

Sf21-Zellen in Insectomed SF express: Wachstumsverlauf und Infektion mit Baculovirus

Biochrom AG Information

Das Insektenzellmedium Insectomed SF express der Biochrom AG eignet sich zur Kultivierung von *Spodoptera frugiperda* und *Drosophila melanogaster*-Zellen. Mit Insectomed SF express lassen sich alle Zelltypen kultivieren. Das Komplettmedium enthält alle für die Kultivierung von Insektenzellen nötigen Zusätze in der optimalen Konzentration: Steroide, Aminosäuren, organische Säuren, Glutamin und Glucose. Insectomed SF express ist für die Expression rekombinanter Proteine geeignet.

Wachstumsrate und Vitalität der Zellen in Insectomed SF express sind vergleichbar mit anderen serumfreien Insektenzellmedien. Von einigen Kunden wurde Insectomed SF express zur Kultivierung von Insektenzellen bereits erfolgreich getestet und zur Infektion mit Baculovirus empfohlen. Die Zellen wurden in den Versuchen erfolgreich von der Vorkultur in das neue Medium eingesetzt. Dabei lag die Infektionsrate der Sf21-Zellen mit dem Baculovirus nach drei Tagen bei fast 100 Prozent. Die Ergebnisse im Detail finden Sie nachfolgend.

1 Anwendung Insectomed SF express

Das neue 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.

Mit Insectomed SF express lassen sich alle Zelltypen kultivieren: Monolayer-, Spinner- oder Schüttelkulturen, adhärenente Zellen und Suspensionszellen.

Das Komplettmedium ist für die Expression rekombinanter Proteine geeignet.

2 Material und Methoden

Material:

- Insectomed SF express (Kat. Nr. F 8275, Flüssigmedium, 500 ml Flaschen)
- Inkubator Fa. New Brunswick Scientific, Modell Innova44
- Zentrifuge Fa. Eppendorf, Nr. 5810R
- Sicherheitswerkbank der Klasse II, Fa. Heraeus, Modell HS18, HeraSafe
- Fluoreszenzmikroskop Eclipse TE2000-U der Firma Nikon
- Sf21 Insektenzellen, DSMZ Nr. ACC119 (vor Versuchsbeginn drei Wochen in Insectomed SF express in silikonisierten Schüttelkolben kultiviert)
- Virus: human-EPO-GFP (Baculogold, Fa. BD)

Methoden:

- Kulturvolumen: 10 und 30 ml
- Kulturdauer: 6 Tage
- Virusstock mit einem TCID₅₀ (engl.: 50 % tissue culture infectious dose¹) mit einem Titer von 2×10^8 Viren/ml
- Bestimmung von Wachstumsrate und Expression von Epo-GFP (GFP: grün fluoreszierendes Protein)

3 Versuchsaufbau

Die Insektenzellen wurden drei Wochen vor Versuchsbeginn in Insectomed SF express serumfrei kultiviert. Einen Tag vor Versuchsbeginn wurde ein vollständiger Mediumwechsel durchgeführt, die Zellzahl bestimmt und so eingestellt, dass sich die Zellen zum Zeitpunkt der Infektion in der logarithmischen Wachstumsphase befinden.

Die Zellen wurden aus der Vorkultur entnommen, zentrifugiert und in 30 ml beziehungsweise 10ml Medium resuspendiert.

Nach 20 Minuten wurde die entsprechende Virussuspension zugegeben, die Zellzahl bestimmt und der jeweilige MOI (engl.: multiplicity of infection, Multiplizität der Infektion²) berechnet (siehe Tab. 1).

Tab. 1: Ausgangsbedingungen

Insectomed SF express			
Niedrige Zellzahl $7,1 \times 10^5$ /ml		Hohe Zellzahl $3,3 \times 10^6$ /ml	
Kontrolle	MOI 4,2	Kontrolle	MOI 4,0

Die infizierten Kulturen wurden über 6 Tage bei 27 °C unter Schütteln kultiviert, täglich daraus Proben entnommen und die Zellzahlen mit Hilfe der Trypanblaumethode in einer Neubauerzählkammer bestimmt. Die Infektionsrate wurde durch Auszählen der GFP-markierten Zellen ermittelt.

4 Ergebnisse

4.1 Wachstum der Zellen in Insectomed SF express

Die Zellen ließen sich problemlos von der Vorkultur in Insectomed SF express umsetzen und wuchsen mit gleicher Teilungsrate weiter. Die Insektenzellen waren stark adhärent in Insectomed SF express.

¹ Virustiter, nach deren Applikation 50 % der Zellen infiziert sind

² In der Virologie ist der MOI das zahlenmäßige Verhältnis von Virus zu Zielzellen.

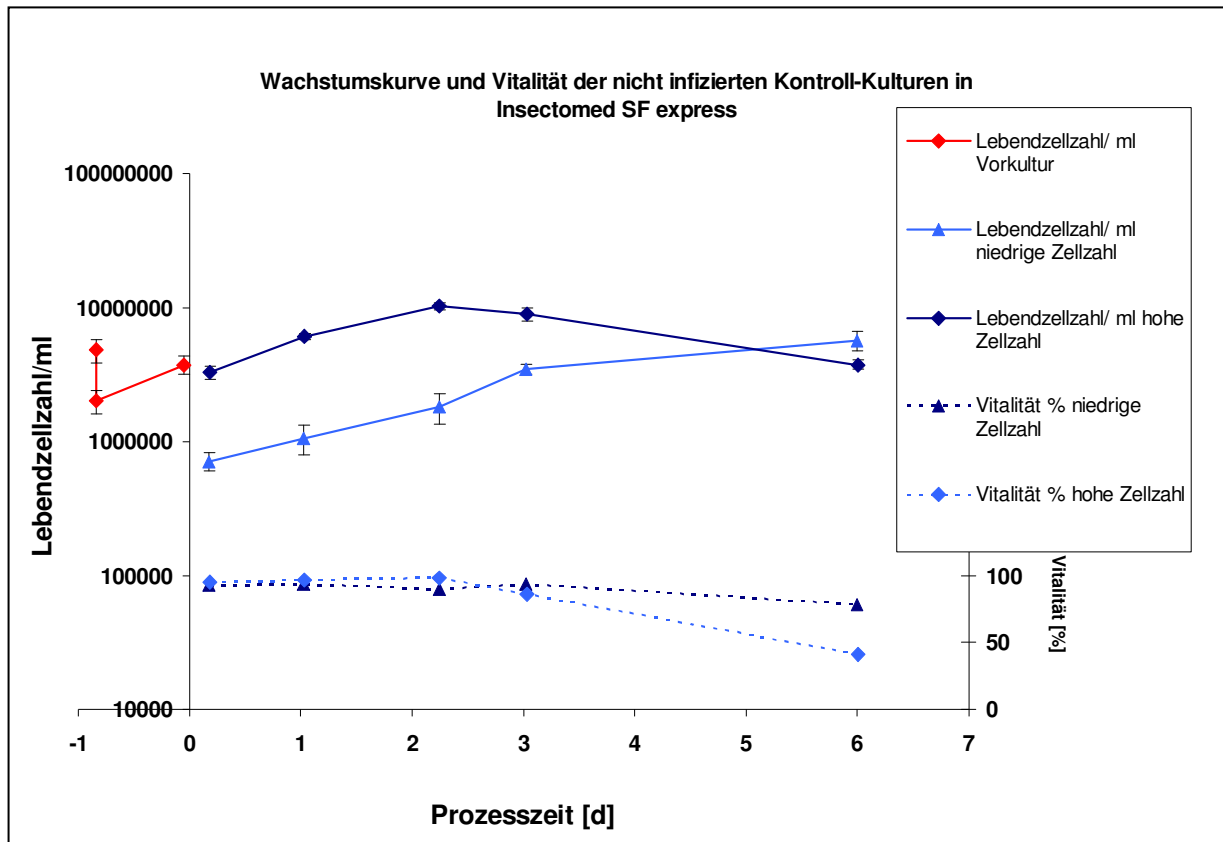


Abb. 1: Wachstumskurve und Vitalität der nicht infizierten Kontrollkulturen

Die Vitalität der Zellkultur liegt anfangs bei über 92 %, erst nach Erreichen der maximalen Zellzahl im System geht die Rate auf 80 % zurück.

Tab. 2: Wachstumsrate

Parameter	Insectomed SF express
Verdopplungszeit Vorkultur (h)	21
Verdopplungszeit Kultur (h)	30
Lebendzellzahl /ml	$1,0 \times 10^7$
Vitalität Start (%)	92
Vitalität nach 4 Tagen (%)	80

Die DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) gibt für die Zelllinie Sf-21, ACC 119, eine Verdoppelungszeit in serumhaltigen Medium von ca. 3 Tagen an. In Insectomed SF express werden Verdoppelungszeiten von 21 h (ohne Virusinfektion) und von 30 h (nach Virusinfektion) erreicht.

4.2 Infektionsverlauf und Infektionsraten

Der Verlauf der Wachstumskurven der infizierten Zellen stellte sich wie erwartet dar: Die mit einem MOI von 3 bis 4 infizierten Zellen stagnieren bei ihrer Startzellzahl und die Kultur geht nach zwei bis drei Tagen in die Absterbephase über.

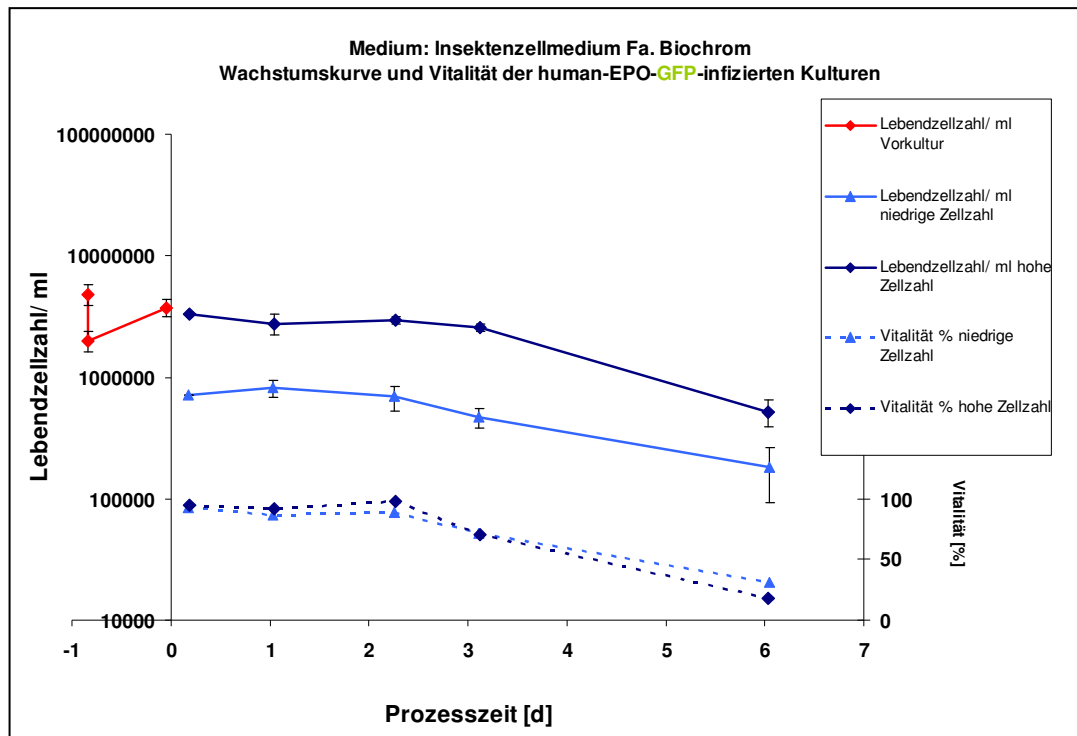


Abb. 2: Wachstumskurve und Vitalität der human-EPO-GFP-infizierten Kulturen

Ein MOI von 3,5 resultiert in einer berechneten Primärinfektion von 97,0 %. Erreicht wurden 94 und 99 % nach 54 h. Insectomed SF express führte zu hohen Infektionsraten, die indirekt über die Produktbildung von EPO-GFP bestimmt wurden.

Tab. 3: Infektionsrate nach Zeitpunkt der Probenahme

Zeitpunkt der Probenahme	Infektionsrate in Insectomed SF express
24 h	61 und 65 %
54 h	94 und 99 %

4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Wachstumsverlauf und Infektion zeigen den erwarteten Verlauf. Nach 54 h war ein hoher Prozentsatz der Zellen infiziert und produzierte EPO-GFP. Die Teilungsrate liegt bei 21 bzw. 30 h deutlich über dem von der DSMZ angegebenen Wert. Insectomed ist somit zur Kultivierung und zur Infektion mit Baculovirus zu empfehlen.

5 Produktdetails von Insectomed SF express

Parameter	Insectomed SF express
Kat. Nr.	F 8275
Einheiten	500 ml
Lagerung	+2 - +8 °C
Rohmaterial	Rezeptur geschützt; serumfrei
Anwendung	Medium für Insektenzellen
Hinweis	<ul style="list-style-type: none">➤ Für die <i>in vitro</i> Anwendung➤ „ready to use“

- Hinweise zur Adaption der Zellen an Insectomed SF express:
http://www.biochrom.de/fileadmin/user_upload/service/Tipps_und_Hinweise/deutsch/100521_hintergrundinformation_insektenzellmedium.pdf
- **Unser Tipp:** Prüfen Sie schnell und einfach die Zellzahl mit unserer neuen Einweg-Zählkammer C-Chip. Ein kostenloses Muster erhalten Sie unter info@biochrom.de

Danksagung:

Die Biochrom AG bedankt sich bei Frau A. Amtmann vom Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik (BVT), Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg für die Durchführung der Vitalitäts- und Zytotoxizitätsstudien.