



Kultivierung der Insektenzelllinie Sf9



Einleitung

Insektenzellen sind im Gegensatz zu prokaryotischen Zellen in der Lage, eukaryotische Proteine in der gewünschten Weise (post-translationale Modifikation, Proteinfaltung) zu produzieren. In der Biotechnologie wird für diese Zwecke häufig die Zelllinie Sf9 (*Spodoptera frugiperda* - Ovarialzellen) eingesetzt. Durch Verwendung des Baculovirus-Expressionssystems können mit Sf9-Zellen eine Vielzahl rekombinanter Proteine hergestellt werden. Die Zelllinie kann in Suspension oder adhärenz als Monolayer kultiviert werden.

1. Equipment

- BIOSTAT® Aplus 2 L, CC-System
- Clean bench
- Mikroskop
- Zählkammer oder Zell-Counter
- Thermoschüttler (z. B. Certomat, Sartorius)
- 1 L Animpfkolben
- 2 L Schottflasche mit Edelstahlkopfstück und Sterilfilter
- STT-Kupplungen
- Sterilfilter 0.2 µm (z. B. Midisart® 2000)
- Sf9 Zellen (ATCC No. CRL-1711)

2. Vorbereitung

a) Zeitplan

1. Tag: Sterilisation des Equipments (Animpfkolben, Schottflaschen...)
2. Tag: Vorbereitung & Inokulation Vorkultur
2. Tag: Reinigung, Vorbereitung & Sterilisation Kulturgefäß
3. Tag: Kalibrierung der pO₂-Sonde & Animpfen des Fermenters, wenn Startzellzahl in der Vorkultur erreicht wird.

b) Fermenter

- Reinigung des Kulturgefäßes mit 1% (w/v) NaOH
- Kalibrierung und Installation der pH-Elektrode
- Reinigung des Kulturgefäßes mit dest. Wasser
- Befüllen des Kulturgefäßes mit dest. H₂O, so dass die Sonden bedeckt sind
- Anbindung der peripheren Ausrüstung (Schläuche, Filter, Probenahmesystem, STT-Kupplungen usw.)
- Sterilisation des Kulturgefäßes im Autoklaven nach Benutzerhandbuch
- Steriler Medientransfer von der Vorlageflasche in das Kulturgefäß
- Kalibrierung der pO₂-Sonde bei Kultivierungsbedingungen

c) Medium

Für die Kultivierung von Sf9-Zellen wird die Verwendung von Grace-Medium empfohlen. Das TNM-FH-Medium ist ein gebrauchsfertiges Grace-Medium, welches bereits Spurenelemente, Lactalbuminhydrolysat, Yeastolate und 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FKS) enthält. Es werden 2 L des sterilen 1x TNM-FH mittels hydrostatischen Druck von der 2 L Schottflasche über STT-Kupplungen in den sterilen Fermenter transferiert.

Beachte

Nach der Sterilisation des Kulturgefäßes sollten alle Arbeiten am Gefäß in steriler Umgebung durchgeführt werden.

d) Inokulum

Für das Inokulum werden 200 mL steriles 1x TNM-FH in einen 1000 mL-Animpfkolben überführt. Der Kolben wird mit Sf9-Zellen aus einer Kryokultur o. ä. angeimpft und bei 28°C und 90 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Zur Inokulation des Fermenters sollte eine Startzellzahl von 2×10^5 Zellen verwendet werden.

e) Kultivierungsbedingungen

Kulturvolumen: 2 L
Begasung: 0,05–0,1 vvm
Rührerdrehzahl: 50–200 rpm
Temperatur: 28°C
pO₂: 60%, geregelt
pH-Wert: 6,3

3. Analytik

Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Die Trypanblau-Methode basiert auf der Eigenschaft lebender Zellen bestimmte Farbstoffe nicht in das Zellinnere aufzunehmen, während tote Zellen sich mit dem Farbstoff anfärben lassen und unter dem Mikroskop blau leuchten.

Für die Zellzählung und Vitalitätsbestimmung werden 10 µl Trypanblau und 10 µl Zellsuspension gemischt. Anschließend werden 10 µl auf eine Zählkammer (Neubauer, Thoma) aufgetragen und bei ca. 100x Vergrößerung mikroskopisch ausgezählt.

Lebendzellzahl = ungefärbte Zellen × KSF × VF

Mit: KSF = Kammerspezifischer Faktor
VF = Verdünnungsfaktor

Vitalitätsbestimmung:

$$\text{Vitalität} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{ungefärbte Zellen} + \text{gefärbte Zellen}} \times 100\%$$

Alternativ kann die Zellzählung auch mit einem „Cell-Counter“ durchgeführt werden.

Sartorius Stedim Biotech GmbH
August-Spindler-Strasse 11
37079 Goettingen, Germany

Phone +49.551.308.0

Fax +49.551.308.3289

www.sartorius-stedim.com

USA Toll-Free +1.800.368.7178

UK +44.1372.737159

France +33.442.845600

Italy +39.055.63.40.41

Spain +34.91.3586102

Japan +81.3.3740.5407

Specifications subject to change
without notice. Printed and copyrighted
by Sartorius Stedim Biotech GmbH

W · G

Publication No.: SBT1006-d09061

Order No.: 85034-538-38

Ver. 06 | 2009