

DE OEC BMBI Szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-001	
	Érvényessége: 2013. szeptember 1-től	
<b>Lentivírus termelés és sejtek virális transzdukciója</b>		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum
Tartalma: 7 oldal	A kétszer egyoldalas melléklettel együtt	
Referenciák: Design and Production of HIV-derived vectors (Salmon P and Trono D) In Cell Biology: A Laboratory Handbook, 3 <sup>rd</sup> Edition, Elsevier, San Diego		

<b>Felülvizsgálta (dátum/aláírás):</b>	<b>Ellenőrizte:</b>	<b>Jóváhagyta:</b>

DE OEC BMBI szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-001	
címe: <b>Lentivírus termelés és sejtek virális transzdukciója</b>		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum

## 1. Tartalma

293T sejtek transzfekciója a lentivírus termeléshez szükséges plazmidokkal, vírustermelés és gyűjtés, koncentráció. 293T sejtek transzdukciója a megtermelt vírus preparátummal. Az itt felvázolt munkautasítások lehetővé teszik a lentivírusok termelését, biztonságos kinyerését és a velük történő további munkafolyamatokat.

## 2. Hatálya

A Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum (DE OEC) dolgozóira vonatkozik, akik engedéllyel rendelkeznek a DE OEC BMBI-BSL2 laboratórium használatára.

## 3. A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

### 3.1 Anyagok

- Sejtek: 293T emlős sejtek
- Tápfolyadék: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)
- Fetal Bovine Serum (FBS)
- Penicillin/Streptomycin oldat
- Polietilénimin (PEI) oldat: pH 7.0 Sterilre szűrjük 0.22 µm-es szűrővel.
- 150 mM NaCl oldat
- Plazmidok:
  - 10 µg pWOX-CMV-GFP
  - 6.5 µg pMDLg/pRRE
  - 2.5 µg pRSV.rev

DE OEC BMBI szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-001	
címe: <b>Lentivírus termelés és sejtek virális transzdukciója</b>		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum

3.5 µg pMD.G

13 µg lazac sperma DNS

### 3.2 Eszközök

Eppendorf centrifuga

15 és 50 ml-es Falcon műanyag centrifugacsövek

T75-ös sejttenyésztő flasks

24 lyukú sejttenyésztő plate-ek

20 ml-es fecskendők

0,45 µm-es fecskendőszűrők (Millex-Durapore, Meck)

Pipettor (5, 10 és 25 ml-es egyszer használatos steril műanyag hegyekkel)

50 ml-es ultracentrifuga csövek

### 4. A vizsgálathoz használt minták előkészítése

A 293T sejteket 70%-os konfluenciára növesztjük. A BSL2 laboratóriumban termelt víruspreparátumot a feldolgozás előtt vagy közben tilos kivinni, illetve más laboratóriumban tárolni.

A transzfekcióhoz és transzdukcióhoz szükséges oldatokat előre el kell készíteni és a BSL2 laboratórium 4 fokos hűtőjében kell tárolni. Minden preparált oldat és tápfolyadék esetében jelezni kell, hogy ki készítette az oldatot és a lejáratot is fel kell tüntetni.

DE OEC BMBI szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-001	
címe: <b>Lentivírus termelés és sejtek virális transzdukciója</b>		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum

## 5. A vizsgálat lépései

### 5.01. 293T sejtek transzfekciója:

5.01.01. 0. nap: A sejteket úgy növesztjük fel, hogy a kísérlet tervezett napjára 70%-os konfluenciát érjenek el.

5.01.02. 1. nap: A plazmidokat egy 15 ml-es centrifugacsőben összekeverjük és sterilre szűrt 150 mM-os NaCl-oldatból annyit adunk hozzá, hogy az össztérfogatuk 1 ml legyen. Egy Eppendorf csőben 56.3 µl PEI-oldatot összekeverünk 943.7 µl 150 mM-os sterilre szűrt NaCl-oldattal (össztérfogat 1 ml). 1 ml-es pipettával a PEI-oldatot cseppenként (kb. 1 csepp/másodperc sebességgel) hozzáadjuk a DNS-oldathoz és 15-30 percet szobahőmérsékleten inkubáljuk.

5.01.03. Az inkubáció után szívjuk le a sejtekről a tápfolyadékot, mossuk a sejteket 10 ml PBS-el, majd adjunk hozzá 5 ml csak 1% FBS-t tartalmazó DMEM-t. Óvatosan adjuk a sejtekhez a transzfekciós komplexet (PEI + plazmidok). 6 óra termosztátban való inkubálás után cseréljük le a tápfolyadékot 15 ml 10% FBS-t tartalmazó DMEM-re.

5.01.04. A 2. 3. és 4. napon egyaránt szívjuk le a vírust tartalmazó felülúszót és adjunk a sejtekhez 15 ml 10% FBS-t tartalmazó DMEM-t. A felülúszót 2500 RPM-el centrifugáljuk 10 percig, 4 °C-on, majd 0.45 µm PVDF fecskendőszűrőn, fecskendő és injekciós tű segítségével átszűrjük. A felülúszókat a következő napig hűtőben, 4 °C-on tároljuk.

5.01.05. 4. nap: A vírust tartalmazó egyesített felülúszókat ultracentrifugálással (2 óra, 100 ezer g, 4 °C) koncentrálnak. A felülúszókat tartalmazó ultracentrifuga csöveket lemérjük, fecskendővel, injekciós tűvel adagolt steril MQ vízzel kiegyensúlyozzuk. Jégen visszük át a másik épületbe, ügyelve arra, hogy a centrifugacsövekhez már ne érjen jég vagy víz! A centrifugába a csövön lévő feliratnak megfelelően tesszük be, annak érdekében, hogy akkor is tudjuk, hogy hol a pellet ha kevésbé látszana.

DE OEC BMBI szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-001
címe: <b>Lentivírus termelés és sejtek virális transzdukciója</b>	
Készítette:	aláírás dátum
Ellenőrizte:	aláírás dátum
Jóváhagyta:	aláírás dátum

A visszahozott mintákról, a sejtlabor fülkéje alatt óvatosan leszívjuk a felülúszót, és a pelletet 200 µl PBS-ben oldjuk, majd szétosztjuk 50 µl-es részletekben és felhasználásig -70 °C-on tároljuk.

#### 5.02. 293T sejtek transzdukciója a koncentrált vírussal:

5.02.01. 0. nap: a transzdukálni kívánt emlős sejteket 24 lyukú lemezre helyezük úgy, hogy a kísérlet napjára 50%-os konfluenciát érjenek el.

5.02.02. 1. nap: a tápfolyadékot leszívjuk (NEM mossuk PBS-sel!), majd 120 µl tiszta DMEM-t (FBS, glutamin és Penicillin-Streptomycin NÉLKÜL!) adunk hozzá. Pipettával vírust tartalmazó PBS-t adunk cseppenként a sejtekhez.

5.02.03. 2. nap: A sejteken lévő tápfolyadékot kiegészítjük 120 µl olyan DMEM-el, amely dupla mennyiségű FBS-t, glutamint és Penicillin-Streptomycin-t tartalmaz.

5.02.04. 6. nap: A tápfolyadékot eltávolítjuk és a sejteket PBS-el mossuk. A sejteket 1 ml PBS-ben felkavarjuk és Eppendorf csőbe tesszük. Lecentrifugáljuk, a felülúszót eldobjuk, majd a sejt pelletet PBS-ben oldjuk.

Újból lecentrifugáljuk, a felülúszót eldobjuk, és a pelletet 1% formaldehidet tartalmazó PBS-ben oldjuk (fixáljuk a sejteket), majd a mintákat FACS csőbe tesszük.

5.02.05. Az így begyűjtött sejtek azonnal analizálhatók áramlási citometriával vagy 4 °C-on tárolhatjuk őket a későbbi vizsgálatig.

### **6. Értékelés**

6.01. A transzfekció eredményeként meg kell határozni, hogy mennyi viriont tartalmaz az 5.01.05. lépésnél keletkezett PBS-ben beoldott preparátum a Reverse transcriptase assay

DE OEC BMBI szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-001	
címe: <b>Lentivírus termelés és sejtek virális transzdukciója</b>		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum

(Reverse Transcriptase Assay, colorimetric, Roche) segítségével. Valamint a flaskában maradt sejteket mikroszkóppal ellenőrizzük, hogy zölden fluoreszkálnak-e.

Továbbá a transzdukció eredményeként a fertőzött (GFP-t termelő) sejtek arányát határozzuk meg áramlási citometria segítségével.

## 7. Dokumentálás

A vizsgálat lépéseiről jegyzőkönyvet kell készíteni, mely tartalmazza mindazokat az adatokat és információkat, ami a kísérlet reprodukálásához szükséges. A jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell, a transzdukció és a porciózás dátumát, valamint a tömény minta koncentrációját.

A transzdukció esetében pontosan rögzíteni kell a kísérlet körülményeit (alkalmazott vírusedménység, esetleges adalékanyagok, gátlószerek koncentrációja), valamint a későbbi citometriás mérés eredményeit. Az eredmények dokumentálásához a mellékelt 2 táblázat használata kötelező.

## 8. Munkavédelmi, higiénés rendszabályok

A BSL2 laboratórium általános szabályai ennél a munkafolyamatnál is érvényesek, s szigorúan betartandók. A steril sejtenyésző fülkék használatát és tisztítását a BSL2-005 számú leírásban külön részletesen ismertetjük.

Az ismertetett lépések túlnyomó részét steril fülke alatt kell elvégezni. Ez az jelenti, hogy a transzdukció során a plazmidokat, illetve a transzdukciós elegyet steril fülke alatt mérjük össze, a vírust tartalmazó felülúszó gyűjtése, ill. centrifugacsövekbe való kitöltése, majd későbbi szűrése is csak a steril fülke alatt végezhető. Továbbá steril fülke alatt történnek a transzdukció lépései és a fertőzött sejtek gyűjtése is. Természetesen az ultracentrifuga csövek kiegyensúlyozása, az áramlási citometriás analízis és a sejtek/vírusok centrifugálása a fülkén kívül történik. Ezekben

DE OEC BMBI szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-001	
címe: <b>Lentivírus termelés és sejtek virális transzdukciója</b>		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum

az esetekben (a kiegyensúlyozás időtartamától eltekintve) viszont a sejteket zárt centrifugacsövekben kell tárolni, s ügyelni kell arra, hogy a fülkéből kikerülő csövek külseje szennyeződést ne tartalmazzon.

Az egész procedúra során keletkező szennyezett fecskendőket, szűrőket, sejtekkel szennyezett centrifugacsöveket, pipetta hegyeket a fülke mellett elhelyezett zárható badellába kell kidobni. A badellákon fel van tüntetve hogy 'biohazard', ezekhez a takarító személyzet nem nyúlhat, ha megteltek légmentesen le kell zárni őket. Az eljárás során keletkeznek olyan folyadékok (pl. a transzdukált sejtek felülúszója), melyek viszonylag tömény potenciálisan veszélyes sejtuszpenziót tartalmaznak, ezek elsőként Clorox-ot tartalmazó tárolóedényekbe kerülnek majd ezután helyezhetőek át a badellákba.

Különösképpen arra kell vigyázni, hogy ne szennyeződjön be a steril fülke a sejteket vagy vírust tartalmazó felülúszóval. Ha véletlenül mégis rácseppen a biológiai anyagot tartalmazó folyadék a fülke felületére vagy oldalára, akkor azonnal fertőtlenítő szerrel (SprayIn-TEVA) le kell kezelni a szennyezett felületet, majd eltávolítani a szennyezést és többször gondosan áttisztítani a kontaminált területet. A sejtlaborban végzett műveletek során kötelező az előírt védőfelszerelés használatát: a BSL2 laboratórium használatra dedikált fehér köpenyt kell viselni, továbbá minden művelet során gumikesztyűt kell hordani. Ha a munka során a kesztyű biológiai szennyeződéssel kontaminálódik, akkor azonnal új kesztyűt kell felvenni. Az eljárás során a dupla védőkesztyű használata javasolt, transzfekciónál az első vírus felülúszó gyűjtésétől (2. nap.), a transzdukció alatt pedig a folyamat minden lépésénél.