

Insectomed SF express: Hinweise zur Adaption der Insektenzellen

Information der Biochrom AG vom 05. Mai 2010

Das neue serumfreie Insektenzellmedium Insectomed SF express der Biochrom AG eignet sich optimal für die Kultivierung von *Spodoptera frugiperda* (SF9, SF21), BTI-TN-5B1-4 (High Five™) Zellen und *Drosophila melanogaster* (beispielsweise D.Mel-2)-Zellen. Die Rezeptur des Mediums ist geschützt.

Als Komplettmedium enthält es alle für die Kultivierung von Insektenzellen nötigen Zusätze in der optimalen Konzentration: Steroide, Aminosäuren, organische Säuren, Glutamin und Glucose. Insectomed SF express ist mit Natriumphosphat gepuffert. Mit Insectomed SF express lassen sich alle Zelltypen kultivieren: Monolayer-, Spinner- oder Schüttelkulturen, adhärente Zellen und Suspensionszellen. Nachfolgend finden Sie Hinweise zur Adaption der Zellen an das Insectomed SF express-Medium. Das Medium ist gebrauchsfertig, der Zusatz von Supplementen ist nicht nötig.

1 Allgemeine Informationen zu Insektenmedien

Die Nährstoffbedingungen von Insekten ähneln generell denen von Wirbeltieren, aber es gibt auch einige Unterschiede, die bei der Entwicklung von Insektenkulturmedien berücksichtigt werden müssen:

- **Steroide**
Da Insekten keine Steroidgenese besitzen, benötigen Insektenzellmedien eine Quelle für die Bildung von Zellmembrankomponenten und eine Quelle für das Steroidhormon Ecdyson.
- **Aminosäuren**
Insektenhämolymph enthalten einen hohen Anteil an Aminosäuren, so dass auch die Medien für die Insektenzellkultur hohe Mengen an Aminosäuren enthalten.
- **Organische Säuren**
Insektenblut enthält einen ungewöhnlich hohen Anteil an freien organischen Säuren, wie z.B. Citrat, Succinat, Oxalat oder Malat, in einem Bereich von 0,1-30 mmol pro Insekt.
- **pH, Puffer und pH-Indikator**
Insekten-Gewebeflüssigkeiten enthalten mehr Säure und besitzen daher einen pH-Wert von 6,2-6,9. Der optimale Bereich für die meisten Insektenkulturmedien liegt daher zwischen 6,2 und 6,5 (im Vergleich zu 7,1-7,6 für die meisten Säugetier-Zellkulturmedien). Insectomed SF express ist optimiert, diesen pH-Bereich unter verschiedenen Kulturbedingungen (z.B. Luftzufuhr, offener Deckel) einzuhalten. Insekten-Zellkulturmedien sind mit Natriumphosphat gepuffert. Es wird kein CO₂ benötigt, um einen konstanten pH-Bereich einzuhalten; ein pH-Indikator wird nicht zugegeben. Daher ist durch Zugabe von Proteinhydrolysaten die Farbe von Insektenmedien gelb.

➤ **Osmolalität**

Der osmotische Druck weicht deutlich von dem im vertebralen Blut ab: Er ist mehr als doppelt so hoch. Insekten-Zellkulturmedien weisen daher eine Osmolalität von 340-390 mOsmol/kg auf im Vergleich zu 290-330 mOsmol/kg für Wirbeltier-Zellkulturen.

➤ **Glutamin, Glukose**

Der exzessive Stoffwechsel von Glutamin und Glukose in Säugetier-Zellkulturen resultiert in einer übermäßigen Produktion von Ammonium bzw. Laktat. Die Anhäufung dieser metabolischen Nebenprodukte ist oft hemmend. Eine Entgiftung dieser Metabolite in Insektenzellen folgt einem anderen Verlauf als in Säugetierzellen. Daher kann für Insekten-Zellkulturmedien ein höherer Anteil an Glutamin und Glukose eingesetzt werden, um das Wachstum bei hohen Zelldichten zu fördern.

2 Anpassung der Zellen an das serumfreie Insektenkulturmedium

Um Insektenzellen von serumhaltigen Medium zu serumfreien Insectomed SF express anzupassen, sind je nach Zelltyp unterschiedliche Vorgehensweisen möglich. Entweder erfolgt eine direkte oder eine schrittweise Anpassung der Zellen (Entwöhnung). Voraussetzung ist dafür jedoch, dass sich die Zellen vor der Zugabe von Insectomed SF express in der exponentiellen Phase befinden und dass die minimale Zelldichte 2×10^5 Zellen/ml beträgt.

Direkte Anpassung:

1. Kultivieren Sie die Zellen bis zu einer Konfluenz von 60 % (adhärente Kulturen) oder einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml (Suspensionskulturen) in serumhaltigen Medien.
2. Ernten Sie die Zellen, verdünnen Sie sie auf 5×10^5 Zellen/ml serumfreien Insectomed SF express und inkubieren Sie die Kulturen bei +27 °C.
3. Nachdem Sie eine Konzentration von $2-4 \times 10^6$ Zellen/ml (normalerweise nach 5-6 Tagen) erreicht haben, nehmen Sie 2×10^6 Zellen/ml in frischem Medium auf und wiederholen Sie diesen Schritt. Nach 2-3 Zyklen sind die Zellen an ein serumfreies Wachstum gewöhnt.

Schrittweise Anpassung:

1. Kultivieren Sie die Zellen in einer Zellkulturflasche oder einer Petrischale bei einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/25 cm² Oberfläche in 3,6 ml serumhaltigem Medium aus. Nach Tag 1 fügen Sie 1/10 Volumen des Insectomed SF express zur Kultur und lassen die Zellen bis zu einer Konfluenz von 60 % wachsen.
2. Subkultivieren Sie in 3 ml serumhaltiges Medium und Insectomed SF express (9:1 v/v) und fügen Sie nach einem Tag 1/4 Volumen Insectomed SF express hinzu.
3. Subkultivieren Sie in 3 ml serumhaltiges Medium und Insectomed SF erxpress (3:1 v/v) und fügen Sie nach einem Tag 1/4 Volumen Insectomed SF express hinzu.

3 Hinweise für Zellen mit spezifischen Wachstumsbedingungen

3.1 Monolayer-Kultur

Mit einer Pipette das Medium und die nicht angehefteten Zellen vom konfluenten Monolayer abnehmen, Überstand verwerfen und 4 ml frisches Insectomed SF express auf eine 25 cm² Kulturflasche geben. Resuspendieren Sie die Zellen, indem Sie das Medium über den Monolayer pipettieren. Beobachten Sie den Zellmonolayer, um die komplette Ablösung der Zellen von der Oberfläche der Flasche sicherzustellen. Ernten Sie die Zellen und zählen Sie die lebensfähigen Zellen (z.B. mit Trypanblau). Kultivieren Sie die Zellen mit ca. $1,2 \times 10^6$ Zellen/25 cm²-Flasche aus. Geben Sie die Kulturen wieder in den Inkubator ($+27 \pm 0,5$ °C). Nach drei Tagen nehmen Sie das Medium von einer Seite der Kulturflasche ab und geben frisches Medium an Rand der Kulturflasche dazu.

3.2 Spinner

Rekalibrieren Sie die Spinner-Flaschen mit einem geeichten Zylinder oder Messkolben. Die Kalibrierung muss ohne Rührvorrichtung im Behälter durchgeführt werden. Das Rührwerk muss frei rotieren, ohne die Wände oder den Boden der Flasche zu berühren. Vermeiden Sie physikalischen Stress, da die meisten invertebraten Zellen sehr sensitiv auf Scherkräfte reagieren. Befestigen Sie den Spinnermechanismus so, dass der Rührer frei zu den Seiten und zum Boden der Flasche ist (vor dem Autoklavieren befestigen). 4-6 konfluente Monolayer aus 75 cm²-Flaschen sind notwendig, um eine 100 ml Kultur zu starten (4-5 Flaschen für die Spinnerkultur, eine Kultur als Rückhalt).

Lösen Sie die Zellen vom Boden der Kulturflasche wie bei der Monolayer-Kultur beschrieben. Vereinigen und zählen Sie die Zellen. Verdünnen Sie die Suspension auf 3×10^5 lebende Zellen/ml in Insectomed SF express. Für Volumen zwischen 75 und 100 ml benutzen Sie eine 100 ml Spinnerflasche, für Volumen von 150-200 ml eine 250 ml Flasche. Stockkulturen sollten in einem Volumen von 150 ml in einer 250 ml Spinnerflasche angelegt werden. Der obere Teil des Rührers wird etwas über dem Medium sein, so dass eine zusätzliche Luftzufuhr zu den Kulturen stattfindet. Der atmosphärische Gasaustausch wird durch Öffnen der Deckel (1/4 Drehung) der Seitenarme der Spinnerflasche gewährleistet.

Inkubieren Sie die Flaschen bei $+27 \pm 0,5$ °C und einer Rührgeschwindigkeit von 75 rpm. Setzen Sie die Kulturen zweimal die Woche mit einer Zelldichte von 3×10^5 /ml in saubere, sterile Spinnerflaschen um. Alle zwei Wochen sollten die Kulturen bei 100xg für 5 Minuten zentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert werden, um die Anhäufung von Zelltrümmern und toxischen metabolischen Nebenprodukten zu reduzieren.

3.3 Shaker-Kultur

Der Schüttler sollte eine Kapazität von bis zu 135 rpm haben. Benutzen Sie als Standardflasche einen 250 ml sterilen Einweg-Erlenmeyer-Kolben. Der Schüttler sollte bei einer Temperatur von $+27 \pm 0,5$ °C in einer Umgebung ohne Luftbefeuchtung und ohne Begasung stehen.

Die Belüftung erfolgt durch Lösen des Deckels um ca. $\frac{1}{4}$ Drehung (innerhalb der Zwischenschließposition). In diesem Zustand gibt es keine Sauerstofflimitierung für die Zellen und sie vermehren sich daher mit ihrer maximalen Verdoppelungsrate.

Beimpfen Sie einen 250 ml Erlenmeyer-Kolben mit 100 ml des Komplettmediums, welches 3×10^5 lebensfähige Zellen pro ml enthält. Stellen Sie den Schüttler auf 125-135 rpm. Subkultivieren Sie zweimal wöchentlich mit ca. 3×10^5 Zellen/ml. Alle drei Wochen sollten die Kulturen bei 100xg 5 min zentrifugiert werden und die Pellets in frischem Medium resuspendiert werden, um Anhäufungen von Zelltrümmern und toxischen Stoffwechselprodukten zu reduzieren. Falls die Zellen Passagen-abhängig kultiviert werden, sollten alle drei Monate frische Kulturen aus gefrorenen Stammkulturen eingesetzt werden.

4 Hinweise für Virus- und rekombinante Proteinproduktion

4.1 Adhärenz Zellen

1. Säen Sie die Zellen in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/25 cm²-Flasche. Die Zellen heften normalerweise innerhalb von 15 Minuten an, spätestens nach einer Stunde.
2. Entfernen Sie nach einem Tag das Medium und inkubieren Sie die Zellen für eine Stunde bei sanftem Schütteln mit 0,5 ml Virussuspension, mit einer Dosis von $4-8 \times 10^7$ TCID₅₀ Units/Zelle (tissue culture infective dose), was in einer Vielfachheit der Infektion (multiplicity of infection, MOI) zwischen 10-20 TCID₅₀ Units/Zelle resultiert.
3. Waschen Sie die Zellen nach dem Entfernen des Mediums und geben Sie 4 ml frisches Medium hinzu.
4. Isolieren Sie den infektiösen Virus, Polyhedra oder rekombinante Proteine ab 48 h nach der Infektion. 72 h nach Infektion beginnen die Zellen zu lysieren.

4.2 Suspensionskulturen

1. Zentrifugieren Sie die Zellen der Suspensionskultur in der logarithmischen Wachstumsphase (500xg für 5 min).
2. Resuspendieren Sie die Zellen in einer Zelldichte von 10^7 Zellen/ml in Medium, welches den Virus enthält. Diese Medium sollte $1-2 \times 10^8$ TCID₅₀ Units des Virus enthalten, um eine Vielfachheit der Infektion (multiplicity of infection) von 10-20 TCID₅₀ Units pro Zelle zu gewährleisten.
3. Isolieren Sie den infektiösen Virus, Polyhedra oder rekombinantes Protein 48 h nach Infektion. 72 h nach Infektion beginnt die Zellyse.

5 Einfrieren und Auftauen der Kulturen

5.1 Einfrieren

Stellen Sie die gewünschte Menge an Zellen in einer Spinner- oder Schüttler-Kultur bereit und ernten Sie die Zellen in der mittleren logarithmischen Wachstumsphase bei einer Viabilität von >90 %.

Bestimmen Sie die Lebendzellzahl und berechnen Sie die erforderliche Menge an Einfrieremedium, um eine Endkonzentration von $0,5-1,0 \times 10^7$ Zellen/ml zu erreichen. Stellen Sie die erforderliche Menge an Einfrieremedium (7,5 % Dimethylsulfoxid (DMSO) und 10 % Bovines Serum Albumin (BSA)) in Insectomed SF express her. Bewahren Sie das Medium bei 4 °C auf. Zentrifugieren Sie die Zellen bei 100xg für 6 Minuten. Resuspendieren Sie das Pellet im festgelegten Volumen in 4 °C kaltem Einfrieremedium. Inkubieren Sie die Suspension bei 4 °C für 30 Minuten (bis sie gut abgekühlt ist). Aliquotieren Sie die Suspension in Kryoröhrchen. Gefrorene Zellen sind in flüssigem Stickstoff unbegrenzt haltbar.

5.2 Auftauen

Nehmen Sie die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff wieder in Kultur durch schnelles Auftauen der Zellen bei 37 °C in einem Wasserbad. Überführen Sie den Inhalt des Kryoröhrchens in eine 250 ml Shaker-Flasche, die 100 ml Insectomed SF express enthält, und inkubieren Sie wie beschrieben die Kultur auf dem Schüttler. Stellen Sie die Kulturen auf eine Zelldichte zwischen $3 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ bei den ersten beiden Subkulturen ein und gehen danach zu Ihrer normalen Zelldichte über.

6 Details zu Insectomed SF express

Parameter	Insectomed SF express
Kat. Nr.	F 8275
Einheit	500 ml
Lagerung	+2 - +8 °C, dunkel lagern, nicht einfrieren
Rohstoff	Serumfrei, L-Glutamin enthalten
Verwendungszweck	Insektenzellen
Hinweis	Nur für den <i>in vitro</i> -Gebrauch bestimmt

Insektenzellmedien der Firma Biochrom AG im Überblick:

<http://www.biochrom.de/produkte/medien/insektenzellmedien/>