

LentiKats®

Tipps & Tricks



10.01

<http://www.geniaLab.de/download/tt-deutsch.pdf>

1 LentiKats® in Ihrem Labor

LentiKat® Liquid ist steril und gebrauchsfertig. Eine Flasche enthält 80 g (200 g) einer speziellen PVA-Lösung mit bestimmten Additiven. Die Dichte liegt bei 1 g/mL. Die Zusammensetzung der Lösung ist auf den Einschluss von 20 ml (50 ml) (Bio)katalysatorsuspension ausgelegt, wobei maximal 100 ml (250 ml) LentiKats® entstehen. Wenn Sie weniger Material einschließen möchten, muss natürlich auch nur weniger Lösung genommen werden, für z.B. den Einschluss von 4 ml (Bio)katalysatorsuspension benötigen Sie nur 16 g LentiKat® Liquid.

Bitte lesen Sie die gesamte Anleitung, bevor Sie die praktische Arbeit beginnen und legen Sie alle benötigten Materialien bereit!



2 Die Herstellung von LentiKats®

Bereiten Sie den LentiKat® Stabilizer aus dem beigefügten Pulver mit destilliertem Wasser zu und stellen Sie ihn für die spätere Verwendung bereit. Die fertige Lösung kann bei Bedarf durch Autoklavieren für 20 min bei 121°C sterilisiert werden.

Die benötigte Menge an Stabilizer wird durch die zur Verfügung stehenden Geräte beeinflusst, als Faustregel kann man aber für 5 g Immobilisat mit 200 mL und für 50 g Immobilisat mit 1000 mL rechnen.

Schmelzen Sie LentiKat® Liquid, indem Sie die Flasche in ein Wasserbad von 95°C stellen. Durchmischen Sie dabei die Lösung sorgfältig mit Hilfe eines Magnetrührers. Der Schmelzvorgang ist beendet, wenn die gesamte Lösung homogen und glasklar ist.

Ein Mikrowellengerät kann beim Erwärmen hilfreich sein. Die Flasche mit LentiKat®Liquid darf dabei jedoch nicht überhitzt werden! Hierdurch würde LentiKat®Liquid zwar nicht geschädigt werden, es bestünde jedoch erhebliche Unfallgefahr.

ACHTUNG! Öffnen Sie keine Flasche mit überhitzter Flüssigkeit!

Um sterile Bedingungen aufrechtzuerhalten und um den Verlust von Wasser zu verhindern, sollten Sie die Flasche während des Schmelzens nach Möglichkeit geschlossen halten.

Nach dem vollständigen Schmelzen wird LentiKat®Liquid auf eine Temperatur abgekühlt, die für Ihren (Bio)katalysator unschädlich ist. Für die meisten Anwendungen wird dies bis auf Raumtemperatur sein. Sie müssen berücksichtigen, dass eine unerwünschte (reversible) Gelierung bei sehr niedrigen Temperaturen eintreten kann. Frisch aufgeschmolzenes LentiKat®Liquid ist bei einer Temperatur von 25°C bis 30°C für mehrere Minuten gut verarbeitbar.

Nach dem Abkühlen geben Sie Ihren (Bio)katalysator zu und dispergieren ihn mit einem Magnetrührer oder durch kräftiges Durchschütteln homogen. Wenn Sie feuchtes Material wie z.B. Biofeuchtmasse aus einer Zentrifugation einschließen wollen, müssen Sie dieses Material bis zu einem maximalen Gehalt von 50% Biofeuchtmasse (feuchtes Material) verdünnen, bevor Sie es zu LentiKat®Liquid hinzugeben. Achten Sie dabei darauf, das richtige Volumen zuzugeben, wie eingangs beschrieben.

Für die Herstellung von LentiKats® ist eine glatte Oberfläche notwendig, vorzugsweise aus Polystyrol. Besonders Einmalpetrischalen sind sehr gut geeignet. Einige Materialien, wie etwa Glas, sind gänzlich ungeeignet. Um die später erforderliche Teiltrocknung optimal durchführen zu können, sollten die Platten einen möglichst flachen Rand haben, bei Petrischalen empfiehlt es sich also, nicht die Bodenschale sondern den Deckel als Platte zu verwenden.

Jede Platte, die Sie später für das Auftropfen verwenden wollen, muss einzeln markiert und gewogen werden. Bitte notieren Sie die Masse jeder Platte.

Mit einer Standardspritze mit Kanüle (Ø etwa 1,0 mm) formen Sie nun Tropfen von LentiKat®Liquid und setzen diese sorgfältig auf der Oberfläche der gewogenen Platte ab. Achten Sie dabei darauf, möglichst gleichmäßige und kleine Tropfen zu formen (Ø etwa 3 mm, Masse etwa 5 mg) und möglichst schnell vorzugehen. Nachdem Sie den Auftropfvorgang auf einer Platte abgeschlossen haben, wiegen Sie direkt anschließend diese Platte aus, um die Masse der aufgetropften Flüssigkeit zu bestimmen.



Je langsamer Sie die Tropfen aufbringen, desto ungleichmäßiger trocknen diese. Möchten Sie mehrere Platten gemeinsam trocknen, können Sie nach Fertigstellung einer Platte diese zunächst abdecken. Im Falle der Verwendung von Petrischalendeckeln nehmen Sie hierfür am besten die Bodenschale, die über die Tropfen gestülpt wird.

Die Massen der Platten tragen Sie am besten in eine Tabelle mit folgendem Aufbau ein. Am Ende dieser Anleitung finden Sie eine entsprechende Kopiervorlage:

Platte	leere Platte	Platte mit feuchten Tropfen	feuchte Tropfen (berechnet)	gewünschte Masse (28% Feuchtmasse)	gew. Masse der Platte
1	10,18	12,52	2,34	0,66	10,84
2	10,25	12,85	2,60	0,73	10,98
3	10,09	12,51	2,45	0,69	10,78

Nach dem Wiegen werden die Tropfen zur Gelierung kontrolliert getrocknet, indem sie an der Luft stehengelassen werden. Um den Trocknungsvorgang zu beschleunigen, kann ein Ventilator eingesetzt werden. Dieser sollte in 0,5 bis 1 m Abstand von oben auf die Platten gerichtet sein. Gerade zu Beginn, wenn die Tropfen noch sehr nass sind, sollten Sie behutsam ventilieren, um eine Verformung zu vermeiden. Die maximale Temperatur der Trocknungsluft sollte 35°C nicht überschreiten, hängt aber vom einzuschließenden (Bio)katalysator ab.

Der Gelierungsvorgang ist abgeschlossen, wenn 72 % der Masse von LentiKat® Liquid, die aufgetropft wurde, verdunstet ist. Es ist daher ratsam, die Massen der trocknenden Platten regelmäßig zu kontrollieren. Die Trocknungsdauer hängt stark von der gewählten Trocknungsmöglichkeit und der vorliegenden Luftfeuchtigkeit ab.

Wenn Ihr (Bio)katalysator gegenüber der Trocknung unempfindlich ist, können Sie praktisch das ganze Wasser entfernen. Dies führt zu sehr stabilen LentiKats®. Die endgültige Größe und die resultierenden Diffusionseigenschaften der LentiKats® werden hierdurch jedoch beeinflusst und sollten daher überprüft werden.

Nachdem die Gelierung abgeschlossen ist, wird LentiKat® Stabilizer über die LentiKats® gegossen, um die Gelpartikel abzulösen und den Rückquellvorgang einzuleiten. LentiKats® quellen hierdurch fast bis auf ihre ursprüngliche Größe zurück. Nach 2 oder 3 Minuten des Kontaktes mit der Stabilizer-Lösung können die LentiKats® von der Oberfläche abgelöst und in eine Flasche mit dem zehnfachen Überschuss an LentiKat® Stabilizer überführt werden.

Im Falle von Petrischalen wird der Kontakt zwischen Stabilizer-Lösung und LentiKats® sehr einfach durch Übergießen zu bewerkstelligt. Nach dem Rückquellen kann die gleiche Lösung durch wiederholtes Abgießen für mehrere Platten verwendet werden - dies spart LentiKat® Stabilizer.

LentiKats® müssen anschließend für mindestens zwei Stunden in der Stabilizer-Lösung gerührt werden, um eine maximale mechanische Stabilität für die spätere Anwendung zu gewährleisten. Jegliche Verkürzung der genannten Zeiten und des Grades der Trocknung muss für den Einzelfall bezüglich des Einflusses auf die Stabilität der LentiKats® überprüft werden.

Wird Ihr Biokatalysator durch die Abwesenheit einer bestimmte Mediumskomponente geschädigt, können Sie versuchen, diese Komponente zum LentiKat® Stabilizer zuzugeben, um den Mangel während des Stabilisierungsvorgangs zu vermeiden.

Nach dem Stabilisieren kann der Überstand entfernt und durch das Medium oder die Lösung ersetzt werden, worin Sie Ihren immobilisierten (Bio)katalysator einsetzen wollen. Sollte sich Schaumbildung zeigen, kann es notwendig sein, den Überstand nach einer kurzen Zeit des Rührens erneut auszutauschen. Der Effekt der Schaumbildung ist abhängig vom Verhältnis der Mengen von LentiKats® zu Medium bzw. Lösung.

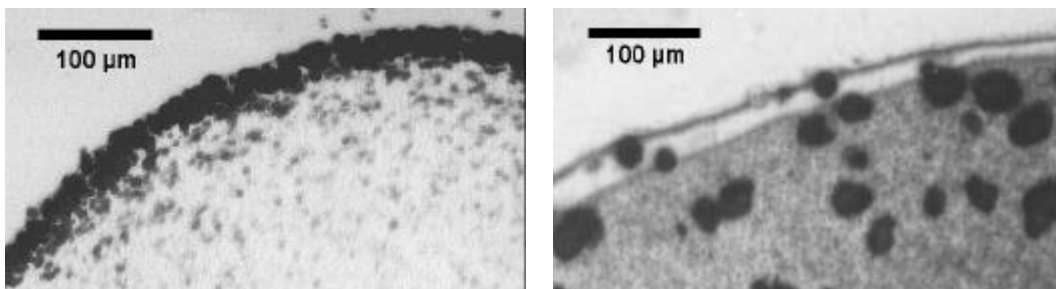
3 Einige Anmerkungen zur Biomassebeladung

Wenn Sie lebende Zellen einschließen, die während einer anschließenden Inkubation in den LentiKats® Kolonien bilden sollen, beeinflusst die gewählte Anfangskonzentration an Zellen im Gel die spätere spezifische Aktivität der LentiKats®. Unter spezifischer Aktivität ist hier eine bestimmte Umsetzung je Stunde und mL Gel zu verstehen, die nach dem Erreichen des "steady states" zu erreichen ist.

Ist die anfängliche Biomassebeladung zu hoch, bildet sich eine Art Schalenkatalysator aus, der sich durch einen sehr hohen Biomassegehalt unmittelbar an der Oberfläche der LentiKats® auszeichnet. Dies führt zu einer äußerst schlechten Nährstoffversorgung im zentralen Bereich und damit zu einer schlechten spezifischen Aktivität (vgl. linke Seite der untenstehenden Abbildung). Ist die anfängliche Biomassebeladung hingegen zu gering, wird das Gelvolumen nicht ausreichend genutzt. Demnach ist der Optimumsbereich für die anfängliche Biomassebeladung für jede Anwendung individuell zu bestimmen.

Als Faustregel kann eine anfängliche Biomassebeladung von etwa 10^7 Zellen pro mL Gel als nahe dem Optimum angenommen werden. Dieser Wert wurde für verschiedene Bakterien gefunden. Die Angabe einer Zellzahl ist hier nützlicher als die einer Biomasse, da Zellen verschiedener Mikroorganismen stark in ihrer Größe variieren - jedoch hat eine Kolonie immer ihrer Ausgangspunkt in einer Zelle und nicht in einer "kleinen Menge" an Biomasse.

Wenn der Biomassegehalt von LentiKats® zu hoch ist, kann es nach längerer Inkubation zu einem Rollen der LentiKats® kommen. Neben dem Absenken der anfänglichen Biomassebeladung können hier eine Vergrößerung der Dicke der LentiKats® oder eine Erhöhung der Stabilität des Hydrogels Abhilfe schaffen (Dauer der Stabilisierung oder stärkeres Trocknen, soweit möglich).



Sollen tote oder ruhende Zellen eingeschlossen werden, empfiehlt sich ein Biomassegehalt von 10 % (w/w) Biofeuchtmasse. Bei einer geplanten Nutzung intrazellulärer Enzyme in mehr oder weniger perforierten Zellen kann eine Quervernetzung des Zellinhalts mit Glutaraldehyd notwendig sein, um ein Auswaschen des gewünschten Enzyms zu verhindern oder zu vermindern.

4 Arbeiten mit LentiKats®

- korrekt stabilisierte LentiKats® tolerieren maximale Temperaturen von 50°C bis 55°C.
- pH-Werte zwischen 3,1 und 8,5 wurden für mehrere Tage oder Wochen ohne Anzeichen für ein Auflösen der LentiKats® getestet. Werte außerhalb dieses Bereichs sind sehr wahrscheinlich ebenfalls möglich.
- Sollen LentiKats® unter eher ungewöhnlichen Bedingungen eingesetzt werden, ist es empfehlenswert, Experimente zur Langzeitstabilität des Hydrogels unter diesen Bedingungen durchzuführen.

5 Dies und Das

Mikroorganismen, die in LentiKats® eingeschlossen sind können mikroskopisch beobachtet werden. Um den Kontrast zwischen Zellen und umgebendem Gel zu verstärken, ist eine Färbung nützlich: Eine Behandlung mit 1:100 verdünnter Färbelösung nach ZIEHL und NEELSEN (Carbol-Fuchsin-Lösung) ergab gute Ergebnisse nach Färbung und Entfärbung von je 30 Minuten.

Wenn Sie mit Ihren Biokatalysator in LentiKats® arbeiten, müssen Sie wahrscheinlich weniger Rücksicht auf Sterilitätsprobleme nehmen. Potenziell kontaminierende Fremdorganismen können nicht in das Hydrogel eindringen und den gewünschten Biokatalysator daher nicht verdrängen. Dies wird meist einen großen Überschuss dieses Biokatalysators gewährleisten.

6 Sicherheitshinweise

LentiKat®Liquid ist ausschließlich für den Gebrauch in Laboratorien bestimmt. Die üblichen Sicherheitsbestimmungen für das Arbeiten mit Chemikalien müssen unbedingt beachtet werden. Bei Kontakt mit Haut oder Augen bitte gründlich mit lauwarmem Wasser ab- bzw. ausspülen.

7 ... ein wenig Werbung

Für die einfache und problemlose Herstellung sehr einheitlicher LentiKats® ist ein speziell entwickeltes Gerät erhältlich.

Dieses Gerät erzeugt in einem einzigen Schritt mehr als 400 identische Tropfen. Sollten Ihre ersten Experimente mit LentiKats® gute Ergebnisse zeigen und Sie ihre Arbeit mit diesen Immobilisaten fortsetzen wollen, sollten Sie einmal über den speziellen LentiKat®Printer nachdenken!

Kaufen Sie nicht "die Katze im Sack": Auf Anfrage ist der LentiKat®Printer abhängig von unserem Lagerbestand auch kurzfristig als Leihgerät erhältlich!

Für weitere Fragen und Kommentare wenden Sie sich bitte an untenstehende Adresse oder an info@geniaLab.com

