

Minna Lempinen

NISÄKÄSSOLUJEN KASVATUS BIOREAKTORISSA

NISÄKÄSSOLUJEN KASVATUS BIOREAKTORISSA

Minna Lempinen
Opinnäytetyö
Kevät 2016
Energiatekniikan koulutusohjelma
Oulun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun ammattikorkeakoulu
Energiatekniikan koulutusohjelma, laboratorio- ja ympäristöala

Tekijä: Minna Lempinen
Opinnäytetyön nimi: Nisäkässolujen kasvatusta bioreaktorissa
Työn ohjaaja: Eija Hakala
Työn valmistumislukukausi ja – vuosi: Kevät 2016
Sivumäärä: 54 + 3 liitettä

Työ tehtiin Oulun yliopistolle Biokemian ja molekyyliäätieteen tiedekunnalle. Opinnäytetyön aiheena oli nisäkässolujen kasvatusta bioreaktorissa. Työn tavoitteena oli ottaa käyttöön eläinsolujen kasvatukseen tarkoitettu bioreaktori. Työhön kuului CHO-solujen ja HeLa-solujen ylläpito ja jakaminen sekä parametrien määrittäminen nisäkässolukasvatuksille bioreaktorissa.

Työ aloitettiin tutustumalla bioreaktorin toimintaan. Bioreaktorille tehtiin testiajot ennen solukasvatusten aloittamista. Olennainen osa työtä oli myös eläinsolujen käsittelyn oppiminen, soluviljely ja eläinsolujen ylläpito. Työssä tehtiin yksi bioreaktorikasvatusta CHO-soluille ja yksi kasvatusta HeLa-soluille.

CHO-solujen kasvatusta bioreaktorilla ei tässä työssä onnistunut. Onnistuneita tuloksia ei saatu muun muassa kontaminoitumisen vuoksi. HeLa-soluille tehtiin 10 vuorokauden kasvatusta, jonka aikana osa soluista kerättiin pois bioreaktorista ja säilöttiin. Kasvatusta HeLa-soluilla lähti hyvin käyntiin, mutta loppujen lopuksi prosessi jouduttiin pysäyttämään hiivasolukontaminaation vuoksi.

Asiasanat: bioreaktori, CHO-solu, HeLa-solu, nisäkässolu, soluviljely

ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences
Degree Programme in Energy Technology (BSc), option of laboratory and environment

Author: Minna Lempinen
Title of thesis: Cultivation of Mammalian Cells in Bioreactor
Supervisor: Eija Hakala
Term and year when the thesis was submitted: Spring 2016
Pages: 54 + 3 appendices

Subject of this thesis was cultivation of mammalian cells in bioreactor. The aim of the thesis was commissioning of the bioreactor, which was intended for high density animal cell culturing. Part of this thesis was maintenance and propagation of CHO- and HeLa-cells. Determination of parameters for mammalian cell cultivation in bioreactor was also an important part of the job.

Working part was started by familiarizing with operation of the bioreactor. Before starting bioreactor culture with cells, test drives were done. Essential part of this thesis was to learn to handle mammalian cells, their propagation and maintenance as well as to determine how dense cell cultures can be obtained by using the bioreactor. In this thesis one bioreactor culture for CHO-cells and one for HeLa-cells were completed.

In this thesis bioreactor culture with CHO-cells did not succeed. The main reason for this was contamination. Culturing of with HeLa-cells succeeded better. During HeLa-cell cultivation, a portion of HeLa-cells were harvested and frozen. Bioreactor culturing with HeLa-cells started very well, but at the end of 10 day growth period, culture was terminated because of yeast contamination and overgrowth.

Keywords: bioreactor, cell culture, CHO-cell, HeLa-cell, mammalian cell,

ALKULAUSE

Työ tehtiin Oulun yliopistolle Biokemian ja molekyyli lääketieteen tiedekunnalle. Oulun yliopistolla työn ohjaajana toimi Tuomo Glumoff. Myös Sakari Kellokumpu Oulun yliopistolta oli tiiviisti mukana opinnäytetyössä. Oulun ammattikorkeakoululta ohjaavana opettajana toimi Eija Hakala.

Kiitos tästä mahdollisuudesta opinnäytetyön valvojalle Tuomo Glumoffille. Kiitos Sakari Kellokummulle avusta opinnäytetyön aikana. Kiitos soluviljelyyn perehdyttämisestä ja kaikesta saamastani avusta myös muulle työryhmälle, johon kuuluivat Deborah Harrus, Antti Hassinen, Fawzi Khoder Agha, Elham Khosrowabadi ja Imran Qadir. Lisäksi kiitokset Johanna Veijolalle perehdyttämisestä bioreaktorin käyttöön sekä Jussi Tuusalle ja Helmut Pospiechille ohjeista HeLa-solujen suspensiokasvatukseen. Yleisesti haluan kiittää koko Oulun yliopiston Biokemian ja molekyyli lääketieteen tiedekunnan henkilökuntaa kaikesta saamastani avusta opinnäytetyön aikana.

Opinnäytetyön aikana olen oppinut paljon ja saanut ammatillista varmuutta. Opinnäytetyöprosessi on antanut paljon. Uuden oppiminen on myös vaatinut paljon aikaa ja voimavaroja. Ilman perheeni ja lähimmäisteni tukea prosessi olisi ollut moninkertaisesti haastavampaa. Erityisesti kiitos puolisololleni korvaamattomasta tuesta ja kannustuksesta kuluneen kevään aikana.

Oulussa 10.5.2016

Minna Lempinen

SISÄLLYS

TIIVISTELMÄ	3
ABSTRACT	4
ALKULAUSE	5
SISÄLLYS	6
SANASTO	8
1 JOHDANTO	11
2 BIOREAKTORI	12
2.1 Ilmastusmoduuli	14
2.2 Peristalttiset pumput	14
2.3 Sekoittaja	14
2.4 Lämpötilan säätö	16
2.5 pH-sensori	17
2.6 Happisensori	18
2.7 UniVessel [®] -kasvatussäiliö	18
2.8 Poistoilmanjäähdytin	19
3 BIOREAKTORIN TESTIAJOT	21
3.1 pH-sensorin kalibrointi	22
3.2 Happisensorin kalibrointi	22
3.3 pH-säädön testaus	23
3.4 Säiliön autoklavointi	24
4 SOLUVILJELY	27
4.1 Liuosten valmistus soluviljelyyn	27
4.2 Solujen ylläpito ja jakaminen	28
5 BIOREAKTORIKASVATUS CHO-SOLUILLA	30
5.1 Ensimmäinen kasvatus	30
5.1.1 Solujen esivalmistelu ensimmäiseen kasvatukseen	33
5.1.2 CHO-solujen lisäys ja kasvatus bioreaktorissa	34
5.1.3 Ensimmäisen kasvatuksen lopetus	37
5.2 CHO-solujen kasvatus suspensiossa	38
6 BIOREAKTORIKASVATUS HELA-SOLUILLA	41
6.1 Suspensiokasvatus	41

6.2 Bioreaktorin valmistelu ja HeLa-solujen siirto bioreaktoriin	44
6.3 HeLa-solujen bioreaktorikasvatus	46
7 POHDINTAA TYÖN AIKANA KOHDATUISTA HAASTEISTA	48
8 YHTEENVETO	52
LÄHTEET	54
LIITTEET	55

Liite 1 CHO-solujen bioreaktorikasvatuksen trendikuvaajat pH-arvolle, happiarvolle, lämpötilalle ja sekoitukselle

Liite 2 Ohjeita Hela-solujen suspensiokasvatukseen

Liite 3 HeLa-solujen bioreaktorikasvatuksen trendikuvaajat pH-arvolle, lämpötilalle ja sekoitukselle

SANASTO

Air Overlay	Bioreaktorin ilmavirtaus, joka menee säiliön sisälle ilmatilaan. Mahdollisuus asettaa arvo prosentteina 0–100 %.
Air Sparger	Bioreaktorin ilmavirtaus, joka menee säiliön nestepinnan alapuolelle. Voidaan asettaa arvo 0–300 ccm.
Autoklavointi	Autoklavointi eli lämminsterilointi tarkoittaa korkeassa lämpötilassa ylipaineessa tapahtuvaa sterilointia. Autoklavoinnalla voidaan steriloida materiaaleja ja liuoksia, jotka kestävät korkeita lämpötiloja ja vesihöyryä. Autoklavointiin käytettävää laitetta kutsutaan autoklaaviksi. Useat soluviljelyssä tarvittavat välineet, kuten pipetinkärjet, steriloidaan autoklavoinnalla.
CHO-solut	Chinese hamster ovary cells, hamsterin munasarjasoluista peräisin oleva solulinja.
DMEM	Peruselatusaineliuos soluille. Liuos sisältää solun kasvuun tarvittavia suoloja, aminohappoja, glukoosia ja vitamiineja. DMEM-liuoksia on saatavilla eri koostumuksilla eri tarkoituksiin. DMEM tulee sanoista Dulbecco's modified Eagle's medium.
Fetal Bovine Serum (FBS)	Naudan sikiöstä peräisin oleva seerumi, joka sisältää paljon soluille hyödyllisiä kasvutekijöitä. Seerumi sisältää proteiinien osia, jotka edesauttavat solujen kasvua. Käytetään soluviljelyssä solujen kasvun edistämiseksi. Markkinoilla seerumia on saatavilla useilta eri valmistajilta.

HeLa-solut	Henrietta Lacksin kohdunkaulansyövästä peräisin olevia soluja, joista käytetään nimitystä HeLa-solut. Soluja on käytetty laboratoriotutkimuksiin maailmanlaajuisesti.
Kontaminoituminen	Kontaminoitumisella eläinsoluviljelyssä tarkoitetaan bakteerien, homeiden ja hiivojen ilmaantumista haluttuun solukasvustoon. Kontaminaatio on aina haitallinen ja solukasvusto on lopetettava.
Medium	Solujen kasvatusliuos, joka sisältää solujen kasvun kannalta tärkeitä ravintoaineita. Medium valmistetaan aina käyttökohteen mukaisesti. Tässä työssä medium tehtiin lisäämällä DMEM-liuokseen Fetal Bovine -seerumia ja penisilliini-streptomysiiniä. Voidaan käyttää myös nimityksiä kasvatusmedium, kasvatusliuos tai ravinneliuos.
PBS-liuos	Soluviljelyssä käytetty fosfaattiperustainen suolaliuos. Liuos on isotoninen ja myrkytön useimmille soluille. Voidaan käyttää solujen pesuun tai soluille käytettävien liuosten laimennukseen. Markkinoilla PBS-liuosta on saatavilla eri valmistajilta.
Penicillin-Streptomycin	Kaupallinen antibioottiliuos, joka sisältää penisilliini- ja streptomysiini-antibiootteja. Käytetään paljon soluviljelyssä suojaamaan soluja ei-toivotuilta bakteereilta. Penisilliini-streptomysiini tehoaa gram-positiivisia ja gram-negatiivisia bakteereja vastaan, mutta ei estä hiivojen tai homeiden kasvua.
Resuspensointi	Liuoksen sekoittaminen pipetillä niin, että liuosta nostetaan varovasti pipettiin ja lasketaan alas. Esimerkiksi sentrifugiputkessa oleva solupelletti resuspensoidaan mediumiin pipetoimalla mediumia edestakaisin pipetillä

	hellävaraisesti muutaman kerran. Näin pohjalla oleva solupelletti hajoaa ja solut sekoittuvat mediumiin.
rpm	Pyörimisnopeus, kierrosta minuutissa.
Suspensiokasvatus	Solujen kasvatus ilman tarttumispintaa nesteessä eli suspensiossa. Yleensä solut tarvitsevat tarttumispinnan jakautuakseen, mutta esim. syöpäsolut jakautuvat ilman kiinnittymistä.
Trypsiini-EDTA	Trypsiini-EDTA-liuosta käytetään solujen irrottamiseen kasvualustalta. Trypsiini toimii irrottaen sidoksia joilla solut ovat kiinnittyneet alustaan. Jotkin proteiinit, joiden avulla solut ovat kiinnittyneet alustaansa, tarvitsevat toimiakseen kalsiumia. Nämä proteiinit saadaan irrotettua käyttämällä kalsiumia kelatoivaa EDTA:ta irrotukseen. Trypsiini-EDTA käsittelyn on oltava nopea, sillä liian pitkä vaikutusaika voi tappaa solut. Trypsiini-EDTA:n vaikutus voidaan pysäyttää lisäämällä soluille Fetal Bovine -seerumia sisältävää mediumia.

1 JOHDANTO

Tämä opinnäytetyö tehdään Oulun yliopistolle biokemian ja molekyyli lääketieteen tiedekunnalle. Työ tehdään tutkimusryhmälle, joka tutkii glykosylaation molekyyli mekanisme ja glykosylaation yhteyttä ihmisten sairauksiin, muun muassa syöpään. Tiedekunnan käyttöön tarkoitettu bioreaktori on ostettu vuonna 2014. Bioreaktori on ollut käyttämättömänä, ja tämän opinnäytetyön tavoitteena on ottaa bioreaktori käyttöön ja tehdä sillä nisäkässolukasvatuksia. Bioreaktori kasvatuksilla nisäkässoluja voidaan tuottaa riittävän isoja määriä proteiinien puhdistamista varten.

Työssä määritetään parametreja nisäkässolukasvatuksiin bioreaktorilla. Bioreaktori kasvatuksissa käytetään hamsterin solulinjasta peräisin olevia CHO-soluja ja ihmisen kohdunkaulasyövästä peräisin olevia HeLa-soluja. Bioreaktorilla kasvatettuja soluja käytetään työryhmän tutkimuksissa. Bioreaktori kasvatuksilla on mahdollista kasvattaa suurempia määriä soluja kuin solujen kasvatuksessa maljalla. Nisäkässolut ovat kuitenkin vaativia kasvattaa ilman tarttumispintaa ja nisäkässolukasvatuksia bioreaktorissa on tiettävästi tehty melko vähän. Solut ovat hyvin herkkiä kontaminaatiolle, mikä lisää työn haastavuutta. Työskennellessä syöpäsolujen kanssa on myös kiinnitettävä erityistä huomiota työturvallisuuteen.

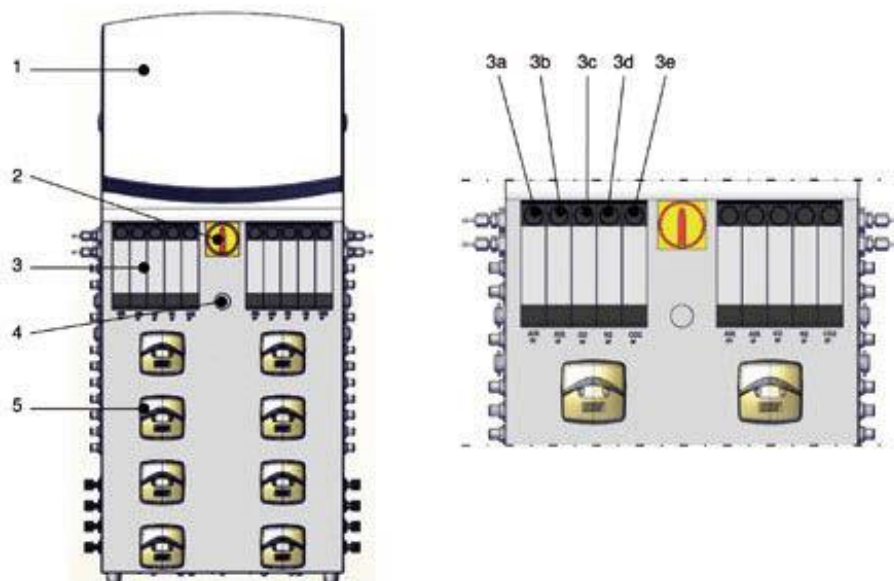
Työn valvojana Oulun yliopistolla toimii Tuomo Glumoff. Ohjaavana opettajana Oulun ammattikorkeakoulusta toimii Eija Hakala.

2 BIOREAKTORI

Työssä käytettiin Biotech Sartorius Stedim BIOSTAT[®] B CC Single -bioreaktoria, johon kuuluu UniVessel[®] -säiliö. Säiliön työskentelytilavuus on 1 litra. BIOSTAT[®] B CC -bioreaktori on suunniteltu mikro-organismien ja eläinsolujen viljelyyn. Laite koostuu ohjausyksiköstä, neljästä peristalttisesta pumpusta, lämpötilan kontrollointimoduuleista, ilmastusmoduuleista, UniVessel[®] -säiliöstä ja kolmilapaisesta sekoittajasta johon kuuluu irrotettava moottori. Bioreaktorin mittaus- ja ohjausjärjestelmän avulla voidaan kontrolloida, mitata ja seurata kasvatuksen eri parametreja, kuten lämpötilaa, pH- ja pO₂-arvoja. Kuvassa 1 on bioreaktorin ohjausyksikkö. Ohjausyksikön osat on numeroitu kuvassa 2. Osat on nimetty taulukkoon 1. (1, s. 25–36.)



KUVA 1 Bioreaktorin ohjausyksikkö (1, s. 26)



KUVA 2 Bioreaktorin ohjausyksikön osat numeroituna (1, s. 27)

TAULUKKO 1 Kuvassa 2 numeroidut bioreaktorin ohjausyksikön osat nimettynä

Osan numero kuvassa 2	Osan nimi
1	Operaattorin näyttö (kosketusnäyttö)
2	Pääkytkin
3	Virtaussäädin (rotametri)
3a	Air "Overlay"
3b	Air "Sparger"
3c	O2 "Sparger"
3d	N2 "Sparger"
3e	CO2 "Sparger"
4	USB-liitäntä
5	Peristalttinen pumppu

2.1 Ilmastusmoduuli

Bioreaktorin ilmastusmoduuleja käytetään kaasujen lisäämiseen säiliöön. Ilmastusmoduuleissa on paikka ilmansyötölle, typpi- ja happikaasujen syötölle ja hiilidioksidin syötölle. Kaikki kaasut lisätään reaktoriin kasvatusliuokseen ”Sparger”-linjaston kautta. Ilmaa on lisäksi mahdollista lisätä myös säiliön sisälle ilmaan ”Overlay”-linjaston kautta. Kaasujen virtausnopeutta voidaan säätää vaihteleavan alueen virtausmittarilla tai massavirtaussäätäjällä. (1, s. 30.)

2.2 Peristalttiset pumput

Bioreaktorin ohjausyksikön etuosassa on neljä peristalttista pumppua, joiden avulla on mahdollista lisätä esimerkiksi happo- ja emäsluosta, ravinteita ja vaahdonestoainetta säiliön sisälle. Liuosten syöttö tapahtuu silikoniletkujen avulla. Syötön voi kytkeä päälle ohjausyksiköstä, jolloin myös virtausnopeudelle asetetaan arvo yksikössä ml/min. Ohjausyksikön avulla voidaan sitoa esimerkiksi vaahdonestoaineen syöttö vaahtosensoriin. Tällöin laite lisää automaattisesti vaahdonestoainetta, mikäli säiliössä on liikaa vaahtoa. Samoin happo- ja emäsluoksien sekä hiilidioksidin syöttö voidaan sitoa pH-arvoon. (1, s. 33.)

2.3 Sekoittaja

Bioreaktorin säiliön sisällä on kolmilapainen sekoittaja. Kuvassa 3 on säiliön kansi irrotettuna säiliöstä. Kuvassa näkyy kanteen kiinnitettynä kolmilapainen sekoittaja, kaasunajoputki ja lämpötila-anturin tasku. Sekoittajaan kiinnitetään erillinen moottori säiliön ulkopuolelta.



KUVA 3 Kolmilapainen sekoittaja, lämpötilamittarin tasku ja kaasunajoputki

Kuvassa 4 on sekoittajan moottori ja kuvassa 5 sekoittajan moottoria ollaan kiinnittämässä säiliön kanteen. Moottorin teho on 200 W ja suurin mahdollinen sekoitusnopeus on 2000 kierrosta minuutissa. Sekoittajan moottori on kytketty ohjausyksikköön ja sekoittajaa ohjataan ohjausyksikön avulla. (1, s. 36.)



KUVA 4 Sekoittajan moottori (1, s. 36)



KUVA 5 Sekoittajan moottorin kiinnitys (1, s. 57)

2.4 Lämpötilan säätö

Laitteeseen on kytketty vesikierto, jonka avulla säädellään lämpötilaa. Vesikiertoa varten kudsvahvisteiset silikoniletkut on kytketty ohjausyksikköön, jonka

sisässä on vastukset veden lämmittämistä varten. Säiliötä ympäröi vaippa, jonka sisällä kulkee lämminvesikierto. Säiliön kannessa poistoilmanjäähdyttimeen on kytketty jäähdytysvesikierto. Lämpötilan mittaamiseen käytetään laitteeseen kuuluvaa lämpötila-anturia. Lämpötila-anturia varten säiliössä on erillinen tasku, johon lämpötila-anturi asennetaan säiliön steriloinnin jälkeen. Lämpötila-anturi ei ole suoraan kosketuksissa kasvatusliuoksen kanssa eikä sitä tarvitse steriloida.

Pienin mahdollinen lämpötila säiliön sisällä on 8 °C. Jos reaktorilla halutaan tehdä prosesseja tätä alhaisimmissa lämpötiloissa, on bioreaktoriin kytkettävä ulkoinen jäähdytysjärjestelmä.

2.5 pH-sensori

Tässä työssä bioreaktorissa käytettiin Hamiltonin process-pH EASYFEM PLUS VP160 -pH-sensoria. Sensoria säilytettiin pakkauksen mukana tullessa säilytysliuoksessa tai KCl-liuoksessa, jonka konsentraatio on 3 mol/l. pH-sensorin kuivumista on vältettävä. Mikäli sensori kuitenkin pääsee kuivumaan, voidaan se regeneroida upottamalla 10 minuutiksi NaOH-liuokseen, sitten 10 minuutiksi HCl-liuokseen ja lopuksi vähintään 15 minuutiksi säilytysliuokseen. Regeneroitiiin käytetään NaOH- ja HCl-liuoksia, joiden konsentraatiot ovat 0,1–1 mol/l. (2.)

pH-sensorin kalibrointiin käytettiin kaupallisia pH-kalibrointiliuoksia. ”Zero Value” kalibroitiin käyttämällä pH 7 -kalibrointiliuosta, jolle jännitteen suositusarvo on -30–30 mV. ”Slope Value” kalibroitiin käyttämällä pH 4 -kalibrointiliuosta. Kalibroinnit pH-sensorille suoritettiin ennen säiliön autoklavointia. pH-sensori autoklavoitiin säiliön mukana ja se voidaan autoklavoida noin 30 kertaa. Autoklavoinnin jälkeen pH-mittari yhdistettiin ohjausyksikköön. (1, s. 122.)

Ohjausyksiköstä asetettiin pH:lle tavoitearvo. Jos pH nousee liian korkealle, laite lisää happoliuosta tai vaihtoehtoisesti hiilidioksidia, mikäli happoliuosta ei käytetä. Mikäli pH laskee liian alas, laite lisää emäsluosta, jos emäsluos on käytössä.

Laitteen testiajoissa kokeiltiin happo- ja emäsluosten lisäämistä, mutta kasvatus-ten aikana ei käytetty happo- ja emäsluoksia. Kasvatusten ajan happo ja emäs-

liuoksia ei ollut kytketty laitteeseen ja ne suljettiin ohjausyksiköstä ”Main”-valikosta.

2.6 Happisensori

Bioreaktorissa käytettiin Hamilton OxyFerm™ O₂ FDA VP160 –happisensoria, joka autoklavoitiin säiliön mukana. Sensori kestää noin 30 autoklavointikertaa. Ohjeiden mukaan happisensorin kalibrointiin tulisi käyttää typpi- ja happikaasuja. Tässä työssä bioreaktoriin ei ollut kytketty typpi- ja happilinjastoja. 0-prosenttinen happi mitattiin säiliöstä autoklavoinnin jälkeen jolloin säiliön tila oli mahdollisimman vähähappinen. 100-prosenttinen happi mitattiin säiliön nesteestä, kun sitä oli ilmastettu runsaasti.

2.7 UniVessel®-kasvatussäiliö

Bioreaktorin kasvatussäiliönä käytettiin kuvassa 6 olevaa lasista UniVessel®-kasvatussäiliötä. Säiliön suurin työskentelytilavuus on 1 litra ja pienin työskentelytilavuus on 0,4 litraa. Säiliöön yhdistettäviä osia ovat poistoilmanjäähdytin, lämpötila-anturi, pH-sensori, happisensori, vaahtoanturi, sekoittaja ja sekoittajan moottori sekä silikoniletkuilla yhdistetyt suodattimet meno- ja tuloilmalle. (3, s. 12–15.)

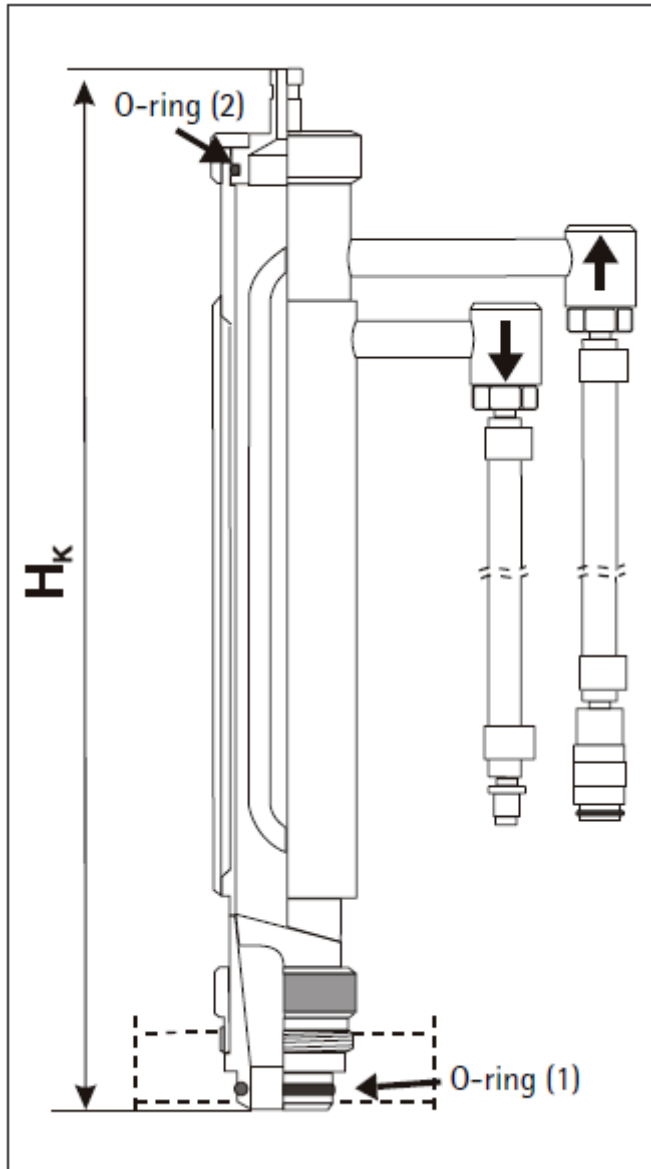


KUVA 6 UniVessel®-kasvatussäiliö (3, s. 1)

Säiliöön voidaan yhdistää 250 millilitran lasipullot happo- ja emäsluoksen tai vaahdonestoaineen syöttöä varten. Pulluille on oma teline, joka kiinnitetään säiliön kylkeen jolloin autoklavointi on helpompaa. Liuosten syöttö tapahtuu silikoniletkujen kautta. Lisäksi säiliöön voitiin asettaa erillinen näytteenotin. (3, s. 12–15.)

2.8 Poistoilmanjäähdytin

Bioreaktorissa jäähdytys tapahtuu vesikierrolla varustetulla poistoilmanjäähdyttimellä, joka on kuvassa 7. Poistoilmanjäähdyttimessä kiertää jäähdytysvesi, jonka reaktori syöttää jäähdyttimeen tasaisella virtausnopeudella. Jäähdytysveden lämpötila riippuu säiliölle asetetusta lämpötila-arvosta. Jäähdytysvesikierto poistoilmanjäähdyttimeen on kytketty kudsvahvisteisilla silikoniletkuilla, jotka on varustettu pikaliittimillä. (3, s. 64–69.)



KUVA 7 Poistoilmanjäähdytin (3, s. 65)

Poistoilman kosteus tiivistyy poistoilmanjäähdyttimen sisäputkeen, jonka ulkopuolella jäähdytysvesi kiertää. Poistoilmanjäähdytin alentaa poistoilman kosteutta, vähentää suodattimen tukkeutumisriskiä ja kosteuden haihtumista. Jos jäähdyttimeen liitetty ulostulosuodatin on tukkeutunut, sisäinen paine voi kasvaa, ja tämä voi aiheuttaa haittaa kasvatukselle tai turvallisuusvaaran. Poistoilmanjäähdytin oli kiinnitetty säiliön kanteen ja se autoklavoiitiin säiliön mukana. (3, s. 64–69.)

3 BIOREAKTORIN TESTIAJOT

Ennen solukasvatuksien aloittamista bioreaktorille tehtiin testiajoja. Testiajoissa ei käytetty soluja ja liuoksena käytettiin steriiliä PBS-puskuriliuosta ja biokarbo-naattipitoista vesiliuosta. Testiajojen aikana opeteltiin bioreaktorin säätöjen asettamista ja sensoreiden kalibrointia.

Bioreaktorihuoneen tasot, kaapistot ja laminaarikaappi puhdistettiin perusteelli-sesti. Laitteen toimintaperiaatteeseen tutustuttiin lukemalla sen ohjekirjoja. Käy-tön aloituksessa oli mukana Oulun yliopiston tutkija Johanna Veijola, joka oli tehnyt bioreaktorikasvatuksia bakteerisoluille. Tässä työssä käytettävä reaktori on tarkoitettu eläinsolukasvatuksille ja se on varustettu hiilidioksidin syötöllä. Nisäkässolukasvatuksia bioreaktorilla ei ollut ennen tehty Oulun yliopistolla.

Säiliön kansi kiinnitettiin paikalleen ja bioreaktori käynnistettiin pääkytkimestä. Sekoittajan moottori kiinnitettiin sekoittajaan. Sekoittajaa testattiin asettamalla sille eri nopeuksia ohjausyksiköstä. pH- ja happisensorit otettiin pakkauksistaan ja yhdistettiin ohjausyksikköön. Koska pH- ja happisensorit on hyvä pitää koko ajan nesteessä, lisättiin bioreaktoriin 500 ml PBS-puskuriliuosta. pH- ja hap-pisensoreille oli omat portit säiliön kannessa, joiden kautta ne asetettiin säiliöön. Vaahtosensori yhdistettiin ohjausyksikköön ja asetettiin paikalleen säiliöön. Lämpötila-anturi kytkettiin ohjausyksikköön ja asetettiin lämpötila-anturille tar-koitettuun taskuun . ”Overlay” ja ”Sparger” -kaasulinjastot yhdistettiin silikonilet-kuilla ohjausyksiköstä säiliöön. Silikoniletkuihin asetettiin suodattimet ja letkun-kiristimet.

Poistoilmanjäähdyttimeen asetettiin suodatin silikoniletkun avulla. Jäähdytti-meen liitettiin jäähdytysvesikierto. Myös säiliön vaipan ympäri kulkeva lämmin-vesikierto yhdistettiin. Vesikierrat liitettiin kudsovahvisteisella letkulla.

Bioreaktorin testauksen aikana sitä ei autoklavoitu, sillä sensoreita ei haluttu kuluttaa turhaan. Ennen jokaista kasvatusta bioreaktorin säiliö steriloitiin auto-klavoimalla. Kasvatusten jälkeen tehtiin jäteautoklaavaus ja sen jälkeen säiliö ja sen osat puhdistettiin. Jotta sensorit eivät kuivuisi, säiliö autoklavoitiin aina niin, että sinne oli lisätty nestettä.

Testauksessa PBS-liuoksella reaktoria pidettiin päällä useiden vuorokausien ajan ja olosuhteita muunneltiin ja tarkkailtiin. Vesikierto käynnistettiin ja testattiin lämpötilaa. Lämpötilaksi asetettiin 37 °C. Kun laite alkoi lämmittää säiliötä, ohjausyksikössä oleva termostaatti lämpeni 50 °C:seen asti. Tarkkailtiin, että säiliön lämpötila ei ylitä 37 °C:ta, sillä ylemmät lämpötilat voivat olla soluille tappavia. Säiliön lämpötila ei kuitenkaan ylittänyt annettua arvoa ja ohjausyksikön sisäinen termostaatti laski nopeasti lämpötilaa heti, kun säiliön tavoitelämpötila lähestyi. Kun säiliön lämpötila oli noussut asetettuun arvoon, lämpötila pysyi tasaisena.

3.1 pH-sensorin kalibrointi

Sensori kalibroitettiin käyttämällä kaupallisia pH 4 ja pH 7 -puskuriliuoksia. Taulukkoon 2 on koottu pH-sensorin kalibroinnin mittaustulokset. Ohjekirjan mukaan suositus ”Zero Value” -arvolle on sensorista riippuen -30 mV – 30 mV (1, s. 118). Kalibroinnissa saadut mittaustulokset pH 7 -puskurille ovat suositusarvojen sisällä.

TAULUKKO 2 pH-mittarin kalibroinnin mittaustulokset

Pvm	”Zero Value”, pH 7 (mV)	”Slope Value” pH 4 (mV)
21.1.2016	4,9	180
21.1.2016	6,2	177,9
22.1.2016	6,2	183,1
22.1.2016	6,5	177

3.2 Happisensorin kalibrointi

Ohjeiden mukaan 0-prosenttinen happi kalibroidaan lisäämällä säiliöön paljon typpeä ja 100-prosenttinen happi kalibroidaan lisäämällä säiliöön happea. Tässä työssä ei käytetty typpi- ja happikaasuja. Happisensorin 0-arvo kalibroitettiin autoklavoinnin jälkeen, jolloin säiliössä olisi mahdollisimman vähähappinen tila.

100-prosenttisen happiarvon kalibrointi tehtiin lisäämällä reaktoriin runsaasti ilmaa ja sekoitusta.

Suosittelava kalibrointi-arvo 0-prosenttiselle hapelle on 0–10 nA. 100-prosenttiselle hapelle suositeltava kalibrointi-arvo oli noin 60 nA. Hapensensorin tuli olla kytkettynä ohjausyksikköön 2 tuntia ennen kalibrointia. (1, s.122–123.)

Bioreaktorin testauksen aikana hapensensori kalibrointia kokeiltiin niin, että 0-prosenttinen happiarvo mitattiin autoklavoidusta vedestä, johon oli lisätty typpi-kaasua 15 minuutin ajan. 100-prosenttinen happi mitattiin autoklavoidusta vedestä, johon oli lisätty paineilmaa 15 minuutin ajan. Tätä kalibrointia varten hapensensori piti irrottaa säiliöstä. Hapensensoria ei voitu kuitenkaan kalibroida tällä tavalla solukasvatuksissa, sillä hapensensoria ei voida irrottaa säiliöstä autoklavoinnin jälkeen kontaminaatoriskin vuoksi.

Taulukkoon 3 on koottu hapensensorin kalibroinnin mittaustulokset. Arvot mitattiin vedestä, jota oli tyytetty ja hapetettu. Saadut arvot eivät ole suositusarvojen puitteissa. Tämä johtunee siitä, että puhtaita typpi- ja happikaasuja ei lisätty tiiviiseen säiliöön ohjeiden mukaan.

TAULUKKO 3 Hapensensorin kalibroinnin mittaustulokset

Pvm	100 % (nA)	0 % (nA)
21.1.2016	49,0	29,2
21.1.2016	46,4	29,0
22.1.2016	45,5	25,5
22.1.2016	45,5	25,5

3.3 pH-säädön testaus

pH-säädön testausta varten happo- ja emäslinjastot kytkettiin säiliöön. Happoliuoksena käytettiin HCl-liuosta jonka konsentraatio oli 0,5 mol/l. Emäsluoksena käytettiin NaOH-liuosta, jonka konsentraatio oli 0,5 mol/l. Happo- ja emäsluos-

ten syöttö tapahtui silikoniletkun avulla peristalttisen pumpun kautta. Ohjausyksiköstä voitiin säätää liuosten virtausnopeutta. Ohjausyksikön kautta pumpput kalibroitiin. Säätöjä testattiin asettamalla eri pH-arvoja, jolloin laite automaattisesti lisäsi säiliöön joko happoa tai emästä tavoitearvojen mukaan.

Kun haponsyöttö kytkettiin pois päältä, laite lisäsi hiilidioksidia alentaakseen pH:ta. PBS-puskuriliuoksella hiilidioksidi ei vaikuttanut pH-arvoon, joten testiliuos vaihdettiin biokarbonaatti-pitoiseen vesiliuokseen, joka oli enemmän solukasvatuksissa käytettävän mediumin kaltainen. Liuos valmistettiin liuottamalla veteen kaliumkloridia, natriumvetykarbonaattia, natriumdivetyfosfaattia ja natriumkloridia. Liuoksessa käytettiin samoja ainemääriä, joita soluviljelyssä käytetty DMEM-liuos sisälsi, ja ne on esitetty taulukossa 4. (4.)

TAULUKKO 4 Bikarbonaattipitoisen vesiliuoksen reagenssien ainemäärät (4)

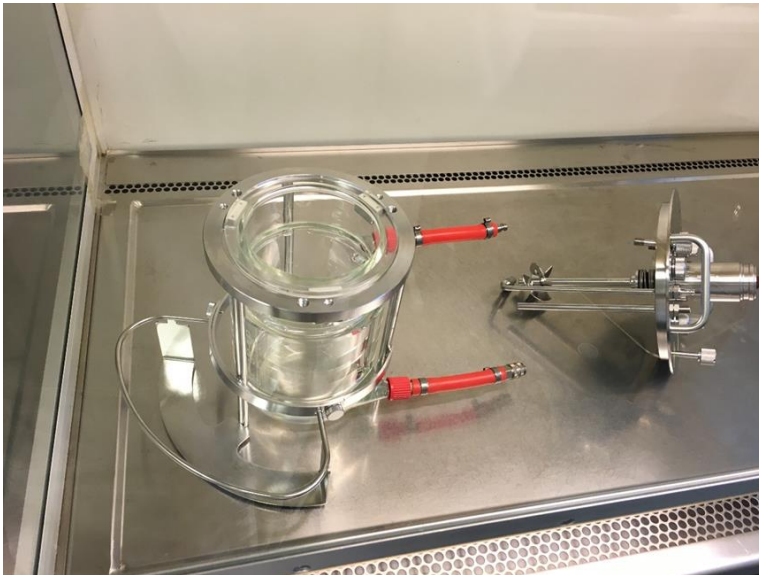
Reagenssin nimi	Ainemäärä mM
Natirumvetykarbonaatti, NaHCO_3	44,05
Natriumdivetyfosfaatti NaH_2PO_4	0,92
Kaliumkloridi, KCl	5,33
Natirumkloridi, NaCl	110,34

pH-arvon alentaminen hiilidioksidilla onnistui, kun käytettiin valmistettua bikarbonaattipitoista liuosta. Hiilidioksidin virtausnopeutena oli tehdasasetuksena 8 l/min. Hiilidioksidin virtausnopeudeksi asetettiin 0,1 l/min. pH-arvon säätöä hiilidioksidin avulla kokeiltiin myös pienemmällä virtausnopeudella, ja se onnistui hyvin.

3.4 Säiliön autoklavointi

Nisäkäkasvatuksille tarvittiin ehdottoman steriilit kasvatusolosuhteet, sillä epäpuhtaudet voivat olla haitaksi soluille ja johtaa kasvatuksen epäonnistumiseen. Sterilointi säiliölle tehtiin autoklavoimalla.

Ennen kasvatusta säiliölle tehtiin puhdasautoklaavaus, jolla varmistettiin puhtaat olosuhteet kasvatukselle. Kasvatuksen jälkeen solujätteet steriloitiin autoklavaimalla, koska työssä käytettiin transformoituja ja syöpäsoluja, jotka luokitellaan biologisiksi vaaratekijöiksi. Myös valmistajan ohjeet velvoittivat jätteiden autoklavointiin. Jäteautoklavoinnin jälkeen säiliö avattiin ja puhdistettiin pesemällä ja harjaamalla. Kuvassa 8 säiliön puhdistus on parhaillaan käynnissä. Puhdistuksen jälkeen säiliö steriloitiin uudelleen autoklavaimalla, jonka jälkeen se oli valmis seuraavalle kasvatukselle. Autoklavointi tehtiin yliopiston välinehuollossa ja sen suoritti välinehuollon henkilöstö. Bioreaktorin käyttäjän tehtävänä oli valmistella säiliö autoklavointia varten. (1, s. 54–55; 3, s. 6–10.)



KUVA 8 Säiliön puhdistusta

Autoklavointia varten säiliö kytkettiin irti ohjausyksiköstä. Ennen säiliön irrottamista tarkistettiin, että vesikierto ja ilman- ja hiilidioksidinsyöttö oli suljettu. Säiliön kannessa olevaan poistoilmanjäähdyttimeen oli kytketty suodatin silikoniletkun avulla. Autoklavoinnin ajaksi poistoilmanjäähdyttimen silikoniletkua ei saanut sulkea. Mikäli letku tai suodatin on tukossa, säiliöön kertyy painetta ja laasisäiliö voi räjähtää. Autoklavoinnin aikana poistoilmanjäähdyttimeen ja siihen liitetty suodatin varmistivat steriilin paineentasauksen säiliössä. Ennen autoklavointia varmistettiin, että poistoilman letku on auki eikä sitä ole suljettu kiristimin. Poistoilman suodattimen tuli olla ehjä, kuiva ja puhdas. Suodatin testattiin ruiskulla

puskemalla ilmaa suodattimen läpi. Mikäli ilma ei kulkenut suodattimen läpi, oli suodatin tukossa ja se piti vaihtaa uuteen. Työn aikana selvisi, että suodattimen kunto kannattaa testata myös autoklavoinnin jälkeen. (1, s. 54–55; 3, s. 6–10.)

Ennen autoklavointia tarkistettiin, että kaasujen syöttöletkujen suodattimet olivat kunnossa. Kaasujen syöttöletkut suljettiin autoklavoinnin ajaksi kiristimillä, millä vältettiin nesteen nouseminen suodattimeen autoklavoinnin aikana.

pH-, happi- ja vaahtosensorin kytkentäjohdot ohjausyksikköön kytkettiin irti. Sensorien päät suojattiin autoklavoinnin ajaksi alumiinifoliolla. Lämpötilamittari irrotettiin säiliöstä ja sen paikka suojattiin foliolla. Poistoilmanjäähdyttimestä irrotettiin jäähdytysvesiletkut. Säiliön sivuilta kytkettiin irti lämmitysvesiletkut. Mikäli happo- ja emäslinjastot olivat käytössä ja ne haluttiin autoklavoida säiliön mukana, niiden kytkennät tarkastettiin. Kaikki osat tarkistettiin ja kiristettiin käsin. Puhdasautoklaavauksessa säiliön kansi peitettiin foliolla. Näin pyrittiin pitämään säiliön kansi mahdollisimman puhtaana autoklavoinnin jälkeenkin.

Säiliössä tuli olla nestettä aina autoklavoinnin aikana. Autoklavointia ei voida tehdä kasvatusmediumin kanssa, koska sen sisältämät kasvutekijät saostuvat jo 50 °C:ssa. Tämän vuoksi autoklavointi tehtiin yleensä lisäämällä säiliöön bioreaktorin testauksessa valmistettua biokarbonaattipitoista liuosta.

Säiliön kuljettaminen ja siirteleminen tehtiin turvallisesti ja varovaisuutta noudattaen. Kuljetuksen ajaksi säiliö siirrettiin sille tarkoitettuun metallikaukaloon ja kuljetukseen käytettiin työkaluvaunuja.

Autoklavoinnin jälkeen tarkistettiin, että säiliön osat olivat ehjiä ja etteivät kiristykset olleet löystyneet. Kaasujen syöttöletkujen kiristykset löysättiin. Säiliö ja sen osat yhdistettiin ohjausyksikköön ja liitokset kytkettiin takaisin paikoilleen.

4 SOLUVILJELY

Solujen kasvattamista laboratorio-olosuhteissa kutsutaan soluviljelyksi. Tällöin solujen kasvuympäristön pH, ravinteet ja lämpötila on säädelty. (5.)

Soluja on mahdollista kasvattaa kiinteällä alustalla ja suspensiossa. Suspensiossa soluilla ei ole kasvualustaa vaan ne kasvavat kasvatusliuoksessa. Suspensiokasvatuksissa saadaan suurempia solumääriä kuin kasvatuksissa solumaljoilla. Eläinsolulinjojen suspensiokasvatuksessa on omat haasteensa, sillä monet eläinsolulinjat eivät kykene kasvamaan ilman kiinnitysalustaa. Lisäksi eläinsolut, erityisesti nisäkässolut, ovat herkempiä rikkoutumaan ja kasvavat hitaammin kuin esimerkiksi bakteerisolut (5). Nisäkässolut jakautuvat keskimäärin kerran vuorokaudessa.

Tässä työssä soluja kasvatettiin aluksi kiinteällä alustalla soluviljelymaljoissa. Bioreaktorikasvatuksen tavoite oli saada nisäkässolut kasvamaan onnistuneesti suspensiossa bioreaktorissa.

4.1 Liuosten valmistus soluviljelyyn

Kasvatusliuosta eli kasvatusmediumia käytettiin solujen kasvatuksessa. Liuos sisältää ravinteita joita solut tarvitset jakautuakseen. Kasvatusliuos valmistettiin liuottamalla 445 ml DMEM-elatusaineliuokseen 50 ml Fetal Bovine -seerumia ja 5 ml penisilliini-streptomysiiniä. Työssä käytettiin Gibcon DMEM(1x)+GlutamaxTM-elatusaineliuosta, Gibcon Fetal Bovine -seerumia ja Sigma Aldrichin soluviljelyyn tarkoitettua Penisillini-Streptomysiini-seosta. (6.)

PBS-liuosta käytettiin solujen pesemiseen solujen jakamisen yhteydessä. PBS-liuos valmistettiin lisäämällä 270 ml:aan autoklavoitua vettä 30 ml Gibcon 10xPBS-puskuriliuosta. (6.)

Kasvaessaan solumaljoilla solut kiinnittyvät maljan pohjaan. Solujen jakamisen yhteydessä solut piti kuitenkin saada irrotettua maljan pohjalta, jotta ne voitiin siirtää uuteen maljaan ja jakaa useille eri maljoille. Solujen irrottamiseen maljan

pohjalta käytettiin Sigma Aldrichin Trypsiini-EDTA-liuosta, joka laimennettiin PBS-liuoksella. (5; 6.)

4.2 Solujen ylläpito ja jakaminen

CHO-solut ovat peräisin hamsterin solulinjasta, ja niitä käytetään paljon biologisissa ja lääketieteellisissä tutkimuksissa. Koko opinnäytetyön ajan CHO-soluja ylläpidettiin ja jaettiin. Solujen ylläpito tarkoittaa sitä, että solut pidettiin elinvoimaisina, niiden jakautumista seurattiin ja niille annettiin ravinteita riittävän usein. Kun soluviljelymalja kasvoi täyteen, se täytyi jakaa. Solumaljan jakamisväli oli yleensä 2–4 vuorokautta. Mikäli solumaljaa ei jaeta tarpeeksi usein, maljat kasvavat täyteen soluja, jolloin soluilta loppuu elintila ja ravinteet ja ne alkavat kuolla. Solumalja tarkistettiin päivittäin mikroskoopilla, ja kun maljasta noin 80 % oli täynnä soluja, se oli valmis jaettavaksi. (6.)

CHO K1 -soluampulli haettiin nestetyyppisäiliöstä ja sitä lämmitettiin hetki +37 °C:n lämpöisessä vesihauteessa. Soluampulliin lisättiin 2 ml kasvatusmediumia ja se jaettiin kolmelle steriilille soluviljelymaljalle. Työssä käytettiin soluviljelymaljoja, joiden halkaisija oli 9 cm. Maljaa huljutettiin varovasti, jotta solut levittäytyvät koko maljalle. Maljoja tarkasteltiin mikroskoopilla ja havaittiin, että solut olivat levittäytyneet koko maljalle, ja ne siirrettiin kasvatukseen hiilidioksidi-inkubaattoriin. Työssä käytettiin hiilidioksidi-inkubaattoria, jossa lämpötila oli +37 °C ja hiilidioksidipitoisuus 5 %. Solujen annettiin kasvaa maljalla 2–3 vuorokautta.

Seuraavana päivänä solumaljoja tarkasteltiin mikroskoopilla ja havaittiin, että solut olivat alkaneet jakautua onnistuneesti. Soluja kasvoi pienissä rykelmissä ympäri maljaa. Suurin osa soluista oli kiinnittynyt pohjaan, mutta jotkin solut eivät olleet kiinnittyneet vaan kelluivat kasvatusliuoksessa.

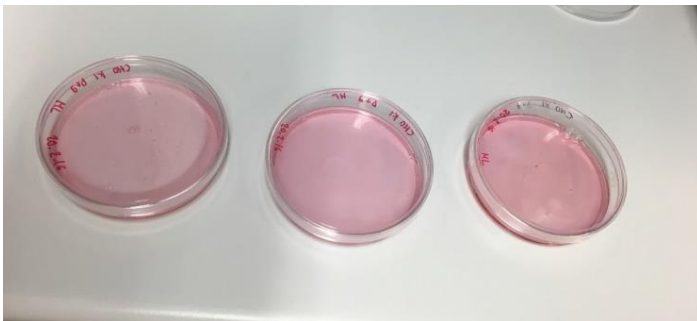
Kasvatusmediumin havaittiin olevan solumaljoissa punaista. Jos kasvatusmedium vaihtaa värinsä keltaiseksi, on maljassa tapahtunut happamoitumista, jolloin malja on voinut kasvaa liian täyteen soluja. Mikäli mediumin väri vaihtuu violetiksi, on se merkki emäksisyydestä ja johtuu useimmiten homekontaminaatiosta tai liian korkeasta hiilidioksidipitoisuudesta inkubaattorissa.

Jotta solut saisivat lisää ravintoaineita, maljoilta poistettiin vanha kasvatusmedium ja uutta mediumia lisättiin 10 ml. Solumaljat siirrettiin takaisin hiilidioksidinkubaattoriin.

Solumaljoja tarkasteltiin päivittäin mikroskoopilla. Kun solut olivat kasvaneet kolme vuorokautta, havaittiin, että maljat olivat kasvaneet melkein täyteen ja ne voitiin jakaa.

Maljoilta poistettiin vanha kasvatusliuos ja solut pestiin kaksi kertaa PBS-liuoksella. Maljoille lisättiin 2 ml Trypsiini-EDTA-liuosta ja maljoja inkuboitiin hiilidioksidinkubaattorissa 5–10 minuuttia. Solut siirrettiin 15 ml:n sentrifugiputkisiin, joihin lisättiin 2 ml kasvatusliuosta. Sentrifugiputkia sentrifugoitiin 4 minuutin ajan. Työssä käytettiin sentrifugia, jolle oli asetettu nopeudeksi 800 rpm ja lämpötilaksi +22 °C. Tyypillinen sentrifugointiaika oli 4 minuuttia. Sentrifugoinnin jälkeen solut olivat painuneet sentrifugiputken pohjalle ja yllä oleva kasvatusliuos pipetoitiin pois varoen. Sentrifugiputkiin lisättiin 2 ml kasvatusmediumia, johon putken pohjassa oleva solunappi resuspensoitiin. (6.)

Soluja sisältävää mediumia pipetoitiin 1 ml steriilille soluviljelymaljalle. Maljoja tehtiin kolme kappaletta ja jokaiseen lisättiin 8 ml kasvatusmediumia. Solumaljat siirrettiin kasvamaan hiilidioksidinkubaattoriin. Maljoja seurattiin päivittäin. Kun solut olivat jakaantuneet tarpeeksi, ne jaettiin jälleen samaan tapaan. Kuvassa 8 on kolme soluviljelymaljaa, joissa on CHO-soluja ja 8 ml mediumia. CHO-solujen lisäksi työssä käytettiin HeLa-soluja, joiden ylläpito ja jakaminen tehtiin kuten edellä kuvattiin.



KUVA 9 CHO-solumaljoja

5 BIOREAKTORIKASVATUS CHO-SOLUILLA

Ensimmäinen bioreaktorikasvatus tehtiin CHO K1-soluilla. Soluja oli kasvatettu maljoilla, joista ne siirrettiin kasvamaan bioreaktoriin suspensioon.

Kasvatuksissa ei käytetty vaahtoamista estäviä aineita, sillä vaahdonestoaineista voi olla nisäkässoluille enemmän haittaa kuin hyötyä. Tämän vuoksi myöskään vaahtoanturia ei kasvatuksissa käytetty. Ensimmäiset kasvatukset haluttiin pitää mahdollisimman yksinkertaisina. Vaahtoanturia ja vaahdonestoaineita voidaan kokeilla myöhemmissä kasvatuksissa, mikäli ensimmäiset kasvatukset saadaan sujumaan hyvin.

5.1 Ensimmäinen kasvatus

Autoklavoinnin jälkeen pH- ja happisensori yhdistettiin ohjausyksikköön. Happisensori kalibroitiin, kun se oli ollut yhdistettynä ohjausyksikköön kaksi tuntia. Happisensorille kalibroitiin arvot 0-prosenttiselle ja 100-prosenttiselle hapelle. 0-prosenttinen happiarvo kalibroitiin säiliön sisällä olevasta liuoksesta autoklavoinnin jälkeen ilman että sekoitus tai ilmavirtaukset olivat päällä. Tällöin oletettiin säiliössä olevan mahdollisimman vähähappinen tila. 100-prosenttinen happiarvo kalibroitiin niin, että ennen mittausta bioreaktorille asetettiin puoleksi tunniksi seuraavat arvot:

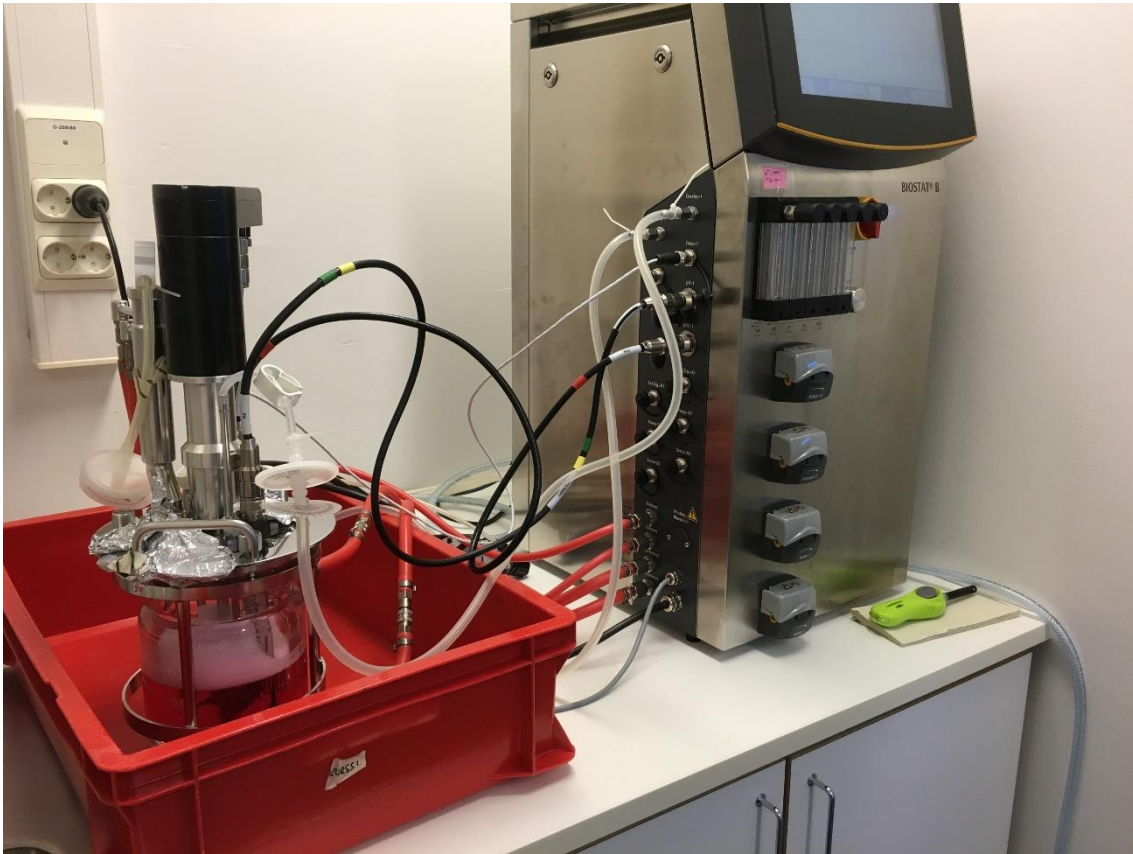
- sekoitus 700 rpm
- Air Overlay 100%
- Air Sparger 225 ccm
- lämpötila +37°C.

Näin saatiin mahdollisimman runsashappinen tila bioreaktoriin. Taulukossa 5 on esitetty happisensorin kalibrointitulokset.

TAULUKKO 5 Happisensorin kalibrointitulokset

Kalibroitu happiarvo	Tulos
0% happi	46,8 nA
100% happi	77,8 nA

Reaktorissa oleva liuos poistettiin pipetoimalla ja sinne lisättiin 500 ml kasvatusliuosta. Ennen solujen lisäämistä säiliöön olosuhteiden tulee olla mahdollisimman hyvät ja otolliset solujen kasvulle. Säiliön lämpötilaksi asetettiin sama lämpötila, jota soluille käytetään koko kasvatuksen ajan eli +37 °C. Kasvatusmediumin annettiin lämmitä kaksi tuntia ennen solujen lisääystä. Air Spargerille asetettiin arvo 225 ccm ja Air Overlaylle 100 % ja sekoitusnopeudeksi asetettiin 500 rpm. Näin olosuhteet saatiin mahdollisimman happipitoisiksi soluja varten. Kuvassa 10 bioreaktori on valmiina solujen lisääystä varten ja mediumin lämmitys ja ilmastus on parhaillaan käynnissä. Juuri ennen solujen lisääystä bioreaktorin ohjausyksiköstä reaktorille asetettiin taulukon 6 mukaiset arvot eri parametreille. Taulukon 6 arvoja käytettiin koko kasvatuksen ajan.



KUVA 10 Mediumin lämmitystä ennen solujen lisäystä

TAULUKKO 6 CHO-solujen kasvatuksessa bioreaktorille asetetut arvot

	Asetettu arvo	Rajat
Sekoitus	100 rpm	20–150 rpm
Air Overlay	50 %	0%–100%
Air Sparger	50 cmm	0-100 ccm
pH	7,3	7,2–7,5
Lämpötila	37°C	36,5°C–37,5°C
Happipitoisuus	95 %	50–100%

Hiilidioksidin lisäys riippui kasvatusliuoksen pH:n arvosta. Kasvatuksessa ei käytetty happo- tai emäsluoksia happamuuden säätöön vaan happamuutta säädettiin hiilidioksidin avulla. Mikäli pH ylitti arvon 7,3, reaktori lisäsi säiliöön hiilidioksidia, jonka avulla pH-arvo aleni.

5.1.1 Solujen esivalmistelu ensimmäiseen kasvatukseen

Kaksi vuorokautta ennen reaktorikasvatuksen aloitusta CHO-solut jaettiin 12 solumaljalle. Ennen kuin sentrifugoidut solut siirrettiin maljoille, niistä otettiin 10 mikrolitran näytteet solutiheyden määrittämistä varten. Solut jaettiin 12 solumaljalle niin, että jokaiselle maljalle lisättiin 0,5 ml mediumia, johon solut olivat resuspensoitu.

Solutiheydet mitattiin jokaiselle maljalle. Tulokset on esitetty taulukossa 7. Keskimäärin yhdellä maljalla oli 3 miljoonaa solua. Elävien solujen prosentti oli jokaisessa näytteessä korkea, yli 90 %.

TAULUKKO 7 Maljojen solutiheydet ennen jakamista

	Solutiheys /ml	Eläviä	Solujen yhteismäärä maljalla
Malja 1	$2,47 \times 10^6$	99 %	$4,94 \times 10^6$
Malja 1	$2,29 \times 10^6$	93 %	$4,58 \times 10^6$
Malja 2	$1,44 \times 10^6$	91 %	$2,88 \times 10^6$
Malja 2	$1,30 \times 10^6$	98 %	$2,6 \times 10^6$
Malja 3	$1,00 \times 10^6$	94 %	$2,00 \times 10^6$
Malja 3	$6,45 \times 10^5$	98 %	$12,9 \times 10^5$
Keskiarvo	$1,52 \times 10^6$	96 %	$3,03 \times 10^6$

5.1.2 CHO-solujen lisäys ja kasvatusta bioreaktorissa

Soluja oli kasvatettu 12 maljalla hiilidioksidikaapissa 2 vuorokautta. Vanha kasvatusliuos poistettiin, solut pestiin kaksi kertaa PBS-liuoksella ja irrotettiin pohjasta Trypsiini-EDTA-liuoksella. Solut siirrettiin sentrifugiputkiin, joihin lisättiin 2 ml kasvatusliuosta. Putkia sentrifugoitiin 4 minuutin ajan, jolloin solut painuivat putken pohjaan solunapiksi. Solujen yllä oleva neste poistettiin varovasti ja putkiin lisättiin 2 ml kasvatusliuosta. Neljä putkea valittiin satunnaisesti ja niistä otettiin 10 mikrolitran näyte solutiheyden määrittämistä varten. Mittaustulokset on esitetty taulukossa 8. Tuloksille laskettiin keskiarvot ja keskihajonta.

Mitatuista solutiheyksistä havaittiin, että suurimmalla osalla maljoista elävien solujen määrä oli hyvä. Pienin prosentti eläville soluille oli 38 %. Tätä lukuun ottamatta muiden maljojen osuus eläville soluille oli 77 – 98 %. Mittaustulosten perusteella yhdellä maljalla olisi keskimäärin 649 000 solua. Bioreaktorikasvatukseen käytettäviä solumaljoja oli 11 kappaletta, jolloin soluja lisättiin reaktoriin noin 7 miljoonaa. Yksi solumalja säästettiin jatkokasvatusta varten.

TAULUKKO 8 Maljoilta mitatut solutiheydet ennen solujen siirtämistä reaktoriin

	Solutiheys / ml	Eläviä	Solujen yhteis- määrä maljalla
Malja1	$3,64 \times 10^5$	77 %	$7,28 \times 10^5$
Malja 1	$2,76 \times 10^5$	83 %	$5,52 \times 10^5$
Malja 2	$1,29 \times 10^5$	82 %	$2,58 \times 10^5$
Malja 2	$1,88 \times 10^5$	38 %	$3,76 \times 10^5$
Malja 3	$4,11 \times 10^5$	97 %	$8,22 \times 10^5$
Malja 3	$4,63 \times 10^5$	95 %	$9,26 \times 10^5$
Malja 4	$5,75 \times 10^5$	95 %	$11,5 \times 10^5$
Malja 4	$5,81 \times 10^5$	98 %	$3,81 \times 10^5$
Keskiarvo	$3,73 \times 10^5$	88 %	$6,49 \times 10^5$

Yhden sentrifugiputken solut jaettiin normaaliin tapaan soluviljelymaljalle. Muiden putkien solut lisättiin bioreaktoriin, jossa kasvatusliuosta oli lämmitetty ja ilmavirtaus oli kytketty päälle kahden tunnin ajaksi.

Tavoitteena oli kasvattaa soluja reaktorissa noin 10 päivää tai siihen asti kunnes solutiheys on tarpeeksi korkea. Kasvatuksesta otettiin näytteitä säännöllisesti ja kasvatukseen lisättiin joka toinen päivä 100 ml kasvatusmediumia, jotta solut saivat säännöllisesti lisää ravintoaineita kasvaakseen.

Näytteenoton ajaksi sekoittaja suljettiin ja säiliössä olevaa mediumia resuspensoitiin pipetillä, jotta solut olisivat mahdollisimman hyvin sekoittuneita. Reaktorista otettiin 10 ml:n näyte, joka sentrifugoitiin. Solut painuivat sentrifugiputken pohjaan, ja päällä oleva liuos pipetoitiin varovasti pois. Putken pohjalla oleva solunappi resuspensoitiin 1 ml:aan mediumia. Tästä otettiin edelleen 10 mikro-

litran näyte solutiheyden määrittämistä varten. Ensimmäisinä päivinä mitatut solutiheydet on koottu taulukkoon 9. Toisena päivänä otetuissa näytteissä elävien solujen prosenttiosuus oli pienentynyt. Solulaskuri näytti välillä jopa elävien solujen prosentiksi 0 %. Kasvatuksesta otettiin uudet näytteet ja näytemäärää päätettiin muuttaa. 1 ml:n näytteen sijasta otettiin 10 ml:n näyte. Elävien solujen prosentit olivat parempia, mutta solutiheyden oletettiin olevan suurempi.

TAULUKKO 9 CHO-bioreaktorikasvatuksesta mitatut solutiheydet

Kasvatus käynnissä, vuorokautta	Näytteen suuruus (ml)	Mittaustulosten keskiarvo, solutiheys / ml	Keskihajonta	Eläviä soluja (%)	Solujen määrä säiliössä
1	1	$1,32 \times 10^5$	$0,1 \times 10^5$	83	$6,6 \times 10^6$
2	1	$0,91 \times 10^5$	$0,4 \times 10^5$	7	$4,6 \times 10^6$
2	10	$1,68 \times 10^5$	$0,4 \times 10^5$	52	$1,0 \times 10^6$

Kolmantena vuorokautena säiliöön lisättiin 100 ml mediumia. Lisäyksen jälkeen kasvatuksesta otettiin näyte. Mitatut solutiheydet on koottu taulukkoon 10. Tulosten perusteella soluja olisi 10 millilitran näytteessä keskimäärin $8,95 \times 10^4$, jolloin niitä olisi 600 millilitran kasvatuksessa noin 5,4 miljoonaa. Soluja odotettiin olevan kasvatuksessa moninkertaisesti enemmän, joten tulos on heikko. Mittaustulosten perusteella ei voida sanoa, että solumäärä olisi lisääntynyt. Koska CHO-solut ovat tottuneet kasvamaan tartuntapinnoilla, voi olla, että reaktorissakin ne ovat painuneet säiliön reunoille tai pohjaan, jolloin niitä ei saada näytteeseen. Kasvaminen ilman tarttumispintaa voi olla soluille shokki, joten saattaa olla, että vie muutaman vuorokauden ennen kuin ne lähtevät kunnolla kasvamaan. Jotta muutos solumäärässä olisi paremmin havaittavissa, päätettiin että seuraava näyte otetaan vasta 5 vuorokauden kuluttua.

TAULUKKO 10 Mitatut solutiheydet mediumin lisäyksen jälkeen

Kasvatus käynnissä, vuorokautta	Näytteen suuruus (ml)	Mittaustulosten keskiarvo, solutiheys / ml	Keskihajonta	Eläviä soluja (%)	Solujen määrä säiliössä
3	10	$8,95 \times 10^4$	4×10^4	58	$5,4 \times 10^6$

5.1.3 Ensimmäisen kasvatuksen lopetus

Kasvatuksen kuudentena päivänä säiliöön lisättiin 200 ml tuoretta mediumia. Kun kasvatus oli ollut käynnissä 8 vuorokautta, havaittiin, että säiliössä oleva medium oli muuttunut sameaksi. Mediumista otettiin näyte ja sitä tutkittiin mikroskoopilla. Kasvatusliuoksen havaittiin kontaminoituneen. Ensimmäinen bioreaktorikasvatus lopetettiin ja kontaminoituneet solut hävitettiin.

Ensimmäisessä bioreaktorikasvatuksessa ei saatu havaintoja siitä, että CHO-solut olisivat lähteneet kasvamaan bioreaktorissa. Tuloksia voi vääristää ongelmat näytteenotossa ja solulaskurin kanssa. Muutaman päivän jälkeen kasvatuksen aloittamisesta näytteenottomäärää piti muuttaa, sillä edustavaa näytettä oli vaikea ottaa 600 millilitran kasvatuksesta. Vaikka säiliössä onkin koko ajan sekoitus päällä, on silti mahdollista, että solut ovat painuneet reaktorin pohjalle tai seinämille, jolloin niistä on vaikea saada näytettä. Loppujen lopuksi kasvatus keskeytettiin bakteerikontaminaation vuoksi.

Voi myös olla, että olosuhteet eivät olleet oikeat CHO-soluille. Saattaa olla, että kasvatuksessa käytettiin herkille nisäkässoluille liian korkeita säätöjä. Sekoittajan nopeus on saattanut olla liian suuri, mikä voi vaurioittaa soluja. Nesteeseen menevä ilma- ja hiilidioksidivirtaus on myös voinut olla liian voimakas ja se on saattanut rikkoa soluja.

Kasvatuksesta otettiin liitteenä 1 oleva tuloste, jossa näkyy trendikuvaaja lämpötilalle, sekoitukselle, happiprosentille ja pH:lle. Liitteessä 1 muuttujille on merkitty oma asteikkonsa jokaiselle parametrille erikseen. Sekoitusnopeudelle on punainen trendiviiva, happiarvolla vaaleansininen, pH-arvolla vihreä ja lämpöti-

lalla tumman sininen trendiviiva. Kuvaajasta nähdään, että lämpötila oli pysynyt kasvatuksen ajan tasaisena. pH oli pysynyt asetetuissa rajoissa (pH 7,3–7,4). Happiprosentti oli kasvatuksen alussa yli 100 %, joten happisensorin 100-prosenttinen arvo jouduttiin kalibroimaan uudestaan kasvatuksen ollessa käynnissä. Tämän jälkeen happiprosentti pysyi noin 90 prosentissa. Sekoitus vaihteli välillä 20–100 rpm. Sekoitukseen vaikutti kaasujen lisäys ja happiarvo, joiden vuoksi sekoitusnopeus vaihteli paljon kasvatuksen aikana.

5.2 CHO-solujen kasvatus suspensiossa

Toista bioreaktorikasvatusta varten CHO-solujen kasvatus päätettiin aloittaa pullokasvatuksella suspensiossa. Kasvatukseen käytettiin 1000 ml:n lasista pulloa. Koska solujen haluttiin kasvavan suspensiossa kiinnittymättä mihinkään tartuntapintaan, soluja sekoitettiin koko ajan magneettisekoittajalla. Kasvatus tehtiin hiilidioksidikaapissa, jossa hiilidioksidipitoisuus oli 5 % ja lämpötila +37 °C.

Kasvatuspullo autoklavoitiin ennen kasvatuksen aloittamista. Sekoittamiseen käytettävä magneettisekoittaja puhdistettiin 70-prosenttisella etanolilla ja magneetti autoklavoitiin. Solujen suspensiokasvatukseen käytettävään pulloon lisättiin 100 ml mediumia. Mediumia oli lämmitetty +37 °C:n lämminvesihauteessa 30 minuuttia.

CHO-soluja oli kasvatettu soluviljelymaljoilla 3 vuorokautta. Vanha kasvatusliuos poistettiin maljoilta ja solut pestiin kaksi kertaa PBS-liuoksella. Maljoille lisättiin 2 ml trypsiini-EDTA-liuosta solujen irrottamiseksi pohjasta. Maljat siirrettiin hiilidioksidi-inkubaattoriin 5–10 minuutiksi. Mikroskoopin avulla tarkistettiin, että solut olivat irronneet pohjasta trypsiini-EDTA:n vaikutuksesta. Pipetin avulla siirrettiin maljoilla olevat solut sentrifugiputkiin ja niihin lisättiin 2 ml kasvatusmediumia. Putkia sentrifugoitiin 4 minuutin ajan. Sentrifugoinnin jälkeen poistettiin varovasti medium sentrifugiputkesta solunapin päältä. Tämän jälkeen lisättiin sentrifugiputkiin 2 ml mediumia, johon solut resuspensoitiin.

Kahdesta sentrifugiputkesta mitattiin solutiheydet. Molemmille mittauksille tehtiin myös rinnakkaiset mittaukset. Mittaustulokset on koottu taulukkoon 11. Ha-

vaittiin, että elävien solujen prosenttiosuus oli hyvä. Mikroskoopilla maljoja tarkasteltaessa huomattiin, että joissain maljoissa kasvoi enemmän soluja kuin toisissa. Solutiheydet voivat vaihdella paljonkin maljojen välillä.

TAULUKKO 11 CHO-solujen solutiheydet ennen suspensiokasvatusta

	Solutiheys millilitrassa	Eläviä (%)
Malja 1	$2,64 \times 10^5$	84 %
Malja 1	$2,70 \times 10^5$	93 %
Malja 2	$5,57 \times 10^5$	93 %
Malja 2	$5,10 \times 10^5$	97 %
Keskiarvo	$4,00 \times 10^5$	92 %

Sentrifugiputkissa olevat 11 maljan solut siirrettiin kasvatuspulloon, johon oli lisätty lämmitettyä mediumia 100 ml. Pullon suu suljettiin alumiinifoliolla löyhästi ja se siirrettiin hiilidioksidikaappiin. Sekoitusnopeudeksi asetettiin 150 rpm. Puolen tunnin kuluttua kasvatuspullosta otettiin näyte ja mitattiin solutiheys. Mittaustulokset on koottu taulukkoon 12. Näytteiden solutiheyksissä mitatut arvot vaihtelivat paljon, samoin elävien solujen prosenttiosuus. Mittaustuloksiin vaikuttaa näytteenottoaikoja. Solut eivät välttämättä ole sekoittuneet tasaisesti kasvatuspullosta. Pullon toiselta reunalta otetussa näytteessä voi solutiheys vaihdella verrattuna toiselta reunalta otettuun näytteeseen. Lisäksi 100 millilitran kasvatuspullosta voi olla vaikeaa saada edustavaa 2 millilitran näytettä. Näytteenottoalustalle näytettä lisätään vain 10 mikrolitraa, joten solujen nappaaminen juuri tuohon 10 mikrolitraan voi olla haastavaa.

TAULUKKO 12 Mittaustulokset CHO-solujen suspensiokasvatuksen aloituspäivänä

Näytemäärä (ml)	Keskimääräinen solutiheys /ml	Näytteiden keskihajonta	Eläviä (%)	Solujen määrä pullossa
2	$9,24 \times 10^4$	$0,5 \times 10^5$	49,5	$4,7 \times 10^6$

Havaittiin, että elävien solujen prosenttiosuus oli laskenut verrattuna maljalta otettuun näytteeseen. Todennäköisesti soluja kuolee pipetoinnin ja sentrifugoinnin aikana, mikä vaikuttaa mittaustuloksiin. Lisäksi magneettisekoitus voi rikkoa soluja. Sekoitusta pienennettiin asettamalla sekoitusnopeudeksi 100 rpm. Solujen annettiin kasvaa suspensiokasvatuksessa 3 vuorokautta. Turhaa näytteenottoa haluttiin välttää kontaminaatoriskin vuoksi.

Kolmen vuorokauden kuluttua kasvatuksen aloittamisesta havaittiin, että medium kasvatuspullossa oli muuttunut jälleen sameaksi. Kasvatuspullosta otettiin muutaman millilitran näyte viljelymaljalle ja tarkasteltiin näytettä mikroskoopilla. Havaittiin, että suspensiokasvatus oli kontaminoitunut. Suspensiokasvatus lopetettiin ja kasvatuksessa käytetty inkubaattori pestiin ja sen osat autoklavoitiin.

Kontaminaatioon vaikuttavat monet asiat, ja on mahdoton tietää, mistä kontaminaatio on loppujen lopuksi tullut. Yksi kontaminaatiotekijä saattoi olla hiilidioksidi-inkubaattorin puhdistus. Vaikka inkubaattori puhdistettiin päällisin puolin ennen kasvatuksen aloittamista, olisi sen autoklavointi ja kokonaisvaltainen puhdistus ennen kasvatuksen aloittamista ollut paikallaan. Lisäksi bioreaktori-huone on yhteydessä tiedekunnan yleiseen laitehuoneeseen, jossa lähes päivittäin käsitellään bakteeri- ja hiivanäytteitä.

6 BIOREAKTORIKASVATUS HELA-SOLUILLA

Koska bioreaktorikasvatusta tai pullokasvatusta CHO-soluilla ei saatu onnistumaan, päätettiin kokeilla kasvatusta HeLa-soluilla. Työssä käytettyä HeLa S3-solukantaa oli kasvatettu aiemminkin suspensiossa. Tämän vuoksi oletettiin, että HeLa S3 -solut kasvaisivat helpommin suspensiossa kuin CHO K1 -solut, jotka olivat tottuneet kasvamaan kiinni tarttumispinnassa.

Yksi työn suurimmista haasteista oli saada herkät nisäkäsolut kasvamaan onnistuneesti suspensiossa. Ennen HeLa-solujen lisäämistä bioreaktoriin aloitettiin suspensiokasvatus kasvatuspullosta hiilidioksidi-inkubaattorissa. Näin saatiin selville, kasvavatko solut lainkaan suspensiossa. Lisäksi bioreaktorin puhdistus, autoklavointi ja mittarien kalibrointi ja asennus oli suuritöinen prosessi. Kasvatuksen aloittaminen suspensiossa pullossa säästi resursseja.

Suspensiokasvatukseen saatiin ohjeita ja neuvoja myös muilta työryhmiltä. Opinnäytetyön liitteessä 2 on Helmut Pospiechilta saadut työohjeet HeLa-solujen suspensiokasvatukseen. Tässä opinnäytetyössä työohjeita käytettiin apuna soveltaen.

6.1 Suspensiokasvatus

Nestetyypisäiliöstä haettiin soluampulli joka sisälsi HeLa S3 -solukantaa. Soluampullissa oli noin 10 miljoonaa solua. Solut oli säilötty nestetyyppeen elokuussa 2001. Soluampullia lämmitettiin varovasti käyttämällä sitä noin minuutin ajan vesihauteessa. Ampullin sisältö resuspensoitiin huoneenlämpöiseen kasvatusmediumiin. Ampullissa olevat solut, jotka olivat sekoittuneet kasvatusmediumiin, lisättiin kasvatuspulloon, johon oli lisätty 250 ml mediumia. Kasvatuspulloon laitettiin steriili magneetti. Pullo suljettiin löyhästi alumiinifoliolla, jotta solut saivat happea. Kasvatuspullo siirrettiin hiilidioksidi-inkubaattoriin, jossa hiilidioksidipitoisuus oli 5 % ja lämpötila +37 °C. Kasvatuspullon alla oli magneettisekoitaja ja sekoitusnopeudeksi asetettiin noin 100 rpm. Kuvassa 11 solut on lisätty kasvatuspulloon ja pullo on asetettu hiilidioksidi-inkubaattoriin.



KUVA 11 HeLa-solujen suspensiokasvatus hiilidioksidi-inkubaattorissa

Kasvatuksen alussa pyrittiin kasvatuksesta ottamaan näyte päivittäin. Aloituspäivänä otettiin näyte, jotta tulosta voitiin vertailla myöhempien päivien näytteeseen. Solut jaettiin kolmantena kasvatuspäivänä. Puolet kasvatuspullon mediumista otettiin pois. Solut sentrifugoitiin sentrifugiputken pohjaan ja säilöttiin. Kasvatuspulloon lisättiin lämmitettyä mediumia saman verran kuin sieltä oli otettu pois. Ennen ensimmäistä jakamista mitattujen solutiheyksien tuloksista lasketut keskiarvot, keskihajonnat ja solujen kokonaismäärä pullossa on koottu taulukkoon 13. Päivää ennen jakamista solujen elävyysprosentti oli parempi kuin aiempina päivinä. Solutiheys kasvoi päivittäin.

TAULUKKO 13 Mitatut solutiheydet HeLa-solujen pullokasvatuksessa

Kasvatus käynnissä, vuorokautta	Näytemäärä (ml)	Mittaustulos, soluja / ml	Näytteiden keskihajonta	Eläviä (%)	Solujen määrä pullossa
0	1	$2,7 \times 10^5$	$0,7 \times 10^5$	47	$6,8 \times 10^5$
1	1	$4,6 \times 10^5$	$0,3 \times 10^5$	40	12×10^6
2	1	$5,8 \times 10^5$	$0,5 \times 10^5$	64	15×10^6

Solujen jakamisen jälkeen otettiin solutiheysnäyte. Elävien solujen prosenttiosuus oli pieni, mutta jakamisella saattoi olla vaikutusta asiaan. Näyte solutiheyden määrittämistä varten otettiin harvemmin, sillä havaittiin, että solut olivat lähteneet jakautumaan ennen ensimmäistä jakamista. Seuraavat jakamiset tehtiin kasvatuksen 6., 7. ja 10. päivä. Elävien solujen prosenttiosuuden havaittiin olevan pieni aina jakamisen jälkeen. Solutiheydet kuitenkin pääsääntöisesti kasvoivat päivittäin. Mittaustuloksille laskettiin keskiarvot, keskihajonnat ja solujen kokonaismäärä pullossa. Solutiheydet on koottu taulukkoihin 14 ja 15.

TAULUKKO 14 HeLa-solujen pullokasvatuksesta mitatut solutiheydet ensimmäisen jakamisen jälkeen

Kasvatus käynnissä, vuorokautta	Näytemäärä (ml)	Mittaustulos, soluja / ml	Näytteiden keskihajonta	Eläviä (%)	Solujen määrä pullossa
4	1	$7,7 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$	25	19×10^6
6	1	$8,9 \times 10^5$	$6,0 \times 10^5$	37	22×10^6

TAULUKKO 15 HeLa-solujen pullokasvatuksesta mitatut solutiheydet toisen jakamisen jälkeen

Kasvatus käynnissä, vuorokautta	Näytemäärä (ml)	Mittaustulos, soluja / ml	Näytteiden keskihajonta	Eläviä (%)	Solujen määrä pullossa
7	1	$2,7 \times 10^5$	$0,3 \times 10^5$	11	$6,7 \times 10^6$
10	1	$5,6 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	43	14×10^6

Suspensiokasvatus pullossa onnistui HeLa-soluilla. Seuraavaksi solut voitiin siirtää bioreaktorikasvatukseen.

6.2 Bioreaktorin valmistelu ja HeLa-solujen siirto bioreaktoriin

Bioreaktorille oli tehty edellisen kasvatuksen jälkeen autoklavoinnit ja puhdistus. Laitteelle tehtiin tarvittavat kytkennät ja muut toimenpiteet kuten CHO-solujen kasvatuksessa. pH- ja happisensorien kalibrointitulokset on koottu taulukkoon 16 ja taulukkoon 17.

TAULUKKO 16 Ennen kasvatusta kalibroitu pH-sensori

Arvo	Käytetty pH puskuri	mV
Zero point	pH 7	-1,3
Slope point	pH 4	173,3

TAULUKKO 17 Happisensorin kalibrointitulokset

Arvo	Tulos (nA)
100% happi	76,2
0% happi	55,5

HeLa-solujen suspensiokasvatus hiilidioksidi-inkubaattorissa onnistui, joten solut voitiin siirtää bioreaktoriin. Bioreaktorin säiliöön oli lisätty kasvatusmediumi kaksi tuntia ennen solujen lisäystä. Solut lisättiin pipetoimalla ne suspensiokasvatuspullosta säiliöön. Kasvatus aloitettiin niin, että säiliössä oli 600 millilitraa kasvatusmediumia soluineen.

HeLa-solujen kasvatuksessa ei pidetty happimittaria aktiivisena. Happimittarille ei asetettu mitään arvoa, eikä happimittaria ollut aktivoitu ohjausyksiköstä. Happimittarin mittaamaa dataa ei tallentunut, mutta happimittari oli kuitenkin paikallaan säiliössä ja sen mittaamaa prosenttiarvoa hapelle voitiin seurata reaaliajassa ohjausyksikön näytöltä. Muille parametreille asetetut arvot HeLa-solujen kasvatukseen on koottu taulukkoon 18.

TAULUKKO 18 HeLa-solujen bioreaktorikasvatuksessa käytetyt säädöt

	Asetettu arvo	Rajat
Sekoitus	75 rpm	20-100 rpm
Ilma, "Overlay"	20 %	0%-100%
Ilma, "Sparger"	5 ccm	0-45ccm
pH	7,3	7,2-7,4
Lämpötila	37°C	36,5°C - 38°C

6.3 HeLa-solujen bioreaktorikasvatus

Kasvatuksen aloituspäivänä otettiin kasvatuksesta 10 millilitran näyte. Mitatuista tuloksista laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja solujen määrä koko kasvatuksessa. Tulokset on koottu taulukkoon 19. Liiallista näytteenottoa kasvatuksen aikana haluttiin välttää, sillä näytteenoton aikana oli aina kontaminaatiovaara. HeLa-soluja oli jo kasvatettu suspensiossa pullossa, joten arvioitiin solujen sopiva jakamisväli.

Ensimmäinen solujen jakaminen tehtiin, kun kasvatus oli ollut käynnissä 4 vuorokautta. Ennen jakamista säiliöstä otettiin kaksi 10 millilitran näytettä solutiheyksien määrittystä varten. Säiliöstä otettiin pois 500 millilitraa solumediumia ja sinne lisättiin saman verran lämmitettyä tuoretta mediumia. Solut sentrifugoitiin sentrifugiputkien pohjaan ja ne pakastettiin.

TAULUKKO 19 HeLa-solujen bioreaktorikasvatuksesta mitattujen solutiheyksien tulokset

Kasvatus käynnissä, vuorokautta	Näytemäärä (ml)	Mittaustulos, soluja / ml	Näytteiden keskihajonta	Eläviä (%)	Solujen määrä säiliössä
0	10	$8,4 \times 10^5$	$0,3 \times 10^6$	14	$5,0 \times 10^6$
4	10	$1,2 \times 10^6$	$0,3 \times 10^6$	13	$7,2 \times 10^6$

Seuraavan kerran solut oli tarkoitus jakaa kasvatuksen 10. päivänä. Näytettä otettaessa huomattiin että säiliössä oleva medium oli samea. Mediumin väri oli hieman oranssi. Näiden syiden vuoksi epäiltiin, että kasvatus oli kontaminoitunut. Kasvatuksesta otettiin kaksi 10 millilitran näytettä joista määritettiin solutiheydet. Taulukossa 20 on näytteiden mittaustuloksista lasketut keskiarvot, keskihajonta ja solujen määrä säiliössä. Solutiheydet olivat kasvaneet huomasti edellisiin mittauksiin verrattuna. Myös elävien solujen määrä oli suuri. Solujen kokoa tarkasteltaessa huomattiin, että elävät solut olivat kooltaan melko pieniä. Näytettä otettiin solumaljalalle ja sitä tarkasteltiin mikroskoopilla. Näytteessä ha-

vaittiin olevan HeLa-solujen lisäksi myös hiivasoluja. Kasvatusliuos oli siten kontaminoitunut. Kasvatus keskeytettiin ja säiliö autoklavoitiin ja puhdistettiin. Kontaminoituneet solut hävitettiin.

TAULUKKO 20 Mitatut solutiheydet, tuloksiin vaikuttaa kontaminaatio

Kasvatus käynnissä, vuorokautta	Näytemäärä (ml)	Mittaustulos, soluja / ml	Näytteiden keskihajonta	Eläviä (%)	Solujen määrä säiliössä
10	10	$1,22 \times 10^8$	$0,1 \times 10^8$	15	$7,3 \times 10^8$

Liitteessä 3 ovat HeLa-solukasvatuksen trendikuvaaja. Kuvaajassa on omat trendiviivat sekoitukselle, lämpötilalle ja pH:lle. Liitteessä 3 reunaan on merkitty asteikot jokaiselle parametrille erikseen. Sekoitukselle on vaalean sininen trendiviiva, pH-arvolle tumman sininen ja lämpötilalle vihreä. Kuvaajasta nähdään, että sekoitus ja lämpötila olivat pysyneet tasaisena koko kasvatuksen ajan. pH-arvo vaihteli tasaisesti 7,2–7,4.

7 POHDINTAA TYÖN AIKANA KOHDATUISTA HAASTEISTA

Bioreaktorikasvatukset sekä CHO-soluilla että HeLa-soluilla lopetettiin kontaminoitumisen vuoksi. Suurin ongelma työssä oli kontaminaatiot, jotka aiheutuivat ilmeisesti hiivasoluista. Kasvatusmediumiin oli lisätty penisilliini-streptomysiiniä antibiootiksi. Antibiootit suojaavat nisäkässoluja joiltain bakteereilta, mutta hiivasoluihin ne eivät tehoa.

Työryhmän käytettävissä oleva työhuone, laboratorio- ja soluviljelytilat sijaitsivat rakennuksen 2. kerroksessa. Bioreaktorihuone sijaitsi 3. kerroksessa. Kerroksien välillä liikkumista oli siis paljon. 3. kerroksessa sijaitsi lisäksi laboratoriotiloja, joissa käsiteltiin hiivasoluja. Näin ollen bioreaktorin käyttäjä tai muut henkilöt voivat tahattomasti vaatteissaan kuljettaa kontaminaatiotekijöitä bioreaktorihuoneeseen. Hiivasolut leviävät erittäin helposti ja kasvavat nopeammin kuin nisäkässolut. Bioreaktorihuoneen lähellä sijaitsevat tilat, joissa hiivasoluja käsitellään, voivat olla syy kasvatuksien kontaminaatioille.

CHO-bioreaktorikasvatuksen jälkeen kiinnitettiin erityistä huomiota suojavaatteisiin. Bioreaktorihuoneessa työskentelyä varten oli oma laboratoriotakki, suoja-käsineet ja -lasit. Samoin soluviljelylaboratoriossa oli omat suojarusteet, jotka oli tarkoitettu käytettäväksi vain soluviljelyssä. Varusteiden ja välineiden kuljettamista kerroksesta toiseen vältettiin.

On mahdotonta sanoa, mistä kontaminaatiot loppujen lopuksi aiheutuivat. Tulevaisuutta ajatellen voisi kuitenkin olla paikallaan harkita bioreaktorin siirtämistä pois hiivasolulaboratorioiden läheisyydestä. Tämän opinnäytetyön päätyttyä bioreaktori päätettiin siirtää tiedekunnan soluviljelytiloihin, joihin on pääsy vain erityisluvalla.

Solutiheydet työssä määritettiin solulaskurilla. Solulaskuriin asetetaan näytteenottoliuskat, jonka molemmissa päissä on näytettä. Solulaskuri laskee automaattisesti solujen määrän ja prosenttiosuuden. Työn aikana huomattiin, että kun solulaskurin tarkennusta säädettiin käsin, saatiin parempia tuloksia solutiheydelle kuin automaattisella tarkennuksella. Välillä solulaskuri ei tunnistanut soluja ollenkaan, ja se näytti elävien solujen määräksi 0 %. Mikroskoopilla näy-

tettä tarkasteltaessa kuitenkin soluja oli havaittavissa. Lisäksi rinnakkaiset näytteet saattoivat poiketa kovastikin toisistaan.

Solulaskurin säätöjä muuttamalla olisi voitu saada paremmat tulokset niin solutiheyksistä kuin prosentiosuuksistakin. Tämä olisi kuitenkin vaatinut solulaskuriin perehtymistä eikä siihen ollut tässä opinnäytetyössä aikaa. Myös näytemäärät vaikuttivat solutiheysiin. Kun 600 millilitran kasvatuksesta otetaan 5 millilitran näyte, ei näyte välttämättä ole kovin edustava. Solutiheys laimeni paljon maljalta suspensioon siirrettäessä ja soluja saattoi olla niin vähän, ettei niitä saatu napattua näytteeseen. Alhainen solumäärä voi olla osasy tulosten vaihteluun eri mittausten välillä. Toinen tekijä, joka voi vaikuttaa haitallisesti määritystuloksiin, oli solulaskuriin asetetut perusasetukset, joita ei ollut optimoitu käytettyjen solujen kokoon perustuen.

Näytteen käsittelyssä soluille aiheutuu paljon mekaanista stressiä. Esimerkiksi pipetointi ja sentrifugointi voi rikkoa soluja ja vaikuttaa elävien solujen osuuteen. Tällöin saatu mittaustulos ei kerro todellista tilannetta bioreaktorissa. Tämän vuoksi elävien solujen prosentiosuutta ei pidetty niin tärkeänä kuin solujen kokonaismäärää. Mittaustuloksia kannattaakin tarkastella kriittisesti, ja työn aikana niihin suhtauduttiin lähinnä suuntaa antavina.

Vastaisuudessa näytteenoton ja solutiheyden määrittämistä voitaisiin kehittää ja parantaa. Paras tapa löytyy vain kokeilemalla. Bioreaktoriin on saatavana näytteenotin, joka voidaan autoklavoida bioreaktorin säiliön mukana. Toisella bioreaktoreja käyttävällä työryhmällä näytteenotin ei kuitenkaan ollut toiminut toivotulla tavalla. Lisäksi oli epäselvää, miten näyte saadaan otettua steriilisti näytteenottimella. Näytteen ottaminen pipetillä steriilin pipetinkärjen avulla vaikutti parhaimmalta ja yksinkertaisimmalta tavalta ottaa näyte. Kasvatukset haluttiin pitää mahdollisimman yksinkertaisina, sillä ei haluttu ottaa riskiä, että kasvatus epäonnistuu. Suunnitelmissa oli, että mikäli saadaan tehtyä useita onnistuneita kasvatuksia, voidaan kasvatuksissa kokeilla eri komponentteja, kuten näytteenotinta, happo- ja emässiöttöä tai vaahtosensoria. Tässä työssä näytteenotinta ei ehditty ottaa käyttöön.

Oman aikansa vei bioreaktorin käytön oppiminen. Laitteessa oli paljon osia, ja kasvatukset sisälsivät monia työvaiheita. Kasvatuksissa käytettävä säiliö oli tilavuudeltaan 1 litra, joten säiliön kansi oli pieni, kanteen kiinnitettäviä osia oli paljon ja liikkumavaraa oli vähän. Sensoreiden ja muiden osien ruuvaaminen kanteen vaatikin sorminäppäryyttä ja opettelu. Työssä käytettiin koko ajan suojaruusteita ja suojakäsinein ruuvien käsikiristys ja silikoniletkujen yhdistäminen suodattimiin oli välillä työlästä. Samaan aikaan kuitenkin säiliön kanteen koskemista yritettiin välttää, jotta siihen ei pääsisi epäpuhtauksia. Saattaa kuitenkin olla, että tässä yhteydessä säiliön kanteen tai muihin osiin on päässyt kontaminoitajia. Kannen kautta haitalliset epäpuhtaudet ovat voineet siirtyä reaktoriin esimerkiksi näytteenoton yhteydessä.

Oikeanlaisella kasvatusmediumilla voidaan saada parempia tuloksia. Työssä käytettiin Gibcon DMEM (1x) + GlutamaxTM -kasvatusmediumia. Medium sisälsi kalsiumia, joka auttaa soluja takertumaan pintaan. Kun soluja kasvatetaan maljoilla, on niiden takertuminen kiinteään pintaan toivottavaa, koska tällöin solut kasvavat helpommin. Bioreaktorikasvatuksissa solujen kuitenkin haluttiin nimenomaan kasvavan tarttumatta pintaan. Kalsiumin vaikutus voidaan kumota esimerkiksi lisäämällä mediumiin kalsium-ioneja sitovaa EGTA:ta eli etyleeni-glykolitetraetikkahappoa. Lisäksi markkinoilla voi olla erikseen suspensiokasvatukseen kehitettyjä mediuumeja.

Kokeilemalla ja asiaan perehtymällä voidaan löytää parhaiten sopiva medium nisäkässolujen bioreaktorikasvatukseen. Työssä käytettiin Gibcon DMEM (1x) + GlutamaxTM -mediumia, koska se oli työryhmällä yleisesti käytössä ja hyväksi havaittu. Tässä opinnäytetyössä kasvatuksia ei kokeiltu eri kasvatusmediumeilla, koska opinnäytetyöhön käytettävä aika on rajallinen. Kasvatusmediumin vaihtamisesta kesken työn saattaisi aiheuttaa enemmän haittaa kuin hyötyä. Tulevaisuudessa bioreaktoria on tarkoitus käyttää solujen kasvatuksessa enenevässä määrin, ja silloin tavoitteena on testata erilaisten kasvatusliuosten vaikutusta solujen kasvuun.

Bioreaktorikasvatuksissa sekoitus, kaasujen syöttö mediumiin ja vaahtoaminen voivat aiheuttaa solujen rikkoutumista. Markkinoilla on saatavilla erilaisia soluja

suojaavia aineita. Myös vaahdonestoaineita bioreaktorikasvatukseen on olemassa. Ei kuitenkaan ole tiedossa, voiko näitä aineita käyttää nisäkässolukasvatuksissa. Herkät nisäkässolut saattavat reagoida odottamattomalla tavalla muutoksiin. Asiaan perehtymällä ja kokeilemalla voidaan löytää juuri käytettävälle solulinjalle sopivat aineet, jolloin voidaan päästä bioreaktorikasvatuksissa yhä suurempiin solutiheyksiin.

8 YHTEENVETO

Työssä otettiin käyttöön bioreaktori onnistuneesti. Laitteelle tehtiin testiajot ja sitä opittiin käyttämään ja säätämään. Laitteessa oli paljon osia ja parametreja, joiden käyttöön perehtyminen ja oikea säätäminen veivät aikaa. Testiajojen aikana sain hyvää käyttökokemusta laitteesta. Tämä auttaa laitteen käyttöönottoa myös jatkossa.

Onnistuneita CHO-solukasvatuksia bioreaktorilla työssä ei saatu tehtyä, vaikka sitä sinnikkäästi yritettiin. Ensimmäisessä kasvatuksessa solujen kasvaminen liuoksessa oli epävarmaa. Loppujen lopuksi kasvatusta keskeytettiin kontaminaation vuoksi.

Ensimmäisessä bioreaktorikasvatuksessa ei saatu selviä merkkejä siitä, että CHO-solut olisivat lähteneet jakautumaan kasvatuksen aikana. Saattaa olla, että kasvatuksessa käytettiin herkille nisäkässoluille sopimattomia säätöarvoja. CHO-solulinja voi olla ominaisuuksiltaan sellainen, että se kasvaa vain kosketuspinoilla. Kasvatettavia soluja päätettiin opinnäytetyön aikana vaihtaa. Suspensiokasvatusta pullossa ihmisen HeLa-soluille oli aiemminkin tehty, joten myös reaktorikasvatukseen onnistumiselle on hyvät edellytykset.

HeLa-soluja esikasvatettiin pullossa ennen bioreaktoriin lisäystä. Suspensiokasvatusta pullossa sujui onnistuneesti ja solut siirrettiin bioreaktoriin. Osa soluista kuitenkin kuoli ilmeisesti magneettisauvasta aiheutuvan mekaanisen rasituksen vuoksi. Bioreaktorissa HeLa-solut kasvoivat hyvin, ja osa soluista ehdittiin kerätä ennen kontaminoitumista. CHO-solujen bioreaktorikasvatukseen verrattuna HeLa-solujen bioreaktorikasvatusta oli onnistuneempi. Työssä saatiin selkeitä merkkejä siitä, että HeLa-solut kasvavat bioreaktorissa. Opinnäytetyön suurimpana saavutuksena pidän sitä, että HeLa-solut saatiin kasvamaan bioreaktorissa ja soluja jopa kerättiin kasvatuksesta.

Nisäkässolukasvatukset bioreaktorissa ovat tuore ja ajankohtainen aihe. Tulevaisuudessa menetelmä voi olla tärkeä työväline lääketieteellisiä ja biologisia tutkimuksia tekeville laboratorioille. Tässä opinnäytetyössä nisäkässolujen bioreaktorikasvatukset saatiin hyvin alulle, ja siitä on hyvä jatkaa. Työn aikana il-

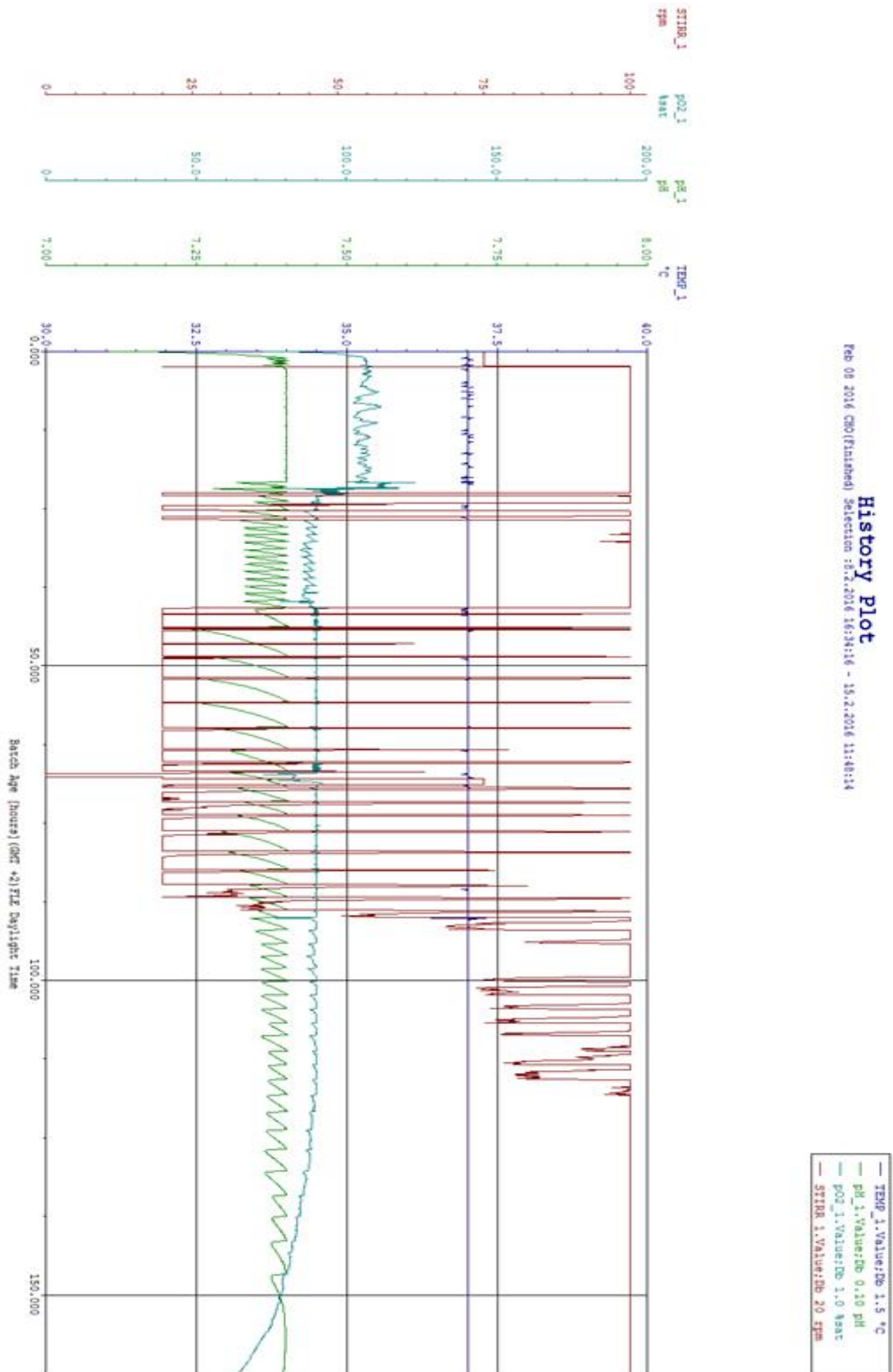
meni paljon työtä viivyttäviä haasteita, joita ei osattu vielä työn suunnitteluvaiheessa ottaa huomioon. Opinnäytetyön tavoitteet kuitenkin saavutettiin niin hyvin, kun ne opinnäytetyöhön käytettävien resurssien puitteissa voitiin saavuttaa.

LÄHTEET

1. Operating Manual BIOSTAT® B, Vers. 10. 2013. Sartorius Stedim Biotech GmbH. Goettingen, Germany.
2. Operating Instructions for pH and Redox electrodes for process applications. 2012. Hamilton Bonaduz AG. Bonaduz, Switzerland.
3. Operating Manual UniVessel®, Version 10. 2013. Sartorius Stedim Biotech GmbH. Goettingen, Germany.
4. Technical Resources DMEM, high glucose, GlutaMAX(T). 2015. Thermo Fisher Scientific. Saatavissa:
<http://www.thermofisher.com/fi/en/home/technical-resources/media-formulation.178.html>. Hakupäivä 25.4.2016.
5. Solubiologia: Soluviljely. 2006. Solunetti. Saatavissa:
http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/soluviljely_1/. Hakupäivä 25.2.2016.
6. Hassinen, Antti - Kokkonen, Nina - Reini, Kaarina - Rivinoja, Antti - Paakkola, Teija 2012. 740362A Cell Biology, practical part. Opintojakson oppimateriaali. Oulu: Department of Biochemistry, University of Oulu

CHO-SOLUJEN BIOREAKTORIKASVATUKSEN TRENDIKUVAAJAT pH-ARVOLLE, HAPPIARVOLLE, LÄMPÖTILALLE JA SEKOITUKSELLE

LIITE 1



8-1-84

Procedure for Thawing Cells

- 1) Determine which cells you want to thaw, which freeze of those cells and how many vials you need. It is best to thaw just one vial at a time to conserve frozen stock. Record on the frozen cell card (green card) how many vials will be thawed and the date. The frozen cell card will tell you where the cells are and how many vials are left.
- 2) Prepare the appropriate kind of growth media for the cells that you're going to thaw. Make sure the medium is warm. Aseptically add 5ml to a 15ml conical centrifuge tube and an appropriate amount of media to the vessel in which the cells will grow, i.e. a petri dish or T-flask.
- 3) If you are going to thaw more than one vial of cells at a time then you should get a bucket with a small volume of crushed dry ice. You must now be sure to observe all safety precautions for using liquid nitrogen. This means that you're wearing a lab coat, a face shield and heavy gloves.
- 4) Remove the cells from the liquid nitrogen tank. Place it on the crushed dry ice. Close the liquid nitrogen tank. Rapidly thaw the cells by placing the vial in a metal can and immersing the frozen cells (not the entire plastic vial!) in a 37 C water bath. Agitate or shake the vial in the water to facilitate quicker thawing. As soon as the cells are completely thawed remove from the water bath and the can and spray with 70% ethanol.
- 5) Put the vial of cells in the hood. Carefully loosen the cap. With a pasteur pipet transfer the cells from the vial to the 15ml centrifuge tube containing 5ml of growth medium. Rinse the vial with about 1ml of the medium. Pellet the cells in the table top centrifuge at about 3/4 of full rpm for about 1-2 minutes. This washes the DMSO off the cells.
- 6) Remove the supernatant growth medium with a pipet or vacuum. Resuspend the cell pellet in a few milliliters of growth medium from the growth vessel. It is best to break up the pellet into a single cell suspension. Put the cells in the growth vessel.
- 7) Microscopically check the cells. This will give you an idea of cell concentration and the general appearance of the cells. Incubate the cells.
- 8) The cells should be checked the day after being thawed. The media may need to be changed to remove dead cells or the cells may be ready to be split. For this reason I don't like to thaw cells on Friday, unless the student will be taking the cells on Saturday.

OHJEITA HELA-SOLUJEN SUSPENSIOKASVATUKSEEN LIITE 2/2

Thawing HeLa cells for Suspension Culture

- 1) Prepare "Thaw F-13":

Thaw 100ml conditioned F-13.

Filter through a 0.22 m disposable filter.

Aseptically add: 125ml F-13

15ml calf serum

7.5ml fetal bovine serum

1.5ml L-glutamine 100x (200mM)

1.5ml Na pyruvate 100x (11mg/ml)

1.5ml MEM non-essential amino acids (optional)

- 2) Rapidly thaw 1-2 vials frozen cells in 37° water bath.
- 3) Wash cells in 5ml Thaw F-13.
- 4) Resuspend cells in 100ml Thaw F-13. Cell density should be 3×10^5 cells/ml.
- 5) Examine the cells 4-12 hours after thawing. They should look round and refractile and have begun to grow.
- 6) The following day the cells should be essentially normal. Split 1- 2 with remaining Thaw F-13. Supplement with F-13 and 5% calf serum if necessary.
- 7) On the third day after thawing, split normally with F-13 and 5% calf serum.

Conditioned F-13 is media that HeLa cells have grown in. This is easily obtained by taking the supernatant off pelleted cells and freezing it.

OHJEITA HELA-SOLUJEN SUSPENSIOKASVATUKSEEN LIITE 2/3

Growing HeLa Cells

Growth Medium:

95% MEM--Joklik modified (F-13)
5% calf serum

HeLas' respond well to continuity. If they are split at about the same time everyday they will grow at the same rate ($T_d=24$ hr) for at least two months. As they "age" they begin to clump. Their growth rate becomes irregular. They will become difficult to lyse by douncing and refractive to infection.

Calf serum should be tested not only for its ability to support growth at this convenient rate, but for its ability to support non-clumped growth. Enlargement is usually due to a block in cell division. Cells accumulate in G_0 and G_1 and will demonstrate a burst of division after the condition preventing growth is changed. Enlargement can also be due to incorrect ionic strength of the growth medium.

HeLas' stay in loggrowth to 8×10^5 cells/ml if split once a day with fresh medium and 5% calf serum. However, 8×10^5 cells/ml is the very end of log phase. Occasionally there will be a 24-36 hr lag if cells are rescued from this concentration. 7×10^5 cells/ml is safely in log phase.

If you want to skip splitting the cells for a day, healthy cells can be diluted to 2×10^5 cells/ml late in the day. They will be about 7×10^5 cells/ml in 44 hours. You can increase to 10% calf serum and obtain a higher concentration before leaving log phase, but then you have to deal with downshifting.

OHJEITA HELA-SOLUJEN SUSPENSIOKASVATUKSEEN LIITE 2/4

Freezing HeLa Cells

Freeze 4L of HeLa cells as soon as possible after thawing them. The cells should be about 5×10^5 cells/ml and healthy.

- 1) Prepare 30 freezer vials.
- 2) Spin down cells in four 1L centrifuge bottles at 1800rpm for 10 minutes.
- 3) Resuspend pelleted cells in a small volume of F-13 and re-pellet.
- 4) Resuspend pellet in:
 - 80% F-13 (24ml)
 - 10% calf serum (3ml)
 - 10% DMSO (3ml)
- 5) Aliquot 1ml cell suspension per freezer vial. Tighten cap. Label.
- 6) Freeze cells in a "freezer box" overnight at -70°C .
- 7) Put cells in liquid nitrogen for long term storage.

OHJEITA HELA-SOLUJEN SUSPENSIOKASVATUKSEEN LIITE 2/5

Subculturing of Spinner HeLa Cells

HeLa cells are maintained as a stock of 500ml; and as cells to be harvested at 4L in 6L boiling flasks. HeLa cells are split 1:2 daily. All procedures are performed aseptically.

Necessary Materials:

2x Minimum Essential Medium-Joklik Modified (F-13) at 37°C
sterile water at 37°C
calf serum
clean, sterile 6L boiling flasks

Procedure:

- 1) Determine Cell Density--Remove an 8-10ml aliquot of cells from a well-mixed flask. Fill a clean, dry hemacytometer. Count the cells. Record the count in the HeLa notebook. The cell density should be about 5×10^5 cells/ml.
- 2) Aliquot calf serum to equal 5% of the media to be added to each flask of cells; i.e. 100ml serum for 2L media.
- 3) Split cells--Pour 2L of cells into a clean, sterile 6L boiling flask. To each of the two flasks, each with 2L of cells at approximately 5×10^5 cells/ml, add 100 ml calf serum, then simultaneously add 1L 2x F-13 and 1L sterile water.
- 4) Spray the flask exterior with 70% ethanol. Incubate, stirring at 37°C.
- 5) Split the stock culture 1:2. Pour off 250ml of cells. Add 250ml fresh 1x F-13 and 12.5ml calf serum. Add bleach to the cells to be discarded; flush them down the sink drain with copious amounts of tap water.

OHJEITA HELA-SOLUJEN SUSPENSIOKASVATUKSEEN LIITE 2/6

Handling Procedure for 6L Boiling Flasks

Six liter boiling flasks are used for growing suspension cell cultures. The maximum capacity of each 6L flask is 4L of cell culture media. These flasks must be returned to the TC wash area, rinsed and decontaminated. All glassware used in the TC facility is scrupulously cleaned with acid cleaning solution. If the flasks aren't adequately rinsed, or are allowed to sit without water, cells remaining on the glass surface will dry there. Dried cells are very difficult to remove from the flask, making the glassware washer's job more difficult. All spent cell culture media and growth vessels are considered contaminated with a biological agent and must be decontaminated before discard or washing, respectfully. It is your responsibility to decontaminate the boiling flask by autoclaving.

NEVER ADD BLEACH TO THE 6L BOILING FLASKS!

When harvesting suspension cells, take the flasks with the oldest date. For example, if today is 10/4, there may be flasks labeled 10/4, 10/3 and 10/2. You want the flasks labeled 10/2 unless there is a note indicating otherwise. If you aren't sure--ALWAYS ASK. Taking the wrong flask will decrease your cell yield and decrease the quantity of cells available for harvest for the next couple of days.

So, here's the procedure:

- decant cell suspension into 1L nalgene screw-cap bottles; pellet cells by centrifugation
- plug sink
- rinse the 6L boiling flasks twice--each with 300-500ml water be sure to rinse entire flask
- pour rinse water into plugged sink
- fill flask with 4.5L water
- add bleach to water in the sink
- be sure stir bar is still in the flask, replace the foil-wrapped stopper and the outer foil cover
- put a piece of autoclave tape on the outer foil
- autoclave the water-filled flasks for 45 min, slow exhaust THIS IS YOUR RESPONSIBILITY
- the flasks are now ready to be washed

HELA-SOLUJEN BIOREAKTORIKASVATUKSEN TRENDIKUVAAJAT pH-
ARVOLLE, LÄMPÖTILALLE JA SEKOITUKSELLE LIITE 3

