

MEGBI Vaccine Pilot Plant – 2nd Project Report
(for project period Feb 2013 – Dec 2013)

تصميم لمحطة انتاج لقاح HBsAg اولية

- Downstream processing elements for Hepatitis B DNA vaccine production process
- Process Chromatographic Purification Device
- Bioreactor Automation

Authors:

Samir Mourad, Jawdat Al Khatib, Rafiq Mourad, Hassan Derbani

Initial Document: 17 March 2013

Last update / آخر تعديل: 22 December 2013



الشركة اللبنانية الالمانية للبيوتكنولوجيا

رقم ٣٩٩ في سجل التجاري بيروت مسجل في تاريخ ٢٨/٥/٢٠٠٩

رأسنحاش – قضاء البترون – لبنان

LG Biotech

Main Road, Ras-Nhache, Batroun, Lebanon

<http://www.aecenar.com/partners/lg-biotech>



مركز أبحاث الشرق الأوسط للجينات والتقنية البيولوجية

رأسنحاش – قضاء البترون – لبنان

**Middle East Genetics and Biotechnology
Institute (MEGBI)**

A Member Institute of AECENAR

Main Road, Ras-Nhache, Batroun, Lebanon

<http://www.aecenar.com/institutes/megbi>

Part II

4		BASICS	3
4Connections	3.1.1.1	
8Column and system setup	3.1.1.2	
12 Appendix A Parts list and diagrams	3.1.1.3	
17 A.2 Columns with any bed support material	3.1.1.4	
20 <i>Columns with acrylic tubes</i>	3.1.2	
21Columns with stainless steel tubes	3.1.2.1	
22A.3 Columns with plastic bed supports	3.1.2.2	
24 <i>A.4 Columns with stainless steel bed supports</i>	3.1.3	
25 A.5 Media valve and tubes	3.1.3.1	
27 Profibus	3.1.3.2	
27 <i>AKTA Distributor: Regional Contact Information</i>	3.1.4	
	GENETIC ENGINEERING PART: INITIAL INSERTING HBSAG INTO S.CEREVISIAE – METHODS AND	3.2	
	28	PROTOCOLS	
28 <i>Transformation von Plasmid-DNA in superkompetente</i>	3.2.1	
30 <i>Arbeiten mit Saccharomyces cerevisiae</i>	3.2.2	
30 Plasmide	3.2.2.1	
31 Hefestämme	3.2.2.2	
32 Kultivierung von Saccharomyces cerevisiae,	3.2.2.3	
32 Kreuzung von Saccharomyces cerevisiae Stämmen	3.2.2.4	
33 Transformation von Plasmid-DNA in Saccharomyces	3.2.2.5	
35 Präparation von Plasmid-DNA aus Saccharomyces cerevisiae	3.2.2.6	
36 Expression von Proteinen in Saccharomyces cerevisiae	3.2.2.7	
36 Aufschluß von Saccharomyces cerevisiae mittels alkalischer Lyse	3.2.2.8	
37 Aufschluß von Saccharomyces cerevisiae mittels Zymolase-Verdau	3.2.2.9	
38 Reinigung von Proteinen über Nickel-Säulen	3.2.2.10	
39 Proteinbestimmung nach Bradford	3.2.2.11	
40	BIOPROCESS MODELLED BY SOFTWARE "SUPERPRO"	3.3	
42		(BIOREACTOR AUTOMATION) التحكم للبيوريكتور	
42 مواصفات (SPECIFICATION)	3.4	
42 (sensors) اجهزة الاحساس	3.4.1	
42 (actuators) محركات	3.4.2	
	42 SYSTEM DESIGN	3.5	
43 شاشة التحكم	3.5.1	
44 IMPLEMENTATION	3.6	
44 (Software) السفتوير	3.6.1	
51 (Hardware) الهاردوير	3.6.2	
51 Example for input/outputs of K8061 for the bioreactor system	3.6.3	
51 Extended USB interface Board K8061	3.6.4	
54		BIOREACTOR TEMPERATURE SYSTEM INTEGRATION	
55		CHROMATOGRAPHIC PURIFICATION DEVICE: SPECIFICATION	
55 SENSOR/ACTUATOR LIST	3.7	
57		MOCK-UP MODEL FOR THE MEBGI VACCINE PILOT PLANT	
58		مراجع	
59		DICTIONNARY ENGLISH - ARAB	

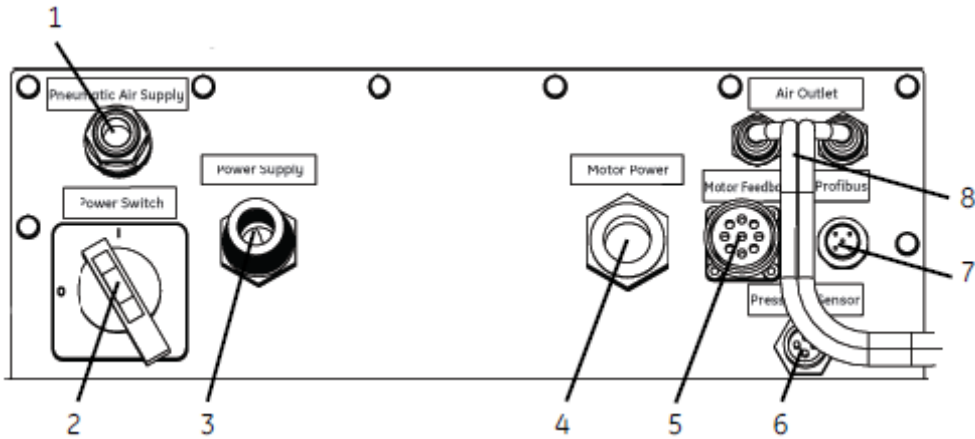
3 Basics

...

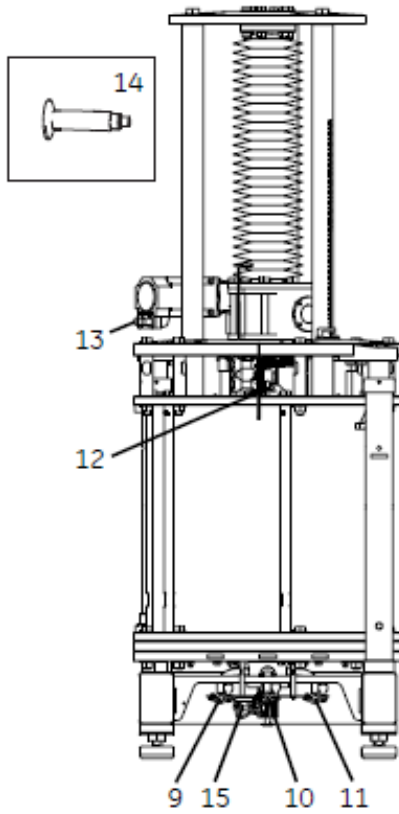
3.1.1.1 Connections

Connections on Master and column

The illustrations below show the AxiChrom Master connector panel and the connection points on a column.



Part	Description	Part	Description
1	Pneumatic air supply	5	Motor feedback
2	Power switch	6	Pressure sensor connector
3	Power supply cable	7	Profibus signal cable connector
4	Motor power cable	8	Two air outlet connectors



Part	Description
9	Slurry inlet
10	Bottom mobile phase inlet/outlet
11	Rinse inlet
12	Top mobile phase inlet/outlet
13	Motor power and motor feedback
14	Pressure sensor (PIS_119, mounted on hose to system)
15	Pneumatic inlets with 2 connectors

Connect column, Master, and external system

The table below shows how to connect the column, Master and an external system.

From	To
Pneumatic air supply (1) on the Master	Wall socket air outlet (5.5-7 bar)
Motor power cable (4) on the Master	Motor power (the right connector) on the column (13)
Motor feedback (5) on the Master	Motor feedback (the left connector) (13) on the column
Pressure sensor connector (6) on the Master	Pressure sensor mounted on system (14)
Profibus signal cable (7) on the Master	Profibus connection on an ÄKTAproucess system
Two air outlet connectors (8) on the Master	Pneumatic inlets with 2 valves (15) on the column
Slurry inlet (9) on the column	Slurry tank
Bottom mobile phase (10) on the column	Bottom mobile phase on a system (Column1 bottom valve on the ÄKTAproucess system)
Rinse inlet (11) on the column	A system (CIP2 Inlet on the ÄKTAproucess system)
Top mobile phase (12) on the column	Mobile phase on a system (CIP1 Inlet on the ÄKTAproucess system)
Protection ground cable on the column stand	Ground (See <i>Grounding the column</i> , on page 65)
Power supply cable (3) on the Master	Power supply connector (380-400 VAC, 50-60 Hz) with protective ground (The AxiChrom Master is delivered with CE or UL approved cables.)

Recommended mobile phase tubing inner diameters

Note: • All dimensions are given in millimeters.

- A dash (-) means that the combination is not compatible with Intelligent Packing.
- TC25 connectors do not have the same inner diameters as the tubing. See *Tubings*, on page 187 for details.

Table 3.1: Tubing inner diameters recommended for top and bottom mobile phase connections for different column inner diameters.

ÄKT process dimension	300	400	450	600	800	1000
6 mm PP	6.4	6.4	6.4	-	-	-
	9.4	9.4	9.4			
3/8" SS	6.4	6.4	6.4	-	-	-
	9.4	9.4	9.4			
10 mm PP	6.4	6.4	6.4	9.4	-	-
	9.4	9.4	9.4	12.7		
	12.7	12.7	12.7	19.1		
1/2" SS	6.4	6.4	6.4	9.4	-	-
	9.4	9.4	9.4	12.7		
	12.7	12.7	12.7	19.1		
1" PP and SS	-	-	-	9.4	25.4	25.4
				12.7	34.7	34.7
				19.1		

Power requirements and connections

The general requirements are:

Requirement	Value
Supply voltage	380-400 VAC
Nominal current	10-15/16 A NTD (Non-Time Delay) (min. -max.)
Frequency	50 - 60 Hz
Max voltage (North America)	480 Y/277 VAC
Max current	6 A
Max power consumption	2400 VA
Short circuit rating	5 kA

Color coding of cable conductors

Conductor	Color
Protective ground (earth)	Green/yellow
Live 1	No 1 or Black
Live 2	No 2 or Brown
Live 3	No 3 or Grey

The black, brown and grey conductors may be connected to any of Live 1, 2 and 3. The phase connection is detected automatically

Compressed air requirements

It is important for personal safety and safe operation to use the correct pressure and quality of compressed air for the pneumatic valve control. The basic requirements are:

- Free of oil and particles
- -30°C dew point
- 5.5 to 7 bar

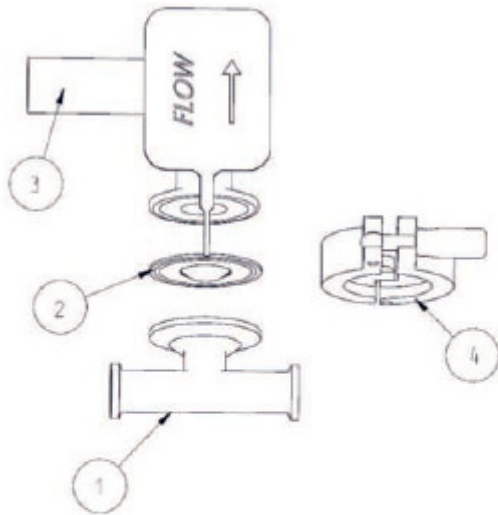
The pneumatic air supply connections on AxiChrom Master are illustrated in *Connections on Master and column, on page 59*.

Rupture discs

To secure equipment and personal safety, rupture discs are available as accessories. *Installation of rupture discs will change the maximum operating pressure for the column from 4 to 3.8 bar (g) due to rupture disc characteristics.*

Note:

For column sizes 300-600 there is a special T-junction provided for use with rupture discs.



Part	Description	Part	Description
1	T-junction	3	Vent
2	Rupture disc	4	Clamp

Figure 3.2: Rupture disc assembly

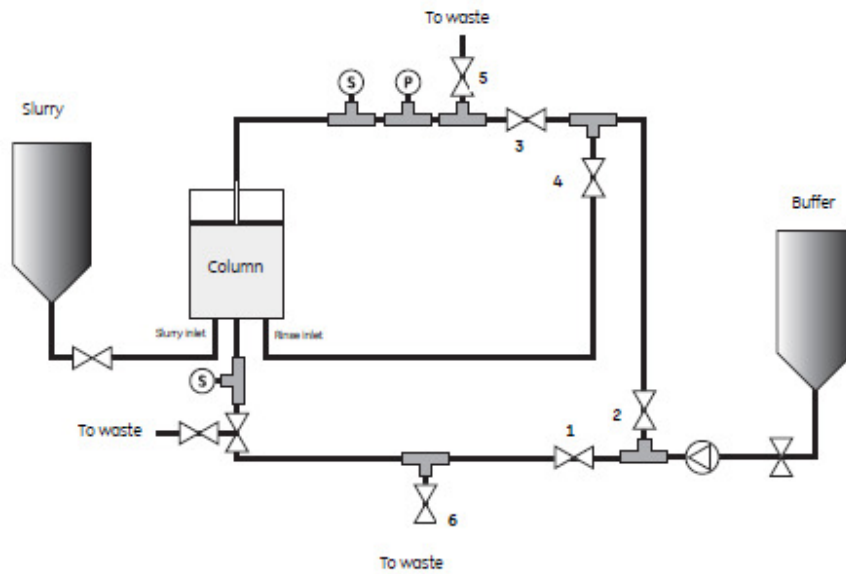
3.1.1.2 Column and system setup

In this section

This section describes how to connect the AxiChrom column to tanks, pumps and for example an ÄKTApocess system, for priming, packing and unpacking sequences in the AxiChrom Master.

Manual configuration

The following manual setup makes it possible to perform all processes available in the AxiChrom Master: **PRIMING**, **INTELLIGENT PACKING** and **UNPACKING**. The setup comprises two way valves and shut-off valves to utilize different flow paths for the different procedures.



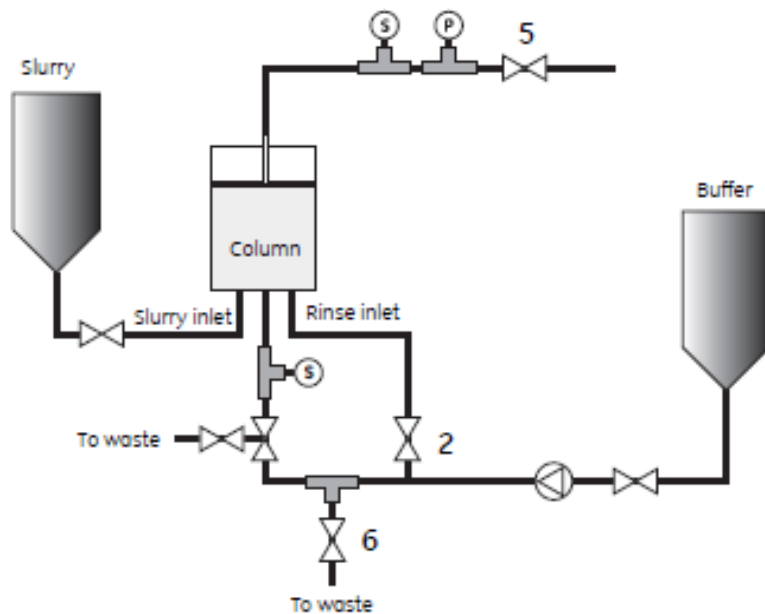
Symbol	Function
	Pressure relief valve, rupture disc or similar
	T-piece
	2-way membrane valve/shutoff valve
	2-way membrane valve/shutoff valve with bleed, can be replaced with two 2-way membrane valves and a T-piece

Possible flowpaths for different column operations

Process	Flow path alternatives (from > to)
Priming	Pump > bottom mobile phase > waste (valve 5)
	Column > bottom mobile phase > waste (valve 6)
Packing	Column > bottom mobile phase > waste (valve 6)
Rinse	pump > valve 2 > rinse > slurry tank
Unpacking "upflow"	pump > bottom mobile phase > top mobile phase > waste (valve 6)
Unpacking "media push out and down flow"	pump > bottom mobile phase > top mobile phase > closed > media valve open to slurry tank
	pump > valve 2 > top mobile phase > bottom mobile phase > waste (valve 6)

Manual configuration: minimal setup

The following manual setup makes it possible to perform the **PRIMING** and **INTELLIGENT PACKING** procedures available in the AxiChrom Master. The setup comprises two way valves and shut-off valves to utilize different flow paths for the different procedures.

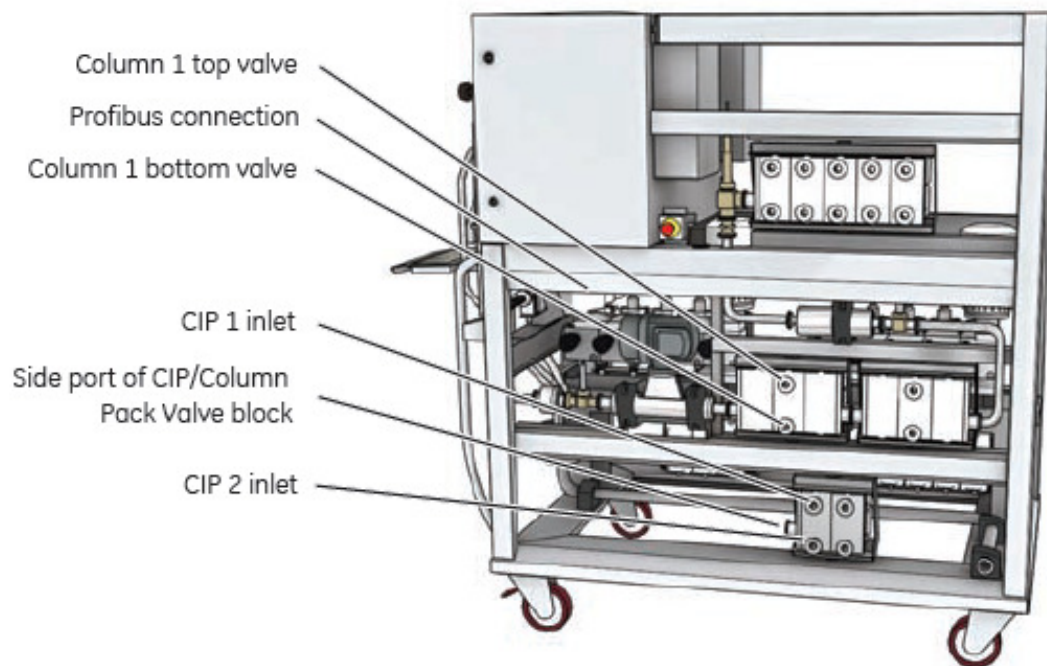
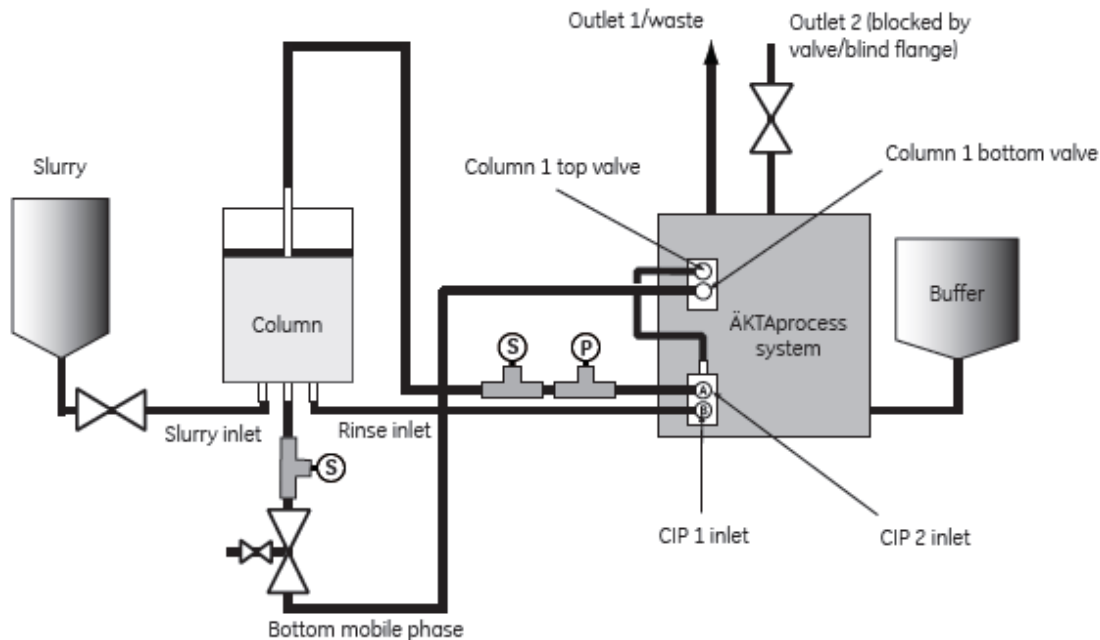


Possible flowpaths for different column operations

Process	Flow path alternatives (from > to)
Priming	Pump > bottom mobile phase > top mobile phase > waste (valve 5)
	Column > bottom mobile phase > waste (valve 6)
Packing	Column > bottom mobile phase > waste (valve 6)
Rinse	Pump > valve 2 > rinse > slurry tank

Automatic configuration connecting ÄKTprocess

The following setup makes it possible to perform all procedures that are available in the Method wizard in UNICORN: **Priming**, **Intelligent Packing** and **Unpacking**. The setup is simplified by using ÄKTprocess controlling the pump and valves for flow directions.



Connecting to an ÄKTprocess system

To simplify automated priming, column packing with HETP evaluation or column unpacking procedure, the AxiChrom column has to be connected to a ÄKTprocess system (equipped with the optional CIP/Column Packing valve block) as described below.

Procedure

- 1 Connect a short piece of tubing of suitable length and the same inner diameter as the system, from **Column1 top valve** to **Side port of the CIP/Column Pack valve block**.
- 2 Connect the AxiChrom Master pressure transmitter **PIS_119** to **INLET CIP1**.
- 3 Connect a pressure relief valve or similar to **PIS_119**.
- 4 Connect a tube of suitable length and inner diameter, from the column **Top mobile phase** to the pressure relief valve on AxiChrom Master pressure transmitter **PIS_119**. For tube diameter recommendations see *Recommended mobile phase tubing inner diameters, on page 62*.
- 5 Connect a tube of suitable length and inner diameter from **CIP2** on the process system CIP/Column Pack valve block to the Rinse inlet on the column.
- 6 Connect a tube of suitable length and inner diameter from **Bottom mobile phase** on the column to a pressure relief valve, rupture disc or similar and then to **Column1 bottom valve** on the process system.
- 7 Connect the profibus cable from the Profibus connection situated under the electrical cabinet of the ÄKTApocess system to the Profibus connection on the AxiChrom Master.

Connecting AxiChrom Master to ÄKTApocess via Profibus

Connect the Profibus cable

- 1 Power down the ÄKTApocess and Master units.
- 2 Remove the Profibus termination plug from the ÄKTApocess bulkhead connector.
- 3 Connect the Profibus cable to the ÄKTApocess bulkhead connector. Make sure that the cable barrel is straight and engages correctly in the threads of the connector.
- 4 Remove the protective cap from the Profibus connector of the Master unit.
- 5 Connect the Profibus cable to the Profibus connector of the Master unit.

3.1.1.3 Appendix A Parts list and diagrams

A.1 Part numbers and names

Position	Name
104	Tube holder 400 to 1000
105	Tube holder bracket
106	Holder
109	Locking part
111	Fastener, adaptor
115	Fastener, Tube holder 300 to 600
116	Flushing connection
117	Flushing connection nut
126	Plate
127	Shock absorber, lower
128	Top plate
129	Level display
132	Tube Roller, asm
133	Flexible tube 3/4in, TC25
134	Lid support, complete
136	Locking pin, asm
137	Flushing Inlet Tubing L1000
143	Hex Head Screw ISO 4017 M6x25 A4-70
144	Screw M6S-H M5X14

Position	Name
145	Screw M10 X 25
146	Hex Head Screw ISO 4017 M12x45 A4-70
148	Hex Head Screw ISO 4017 M16x40 A4-70
149	Hex Head Screw ISO 4017 M16x45 A4-70
150	Hex Head Screw M12x45
151	Hex Head Screw M12x45
152	Hex Head Screw M12x45
154	Parallel Pin ISO 2338 12m6x60 A2
155	Foot M30
157	Hex Nut ISO 4032 M30 A4-70
159	Domed Cap Nut M10
160	Hex Head Screw ISO 4017 M6x16 A4-70
161	Washer ISO 7089 6.4x12x1.6 A4
163	Washer ISO 7089 13x24x2.5 A4
165	Washer 21x37
169	Washer Nylon 13x24x2.5
170	Washer Nylon 10.5x21x2.5
171	Motor
172	Hex Head Screw ISO 4017 M24x60 A4-70
173	M6S M20x200 A4-70
174	Hex Head Bolt ISO 4014 M16x80 A4-70
175	Hex Socket Head Cap Screw ISO 4762 M10x30 A4-70
178	Hex Socket Head Cap Screw ISO 4762 M8x30 A4-70
181	Hex Nut ISO 4032 M16 A4-70
182	Hex Nut ISO 4032 M8 A4-70
193	Pneumatic Connection Plug
194	Pneumatic Connection Plug

Position	Name
196	O-ring 54x3
197	O-ring 6.02x2.62
198	O-ring 26.64x2.62
201	Column tube
202	Tie rod
203	Flange, bottom
204	Flange, top
211	O-ring 673.1x9.525
213	Hex Head Screw M20x60
221	Hinge lower asm
231	Hex head screw ISO 4017 M16x45 A4-70 (SSI column tube)
232	Hex head screw ISO 4017 M16x50 A4-70 (SS column tube)
301	Bed support bottom 600, 10 or 20 μm
302	Bed support adapter 600, 10 or 20 μm
401	Distributor bottom 600
402	Distributor adaptor 600
403	Bed support screw bottom 300-600
404	Bed support screw adaptor 300-600
405	Distributor adaptor ring 600
406	Snap ring 600
409	Fastener, bottom
411	T-piece, 3TC, ASME BPE DT- 18, 1/2in, SF5
412	Pressure Transmitter
413	O-ring 26.7x1.78
414	O-ring 600x10
415	O-ring 556.86x6.985
416	O-ring 506.86x6.985

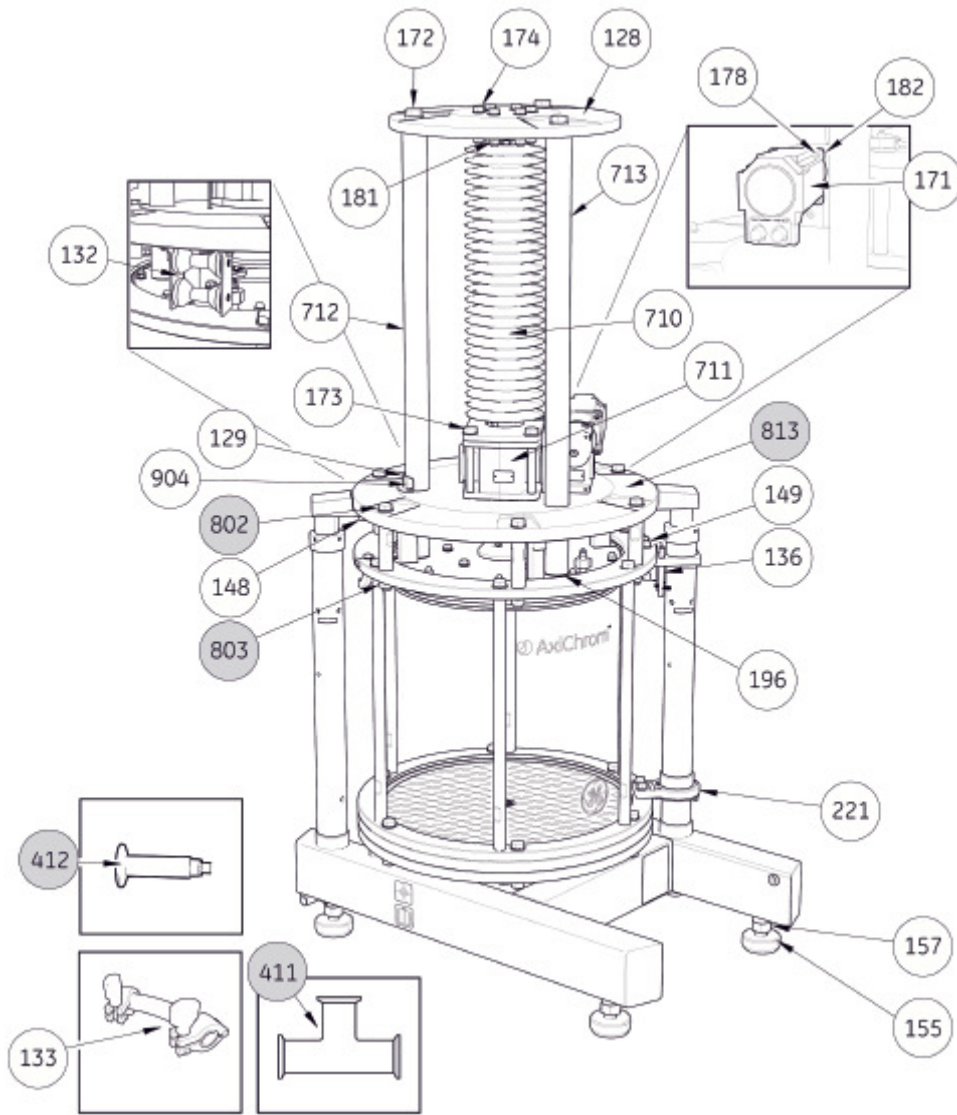
Position	Name
417	O-ring 30x3.5
421	Hex Socket Head Cap Screw ISO 4762 M8x25 A4-70
422	Washer ISO 7089 8.4x16x1.6 A4
423	Parallel Pin ISO 2338 6m6x16 A2
431	Hex Nut ISO 4032 M10 A4-70
432	Washer ISO 7089 10,5x20x2 A4
501	Tube Mobile Phase, bottom
502	Tube Slurry inlet/outlet, bottom
503	Tube Rinse, bottom
504	Connector top inlet
505	End cap
506	TC clamp for TC 25
507	TC-gasket, TC25 ID15, EPDM
508	Inner Connector Rinse (only used with PP tubes on 300-600 columns)
509	O-ring (only used with PP tubes on 300-600 columns)
511	Top Inlet/outer body
512	O-ring 16x3 EPDM70
513	Parallel Pin ISO 2338 4M6x16 A2
516	Valve body, outer
517	Valve body, inner
518	O-ring holder
519	Piston
521	Pneumatic cylinder
537	Washer
541	O-ring 125x5
542	Top inlet
543	Valve

Position	Name
601	O-ring 14x3
602	O-ring 48x3.5
603	O-ring 21.2x3
604	O-ring 27x4
607	O-ring 48x3.5
611	O-ring 48x3.5
612	O-ring 27x4
614	O-ring 48x3.5
616	O-ring 14x1.78
617	O-ring 14x1.78
618	O-ring 8x3
624	O-ring 14x3
628	O-ring 565x11
641	Scraper
710	Bellows
711	Screw and gear
712	Adapter rod with level scale
713	Adapter rod
801	Hex Head Bolt M20x110
802	Hex Head Bolt M24x300
803	Hex Nut M24
811	Bottom backing plate
812	Adapter backing plate
813	Lid
814	Adapter stop
904	Level display label

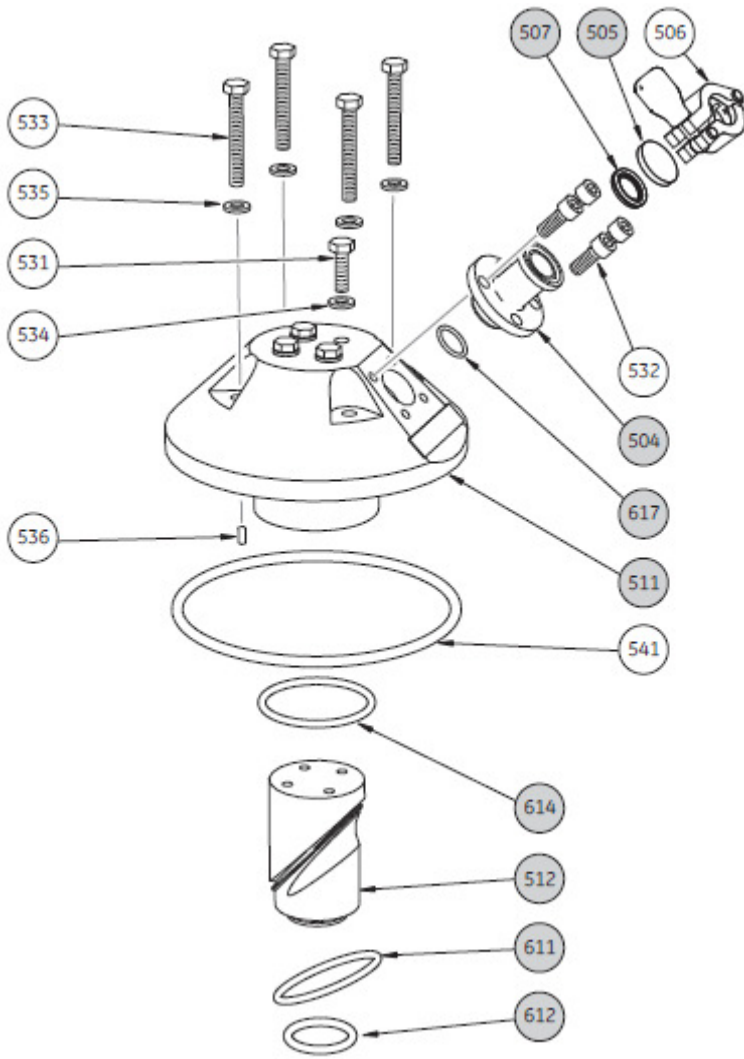
3.1.1.4 A.2 Columns with any bed support material

Note: • The numbers correspond to position numbers in Material Conformity and Spare Parts.

- Grey circles indicate parts which retain pressure or are in contact with process fluids

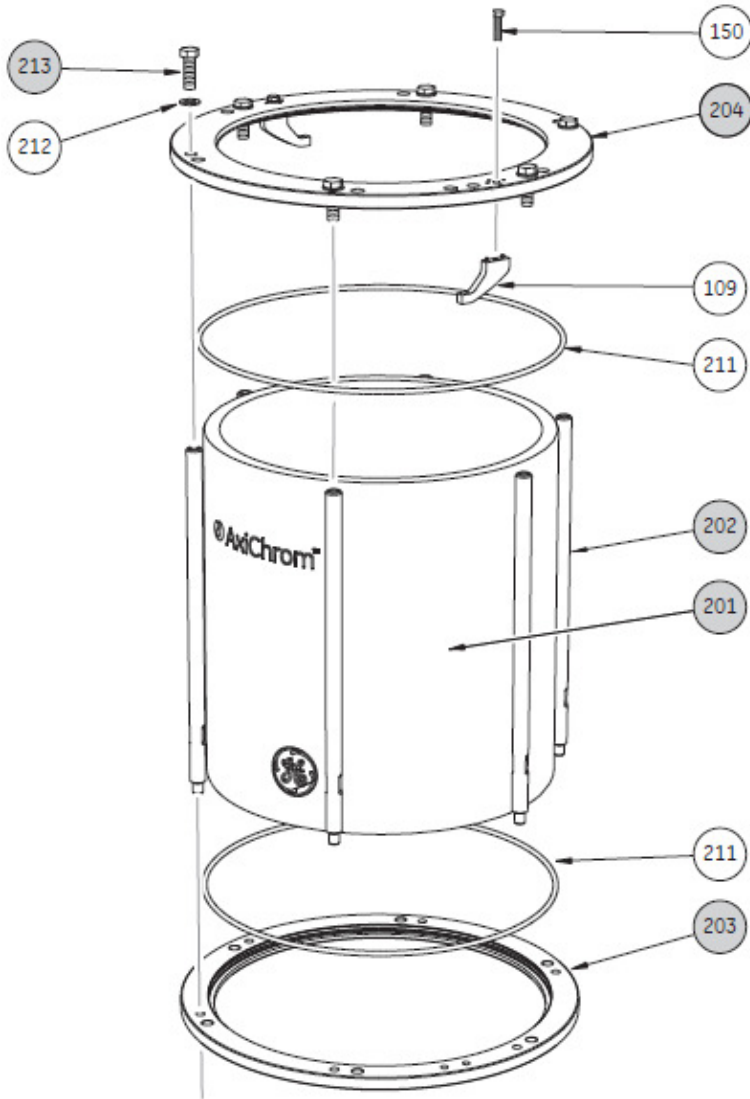


Parts 411 and 412 are mounted on the system.
Part 133 (Storage solution fill hose) is dismantled after commissioning

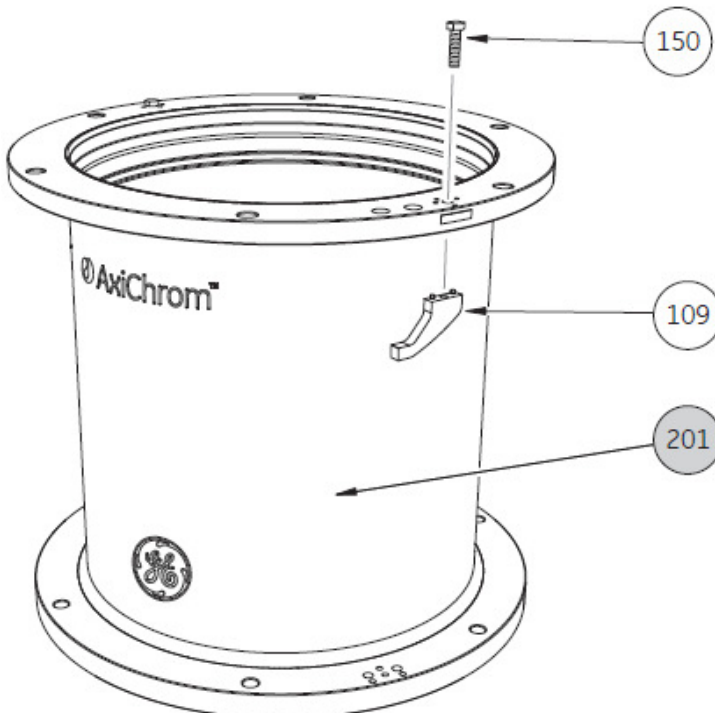
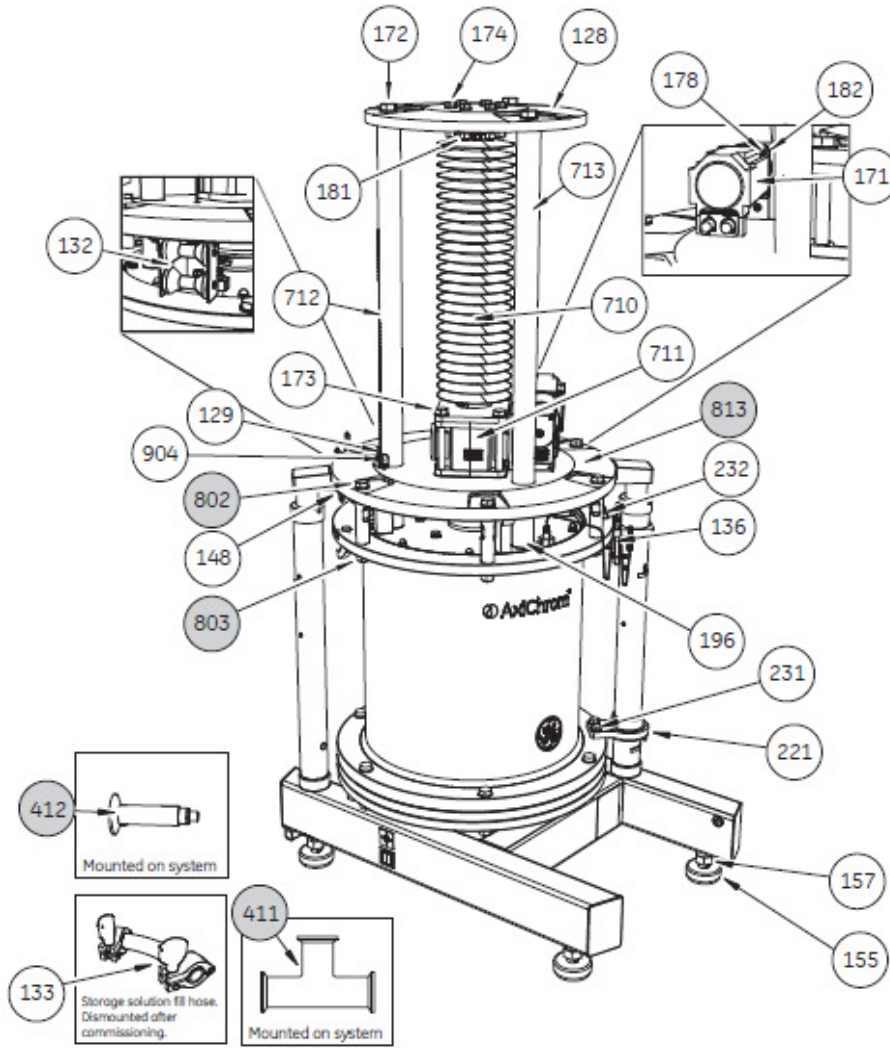


Part 536 is not included in newer inlet/outlets.

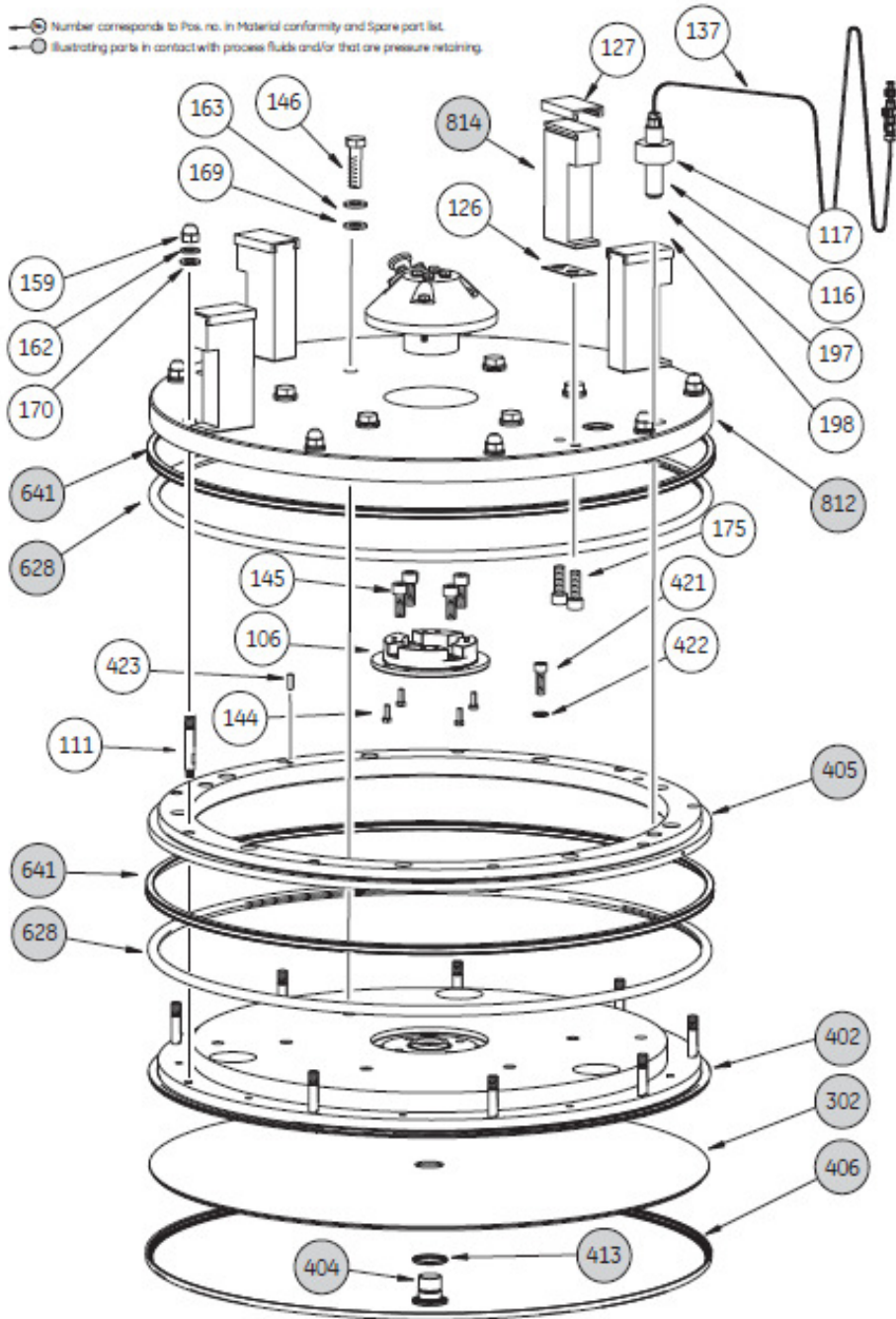
3.1.2 Columns with acrylic tubes

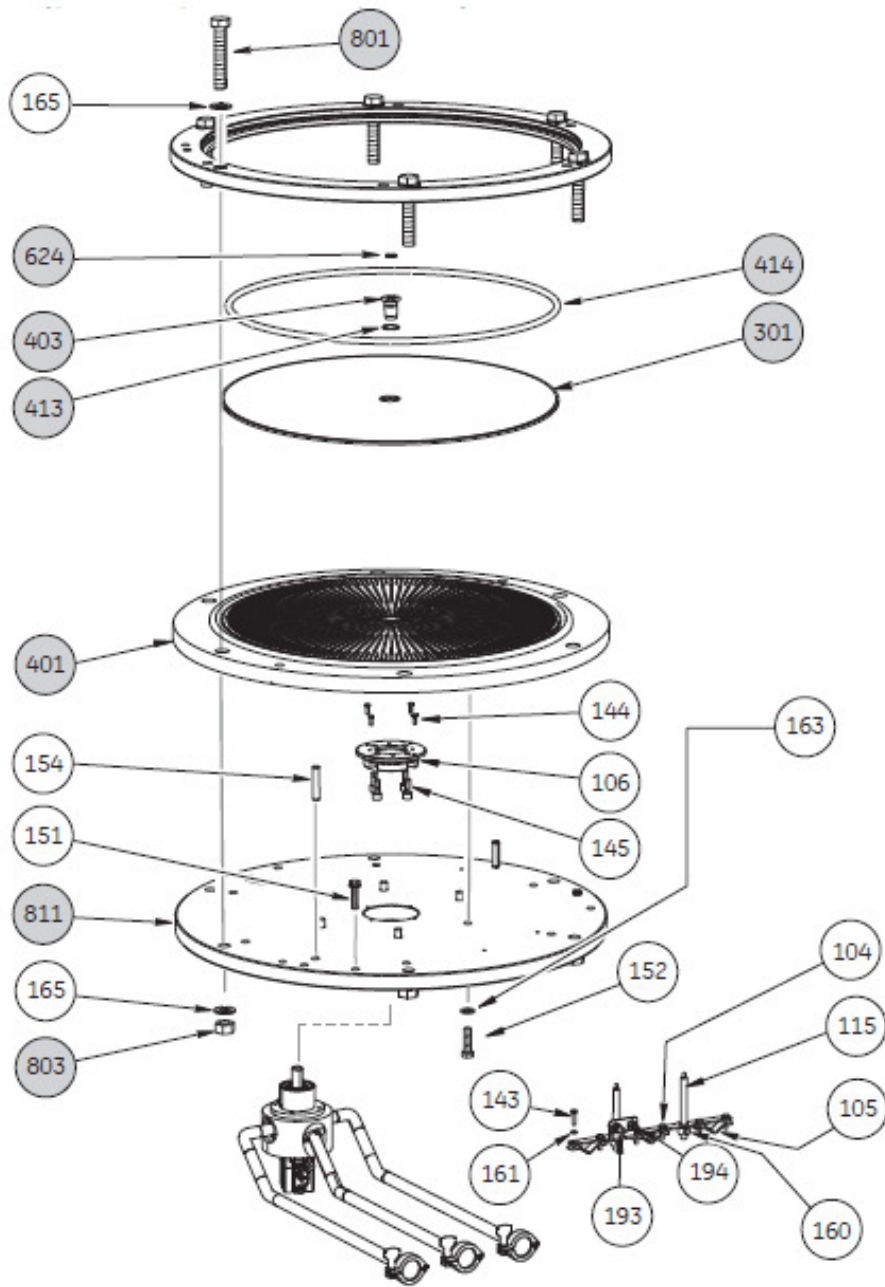


3.1.2.1 Columns with stainless steel tubes

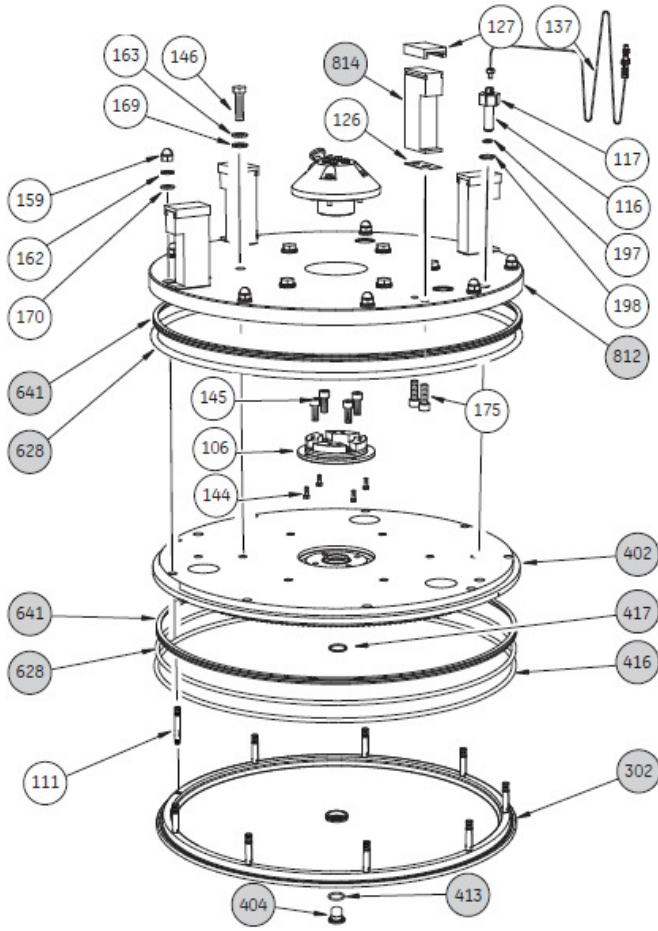


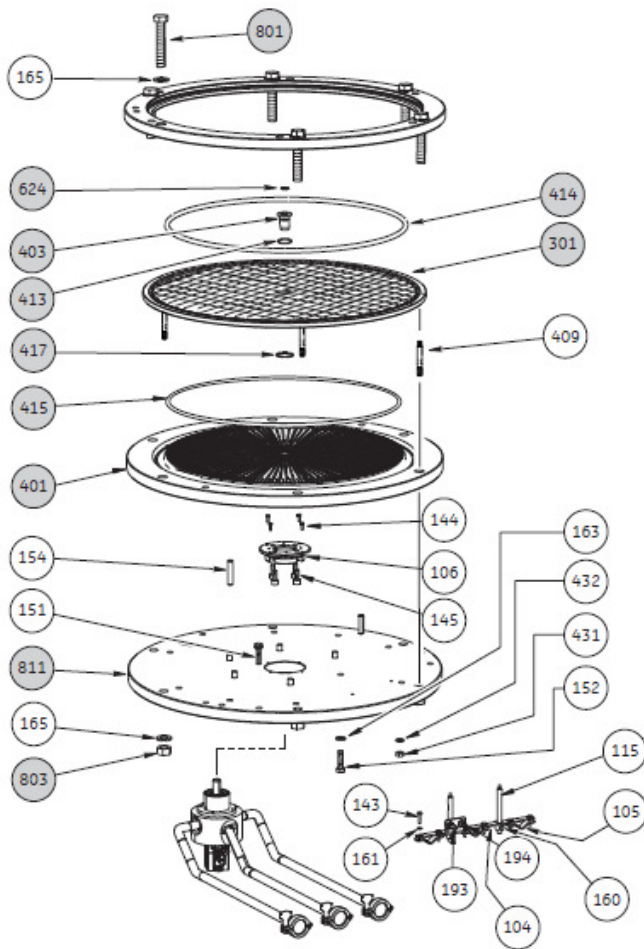
3.1.2.2 A.3 Columns with plastic bed supports





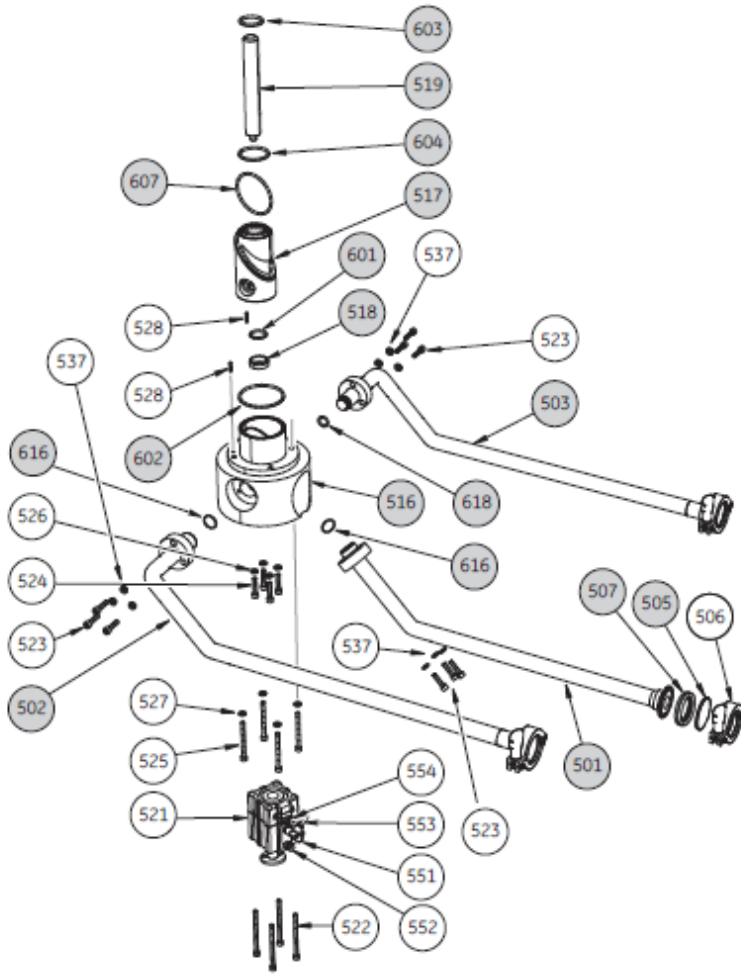
3.1.3 A.4 Columns with stainless steel bed supports



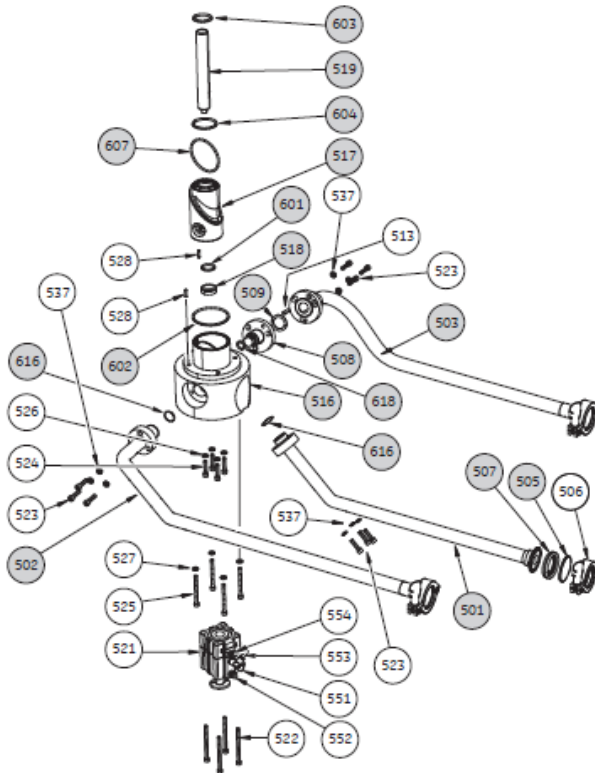


3.1.3.1 A.5 Media valve and tubes

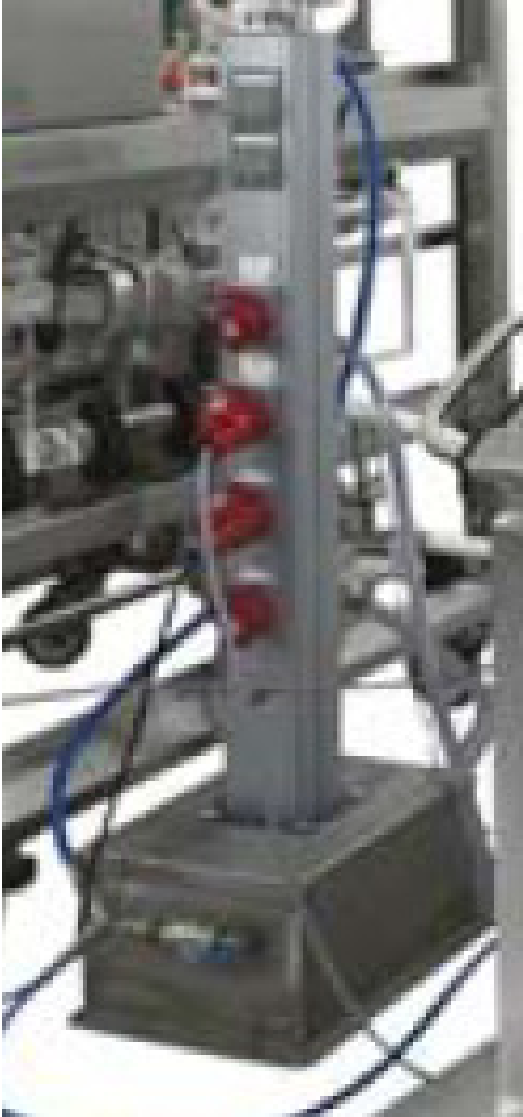
Columns with stainless steel tubes and 800 and 1000 columns with PP tubes



300-600 columns with PP tubes



3.1.3.2 Profibus



3.1.4 AKTA Distributor: Regional Contact Information

Lebanon

Biopharm S.A.R.L.
P.O. Box 166418
Badaro-Sami el Solh Street
Beirut, Lebanon

Customer Service

Telephone 1: + 961 1 381 078
Fax nr: + 961 1 399 573
Email: mct@biopharmlb.com

Technical Support

Support to Algeria, Bahrain, Cyprus, Egypt, Greece, Iran, Iraq, Jordan, Kuwait, Lebanon, Malta, Morocco, Oman, Pakistan, Qatar, Republic of South Africa, Saudi Arabia, Syria, Tunisia, United Arab Emirates and Yemen.

Telephone 1: + 30 210 96 00 687

Fax nr: + 30 210 96 00 693

Email: service@hvd.gr

Instrument Service

Email: service@hvd.gr

3.2 Genetic Engineering Part: Initial inserting HBSAg into *S.cerevisiae* – Methods and Protocols¹

3.2.1 Transformation von Plasmid-DNA in superkompetente

E. coli

Soll Plasmid-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* isoliert werden, so empfiehlt sich die Isolation mit dem „Yeast DNA Isolation System“ von Stratagene (siehe 2.2.7). Dabei wird eine einzelne Hefekolonie innerhalb von 10 min aufgeschlossen, kurz bei 10.000 x g in einer Tischzentrifuge (Heraeus) zentrifugiert und ein Aliquot des Überstands in superkompetente XL1-blue transformiert. Anschließend wird vorgegangen wie unter 2.1.7 Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA beschrieben.

superkompetente XL1-blue Stratagene

®-Mercaptoethanol-Stammlösung:

®-Mercaptoethanol 1,42 M Sigma

Mg²⁺-Lösungen:

MgCl₂ x 6 H₂O 1 M Merck

MgSO₄ x 7 H₂O 1 M Merck

beide Lösungen steril filtrieren (0,2 µm).

Glucose-Lösung:

Glucose 2 M Merck

steril filtrieren (0,2 µm).

NZY+ Broth:

Casein-Hydrolysat, säurehydrolysiert 10 g/l Roth

Hefeextrakt 5 g/l Difco

NaCl 5 g/l Roth

bei 121°C 20 min autoklavieren und vor Gebrauch pro Liter folgendes zusetzen:

je 12,5 ml der beiden Mg²⁺-Lösungen und 10 ml Glucose-Lösung

Die bei -80°C gelagerten superkompetenten XL1-blue werden auf Eis langsam aufgetaut, vorsichtig gemischt und jeweils 75 µl in eisgekühlte 15 ml-Falconröhrchen (Falcon® 2059 polypropylene tubes) vorgelegt. Es werden jeweils 1,3 µl ®-Mercaptoethanol (Endkonz.: 25 mM) dazupipettiert

¹ Mostly from [Braun 2001]

und 10 min auf Eis inkubiert, wobei jeder Ansatz zu Beginn und dann alle 2 min vorsichtig durchmischt wird. Danach werden 2 µl eines Hefezelllysats (2.2.8) dazupipettiert und alles 20-30 min auf Eis inkubiert. Für die Kontrolltransformation wird anstelle des Zellysats 0,1 ng eines Kontrollplasmids dazupipettiert. Die Zellen werden anschließend 40 s in einem 42°C warmen Wasserbad erhitzt, dann sofort auf Eis gestellt und 2 min inkubiert. Jedem Ansatz werden 400 µl NZY+ Broth zugesetzt und die Zellen 1 h bei 37°C und 225-250 rpm inkubiert. 5 µl der Kontrolltransformation werden auf einer LB/Amp-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die restlichen Transformationsansätze werden komplett auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und ebenfalls bei 37°C über Nacht inkubiert. Bei der Kontrolltransformation sollten 100-500 Kolonien, bei den restlichen Transformationen 10-200 Kolonien auf den LB-Agarplatten wachsen.

Hybridisierung komplementärer Oligonukleotide

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten, für die keine Matrize vorliegt, müssen komplementäre Oligonukleotide der gewünschten Sequenz konstruiert werden. Dabei werden die überhängenden Enden dieser synthetischen Oligonukleotide komplementär zu den kohäsiven Enden der zur Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme gewählt. Auch die Klonierung kleiner DNA-Fragmente (< 100 bp), die bei 366 nm kaum sichtbar sind und deswegen nur schlecht mittels präparativer Gelelektrophorese aufgereinigt werden können, läßt sich auf diese Weise erleichtern.

Hybridisierungspuffer, pH 8,0:

Tris/HCl 10 mM Sigma

EDTA, Dinatriumsalz 1 mM Sigma

NaCl 50 mM Roth

Die synthetischen Oligonukleotide werden in Hybridisierungspuffer aufgenommen (200 pmol/µl). Je 20 µl (4 nmol) der komplementären Oligonukleotide werden zusammen in ein Eppendorfcup pipettiert, in einem Thermomixer (Eppendorf) bei 95°C für 5 min inkubiert und im ausgeschalteten Heizblock langsam auf RT abgekühlt. Die entstandenen doppelsträngigen DNA-Fragmente können anschließend sofort in ein entsprechend verdautes Plasmid ligiert (2.1.6.2) werden.

Dephosphorylierung gespaltener linearisierter DNA

Bei Klonierungen mittels Schnittstellen, deren kohäsive Enden komplementär sind (z.B. Eco RI und Mun I) sollte die Plasmid-DNA vor der Ligation dephosphoryliert werden. Ansonsten werden vorwiegend die Enden des Plasmids miteinander ligiert.

Für die Dephosphorylierung von 0,5-1 µg gespaltener DNA wird folgendes

zu einem 20 µl-Restriktionsansatz⁴ pipettiert:

2 µl 10 x Reaktionspuffer für Alkalische Phosphatase Boehringer

2 µl Alkalische Phosphatase (1 U/µl) Boehringer

16 µl autoklaviertes H₂O_{bidest}

Der Ansatz wird 30 min bei 37°C in einem Thermomixer (Eppendorf)

inkubiert und das gewünschte DNA-Fragment anschließend mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt (2.1.7.3, 2.1.7.4).

3.2.2 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

3.2.2.1 Plasmide

Plasmid	Größe	Beschreibung	Referenzen
GAL4 AD-Plasmide:			
pGAD GH	7,9 kb	<i>LEU2</i> -Gen zur Selektion in Leu ⁻ Hefen Amp ^r zur Selektion in <i>E. coli</i>	van Aelst et al., 1993
pGAD T7	8,0 kb	<i>LEU2</i> -Gen zur Selektion in Leu ⁻ Hefen Amp ^r zur Selektion in <i>E. coli</i>	Clontech
GAL4 DNA-BD-Plasmide:			
pGBT 9	5,5 kb	<i>TRP1</i> -Gen zur Selektion in Trp ⁻ Hefen Amp ^r zur Selektion in <i>E. coli</i>	Access.: U 07646 Bartel et al., 1993
pGBK T7	7,3 kb	<i>TRP1</i> -Gen zur Selektion in Trp ⁻ Hefen Kan ^r zur Selektion in <i>E. coli</i>	Clontech Louret et al., 1997

Tab. 2.3: Yeast Two Hybrid-Klonierungsvektoren (Clontech).

Plasmid	Beschreibung	Referenzen
pCL 1	Wildtyp GAL4-Gen <i>LEU2</i> -Gen zur Selektion in Leu ⁻ Hefestämmen Amp ^r zur Selektion in <i>E. coli</i>	Fields & Song, 1989
PGAD T7-T	SV 40 <i>large T antigen</i> (84-708) in pGAD T7	Clontech
PGBK T7-53	Maus p53 (72-390) in pGBK T7	Clontech
PGBK T7-Lam	Human Lamin C (66-230) in pGBK T7	Clontech

Tab. 2.4: Yeast Two Hybrid-Kontrollplasmide (Clontech).

Plasmid	Größe	Beschreibung
pYES 2	5,9 kb	GAL1-Promoter, Proteinexpression Galaktose-induzierbar <i>URA3</i> -Gen zur Selektion in Ura ⁻ Hefestämmen Amp ^r zur Selektion in <i>E. coli</i>
pYES 3	5,9 kb	GAL1-Promoter, Proteinexpression Galaktose-induzierbar <i>TRP1</i> -Gen zur Selektion in Trp ⁻ Hefestämmen Amp ^r zur Selektion in <i>E. coli</i>

Tab. 2.5: Galaktose-induzierbare Expressionsvektoren (Invitrogen).

3.2.2.2 Hefestämme

***Saccharomyces cerevisiae*: HF7c** (Feilotter et al., 1994)

Genotyp: *MATa*, *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *lys2-801*, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *gal4-542*, *gal80-538*,

LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3,

URA3::GAL4_{17mers(x3)}-CYC1_{TATA}-lacZ

Reportergene: *HIS3*, *lacZ*

auxotrophe Marker: *trp1*, *leu2*, *cyhr2*

***Saccharomyces cerevisiae*: Y187** (Harper et al., 1993)

Genotyp: *MAT \langle* , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *gal4 \otimes* , *met-*, *gal80 \otimes* ,

URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ

Reportergene: *lacZ*

auxotrophe Marker: *trp1*, *leu2*

***Saccharomyces cerevisiae*: PJ69-2A** (James et al., 1996)

Genotyp: *MATa*, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 \otimes* , *gal80 \otimes* ,

LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3,

GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2

Reportergene: *HIS3*, *ADE2*

auxotrophe Marker: *trp1*, *ura3*, *leu2*

***Saccharomyces cerevisiae*: AH109** (James et al., 1996)

Genotyp: *MATa*, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 \otimes* , *gal80 \otimes* ,

LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3,

GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2,

ura3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ

Reportergene: *HIS3*, *ADE2*, *lacZ*

auxotrophe Marker: *trp1*, *ura3*, *leu2*

***Saccharomyces cerevisiae*: INV Sc1**

Genotyp: *MAT \langle* , *his3 \otimes 1*, *leu2*, *trp1-289*, *ura3-52*

auxotrophe Marker: *trp1*, *ura3*, *leu2*, *his3*

3.2.2.3 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*,**Anlegen von Glycerolkulturen**

Glycerol (autoklavieren)	Merck
Kanamycin	Sigma
Agar, für Platten	Difco
YPD Medium	Clontech/Anachem
Minimal SD Base	Clontech/Anachem
Minimal SD Base / Gal / Raf	Clontech/Anachem
DO-Supplemente:	Clontech/Anachem
-His, -Leu, -Trp, -Ura, -His/-Trp, -Leu/-Trp, -Trp/-Ura, -Leu/-Trp/-His, -Leu/-Trp/-His/-Ade	

Das Kompletmedium (YPD) wird nach Herstellerangaben in H₂O_{bidest.} gelöst, mit NaOH pH 5,8 eingestellt und in einem Autoklaven mit Schnellrückkühlung (HICLAVE HV-85, NeoLab) bei 121°C 15 min autoklaviert.

Zur Herstellung von Selektionsmedium (*synthetic dropout, SD*) wird Minimal SD Base bzw. Minimal SD Base/Gal/Raf zusammen mit dem gewünschten DO Supplement nach Herstellerangaben in H₂O_{bidest.} gelöst, mit NaOH pH 5,8 eingestellt und in einem Autoklaven mit Schnellrückkühlung bei 121°C 15 min autoklaviert.

Zur Herstellung von Agar-Platten wird dem Flüssigmedium 20 g/l Agar zugesetzt, **anschließend** der pH-Wert mit NaOH oder HCl auf 5,8 eingestellt und in einem Autoklaven mit Schnellrückkühlung bei 121°C 15 min autoklaviert.

Bei Bedarf kann dem Medium nach dem Autoklavieren 15 µg/ml Kanamycin (Stammlösung: 30 mg/ml in EtOH) zugesetzt werden. Dabei sollte das Medium aber schon abgekühlt sein (max. 50°C).

Die Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* erfolgt im allgemeinen über Nacht in Flüssigmedium bei 30°C und 220 rpm in Schikanekolben.

Zum Anlegen von **Glycerol-Kulturen** werden die Hefezellen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 (logarithmisches Wachstum) in Flüssigmedium kultiviert. Die Zellen werden bei 5.000 x g für 5-10 min pelletiert und das Pellet in demselben Volumen Flüssigmedium mit 25% Glycerin resuspendiert. Die Aliquots werden bei -80°C gelagert.

3.2.2.4 Kreuzung von *Saccharomyces cerevisiae* Stämmen**(Mating)**

Die Zellen zweier Hefestämme mit passendem *mating type* (MATa, MATα) können zu einem diploiden Hefestamm, mit den Eigenschaften beider Stämme, verschmelzen.

Von jedem der beiden vortransformierten Hefestämme wird eine 2-3 mm

große Kolonie (< 2 Monate alt) gepickt und in 500 µl YPD-Medium (mit 15 µg/ml Kanamycin) in einem 1,5 ml Eppendorfcup resuspendiert. Die Zellen werden ca. 20 h bei 30°C und 200 rpm kultiviert, auf SD-Mediumplatten ausplattiert und 2-3 Tage bei 30°C inkubiert.

3.2.2.5 Transformation von Plasmid-DNA in *Saccharomyces*

cerevisiae

Heringssperma-DNA 10 mg/ml Stratagene

DMSO 100 % Sigma

PEG-Stammlösung:

PEG 3350 50 % Sigma

bei 121°C 20 min autoklavieren.

TE-Puffer (10x), pH 7,5:

Tris/HCl 0,1 M Sigma

EDTA, Dinatriumsalz 10 mM Sigma

bei 121°C 20 min autoklavieren.

LiAc (10x), pH 7,5:

Lithiumacetat 1 M Sigma

pH-Wert einstellen und bei 121°C 20 min autoklavieren.

PEG / LiAc-Lösung: immer frisch aus den Stammlösungen ansetzen

Endkonz.: für 10 ml Lösung:

PEG 3.350 40 % 8 ml 50 % PEG

TE-Puffer (10x) 1 x 1 ml 10 x TE

LiAc 1 x 1 ml 10 x LiAc

Herstellung kompetenter Hefezellen

	Transformation Scale		
	<u>Small</u>	<u>Large</u>	<u>Library</u>
• YPD-Medium am Tag vor der Transformation mit 2-3 Hefekolonien (2-3 mm Durchmesser) in Erlenmeyer-Kolben mit Schikanen animpfen	50 ml	50 ml	150 ml
• 16-18 h bei 30°C und 200 rpm bis zur stationären Phase ($OD_{600} > 1,5$) kultivieren			
• Teil der Übernachtskultur in frisches Medium überführen → $OD_{600} = 0,2-0,3$	300 ml	300 ml	1 Liter
• weitere 2-4 h bei 30°C und 220 rpm kultivieren, bis zu $OD_{600} = 0,4-0,8$			
• Zellen 5 min bei 1.000 x g und RT pelletieren			
• Zellpellet in H ₂ O resuspendieren (vortexen)	25-50 ml	25-50 ml	500 ml
• Zellen 5 min bei 1.000 x g und RT zentrifugieren			
• Zellpellet in frisch hergestelltem, sterilem 1 x TE/LiAc resuspendieren	1,5 ml	1,5 ml	8 ml

Kompetente Hefezellen können einige Stunden bei RT gelagert werden. Bei *Library-Screens* sollten sie aber sofort verwendet werden, um möglichst gute Ergebnisse zu erzielen.

Transformation von Plasmid-DNA in kompetente

Hefezellen

	<i>Transformation Scale</i>		
	<i>Small</i>	<i>Large</i>	<i>Library</i>
• sterile PEG/LiAc-Lösung herstellen	10 ml	10 ml	100 ml
• in jedem Cup vorlegen, gut mischen:			
BD-Vektor mit <i>bait</i> :	0,1 µg	20-100 µg	0,2-1,0 mg
AD-Vektor mit <i>Library</i> :	0,1 µg	10-50 µg	0,1-0,5 mg
Carrier DNA ⁶ (10 mg/ml):	0,1 mg	2 mg	20 mg
• zu jedem Ansatz die kompetenten Hefezellen zugeben und gut mischen (nicht vortexen)	0,1 ml	1 ml	8 ml
• PEG/LiAc-Lösung zugeben, vortexen	0,6 ml	6 ml	60 ml
• 30 min bei 30°C und 220 rpm inkubieren			
• DMSO zugeben, vorsichtig mischen	70 µl	700 µl	7 ml
• Hitzeschock: bei 42°C für 15 min inkubieren; <i>Large</i> und <i>Library Scale</i> gelegentlich mischen			
• Zellen auf Eis abkühlen			
• Zellen bei 1.000 x g und RT pelletieren	5 s	5 min	5 min
• Überstand abnehmen			
• Zellen in 1 x TE-Puffer resuspendieren	0,5 ml	1,0 ml ⁷ oder 10,0 ml	10 ml
• jeweils 100 µl / 200 µl auf einer Agarplatte (SD; Ø 100 mm / 150 mm) ausplattieren			

⁶ Heringssperma Carrier-DNA vorher ca. 10 min bei 95 °C kochen, dann sofort auf Eis akühlen

⁷ 1,0 ml bei simultaner Kotransformation, 10 ml bei sequentieller Transformation

3.2.2.6 Präparation von Plasmid-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

„Yeast DNA Isolation System“ Stratagene

Eine Hefe-Kolonie (Ø 2-3 mm) wird in 20 µl Lysepuffer in einem 1,5 ml Eppendorfcup resuspendiert, 30 s in flüssigen Stickstoff getaucht und bei 37°C aufgetaut. Nach 5-minütiger Inkubation bei 95°C wird die Membranfraktion

30 s bei 14.000 x g in einer Tischzentrifuge (Heraeus) pelletiert und der Überstand in ein frisches Eppendorfcup überführt. 2 µl des Plasmid-haltigen Überstands werden wie unter 2.1.1.6 beschrieben in superkompetente *E. coli* transformiert. Zur Gewinnung einer ausreichenden Menge Plasmid-DNA wird vorgegangen wie unter 2.1.7.5.1 Präparation und Reinigung von DNA beschrieben.

3.2.2.7 Expression von Proteinen in *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Expression von Proteinen in *Saccharomyces cerevisiae* sollten möglichst hoch exprimierende, induzierbare Vektoren, z.B. pYES 2, verwendet werden. Sollen Proteine exprimiert werden, die toxisch auf Hefe wirken, muss allerdings auf schwächer exprimierende Vektoren zurückgegriffen werden.

Nach Transformation des gewünschten Vektorkonstrukts werden die Hefen zunächst auf nicht induzierenden SD-Agarplatten ausplattiert. Die Hefezellen einer 50-100 ml-Übernachtskultur (SD-Induktionsmedium, z.B. SD Base Gal/Raf; pYES 2) werden nach 2.3.2 aufgeschlossen und die Proteinexpression mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.3.6) überprüft. Anschließend werden die Hefen über Nacht im Großansatz (2-3 l) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-1,2 (je nach Hefestamm) kultiviert, nach 2.3.3 aufgeschlossen und das Protein anschließend z.B. über Nickelsäulen (2.3.4, Protein mit *HisTag*) angereinigt.

3.2.2.8 Aufschluß von *Saccharomyces cerevisiae* mittels alkalischer Lyse

Der Aufschluß erfolgt nach einer Vorschrift von Silve et al. (1991) durch alkalische Lyse mit anschließender Proteinfällung.

TCA	50 %	Sigma
Tris/HCl, pH 6,8	1 M	Merck
<u>Lyselösung:</u>		
NaOH	1,85 M	Merck
β-Mercaptoethanol	7 %	Sigma

β-Mercaptoethanol immer frisch zusetzen.

Die Hefezellen bis zur frühen log-Phase ($H 1 \times 10^7$ Zellen/ml) in Flüssigkultur wachsen lassen und bei OD₆₀₀ = 1,0 (in YPD) bzw. 0,8 (in SD Base) 3 ml der Zellsuspension 5 min bei 14.000 x g zentrifugieren. Das Zellpellet mit 1 ml H₂O_{bidest} waschen, in 100 µl frisch hergestellter Lyselösung resuspendieren und 10 min auf Eis inkubieren. Anschließend werden die Proteine durch Zusatz von 50% TCA und 5-minütiger Inkubation

auf Eis gefällt und bei $> 12.000 \times g$ in 10 min pelletiert. Das Pellet wird durch Zugabe von 500 μl Tris-Puffer (1 M) neutralisiert (Pellet **nicht** resuspendieren). Das Pellet in 50-100 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aufnehmen, evtl. beschallen, die Proteinkonzentration nach Bradford (2.3.5) bestimmen und mittels SDS-PAGE (2.3.6) und Western Blot (2.3.7) analysieren.

3.2.2.9 *Aufschluß von Saccharomyces cerevisiae mittels Zymolase-Verdau*

PBS, pH 7,5:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	7 mM	Sigma
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	3 mM	Sigma
NaCl	150 mM	Roth

Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,5:

K_2HPO_4	1 M	Sigma
KH_2PO_4	1 M	Sigma

Sorbitol-Lösung:

Sorbitol	2 M	Sigma
----------	-----	-------

Zymolase-Lösung:

20 mg/ml Zymolase 20T (ICN #320921) in Wasser; frisch ansetzen

Puffer A (10 x):

KH_2PO_4	350 mM	Sigma
$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	65 mM	Merck

pH-Wert mit K_2HPO_4 auf 6,5 einstellen

Lösung B [pro ml]: 1,2 M Sorbitol in Puffer A

600 µl Sorbitol (2 M)
 100 µl Puffer A (10x)
 300 µl dest. Wasser

Lösung C [pro ml]:

100 µl Zymolase-Lösung
 100 µl Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,5 (1 M)
 600 µl Sorbitol (2 M)
 200 µl dest. Wasser

PBS mit Inhibitoren, pH 7,5 [pro 10 ml]:

		Stammlösung:	Endkonz.:	
Pepstatin A	3 ml	1 mg/ml (in DMSO)	0,1 mg/ml	Sigma
Leupeptin	30 µl	1 mg/ml	1 µg/ml	Sigma
Benzamidin	3 ml	1,5 M	150 mM	Sigma
Aprotinin	30 µl	2,5 mg/ml	2,5 µg/ml	Sigma
PMSF	30 µl	100 mM	0,1 mM	Sigma
EDTA	300µl	0,1 M	1 mM	Sigma

Die aufzuschließenden Hefezellen werden bei 5.000 x g 5 min abzentrifugiert und das Pellet in demselben Volumen Lösung B resuspendiert. Die Zellen werden erneut pelletiert, in demselben Volumen Lösung C resuspendiert und 1h bei 37°C inkubiert (Verdau der Zellwand Spheroplasten). Die empfindlichen Spheroplasten werden bei 3.500 x g und 4°C

5 min abzentrifugiert und anschließend in PBS mit Inhibitoren (½ des Zellvolumens) resuspendiert. Durch Beschallen (3-5 x, jeweils 20-30s) mit einem Ultraschallstab werden die Spheroplasten unter **Eiskühlung** aufgeschlossen. Die Membranfraktion wird bei 20.000 x g, 4°C in 20-30 min pelletiert.

3.2.2.10 Reinigung von Proteinen über Nickel-Säulen

Ni-NTA Superflow Qiagen

TALON 2 ml Disposable Gravity Column Clontech

Waschpuffer, pH 8,0:

100 mM NaCl Roth

20 mM Tris/HCl, pH 8,0 Merck

20 mM Imidazol Sigma

Elutionspuffer I, pH 8,0:

100 mM NaCl Roth

20 mM Tris/HCl, pH 8,0 Merck

50 mM Imidazol Sigma

Elutionspuffer II, pH 8,0:

100 mM NaCl Roth

20 mM Tris/HCl, pH 8,0 Merck

100 mM Imidazol Sigma

Elutionspuffer III, pH 8,0:

100 mM NaCl Roth

20 mM Tris/HCl, pH 8,0 Merck

500 mM Imidazol Sigma

Elutionspuffer IV, pH 8,0:

1 M Imidazol Sigma

Regenerierungspuffer, pH 5,0:

0,5 M MES Sigma

Die Säule mit 5-10 ml H₂O_{bidest} durchspülen, das Säulenmaterial vorsichtig aufschütteln, etwa 1 ml in die Säule füllen und absetzen lassen. Die befüllte Säule zweimal mit 1 ml Waschpuffer spülen, die Probe auftragen und 5 min inkubieren. Anschließend zweimal mit jeweils 1 ml Waschpuffer waschen und die Probe mit jeweils 1 ml Elutionspuffer I, II und III schrittweise von der Säule eluieren. Den Durchlauf, sämtliche Waschfraktionen und Eluate getrennt sammeln. Mit 1-2 ml Elutionspuffer IV kann vor Regenerierung der Säule der letzte Rest Protein heruntergespült werden. Dann wird sie mit 3 x 1 ml Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 5 ml MES (20 mM) regeneriert. Die Säule kann nach Zugabe von 1-2 ml Waschpuffer bei 4°C gelagert werden.

3.2.2.11 *Proteinbestimmung nach Bradford*

Dieser Test wurde 1976 von Bradford entwickelt und eignet sich für Proteinbestimmungen in Lösungen, die Pufferchemikalien und reduzierende Stoffe enthalten. Für Proben, die Detergenzien wie Triton X-100 o.ä. enthalten ist dieser Test jedoch ungeeignet.

Spektrophotometer Ultrospec 3000

Pharmacia Biotech

BSA-Eichstandard

Boehringer

Bradford-Reagens (5x):

0,1 g Coomassie Brilliant Blue G 250

Serva

50 ml Ethanol, 50 % (v/v)

Merck

100 ml Phosphorsäure, 85 %

Merck

mit destilliertem Wasser auf 250 ml auffüllen.

Diese Lösung muß vor Gebrauch 1:5 verdünnt und durch einen Faltenfilter

filtriert werden und sollte außerdem mindestens 4 Wochen stehen.

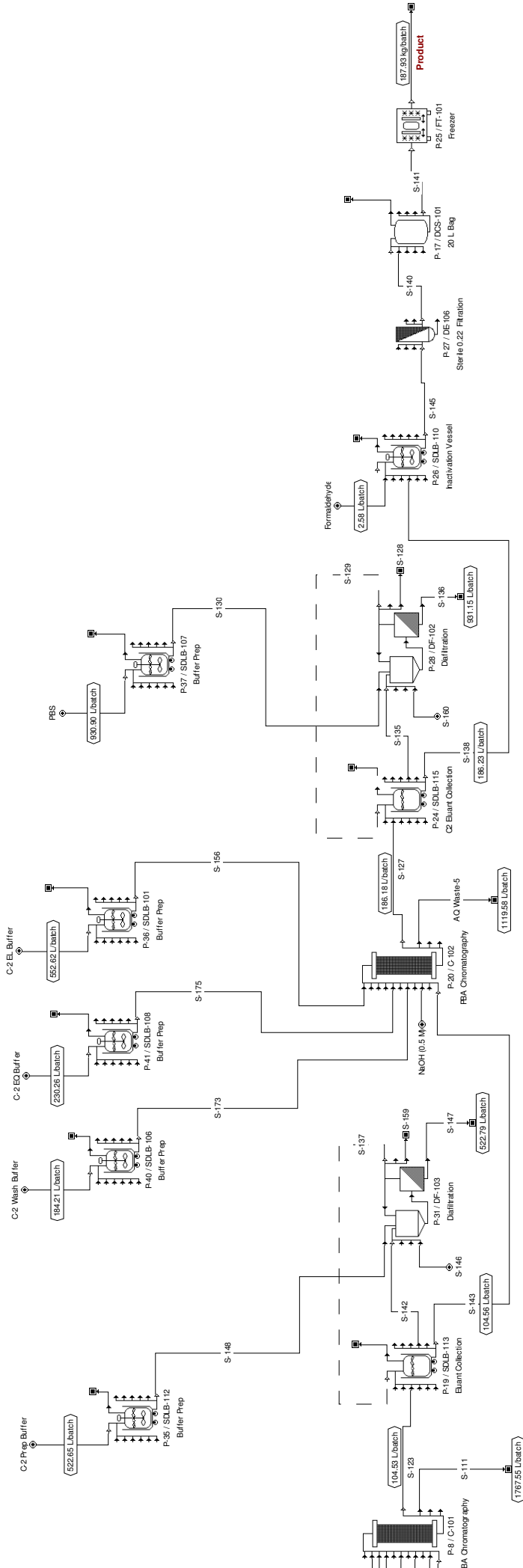
Zu 1,0 ml Bradfordreagenz in einer Küvette werden 50 µl Probenlösung pipettiert. Das Ganze wird gut gemischt und nach 10 min wird die Absorption der Probenlösung bei 595 nm bestimmt. Die Probenlösung sollte 5 bis 50 µg Protein enthalten. Als Leerwert werden 50 µl des zur Probenverdünnung verwendeten proteinfreien Puffers anstelle der Probenlösung pipettiert. Ein Serumalbumin-Standard sollte im Bereich von 1 µg bis 70 µg aufgenommen werden.

3.3 Bioprocess modelled by software "SuperPro"

http://www.intelligen.com/superpro_overview.html

There can be downloaded a evaluation version. With this version diagrams can be built, but not stored (if they have more than 2 elements).

On the next sheet there is a process model example.



التحكم للبيوريكتور (bioreactor automation)

3.4 مواصفات (Specification)

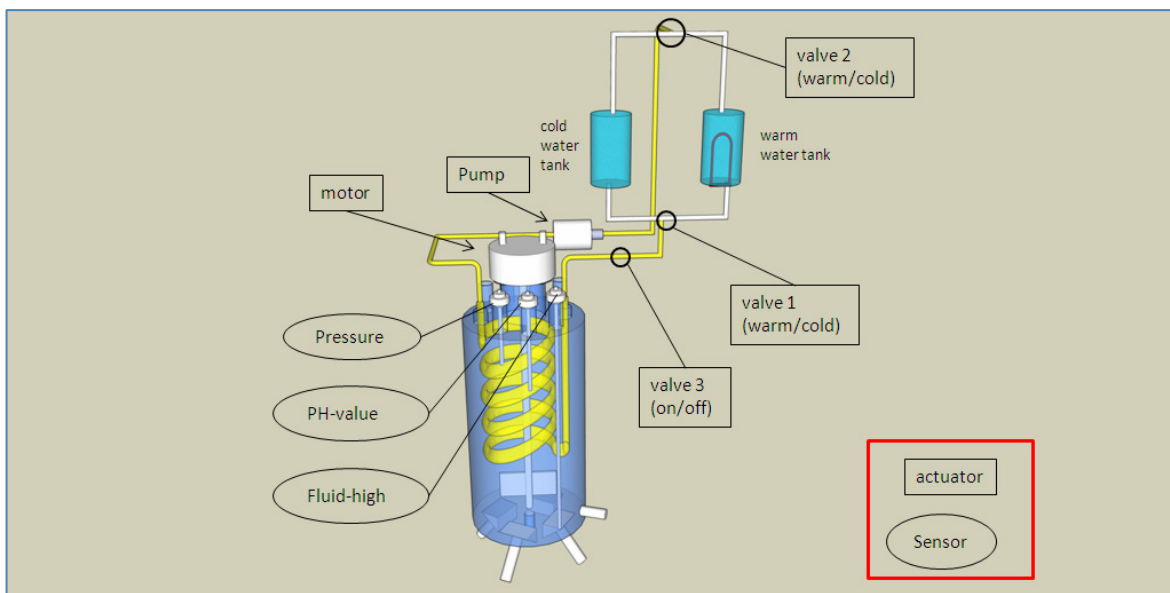
3.4.1 اجهزة الاحساس (sensors)

		مقياس الحرارة داخل البيوريكتور
		مقياس الPH
		مقياس العلوّ

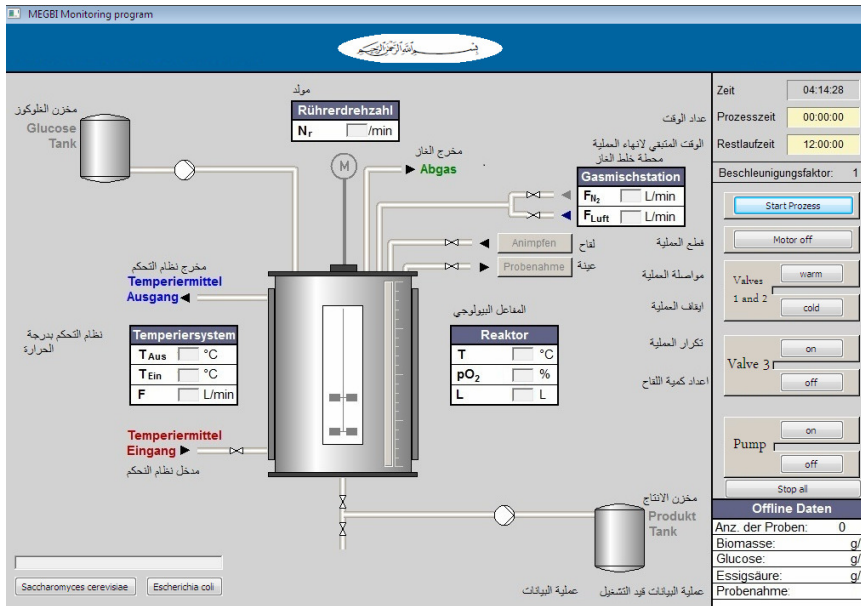
3.4.2 محركات (actuators)

		المولّد (Motor)
		Electronic valve 1
		Electronic valve 2
		Electronic valve 3
		الترومبة (Pump)

System Design 3.5



3.5.1 شاشة التحكم



Implementation 3.6

السفتوير 3.6.1 (Software)

260613_MEGBI.py

```

#-----
# Name:      MEGBI monitoring software
# Purpose:
#
# Author:    abdurrahman
#
# Created:   09/05/2013
# Copyright: (c) aecenar 2013
# Licence:   <AECENAR>
#-----
-----

#!/usr/bin/env python
## -*- coding: iso-8859-15 -*-

import wx
import random
import sys

import time

#import ctypes
from ctypes import *

import thread

#*****                                panel frame
#*****
#*****

wx.SetDefaultPyEncoding("iso-8859-15")
BACKGROUND_IMAGENAME = "reactor-h-bild.bmp"
##"hintergrundbild.jpg"

class MyBackgroundPanel(wx.Panel):

    def __init__(self, parent):
        wx.Panel.__init__(self, parent)
        self.bmp = wx.Bitmap(BACKGROUND_IMAGENAME)
        self.SetSize(self.bmp.GetSize())
        self.Bind(wx.EVT_PAINT, self.on_paint)

    def on_paint(self, event = None):
        dc = wx.BufferedPaintDC(self, self.bmp)

class MyFrame(wx.Frame):

    def __init__(self, parent = None, title = "MEGBI Monitoring program"):

```

1/7

260613_MEGBI.py

```

self.testUSB          = True
self.dll              = None
self.USBAdr0         = 0
self.USBAdr1         = 1
self.USBAdr2         = 2
self.USBOpened       = False
self.counterUSBBoards = 3

wx.Frame.__init__(self, parent, -1, title)

panel = MyBackgroundPanel(self)

LABELSTYLE = wx.BORDER_SUNKEN | wx.ST_NO_AUTORESIZE |
wx.ALIGN_CENTER_HORIZONTAL

#Start Prozess
self.prozess_Start_Flow_Read = wx.Button(panel, -1, "          Start Prozess", pos=(855,202))
self.Bind(wx.EVT_BUTTON, self.OpenMotorANDStartRead, self.prozess_Start_Flow_Read)

#Stop of Motor
self.button_Stop_Read_motor = wx.Button(panel, -1, "          Motor off", pos=(855,242))
self.Bind(wx.EVT_BUTTON, self.StopMotor, self.button_Stop_Read_motor)

#Valve 1 and 2
self.valve_1_and_2_warm = wx.Button(panel, -1, "warm", pos=(910,282))
self.Bind(wx.EVT_BUTTON, self.Valve1AND2Warm, self.valve_1_and_2_warm)
self.valve_1_and_2_cold = wx.Button(panel, -1, "cold", pos=(910,322))
self.Bind(wx.EVT_BUTTON, self.Valve1AND2Cold, self.valve_1_and_2_cold)

#Valve 3
self.valve_3_on = wx.Button(panel, -1, "on", pos=(910,370))
self.Bind(wx.EVT_BUTTON, self.Valve3on, self.valve_3_on)
self.valve_3_off = wx.Button(panel, -1, "off", pos=(910,410))
self.Bind(wx.EVT_BUTTON, self.Valve3off, self.valve_3_off)

#Pump
self.pump_on = wx.Button(panel, -1, "on", pos=(910,466))
self.Bind(wx.EVT_BUTTON, self.PumpOn, self.pump_on)
self.pump_off = wx.Button(panel, -1, "off", pos=(910,506))
self.Bind(wx.EVT_BUTTON, self.PumpOff, self.pump_off)

#Stop all
self.stopp_all = wx.Button(panel, -1, "          Stop all", pos=(845,535))
self.Bind(wx.EVT_BUTTON, self.StopAll, self.stopp_all)

```

2/7

```
#modeselect
self.mode_1 = wx.Button(panel, -1, "Saccharomyces cerevisiae", pos=(10,650))
self.Bind(wx.EVT_BUTTON, self.Mode1, self.mode_1)
self.mode_2 = wx.Button(panel, -1, "Escherichia coli", pos=(165,650))
self.Bind(wx.EVT_BUTTON, self.Mode2, self.mode_2)

# Lable

# Reaktor
self.temperature_reaktor = wx.StaticText(
    panel, size = (26, -1), pos = (595, 380), style = LABELSTYLE
)
self.p_h_reaktor = wx.StaticText(
    panel, size = (26, -1), pos = (595, 405), style = LABELSTYLE
)
self.fluid_high_reaktor = wx.StaticText(
    panel, size = (26, -1), pos = (595, 428), style = LABELSTYLE
)

# Ruehrerzahl
self.n_r_ruehrerzahl = wx.StaticText(
    panel, size = (26, -1), pos = (400, 117), style = LABELSTYLE
)

#Gasmischstation
self.f_n_two_gasmischstation = wx.StaticText(
    panel, size = (26, -1), pos = (722, 194), style = LABELSTYLE
)
self.f_air_gasmischstation = wx.StaticText(
    panel, size = (26, -1), pos = (722, 219), style = LABELSTYLE
)

#Temperiersystem
self.t_aus_temperiersystem = wx.StaticText(
    panel, size = (26, -1), pos = (202, 380), style = LABELSTYLE
)
self.t_ein_temperiersystem = wx.StaticText(
    panel, size = (26, -1), pos = (202, 405), style = LABELSTYLE
)
self.f_temperiersystem = wx.StaticText(
    panel, size = (26, -1), pos = (202, 428), style = LABELSTYLE
)

# Mode
self.mode = wx.StaticText(
    panel, size = (245, -1), pos = (10, 625), style = LABELSTYLE
```

```
)

# Layout
self.Fit()

def on_timer(self, event = None): #new_value =
str(windll.K8061.ReadAnalogChannel(1,1))

# Reaktor
new_value = str(self.dll.ReadAnalogChannel(1,1))
self.temperature_reaktor.SetLabel(new_value)
self.temperature_reaktor.Refresh()
new_value = str(self.dll.ReadAnalogChannel(1,2))
self.p_h_reaktor.SetLabel(new_value)
self.p_h_reaktor.Refresh()
new_value = str(self.dll.ReadAnalogChannel(1,3))
self.fluid_high_reaktor.SetLabel(new_value)
self.fluid_high_reaktor.Refresh()

# Ruehrerzahl
new_value = str(self.dll.ReadAnalogChannel(1,4))
self.n_r_ruehrerzahl.SetLabel(new_value)
self.n_r_ruehrerzahl.Refresh()

#Gasmischstation
new_value = str(self.dll.ReadAnalogChannel(1,5))
#self.f_n_two_gasmischstation.SetLabel(new_value)
self.f_n_two_gasmischstation.Refresh()
new_value = str(self.dll.ReadAnalogChannel(1,6))
#self.f_air_gasmischstation.SetLabel(new_value)
self.f_air_gasmischstation.Refresh()

#Temperiersystem
new_value = str(self.dll.ReadAnalogChannel(1,7))
#self.t_au_temperiersystem.SetLabel(new_value)
self.t_au_temperiersystem.Refresh()
new_value = str(self.dll.ReadAnalogChannel(1,8))
#self.t_ein_temperiersystem.SetLabel(new_value)
self.t_ein_temperiersystem.Refresh()
new_value = str(random.randint(20, 25))
#self.f_temperiersystem.SetLabel(new_value)
self.f_temperiersystem.Refresh()
```


260613_MEGBI.py

```

*****                               Run USB System
*****
*****
*****
def OpenUSBBoardThread(self):
    self.dll = windll.K8061
    i = self.counterUSBBoards
    for doit in range(0,i+1):
        try:
            self.dll.OpenDevice()
            self.USBOpened = True

# debug info
            print 'USB Board is now connected!'
#end debug info
        except:
            txt = 'Please Check USB Board connection'
            print txt
            return

*****                               STOP Motor
*****
*****
*****

def StopMotor(self, event):
    self.dll.ClearDigitalChannel(1,1)
    print 'Digital Channel Cleared, motor turn off'

*****                               START Prozeess
*****
*****
*****

def OpenMotorANDStartRead(self, event):

    wx.MessageBox("Do you want to open motor and start monitoring?", "start
monitoring", wx.OK|wx.ICON_INFORMATION)

# open the USB board

    self.OpenUSBBoardThread()

    time.sleep(0.5)

    self.dll.SetDigitalChannel(1,1)

    self.timer = wx.Timer()
    self.timer.Bind(wx.EVT_TIMER, self.on_timer)
    self.timer.Start(1000)

```

5/7

```
***** Valve 1 and 2 *****
*****
*****
def Valve1AND2Warm(self, event):
    self.dll.SetDigitalChannel(1,2)
    print 'Valve 1 and 2: warm'

def Valve1AND2Cold(self, event):
    self.dll.ClearDigitalChannel(1,2)
    print 'Valve 1 and 2: cold'

***** Valve 3 *****
*****
*****
def Valve3on(self, event):
    self.dll.SetDigitalChannel(1,3)
    print 'Valve 3: on'

def Valve3off(self, event):
    self.dll.ClearDigitalChannel(1,3)
    print 'Valve 3: off'

***** Pump *****
*****
*****
def PumpOn(self, event):
    self.dll.SetDigitalChannel(1,4)
    print 'Pump: on'

def PumpOff(self, event):
    self.dll.ClearDigitalChannel(1,4)
    print 'Pump: off'

***** Stopp all *****
*****
```

260613_MEGBI.py

```

#*****
#*****

def StopAll(self, event):
    self.dll.ClearDigitalChannel(1,1)
    self.dll.ClearDigitalChannel(1,2)
    self.dll.ClearDigitalChannel(1,3)
    self.dll.ClearDigitalChannel(1,4)
    print 'All stopped'

#*****                                     Mode
#*****
#*****
#*****

def Mode1(self, event):
    self.mode.SetLabel("Saccharomyces cerevisiae")
    print 'Saccharomyces cerevisiae'

def Mode2(self, event):
    self.mode.SetLabel("Escherichia coli")
    print 'Escherichia coli'

#*****                                     main definition and Loop
#*****
#*****

def main():
    """Testing"""
    app = wx.PySimpleApp()
    f = MyFrame()
    f.Center()
    f.Show()
    app.MainLoop()

if __name__ == "__main__":
    main()

```

7/7

3.6.2 الهاردوير (Hardware)

- K8061 Test & Diagnosis Utility (Rev. V1.1)
- USB cable
- Boards for sensors und actuators

3.6.3 Example for input/outputs of K8061 for the bioreactor system

#	Unit	Type	Symbol	Input/Output	Port/Pin	Signal	part/range	Remark
1	Emergency switch (Software)	switch	N	I	PH0	Digital	0-1	Bioreactor control OFF
1	rotor	switch	C	O	PJ0-3	Digital	0-1	Turning ON/OFF
1	Pump for heating water	220 V pump with relais	M	O	PA0-1-2	Digital	Stufen 0,1,2,3	Pump control
1	Speed counter with photocell	Hitachi	S _G	I	PT7	digital (impulses)	50 Hz	Drehzahlzähler für Generator
2	Level meter	Farnell	L	I	PA3-4	digital	0-100%	Bioreactor tank
1	Control valve	Danfoss	V	O	PB3-4	digital/analog	1-2/3-1	...
1	Control valve	Danfoss	V	O	PB3-4	digital/analog	1-2/3-1	...
...
5	Temperature sensor	Pt100 TFK01	T	O	PAD00-PAD04	analog (4-20 mA)	-200 - +600°C	
3	Pressure sensor	Mano-meter	p	I	PAD08-PAD10	analog (4-20 mA)	0-180 bar	
3	Mass flow	Danfoss	dm/dt	I	PAD11-PAD13	analog (4-20 mA)		

Table 6.1: Specification for actuators and sensors**Remark:**

In sensors for the output signal is 4-20 mA standard, ie the lowest measured value corresponds to 4 mA, 20 mA corresponds to the top and what is below 4 mA for line fault detection. Actuators at the output signal must be amplified.

3.6.4 Extended USB interface Board K8061

The Velleman K8061 module has 33 Ein-/Outputs and is connected via a USB port on the PC. The connection is galvanically-optically isolated, so that damage to the PC is not possible.

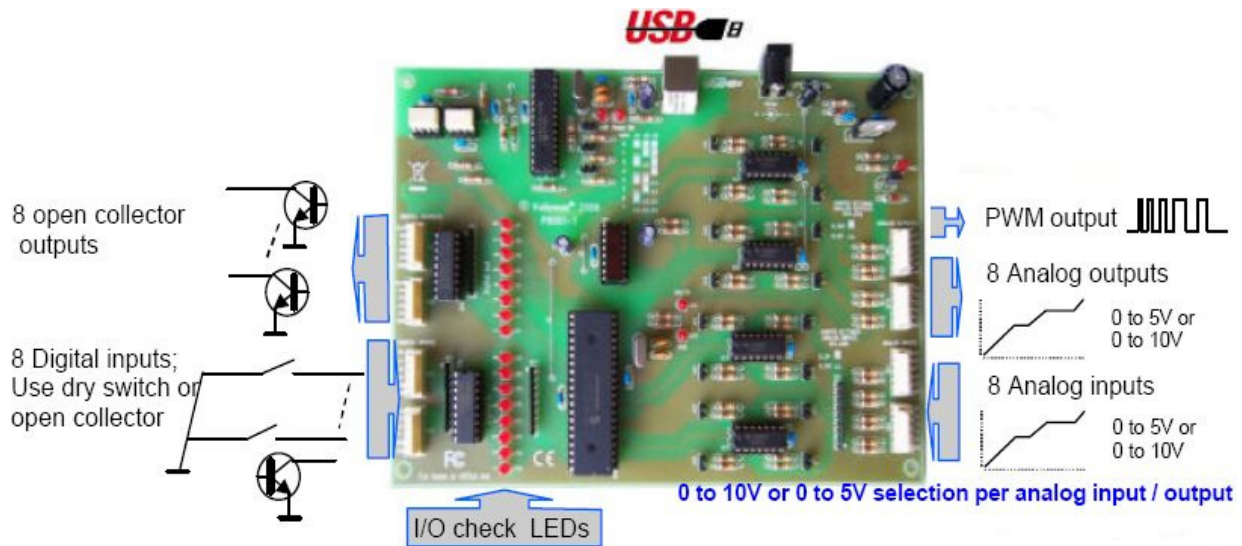


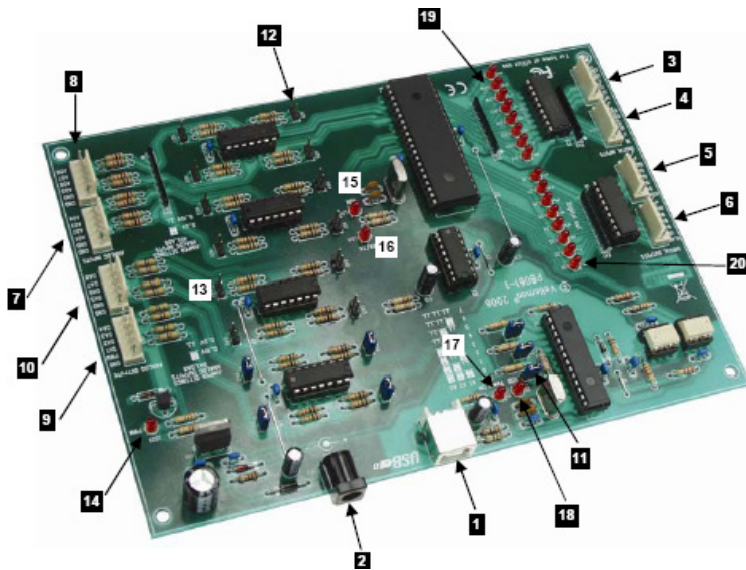
Abb. 8.1-2: I/O-Karte K8061

Characteristics:

- 8 analog Inputs with 10 bit-Auflösung: 0...5 V oder 10 VDC / 20 k Ω
- 8 analog Outputs with 8 bit-Auflösung: 0...5 V oder 10 VDC / 47 Ω
- 8 digital Inputs: „Open Collector“-Kompatibel (Anschluss an GND=0) with integrated LED display
- 8 digitale „Open Collector“-Outputs (max. 50 V/100 mA) with integrated LED display
- One 10 bit PWM-Ausgang: 0 bis 100% „Open Collector“-Ausgang (max 100 mA / 40 V) with integrated LED display
- General response time: 4ms per command
- USB Port: 2.0

Specifications:

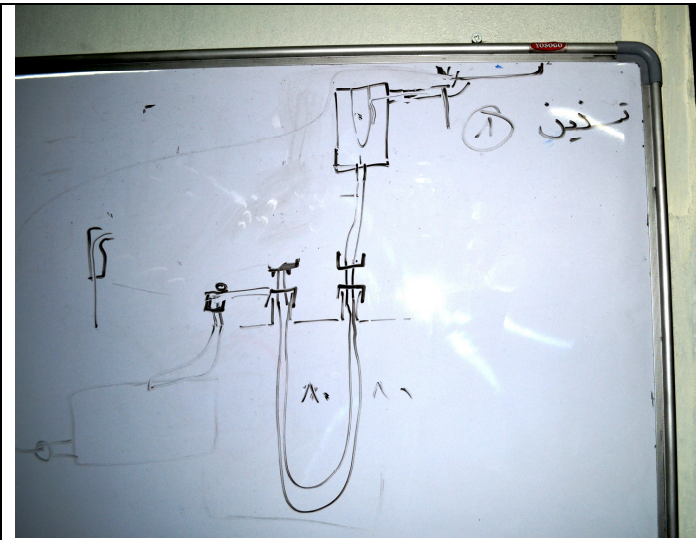
- Power consumption from USB port: about 60 mA
- can be connected to the PC up to 8 cards
- Powered by PS1205 adapter: 12Vdc / 300 mA
- PWM frequency: 15.6 KHz
- Standard time: 48 ms (Microchip and K8061D.DLL drivers)
- Enhanced Execution time: 21 ms (K8061_C.DLL V1.0 for RE applications use)
- PCB Dimensions: 195 x 142 x 20mm (2.7 "x 5.6" x 0.8 ").

Connections of the K8061:

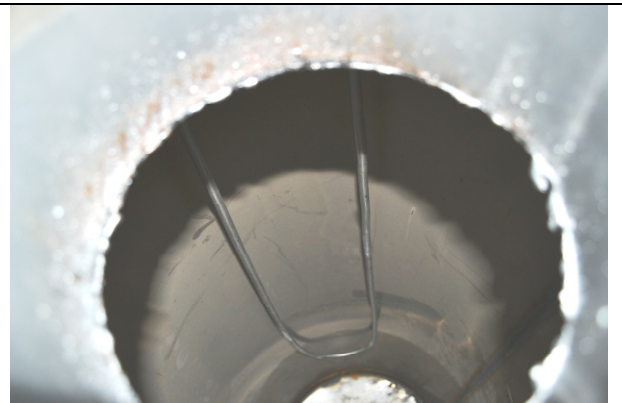
- 1: K8061-PC USB port
- 2: power supply (12VDC non-stabilized, at least 300mA)
- 3 and 4: Digital inputs 1-4/5-8: External "LOW" activate (with GND).
- 5 and 6: Digital Outputs 1-4/5-8: "open collector" outputs
- 7 and 8: Analog inputs 1-4/5-8: With their help, you can digitize read an analog voltage applied to it via the PC.

These inputs require a stable DC voltage (0-5V or 0-10V).

Bioreactor Temperature System Integration



Zeichnung



Temperiersystem innen



Bioreactor_mitTemperiersystem

Chromatographic Purification Device: Specification

3.7 sensor/actuator list

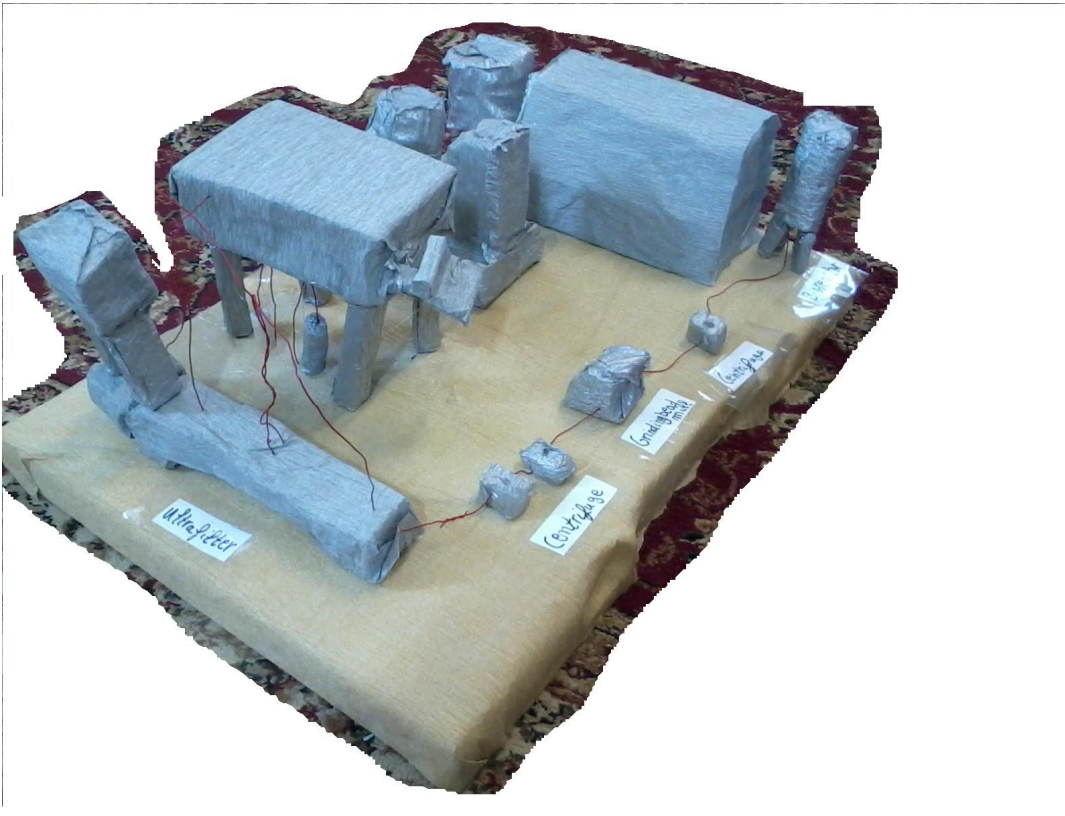
similar to AKTA process

Akta process Sensors and actuators 13.12.13

Teil	Anzahl	Item Price
Air trap	1	
Filter	1	
Filter vent valve	1	
Capsule filter bottom manual valve	1	
Capsule filter top manual valve	1	
System pump	2	
Sample pump	1	
Pressure control valve	2	
Buffer A inlet valves	10	
Buffer B inlet valves	6	
Sample connection valve	1	
Sample inlets valves	2	
Air trap inlet valve	1	
Air trap bypass valve	1	
Air trap vent valve	1	
Air trap outlet valve	1	
Filter inlet valve	1	
Filter bypass valve	1	
Filter outlet valve	1	
System connection valve	1	
Column 1 top inlet valve	1	
Column 1 bottom inlet valve	1	
Column 1 top valve	1	
Column 1 bottom valve	1	
Column 1 top outlet valve	1	
Column 1 bottom outlet valve	1	
Column 2 top inlet valve	1	
Column 2 bottom inlet valve	1	
Column 2 top valve	1	
Column 2 bottom valve	1	
Column 2 top outlet valve	1	
Column 2 bottom outlet valve	1	
Outlet valves	9	
Air trap drain valve	1	
Filter drain valve	1	
CIP / AxiChrom manifold	1	
Buffer inlet air sensor	1	
Pre-column air sensor	1	
Post-column pH-meter	1	

Post-column UV-meter	1
Pre-column conductivity meter	1
Post-column conductivity	1
System flow meter	1
Air trap high level meter	1
Air trap low level meter	1
Pre-filter pressure meter	1
Pre-column pressure meter	1
Sample pump pressure meter	1
PCV pressure meter, A inlets	1
PCV pressure meter, B inlets	1

Mock-up model for the MEBGI vaccine pilot plant



<http://www.biopharminternational.com/biopharm/Downstream+Processing/Recombinant-Vaccine-Production-in-Yeast/ArticlesStandard/Article/detail/485189>

[Patent Engerix B] Patent Engerix B (rHBsAg produced in *S. cerevisiae*)" SmithKline Beecham, 1998 (US), vaccination against hepatitis B

[Braun 2001] Fluoreszenz-optimierte Detektion heterologer Protein-Protein Interaktionen in *Saccharomyces cerevisiae* als Alternative zur Yeast Two Hybrid Methode DISSERTATION der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften 2001

vorgelegt von Manuela Braun

Datum der mündlichen Prüfung 14. Mai 2001

Dekan Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter Prof. Dr. J. P. Ruppertsberg

2. Berichterstatter Prof. Dr. D. Mecke

[Walsh 2007] Gary Walsh, "Pharmaceutical Biotechnology – Concepts and Applications", Wiley, Chichester/England, 2007

[AKTA Process Technical Manual]

Dictionnaire English – Arab

Please see <http://www.arab-ency.com/>

dialysis	in biochemistry, dialysis is the process of separating molecules in solution by the difference in their rates of diffusion through a semipermeable membrane, such as dialysis tubing.	
cellular		خلوية
detergents	Reinigungsmittel	المنظفات
dialysis		
protein expression		تعبير بروتيني
heterologous protein		بروتين لجين خارجي
thioredoxin		ذيوريدوكسين
plasmid		بلازميد
fusion protein		البروتين الانصهاري
Medium (Media)/ Culture Medium	Medium	مستنبت
purification		تنقية
incubation		احتضان
hydrophobic		هيدروفوبية
stimulated		محفز
Ammonium sulfate precipitation	Ammonium sulfate precipitation is a method used to purify proteins by altering their solubility. It is a specific case of a more general technique known as salting out .	ترقيد كبريتات الأمونيوم
recombinant		مؤتلف
glycoproteins		البروتينات السكرية
Mannose		مأنوز
immunogenic		
initialization		الاستهلال
sensors	Sensoren	اجهزة الاحساس

to research : Ti 15 rotor from Beckman