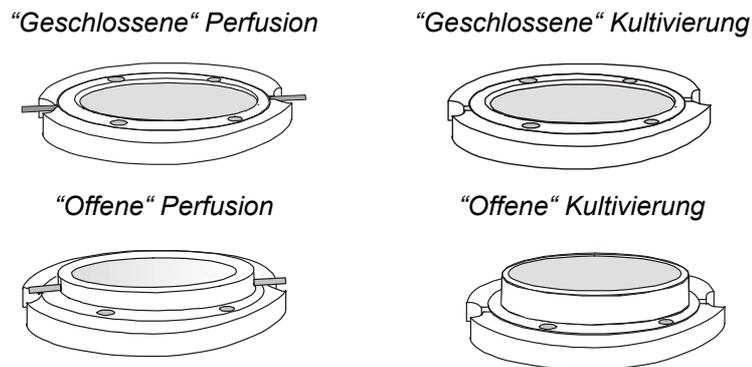
Ein Kammer-System für Zellen *in vitro* - für

Perfusion, "Offene" und "Geschlossene" (Closed) Kultivierung.

Durch verbesserte Mikroskope, Objektive, optische Verfahrensweisen ist es heutzutage möglich, höhere Anforderungen an die mikroskopische Analyse lebender Zellen zu stellen. Parallel dazu sind heizbare Mikroskoptische und Klimaboxen erhältlich, die die Temperatur bei der mikroskopischen Analyse von Zellen auf einen vorgegebenen Wert stabilisieren. Zusätzlich kann in einer Klimabox neben der Temperatur auch der pH-Wert im Nährmedium über den CO₂-Wert der Luft eingestellt werden (Carl Zeiss, Göttingen). Diese Regelung ist ein weiterer Schritt zur Stabilisierung bestimmter Parameter und damit auch zu einer notwendigen Standardisierung für *in vitro*-Tests.

Das **POC-R - Kammer System** erfüllt Bedingungen, die für den Einsatz der verschiedenen mikroskopischen Verfahren bei lebenden Zellen notwendig sind.

Das System mit einer runden Basisplatte bietet 4 verschiedene Anwendungsversionen



Maße der Grundplatte 58 Ø x 5,5 mm (Aluminium, schwarz eloxiert)

Es können die **Heizbaren Universalhalterahmen A-H, K-H oder M-H** und **Heizeinsatz P** verwendet werden

Kultivierungsfläche

- Kultivierung auf Glas: Deckglas 0,17 mm (idealer Brechungsindex für alle Objektive) oder auf Folie (z.B. CultFoil, 0,025 mm, gaspermeabel).

Beobachtungsbereich (29 - 32 mm Ø)

- Es kann mit hochauflösenden Ölimmersionsobjektiven ein bestimmtes Areal abgefahren werden.

Variable Kammerhöhe

- Bei der *geschlossenen* Kultivierung kann der Abstand zwischen dem unteren und dem oberen Deckglas verändert werden (1 mm oder 2 mm Dichtung). Die Kammer kann mit der Unter- oder Oberseite auf dem Mikroskoptisch liegen. Dadurch ist die Kammer auch an Mikroskopen "aufrechter" Bauweise einsetzbar.

Perfusion

- Bei der Perfusion im "*geschlossenen*" System beträgt die Kammerhöhe 0,7 mm (oder weniger).

Die Kammer ist umbaubar

- Ein Wechsel zwischen "*offener*" Kultivierung, "*geschlossener*" Kultivierung und den Perfusionseinsätzen ist möglich.
- Die Zellen können auf Deckgläsern (42 mm Ø) in Petrischalen (60 mm Ø) vorkultiviert werden.

Allgemein

- leichte **Handhabung**, schnelle **Montage**
- Verwendung von **nicht-toxischem** Material
- gute **Sterilisierbarkeit**

Ansicht des POC-R Systems: (Originalgröße)



Geschlossene Perfusion

Beobachtungsbereich: 6,6 cm², Ø 29 mm
Gewicht (ca): 34 g



Geschlossene Kultivierung

Beobachtungsbereich: 8 cm², Ø 32 mm
Gewicht (ca): 27 g



Offene Kultivierung

Beobachtungsbereich: 6,6 cm², Ø 29 mm
Gewicht (ca): 39 g

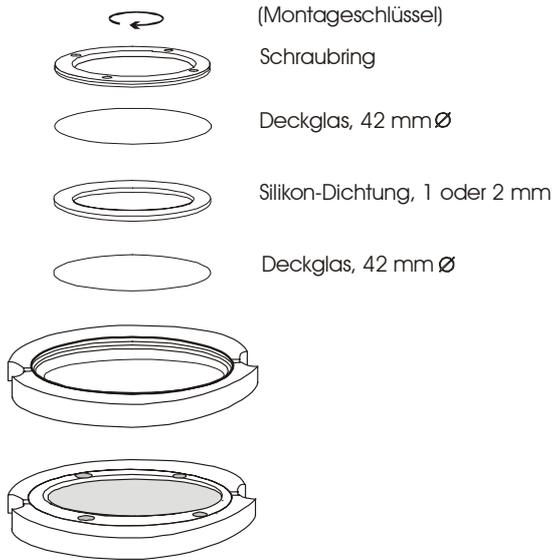


Offene Perfusion

Beobachtungsbereich: 6,6 cm², Ø 29 mm
Gewicht (ca): 68 g

"Geschlossene" Zellkultivierung in der POC-R - Kammer

Montage



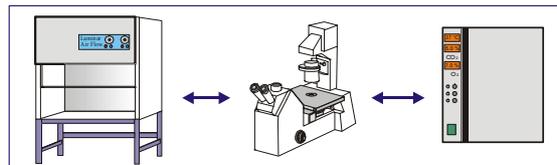
Außenmaße 58 Ø x 5,5 mm
Beobachtungsbereich 8 cm² = 32 mm Ø
Volumen bei 1 mm Dichtung ca 0,9 ml
 bei 2 mm Dichtung ca 1,8 ml

Material Basisplatte: Aluminium, schwarz eloxiert
 Schraubring: V2A-Stahl
 Dichtung: Silikon
 Deckglas: 42,0 Ø x 0,17 mm
 Montageschlüssel: Aluminium mit V2A-Stiften

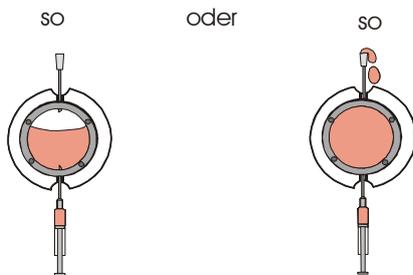
Eigenschaften: Silikon ist hitzesterilisierbar, gasdurchlässig, nicht-toxisch und "schließt" sich wieder, wenn die Kanüle herausgezogen wird.
Aluminium hat eine hohe Wärmeleitfähigkeit
 Das Deckglas ist aus Borosilikatglas und für alle mikroskopischen Verfahren sehr geeignet
V2A-Stahl ist rostfrei

Besonderheit: * Kein störender Meniskus der Flüssigkeit bei der mikroskopischen Beobachtung
 * Die Kammer kann auch umgedreht werden, Kultivierung von Zellen auf beiden Deckgläsern
 * Mit einem Weitschnittkondensator können die Zellen auch an Mikroskopen "aufrechter" Bauweise beobachtet werden. Dafür wird die Kammer gedreht.

Sterilisierung: 165°C ca 2 Std. - dann den Schraubring mit Schlüssel nochmals festdrehen



Mediumwechsel



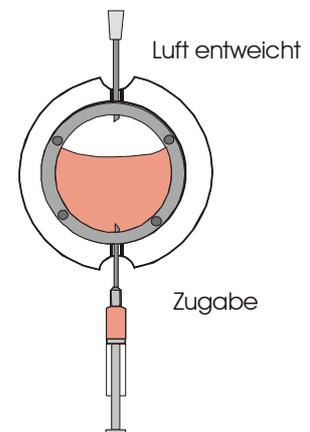
so
 Medium abziehen und neues Medium **langsam** wieder zugeben (bessere Methode)

oder
 so
 neues Medium **langsam** zugeben, dabei altes verdrängen

Empfehlung Kanülen

bei 1 mm Silikon : Zugabe mit 18er (25 G), Ausgang 17er (24 G)
 bei 2 mm Silikon : Zugabe mit 14er (23 G), Ausgang 1er (20 G)

Nährmedium + Zellen zugeben



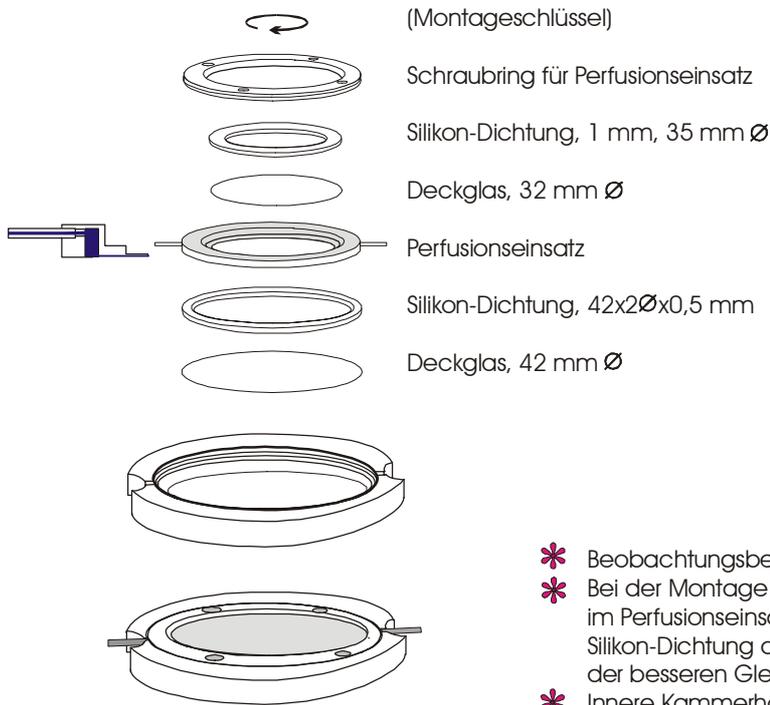
auch eine Vorkultivierung der Zellen auf Deckgläsern in "60"er Petrischalen ist möglich !



die Einzelkomponenten der POC-R - Kammer müssen vorher sterilisiert werden, der Zusammenbau erfolgt unter dem Laminar Air Flow.

Perfusion in der "geschlossenen" Kultivierungskammer

Montage



Sterilisierung: +165°C ca 2 Std. - dann mit Schlüssel nochmals festdrehen



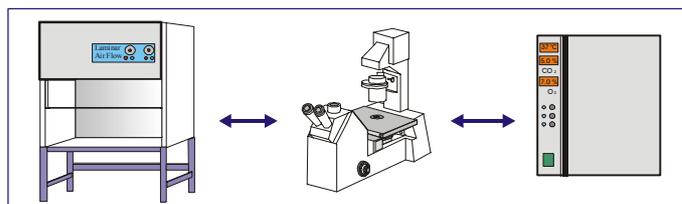
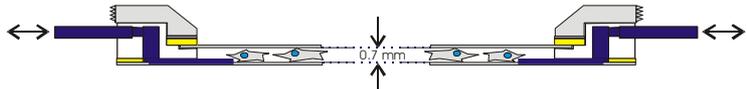
Perfusionsring von unten gesehen

Der Perfusionsersatz wurde optimiert. Durch die Verlagerung der Dichtung auf den Randbereich wurde die Verteilung der Flüssigkeit über die Gesamfläche bei der Perfusion wesentlich verbessert. Zusätzlich kann jetzt auch mit höherer Geschwindigkeit perfundiert werden.

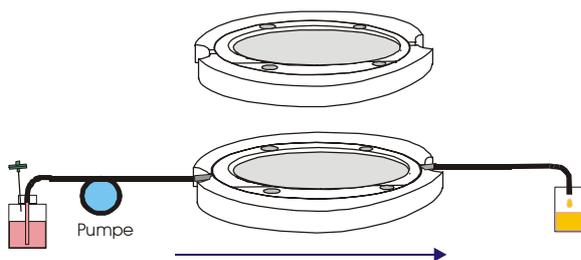


Der Ring für die Abdichtung, 42 x 2 mm, hat jetzt einen schmalen Rand
Es stehen 2 verschiedene Dichtungen zur Verfügung:
* Silikonring, 0,5 mm dick, innere Kammerhöhe 0,7 mm (# 0727.023)
* FEP-Ring, 0,25 mm dick, innere Kammerhöhe 0,45 mm (# 0727.014)

- * Beobachtungsbereich 29 mm Ø
 - * Bei der Montage muß auf den korrekten Sitz des Deckglases im Perfusionsersatz geachtet werden, damit die darüberliegende Silikon-Dichtung die Einheit gut abdichten kann. Der PTFE-Ring dient der besseren Gleitfähigkeit des Schraubinges für den Perfusionsersatz..
 - * Innere Kammerhöhe bei
 - Silikon-Dichtung 0,5 mm = 0,7 mm
 - FEP-Dichtung 0,2 mm = 0,4 mm
 - FEP-Dichtung* 0,025 mm = 0,225 mm
- *Die FEP-Dichtung (0,025 mm) kann aus den FEP-Folien, die im Set vorhanden sind, hergestellt werden. Dazu wird ein 32 mm Loch (Locheisen) aus der Mitte der FEP-Folie gestanzt.

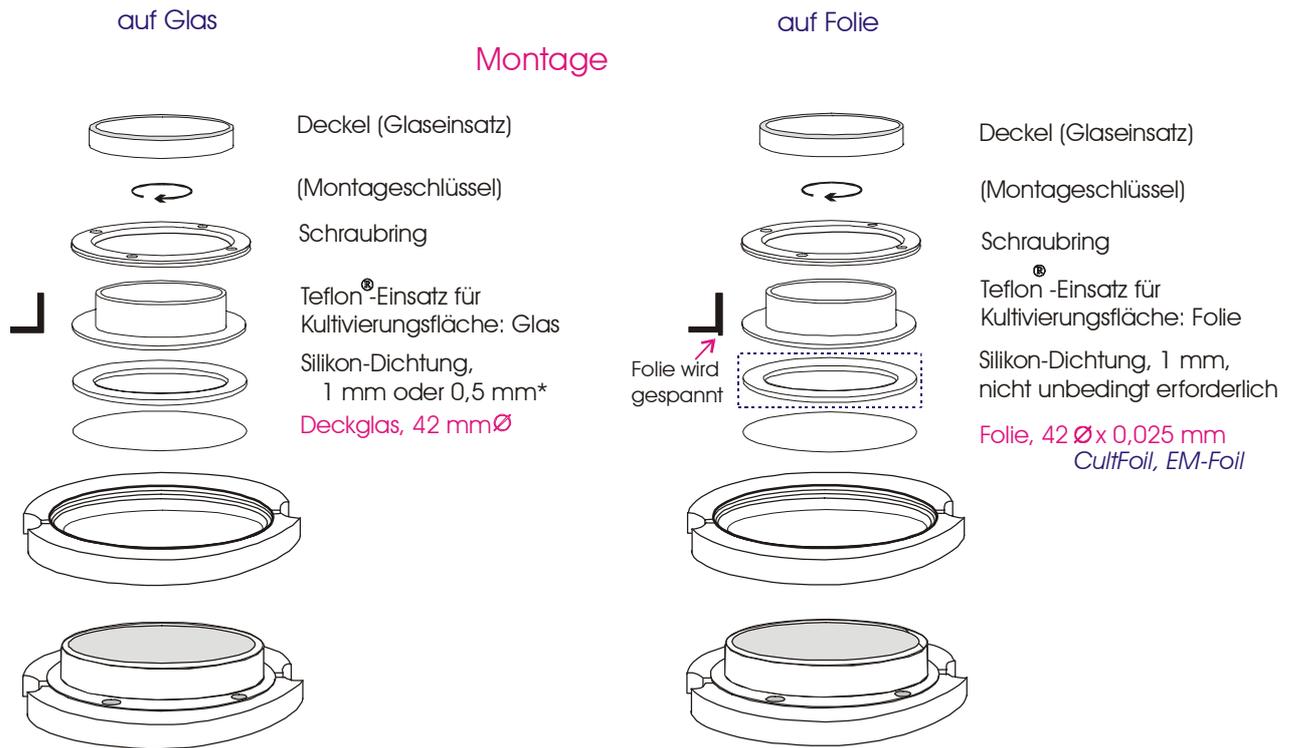


Beispiel einer Perfusion



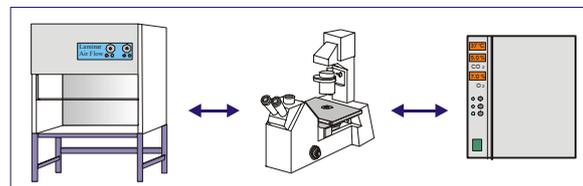
- * Sterilisierte Schläuche (z.B. Silikon Schlauch, Innen Ø 0,9 - 1.0 mm) über die Kanülen (V2A-Rohr, InnenØ 0,6 mm) am Perfusionsring schieben.
- * Perfusion erfolgt normalerweise über Druck:
Spritze (1 ml) von Hand
automatischer Spritzenvorschub
Schlauchpumpe
- * Flow-Rate: Für optimale physiologische Bedingungen in einer Zellkultur mit mittlerer Dichte hat sich eine Flow-Rate von 0,1 - 0,25 ml/Std. bewährt.

"Offene" Zellkultivierung in der POC-R - Kammer

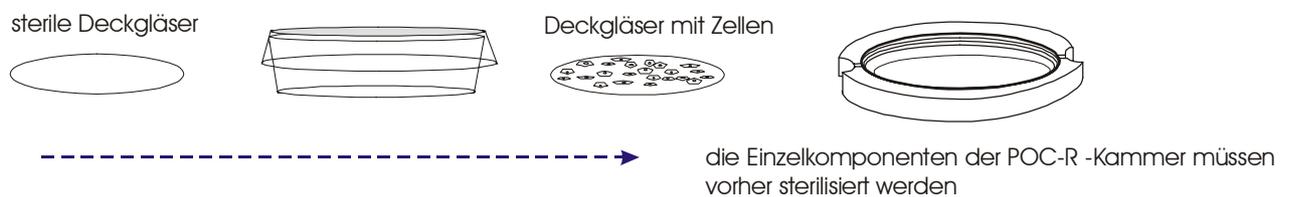


Beobachtungsbereich: 29 mm Ø

Sterilisierung der zusammengebauten Kammern mit Deckel bei 165°C ca 2 Std.



Nährmedium, Zellen etc. zugeben oder wegnehmen wie bei einer Petrischale, auch eine Vorkultivierung der Zellen auf Deckgläsern in "60"er Petrischalen ist möglich !

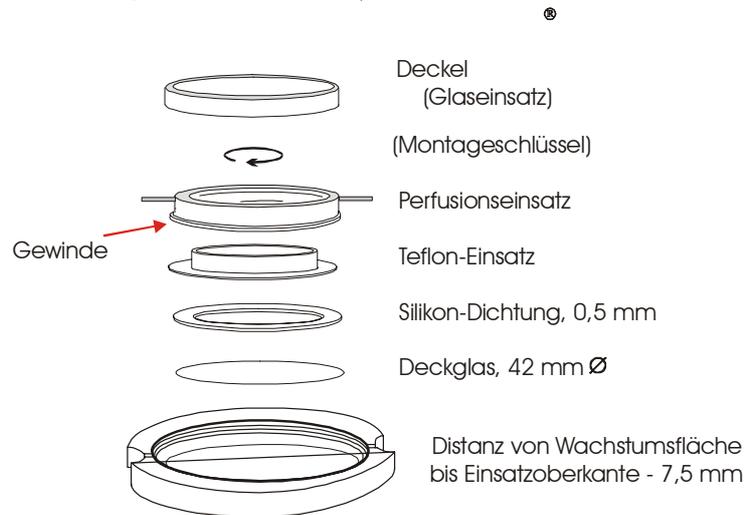


* Umbau von "offener" Kultivierungskammer (Glasboden) in die "geschlossene" Perfusionseinheit bei 0,5 mm Silikon-Dichtung unter dem Laminar Air Flow:
Montageschlüssel sterilisieren - PTFE-Einsatz entfernen - sterilen Perfusionseinsatz mit Deckglas (32 mm Ø) und Silikon-Dichtung einsetzen und mit dem speziellen Schraubring fixieren

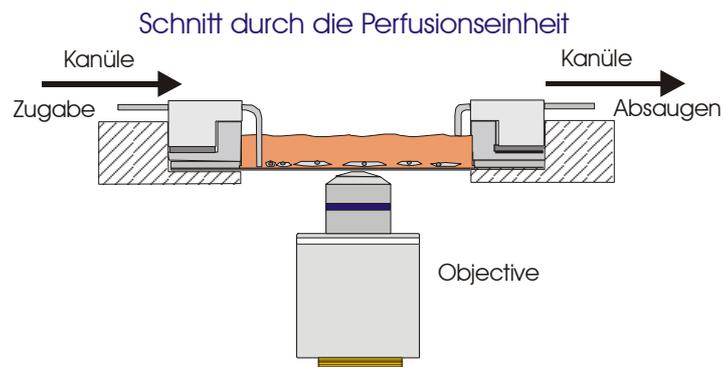
Perfusionseinsatz für die "offene" Kultivierung von Zellen

Perfusionseinsatz

schraubbar, mit speziellem niedrigen Teflon -Einsatz
(Mikromanipulation an Zellen)

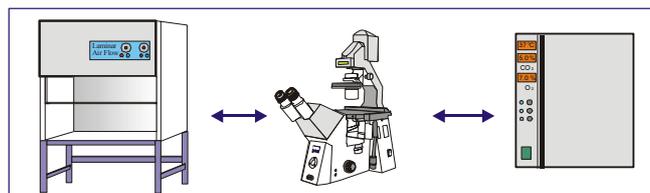


Sterilisierung: +165°C ca 2 Std. - dann mit Schlüssel nochmals festdrehen

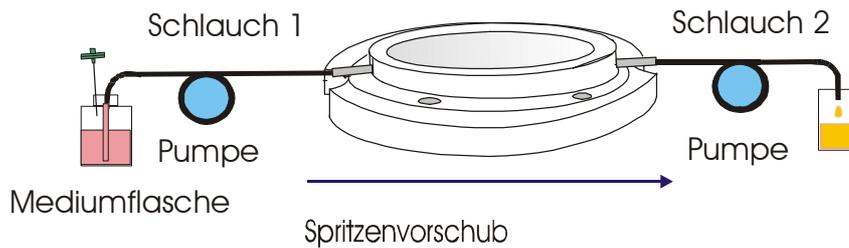


Vorteil des Perfusionseinsatzes:

- * Beobachtungsbereich beträgt 29 mm Ø
- * flacher Tefloneinsatz, ideal für Mikromanipulation
- * freier Zugang (Deckel)
- * langsamer und sehr schneller Mediumwechsel, durch zwei unterschiedlich lange Kanülen für die Zu- und Entnahme von Flüssigkeit
- * Durch variable Positionierung der Kanülen kann eine bestimmte Flüssigkeitsmenge eingestellt werden



Beispiel einer Perfusion



Schlauchpumpe

Bei einer Mehrkanal-Pumpe kann die *Zufuhr* und das *Absaugen* der Flüssigkeit durch nur *eine* Pumpe erfolgen, wobei das Medium durch einen Schlauch mit einem etwas größeren Innendurchmesser abgesaugt wird.

Spritzenvorschub

Statt einer Schlauchpumpe kann auch ein Spritzenvorschub bei der Zugabe von Medium verwendet werden.

Mediumflasche

In den Deckel der Flasche wird eine ca 25 mm große Öffnung gebohrt, die mit einer ca 4 mm starken Silikonplatte abgedichtet wird. Eine Kanüle (z.B. Injektionskanüle 1.2, 15 mm lang) wird umgekehrt (Ansatzstelle für die Spritze in die Flasche) durch die Silikondichtung gestoßen und vorsichtig umgebogen. Der Druckausgleich in der Flasche ist durch eine weitere Kanüle (z.B. 1er Kanüle) mit aufgesetztem Sterilfilter (hydrophob), die ebenfalls durch die Silikondichtung gestoßen wird, gewährleistet.

Schlauch 1

Schlauch in der Pumpe für Mediumzufuhr (z.B. Silikon, Innendurchmesser 0,7 mm)

Schlauch 2

Schlauch in der Pumpe für Mediumentnahme (z.B. Silikon, Innendurchmesser 1,0 mm)

Der Außendurchmesser des Kanülenrohrs im Perfusionseinsatz und Perfusionsaufsatz ist 1,4 mm.

Es können verschiedene Schlauchmaterialien verwendet werden,

z.B. Silikon, Norprene®, Tygon®, Teflon®, *Siehe Materialbeschreibung !*

Alle Zubehörteile können trockensterilisiert, ca 2 Std. bei +165°C oder bei +121°C autoklaviert werden.

Perfusionsablauf

langsamer Mediumwechsel

Das Medium gelangt durch die Kanüle und die sterilisierten Schläuche (Silikon etc.) über die Schlauchpumpe in die POC-R - Kammer (längere Kanüle in der Kammer) und wird durch die kürzere Kanüle über die Schlauchpumpe wieder abgesaugt. Die Durchflugeschwindigkeit kann in einem weiten Bereich variiert werden. Für optimale physiologische Bedingungen in einer Zellkultur mit mittlerer Dichte hat sich z.B. eine Flow-Rate von ca 0,1 - 0,25 ml/Std. bewährt. Bei *Langzeitbeobachtungen* am inversen Mikroskop müssen die Temperatur und der pH-Wert konstant gehalten werden. Für diese Untersuchungen ist eine *Klimabox* (Temperatur- und CO₂-Steuerung) mit heizbarem Mikroskoptisch (Carl Zeiss, Leica) notwendig. Die Vorratsflasche mit Medium kann bei dieser Konfiguration außerhalb der *Klimabox* stehen, wobei bei langsamer Perfusion die Mediuenerwärmung und die pH-Einstellung in dem Teil des gasdurchlässigen Schlauches erfolgt (Silikon), der innerhalb der *Klimabox* ist.

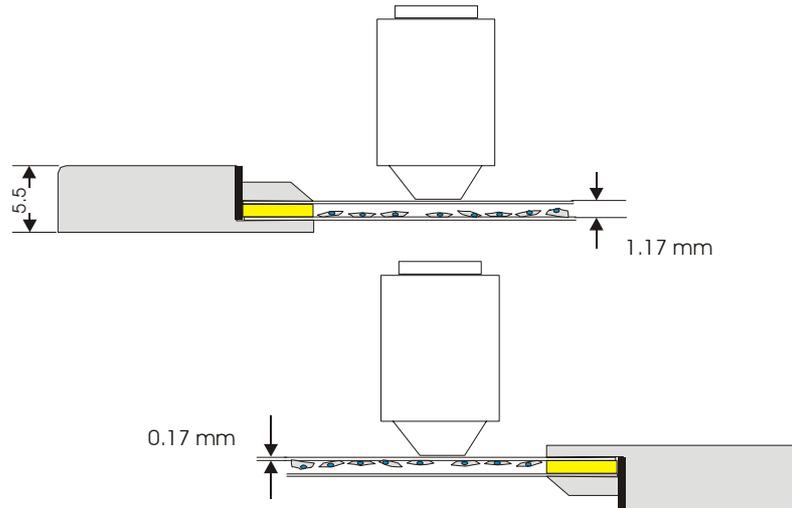
schneller Mediumwechsel

Bei einem sehr schnellen Mediumwechsel kann über die lange Kanüle im Perfusionsaufsatz, bzw. Perfusionseinsatz abgesaugt (Vakuum) und anschließend via Spritze, Schlauch und kurze Kanüle im Perfusionsaufsatz, bzw. Perfusionseinsatz eine definierte Mediummenge wieder zugegeben werden. Der Mediumwechsel kann auf diese Weise in ca 8 sec. erfolgen (Zugabe von 2,5 ml Medium in 4 sec. und Entnahme durch Vakuum in 4 sec.) bei einem Innendurchmesser der Schläuche von 0,7 mm. Da der Innendurchmesser der Kanülen bei den Perfusionsringen 1,2 mm beträgt, kann die Geschwindigkeit von Zugabe und Entnahme des Mediums mit Schläuchen mit größerem Innendurchmesser noch erhöht werden. Die Zeit reduziert sich dann auf je 2,5 - 3 sec..

POC-R Zellkultivierungssystem an Mikroskopen "aufrechter" Bauweise

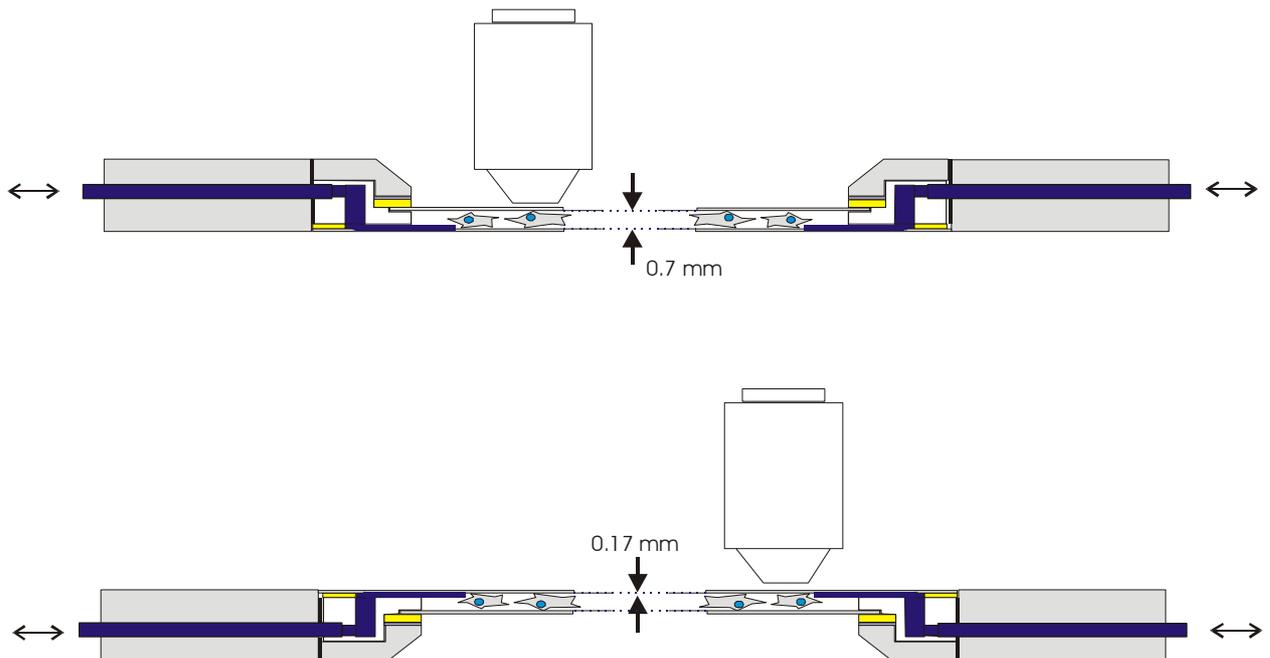
Das POC-R - Kammer System kann auch an Mikroskopen "aufrechter Bauweise" eingesetzt werden, wobei der Arbeitsabstand der Objektive und Kondensoren ausschlaggebend ist.

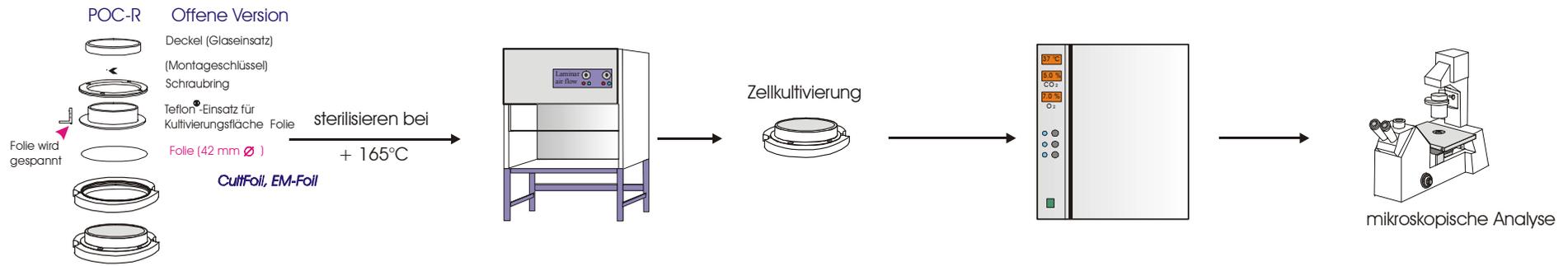
Geschlossene Kultivierung



Die POC-R - Kammer kann auch umgedreht auf den Mikroskoptisch, bzw. in die Halterahmen gelegt werden

Perfusion im geschlossenen System





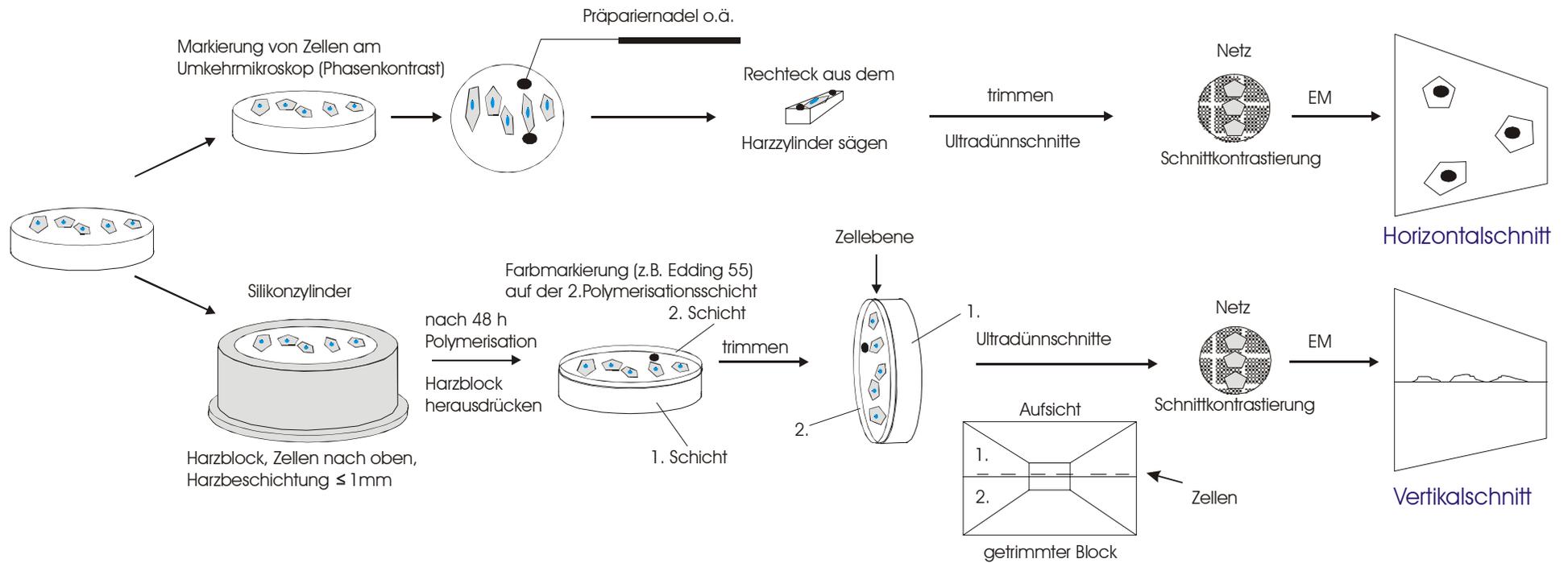
Aufbereitung der Zellen für EM-Untersuchungen in der POC-R - Kammer

Fixierung
Kontrastierung
Dehydrierung
Polymerisation

nach Polymerisation

PTFE-Einsatz aus der POC-R
herausschrauben und
Folie abziehen

Einbettungsharz aus dem
PTFE-Einsatz herausdrücken



Folie für die Aufbereitung einer Monolayer-Zellkultur für das Elektronenmikroskop

Die EM-Folie, eine spezielle Polyesterfolie, ist besonders für die elektronenmikroskopische Präparation von Monolayer-Zellkulturen geeignet, da sie sehr leicht vom Einbettungsharz abgezogen werden kann.

Bei der Sterilisierung tritt eine leichte Trübung der 23µm starken Folie auf, die aber keinen Einfluß auf das Zellwachstum hat. Diese Trübung ist eine Änderung des amorphen in einen teil-kristallinen Zustand des Polyestermaterials. Die EM-Folie ist nur sehr gering durchlässig für Gase und Wasserdampf.

Bei sorgfältiger Handhabung ist eine zusätzliche Reinigung der Folie nicht notwendig. Staub wird mit gefilterter Preßluft entfernt. Verschmutzte Folie sollte mit Detergenzien oder 70 % Ethanol gereinigt und sorgfältig mit Aqua dest. nachgespült werden. Es wird empfohlen nach der Sterilisierung die Innenkammer mit sterilem Aqua dest. zu spülen.

Zellzüchtung

Die vorgestanzte EM-Folie (42 mm Ø) in die Grundplatte einlegen und mit dem Montageschlüssel den Schraubring mit dem PTFE-Einsatz (Folie) ohne Silikon-Dichtung fest in die POC-R - Kammer einschrauben. Die EM-Folie erhält so ihre notwendige Spannung und wird gleichzeitig am inneren Einsatzrand abgedichtet. Mit dem aufgesetzten Deckel wird die POC-R - Kammer 2 Std. bei +165°C trocken sterilisiert oder bei +121°C autoklaviert.

Die Zellen werden mit Nährmedium in die Kammer gebracht und im CO₂-Schrank inkubiert.

Präparation für das Elektronenmikroskop

- Deckel entfernen, Nährmedium absaugen und Zellen 3x mit Medium ohne Serum (37°C) spülen
- *Fixierung* mit 2 % Glutaraldehyd in 0,05 M Natrium-Cacodylat-Puffer, pH 7,2, für 1 Std.
- *Waschen* mit 0,05 M Natrium-Cacodylat-Puffer
- *Kontrastierung* in 1 % Osmiumtetroxid in 0,05 M Cacodylat-Puffer, pH 7,2 + 8 % Sucrose für 1,5 Std.
- *Dehydrierung* in aufsteigender Ethanolreihe
- *Einbettung* in Epoxidharz über Methacrylsäure-2-hydroxy-polyester.

Schichtdicke: 2 - 3 mm

- *Polymerisation* ca 48 Std. bei +65°C

Wichtig:

- Während und nach der Einbettung darf der Deckel nicht aufgesetzt werden
- Es darf kein Einbettungsharz in das Gewinde (Grundplatte - Schraubring) fließen

Nach der Polymerisation wird der Schraubring und PTFE-Einsatz mit dem Montageschlüssel herausgeschraubt, der PTFE-Einsatz mit dem Harz und der Folie entnommen, die Folie vom Einbettungsharz abgezogen und das Harz mit den eingebetteten Zellen aus dem Einsatz herausgedrückt.

Die eingebetteten Zellen können jetzt lichtmikroskopisch (Phasenkontrast) betrachtet und gegebenenfalls markiert werden.

Für das grobe Zurechtschneiden eignet sich im besonderen Maße eine Dekupiersäge.

Da die Zellen direkt unter der Oberfläche des Harzes eingebettet sind, müssen schon beim Horizontalschnitt und bei einer gewünschten Darstellung der Kontaktfläche, Folie - Zelle, die ersten Schnitte auf die Grids gebracht werden.

Danach kann die übliche Schnittkontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat erfolgen.

An Vertikalschnitten konnte gezeigt werden, daß die Zellen beim Abziehen der Folie nicht beschädigt werden.

Materialbeschreibung

Aluminium: Grundplatte, Montageschlüssel

- Aluminium hat eine gute Wärmeleitfähigkeit. Die Teile sind oberflächenvergütet - gehärtet durch eine Eloxalschicht. Diese Vergütung verträgt keine starken alkalischen Reinigungsmittel. Die Teile sollten deshalb z.B. nur mit 70 % Ethanol oder mit Aqua dest. gereinigt werden.
- Die schwarz eloxierte Grundplatte darf in CO₂-Inkubatoren mit hoher Luftfeuchtigkeit nicht direkt auf Kupferplatten gelegt werden, da sonst durch "Elektrolyse" die Oberfläche beschädigt werden kann. Für diesen Fall kann man eine Glas-, Plastik- oder Edelstahl-Unterlage verwenden.

V2A-Stahl: Perfusionseinsatz für geschlossene Kultivierung, Perfusionseinsatz und Perfusionsaufsatz für offene Kultivierung, Schraubringe, Kanülenrohr und Deckelrahmen

- Der Perfusionseinsatz für geschlossene Kultivierung sollte sehr vorsichtig behandelt werden, da der dünne Trägerrand für das Deckglas (0,2 mm) leicht verbogen werden kann. Das Kanülenrohr mit Laborreinigungsmittel durchspülen, anschließend mit Aqua dest. und evtl. 70 % Ethanol sorgfältig nachspülen.

PTFE und FEP: Teflon® (DuPont), Hostaflon® (Hoechst)

- *PTFE-Einsatz*: Sehr inertes Material, unempfindlich gegenüber den meisten Lösungsmitteln. Reinigung mit 70 % Ethanol oder mit sonstigen Laborreinigungsmitteln, sorgfältig mit Aqua dest. nachspülen. Temperatur: PTFE über 200°C
- *FEP-Folie (CultFoil, PeCon)*: Die Folie hat eine behandelte (*hydrophile*) und eine glatte (*hydrophobe*) Oberfläche. Stärke: 25 µm

Unterscheidung:

- a.) Die *hydrophile* Seite der Folie zeigt eine Adhäsion zu Papier und kann mit Filzstift beschrieben werden.
- b.) Auf der *hydrophoben* Seite ist es nicht möglich mit einem Filzstift zu schreiben.

Eigenschaften und Verwendung

- hohe Gaspermeabilität
- Strahlendurchlässigkeit auch unter 300nm Wellenlänge
- nicht toxisch
- inert gegen die meisten Lösungsmittel
- hydrophile* Oberfläche:
 - gute Zellanheftung
- hydrophobe* Oberfläche:
 - Kultivierung von Skelettmuskelzellen (Differenzierung)
 - Koloniewachstum in Agar oder Methylzellulose
 - gute Ablösung von Einbettungsharz für die Elektronenmikroskopie
 - Temperatur +170 - 180°C

Silikon-Dichtungen: nicht toxisch, gaspermeabel, 40 und 60 Shore-Härte

- Nach Benutzung sofort unter fließendem Wasser abspülen und in Aqua dest. reinigen. Silikon kann auch, falls notwendig, 10 Min. in Aqua dest. gekocht oder bei +121°C in Aqua dest. autoklaviert werden. Reinigungsmittel vermeiden! Ethanol unvergällt kann verwendet werden. Temperatur: +180°C

Schlauchmaterial für die Perfusion: nicht toxisch

- *Silikon* ist sehr elastisch und gaspermeabel, autoklavierbar und kann auch trocken bei +165 - 180°C sterilisiert werden.
- *Norprene®* ist gering gaspermeabel, es hat in der Schlauchpumpe eine ca 15-fache Lebensdauer gegenüber Silikon, es ist autoklavierbar bei +121°C.
- *Tygon®* ist glasklar, nicht-oxidierend, hat sehr glatte Innenwände, ist elastisch, ebenfalls ideal für Schlauchpumpen und ist nur gering gaspermeabel. Es ist autoklavierbar bei +121°C.
- *Teflon®* (PTFE, TFE, FEP) ist sehr inert gegenüber fast allen Lösungsmitteln, bei dünner Schlauchwandung etwas gaspermeabel, wenig elastisch und muß mit den Kanülen über elastische Verbindungsschläuche (z.B. Silikon) verbunden werden und ebenso in den Schlauchpumpen. Es ist bei +121°C autoklavierbar und kann, wie auch Silikon bei +165 - 180°C trocken sterilisiert werden.

Glas: Deckgläser 0,17 mm

- Hydrolytische Klasse 1, Borosilikatglas. Reinigung ist meist nicht notwendig, sonst laborübliche Reinigung, mehrmaliges Nachspülen mit Aqua dest.. Zur Handhabung immer eine Pinzette verwenden und nur am Deckglasrand halten.

Reinigungsempfehlung: Die Deckgläser unter der sterilen Werkbank in Ethanol, (unvergällt), tauchen, kurz am Becherrand abtropfen lassen, durch die Flamme ziehen und Ethanol abbrennen, dabei wird das Deckglas bis zur Abkühlung waagrecht gehalten.

Sterilisation: zusammengebaute Kammer oder Teile der Kammer

- Trockensterilisation bei +165 - 180°C ca 2 Std.
- Autoklavieren bei +121°C

Nach dem Sterilisieren sollte der Schraubring bei den Einheiten: *geschlossene* Kultivierung und *geschlossene* Perfusion nochmals angezogen werden.

Fehlersuche

Beobachtung	Fehlermöglichkeit	Behebung
Glas zerspringt bei der Montage oder beim Sterilisieren	Glasfehler	neues Glas
	<i>Geschlossene</i> Kultivierung: zu großer Druckanstieg beim Sterilisieren (Luftausdehnung)	Kanüle während des Sterilisierens durch die Silikonwandung stecken (Druckausgleich)
	<i>Offene</i> Kultivierung: statt PTFE-Einsatz "Glas" wurde der Einsatz für FEP-Folie genommen (hervorstehender Rand)	Einsatz wechseln
Kammer ist undicht	Andruck zu schwach	stärker festschrauben
	Silikonring wurde schlecht gereinigt Reinigung: evtl. mit Alkohol abreiben. so daß Staubpartikel auf der Oberfläche eine ausreichende Haftung verhindern Bei PTFE-Einsätzen: Starke Kratzer auf der Oberfläche, die mit der Silikon-Dichtung in Berührung kommt	neuen Einsatz verwenden

References

- Pentz, S. and Hörler, H. (1992) A variable cell culture chamber for "open" and "closed" cultivation, perfusion and high microscopic resolution of living cells. *J. Microsc.* **167**, 97-103.
- Pentz, S. and Hörler, H. (1990) Beating heart cells in vitro - a cells system for drugs and toxins. *Eur. J. Cell Biol.m Suppl.* **30**, 51.
- Freimann, R. Pentz, S. and Hörler, H. (1997) Development of a standing-wave fluorescence microscope with high nodal plane flatness. *J. Microsc.* **187**, 193-200.

POC-R Zellkultivierungssystem (Perfusion, Open, Closed)

Bestellung von Zubehör bei:

PeCon GmbH
Fon 07305 95666 0
Fax 07305 95666 90
e-mail info@pecon.biz

Stück	Artikel	Bestell-Nr.
	POC-R Set im Aufbewahrungskasten	0727.100
	bestehend aus:	
1	Kammer, Grundplatte	0727.101
1	Montageschlüssel	0727.002
1	PTFE-Einsatz für Folie	0727.003
1	PTFE-Einsatz für Glas	0727.004
1	Deckel für PTFE-Einsätze	0727.005
1	Schraubring für PTFE-Einsätze und geschlossene Kultivierung	0727.006
1	Perfusionseinsatz	0727.107
2	dafür Dichtungsring, Silikon 42 x 2 x 0.5 mm	0727.023
1	Schraubring f. Perfusionseinsatz	0727.008
3	Dichtungsring, Silikon 35 x 1.0 mm	0727.010
2	ditto 42 x 0.5 mm	0727.011
5	ditto 42 x 1.0 mm	0727.012
4	ditto 42 x 2.0 mm	0727.013
1	Silikonschlauch 1.0 x 2.4 mm, 1 m	0727.018
100	Deckgläser 32 x 0.17 mm	0727.015
100	Deckgläser 42 x 0.17 mm	0727.016
25	FEP-Folie, (CultFoil) 42 x 0.025 mm	0727.017

Zubehör (nicht im Set enthalten)

Stück	Artikel	Bestell-Nr.
1	Perfusionseinsatz , flach, einschraubbar mit PTFE-Einsatz und Deckel, <i>offene</i> Kultivierung	0727.121
1	Foliendeckel (FoilCover) für POC-R - Kammer (<i>offene Kultivierung</i>), bestehend aus Spannring und Basisring	0727.025
25	CultFoil, 25 µm für FoilCover	0727.026
25	EM-Folie 42 x 0.023 mm	0727.024

POC-R Set im Aufbewahrungskasten



Foliendeckel (FoilCover) für POC-R Kammer / POCmini Kammer ("offene Kultivierung") und Petrischalen

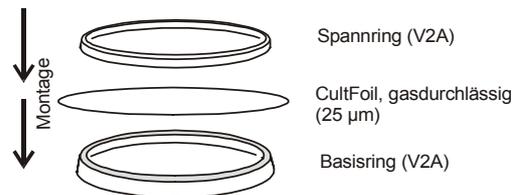
Reduktion der Verdunstungsrate von Wasser aus Nährmedien, Agar und Methylzellulose.

Petrischalen für die Zell- und Gewebekultur oder Mikrobiologie sind fast immer Einmal-Schalen aus Polystyrol mit einem Deckel, der lose und etwas erhaben auf dem Unterteil der Schale liegt. Dadurch ist ein Austausch der Gasphase zwischen Außenluft und Schalenatmosphäre gewährleistet.

Der *Nachteil* dieser Konstruktion ist eine relativ *hohe Verdunstungsrate*, so daß eine erhöhte Ionenkonzentration im Medium zu Zellschädigungen führen kann. Die meisten CO₂-Inkubatoren haben deshalb eine relative Feuchte von über 90% bei 37°C.

Zellen, die in Petrischalen in Inkubatoren mit geringer relativer Feuchte kultiviert werden (z.B. Mikroskop-Inkubator, Zeiss), sollten deshalb besser gegen Verdunstung des Wassers im Medium geschützt werden.

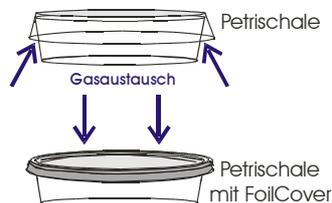
Die Verdunstungsrate in Petrischalen kann durch einen Spezialdeckel wesentlich reduziert werden. Der Deckel hat eine glasklare Folie (CultFoil), die für Gase wie CO₂, O₂, N₂ *permeabel* ist; dagegen können Wassermoleküle fast nur bei höherem Druck (z.B. beim Autoklavieren) die Folie passieren. Die Folie liegt direkt auf dem Schalenrand.



Der Deckel besteht aus 3 Teilen: Basisring, Folie und Spannring und läßt sich sehr leicht montieren. Die Sterilisation erfolgt nach der Montage im Autoklav (+121°C) oder durch Trockensterilisation bei ca +165°C. Wenn die Folie nach Gebrauch keine Risse aufweist, kann sie weiterhin nach erneuter Sterilisation verwendet werden.

Vergleich der Verdunstungsrate: CO₂-Inkubator versus Mikroskop-Inkubator

Evaporation von Wasser aus "60"er Petrischalen (5 ml Hank's Puffer) ohne und mit FoilCover im Inkubationssystem am inversen Mikroskop im Vergleich zu Petrischalen im konventionellen CO₂-Inkubator:



	Normaldeckel	"FoilCover"	Relative Feuchte der Umgebungsluft
Mikroskop-Inkubator	40 µl/h	4 µl/h	20 % bei 37°C
CO ₂ -Inkubator	3 µl/h	—	95 % bei 37°C

Inkubationssystem am inversen Mikroskop:

CTI-Controller 3700, Tempcontrol 37-2, Inkubator S, Heizeinsatz P

Die Meßwerte zeigen deutlich die Vorteile des Foliendeckels, wenn Zellkulturen in Petrischalen oder in der POC-R Kammer / POCmini Kammer(offene Kultivierung) für Versuche am Mikroskop eingesetzt werden.

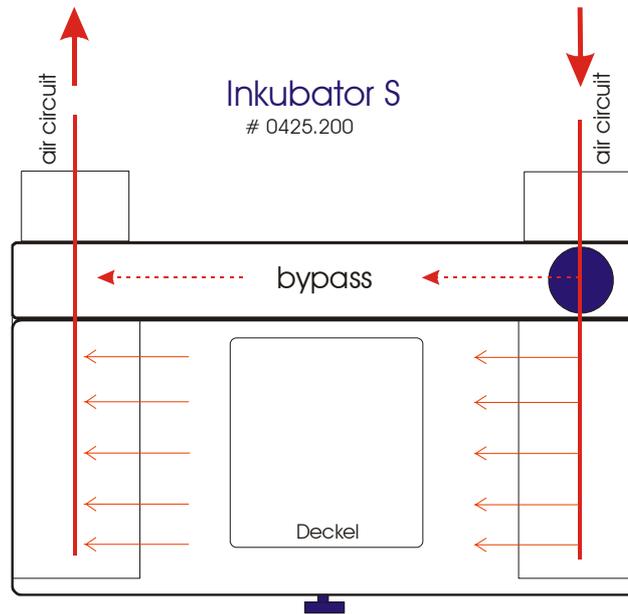
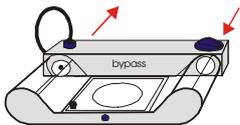
Den Foliendeckel gibt es in vier Ausführungen

Beschreibung	Bestell-Nr.
1 Deckel für POC-R Kammer (offene Kultivierung) bestehend aus Spannring und Basisring	0727026
1 Pack à 25 Stück CultFoil, 25 µm	0727.026
1 Deckel für POCmini Kammer (offene Kultivierung) bestehend aus Spannring und Basisring	0730.020
1 Pack à 25 Stück CultFoil, 25 µm	0730.021
1 Deckel für "35"er Petrischalen bestehend aus Spannring und Basisring	0701.000
1 Pack à 25 Stück CultFoil, 25 µm	0701.001
1 Deckel für "60"er Petrischalen bestehend aus Spannring und Basisring	0702.000
1 Pack à 25 Stück CultFoil, 25 µm	0702.001

Perfusion in der POC-R

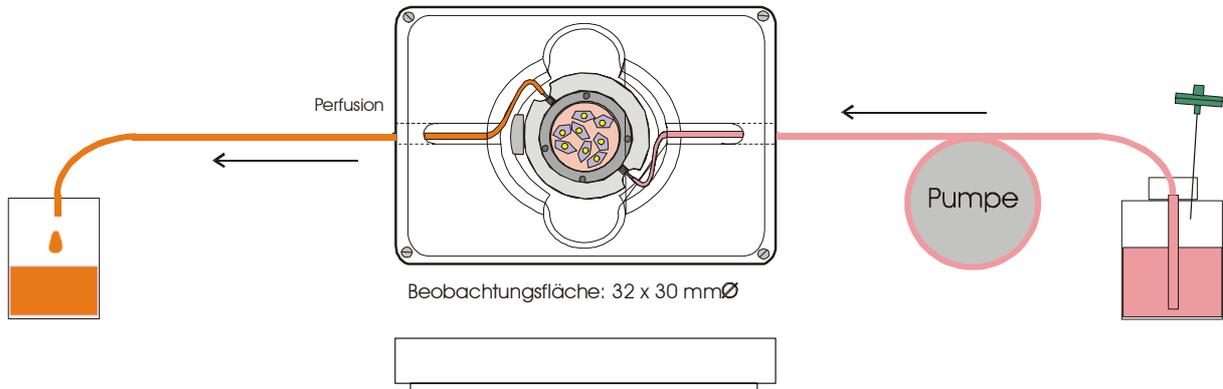
Regulierung von °C und pH-Wert im Inkubationssystem am inversen Mikroskop (Axiovert 100, 135, 200 mit Scanningtisch oder Kreuztisch).

Komponenten:
 Inkubator S, Heizeinsatz P,
 CTI-Controller 3700,
 Tempcontrol 37-2 digital

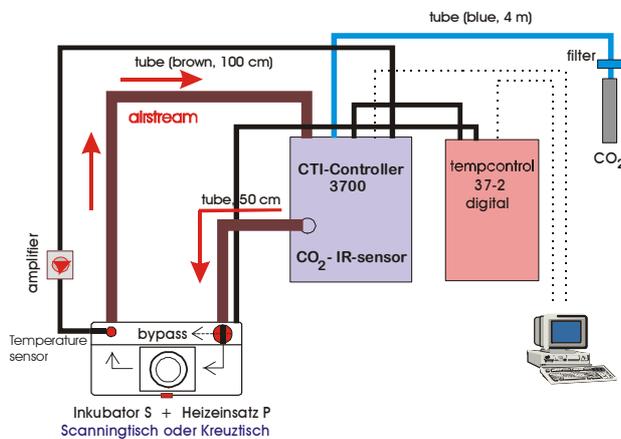


Besonderheit:
 * Bypass System, der konditionierte Luftstrom kann bei Wegnahme des Deckels vorübergehend durch einen Bypass-Kanal geleitet werden.
 * Der LD-Kondensor 0.55 kann verwendet werden.

POC-R, Perusion, Beobachtungsfläche: 29 mm Ø



Heizeinsatz P
 # 0426.100

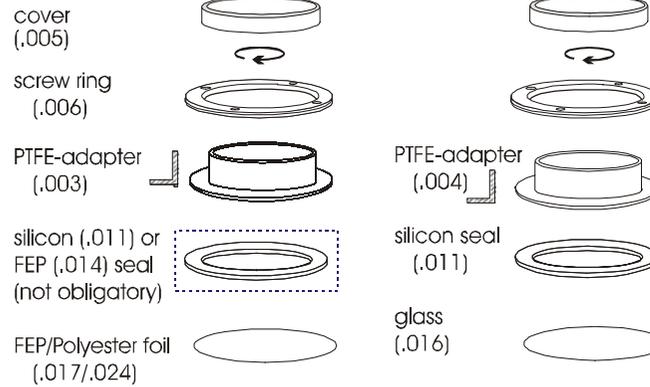
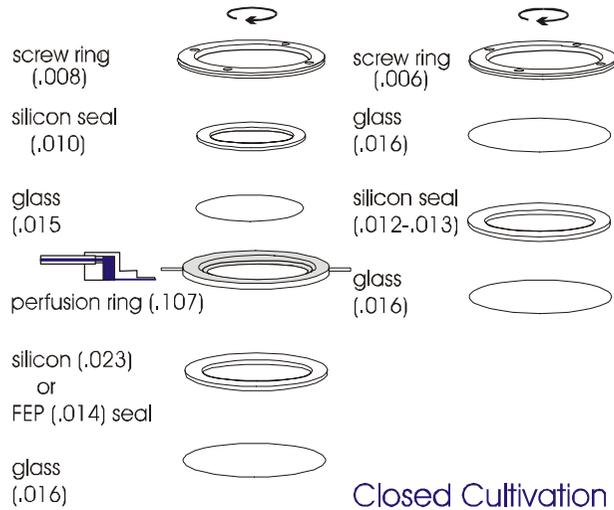


Inkubator S + Heizeinsatz P
 Scanningtisch oder Kreuztisch

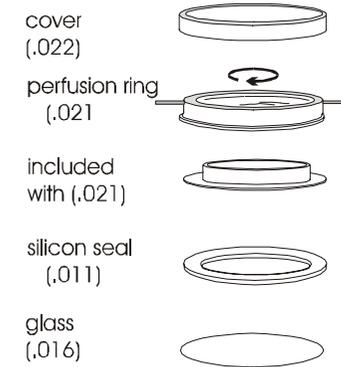
POC-R Cultivation System

(Cat. No. 0727.100)

"Closed" Perfusion



"Open" Perfusion # 0727.121



POC-R Chamber base plate (0727.101)

