



# Kultivierung der Hybridomazelllinie CF-10H5 (DSMZ ACC477)

Dipl.-Ing. Th. Schnitzler, Fachbereich Angewandte Naturwissenschaften und Technik, FH Aachen



## 2. Vorbereitung

### a) Zeitplan

- 1. Tag: Autoklavieren der Vorratsflaschen
- 1. Tag: Herstellung und Sterilfiltration der einzelnen Lösungen
- 1. Tag: Vorbereitung und Inokulation der Vorkultur I (T25)
- 3. Tag: Vorbereitung und Inokulation der Vorkultur II (T75)
- ... Passage der Zellen nach Erreichen von  $1 \times 10^6$  Z/mL in neue T75-Flaschen
- ... Vorbereitung und Inokulation der Spinnerflasche nach Erreichen der Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Z/mL
- 14. Tag: Vorbereitung, Reinigung und Sterilisation des Kulturgefäßes
- 14. Tag: Sterilttest
- 16. Tag: Animpfen des Fermenters

### b) Fermenter

- Reinigung des Kulturgefäßes mit 1% (w | v) NaOH
- Kalibrierung und Installation der pH-Elektrode
- Installation der  $pO_2$ -Elektrode
- Reinigung des Kulturgefäßes mit Reinstwasser
- Befüllen des Kulturgefäßes mit Reinstwasser, so dass die Sonden bedeckt sind
- Anbindung der peripheren Ausrüstung (Schläuche, Filter, Probenahmesystem, Sterilkupplungen usw.)
- Sterilisation des Kulturgefäßes im Autoklaven nach Benutzerhandbuch

## Einleitung

Die Zellen des Immunsystems von Mensch und Tier sind in der Lage Antikörper zu produzieren, die zur Erkennung von Krankheitserregern dienen. Es gibt eine riesige Anzahl von unterschiedlichen Antikörpern, die spezifisch auf bestimmte Erreger reagieren. Antikörper werden in vielen Bereichen der Forschung, der Medizin und der Diagnostik benötigt. Man versucht sie mit Hilfe von Hybridomazellen in unterschiedlichsten Bioreaktoren in großen Mengen herzustellen.

Eine Hybridomazelle ist eine Fusionszelle aus zwei unterschiedlichen Zellen. Zum einen einer Myelomzelle und zum anderen einer Plasmazelle. Diese Hybridomazelle vereint die wichtigsten Eigenschaften der beiden Zellen, sie lebt „ewig“ und produziert den gewünschten monoklonalen Antikörper.

## 1. Equipment

- BIOSTAT® Aplus 2 L CC-Ausstattung
- 2 × 1 L Schottflaschen
- 7 × 500 mL Schottflaschen
- 1 × 100 mL Schottflasche
- 1 × 50 mL Schottflasche
- 2 × 25 mL Schottflasche
- 2 × 2 L Schottflasche mit Edelstahlkopfstück
- 1 × 5 L Schottflasche mit Edelstahlkopfstück
- 25 × 25 mL Schottflaschen
- T-Flaschen (T25, T75)
- Spinnerflasche
- 1.5 mL - Reaktionsgefäße
- 15 mL - Zentrifugenröhrchen
- Glucose-Analysator oder Glucose Kit
- Glutaminanalysator oder Glutamin Kit
- Osmometer- Zentrifuge
- Mikroskop mit Hemocytometer
- Erythrosin B
- Zählgerät (z.B. CASY, Schärfe)
- Waage (e.g. Sartorius CP serie)
- $CO_2$  Inkubator
- Sterilwerkbank
- Sterile Pipetten
- Reinstwasser
- Mikrotiterplatten (96-Well)
- Mikrotiterplattenreader (Wellenlänge = 690 nm + 410 nm)
- Sterilfilter (Midisart® 2000, Sartobran® P, Sartobran® 300)
- Sterilkupplungen

### c) Lösungen und Medien

#### Spurenelement-Lösung

Salze einzeln in jeweils 150 mL 1M HCl lösen und im Messkolben mit Reinstwasser auf 1000 mL auffüllen. Die Lösung muss hellgelb und vollständig klar sein.

FE(III)-Citrat	1126,00 mg/L
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	3,75 mg/L
ZnCl <sub>2</sub>	518,00 mg/L

#### Vitamin Lösung

Die Vitamine werden in 1000 mL Reinstwasser gelöst. Lagerung bei -20°C für 6 Monate.

Cholin chlorid	100,00 mg/L
D-Ca-Panthothenat	100,00 mg/L
Folsäure	100,00 mg/L
i-Inositol	200,00 mg/L
Nicotinamid	100,00 mg/L
Pyridoxal.HCl	100,00 mg/L
Riboflavin	10,00 mg/L
Thiamin. HCl	100,00 mg/L

#### Fettsäure-Lösung

Es werden von den beiden Fettsäuren zunächst Stammlösungen hergestellt. Für die Liponsäure-Stammlösung werden 100 mg D,L-6,8-Liponsäure und für die Linolensäure-Stammlösung 100 mg Linolensäure in jeweils 10 mL Ethanol (abs.) gelöst und bei -20°C gelagert (Haltbarkeit ca. 12 Monate). Anschließend werden 760 µl Liponsäure-Stammlösung, 320 µl Linolensäure-Stammlösung sowie 8,9 mL Ethanol (abs.) gemischt und bis zum Gebrauch ebenfalls bei -20°C gelagert (Haltbarkeit ca. 6 Monate).

#### 2-Aminoethanol-Lösung

Zu 48 mL Reinstwasser werden 3 mL 2-Aminoethanol gegeben (Haltbarkeit ca. 3 Monate).

#### Natrium-Selenit-Lösung

3,46 mg Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> werden in 100 mL Reinstwasser gelöst (Haltbarkeit ca. 6 Monate).

#### Insulin-Lösung

Für die Insulin-Lösung werden 100 mg Insulin in 25 mL 0,01 M HCl im Ultraschallbad gelöst und bis zum Gebrauch bei 2-8°C gelagert (Haltbarkeit ca. 6 Monate).

#### Transferin-Lösung

500 mg Transferin in 25 mL Reinstwasser lösen und bis zum Gebrauch bei -20°C lagern (Haltbarkeit ca. 12 Monate).

### Kulturmedium

Die pulverförmigen Komponenten werden eingewogen und in ca. 4 Liter Reinstwasser auf einem Magnetrührer gelöst. Danach werden die verschiedenen Lösungen zugesetzt und noch einige Zeit weitergerührt. Der pH-Wert wird bestimmt und ggf. auf 7,1 nachgestellt (NaOH | HCl). Anschließend wird mit Reinstwasser auf 5 Liter aufgefüllt, die Osmolalität bestimmt und eventuell auf 320-330 mosmol/kg nachgestellt.

DMEM (Gibco 52100, abhängig von der Charge)	33,30 g
HAM F-12 (Gibco 21700, abhängig von der Charge)	17,70 g
HEPES	4,37 g
NaHCO <sub>3</sub>	12,00 g
BSA	0,50 g
Glutamin	1,27 g
Glucose*	16,00 g
Insulin	500,00 mL
Transferin	100,00 mL
Selenit	25,00 mL
Fettsäuren	305,00 mL
2-Aminoethanol	500,00 mL
Vitamine	25,00 mL
Spurenelemente	4,30 mL
FKS	50,00 mL

\*3,2 g/L - Angaben DMEM beachten!

Das Kulturmedium wird unmittelbar nach der Herstellung sterilfiltriert. Das Medium für die Vorkultur wird unter der Clean bench in sterile 500 mL-Schottflaschen und für den Fermenter in eine sterile 2000 mL-Schottflasche filtriert.

#### d) Vorkultur

Für die Anzucht der Vorkultur für den Fermenter werden etwa 14 Tage benötigt. Die Zellen aus einem Kryoröhrchen aus der N2-Lagerung werden in eine T25-Flasche überführt. Nach 2 Tagen werden die Zellen in einer T75-Flasche weiterkultiviert. Nach Erreichen einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Z/mL werden die Zellen auf  $2 \times 10^5$  Z/mL verdünnt und weiterkultiviert. Wird erneut eine Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Z/mL erreicht und ist die Vitalität der Kultur  $\geq 70\%$  wird die Kultur in die Spinnerflasche gegeben. Die Startzellzahl sollte bei  $2 \times 10^5$  Z/mL liegen. Es wird so lange im Spinner kultiviert, bis eine ausreichende Menge an Zellen zur Verfügung steht. Die Zellzahl im Spinner sollte  $2 \times 10^6$  Z/mL nicht überschreiten. Zum Animpfen des Fermenters werden etwa  $1,8 \times 10^5$  Z/mL benötigt. Bei einem Kulturvolumen von 1000 mL werden also  $1,8 \times 10^8$  Zellen benötigt, das entspricht 120 mL einer Spinnerkultur mit  $1,5 \times 10^6$  Z/mL. Die Vitalität der Zellen sollte  $\geq 80\%$  sein.

### e) Korrekturmittel

Säure: CO<sub>2</sub>

#### f) Fermentationsbedingungen

Arbeitsvolumen:	1000 mL
Rührerdrehzahl:	150 rpm
pO <sub>2</sub> :	60%; geregelt
pH-Wert:	7,1; geregelt
Temperatur:	37°C
Startzellzahl:	$1,8 \times 10^5$ Z/mL
Fermentationszeit:	100 h

#### g) Steriltest

- Sterile Anbindung der Abfallflasche über Sterilkupplungen
- Abpumpen des Wassers aus dem Gefäß in die Abfallflasche
- Sterile Anbindung der Medienflasche
- 1000 mL Medium in den Fermenter pumpen
- Gefäß auf 37°C temperieren, mit Luft begasen
- Nach 48h Sterilität des Mediums überprüfen, wenn steril kann fortgefahren werden
- pO<sub>2</sub> Elektrode kalibrieren (2-Punktkalibrierung)
- Medium aus dem Fermenter in die Abfallflasche pumpen
- 880 mL (bei 120 mL Vorkultur) frisches Medium einfüllen

#### h) Inokulation

- Temperaturregelung, pO<sub>2</sub>- und pH-Regelung werden eingeschaltet, warten bis alle Sollwerte erreicht und stabil sind
- Spinnerflasche über Sterilkupplungen steril an den Fermenter anschließen
- Kultur in den Fermenter pumpen
- Erste Probe nehmen und die Startwerte (Glutamin, Glucose, Zellzahl...) bestimmen.

### 3. Probenahme und Analytik

Es werden täglich ein bis zwei Proben genommen und Zellzahl, Vitalität, Glucose- und Glutaminkonzentration sowie die Osmolalität analysiert.

#### Bestellung der Zellzahl und Vitalität

100 µl der Zellsuspension wird mit 100 µl der Erythrosin-B-Lösung in ein Eppendorfgefäß gegeben. Die Suspension wird falls nötig mit PBS verdünnt. Der Verdünnungsfaktor sollte so gewählt werden, dass man etwa 50–150 Zellen in einem Großquadrat (Neubauerkammer) erreicht. Rot gefärbte Zellen sind tot, nicht gefärbte Zellen sind lebend.

Erythrosin B Lösung:

Erythrosin B (Sigma E9259)	2,00 g
NaCl	4,05 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,30 g

Komponenten in ca. 400 mL Wasser lösen, unter rühren erhitzen bis alle Substanzen vollständig gelöst sind. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur den pH-Wert mit 1M NaOH auf pH 7.2–7.3 einstellen und mit Reinstwasser auf 500 mL auffüllen. Lösung vor Gebrauch 1:10 mit PBS verdünnen (Lagerung bei 2–8°C, ca. 12 Monate haltbar).

cells (viable) =

$$\frac{\text{viable cells in big squares}}{\text{number of squares}} \times 10^4 \times \text{dilution (cells/mL)}$$

Viability (%) =

$$\frac{\text{number of cells (viable)}}{\text{number of cells (dead and viable)}} \times 100$$

#### Messung von Glucose, Glutamin & Osmolalität

2 mL der Probe werden bei 15.000 × g für 4 min. zentrifugiert und aus dem Überstand die Konzentration an Glucose und Glutamin sowie die Osmolalität bestimmt.

Hierfür können folgende Analysatoren nach Herstellerprotokoll eingesetzt werden:

- YSI 2700 für Glutamat | Glutamin
- Eppendorf Ebio für Glucose
- Gonotec Osmomat 030 für Osmolalität

Alternativ können auch Tests-Kit (z.B. Roche Diagnostics) für die Bestimmung der Glucose- und Glutaminkonzentration verwendet werden. Der restliche Überstand wird bei -20°C eingefroren und für die spätere, gesammelte Bestimmung der Antikörperkonzentration eingesetzt.

#### Bestimmung der Antikörperkonzentration

Zur Bestimmung der Antikörperkonzentration wird ein Sandwich-ELISA (Standard Methode zur Bestimmung von AK-Konzentrationen) verwendet.

Fänger-AK:	Anti-Mouse IgG (Sigma M8642)
Blockierungsreagenz:	BSA (Sigma A9647)
Detektions-AB:	Anti-Mouse IgG Alkaline Phosphatase Konjugat (Sigma A5153)
Substrat:	p-Nitrophenylphosphat Sigma N-2765)
Standard:	IgG (Sigma M5284) (Standardkonzentration von 0,02 mg/mL– 3 µg/mL)

(Eine ausführliche Anleitung für den ELISA kann bei Bedarf beim Autor angefordert werden [schnitzler@fh-aachen.de](mailto:schnitzler@fh-aachen.de)).

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](http://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.: SBT1008-d09061

Order No.: 85034-538-42

Ver. 06 | 2009