

DE OEC BMBI Szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-002	
	Érvényessége: 2013. szeptember 1-től	
Retrovírus termelés és sejtek virális transzdukciója		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum
Tartalma: 7 oldal	A két darab egyoldalas melléklettel együtt	
Referenciák: Promega phoenix_helper_free.html; Pear WS, Scott ML, Nolan GP: Rapid production of high titer, helper-free retroviruses using transient transfection		

Felülvizsgálta (dátum/aláírás):	Ellenőrizte:	Jóváhagyta:

DE OEC BMBI szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-002
Retrovírus termelés és sejtek virális transzdukciója	
Készítette:	aláírás dátum
Ellenőrizte:	aláírás dátum
Jóváhagyta:	aláírás dátum

1. Tartalma

Főnix A sejtek transzfekeciója a retrovírus termeléshez szükséges plazmidokkal, vírustermelés és gyűjtés, koncentráció. HUVEC (humán köldökvénából származó endothel sejtek) sejtek transzdukciója a megtermelt vírus preparátummal. Az itt felvázolt munkautasítások lehetővé teszik a retrovírusok 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: Főnix A emlős sejtek (Promega), HUVEC sejtek

Tápfolyadék: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), M-199

Mosófolyadék: PBS, Hanks' balanced salt solution

Fetal Bovine Serum (FBS),

Penicillin/Streptomycin oldat 1%

L-Glutamine 1%

Amphotericin

Hepes puffer

EGM-2 (Lonza)

Opti-mem (Gibco)

Lipofectamine (Invitrogen)

DE OEC BMBI szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-002	
Retrovírus termelés és sejtek virális transzdukciója		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum

Plazmid: 36 µg pBabe-neo.hTert

3.2 Eszközök

Eppendorf centrifuga

15 és 50 ml-es Falcon műanyag centrifugacsövek

1.5ml-es Eppendorf csövek

T75-ös sejttenyésztő flasks

24 lyukú sejttenyésztő plate-ek

20 ml-es fecskendők

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

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

Automata-pipetták (1000µl, 200µl, 20µl, 10 µl steril hegyekkel)

50 ml-es ultracentrifuga csövek (Amicon Ultra)

4. A vizsgálatához használt minták előkészítése

A Fönix A (Promega) 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 lejáratidőt is fel kell tüntetni.

5. A vizsgálat lépései

5.01. Fönix A sejtek transzfekciója:

DE OEC BMBI szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-002	
Retrovírus termelés és sejtek virális transzdukciója		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum

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: Transzfektálás előtt 2 órával tápfolyadékot cserélünk és csak 10 ml DMEM-t (2% FBS tartalmú) teszünk egy T75-ös sejttenyésztő flaskára.

5.01.03. 1. nap: Lipofectamine-t Eppendorf csőben összekeverünk Opti-mem-mel (végtérfogat: 300 μ l/T75 flaska), illetve ezzel párhuzamosan a plazmidot (DNS-t) egy másik Eppendorf csőben elkeverjük az Opti-mem-mel (végtérfogat: 300 μ l/T75 flaska). A DNS-t a lipofectaminnal végül 1:2.5 arányban kell majd használni, ennek megfelelően kell az opti-mem-mel kiegészíteni őket (36 μ g DNS (plazmid) egy T75 flaskához; a midipreppel nyert plazmid koncentrációjából kiszámoljuk, hogy hány μ l kell a plazmid-ból, hogy a kívánt 36 μ g plazmid-ot vigyük be a transzfektálás során. A kiszámolt X μ l-t kivonjuk 300 μ l-ből, ennyi Opti-mem-mel egészítjük ki. Ezután a lipofectamine mennyiségét is kiszámoljuk, $36 \times 2.5 = 90 \mu$ l, így 210 μ l Opti-memet adunk hozzá, hogy a végtérfogat 300 μ l legyen. 5 percig szobahőmérsékleten kell inkubálni a két keveréket (300 + 300 μ l), majd ezt követően a lipofectamine-os oldatot hozzá kell adni a DNS-es keverékhez és 20 percig inkubálni szobahőmérsékleten (végtérfogat 600 μ l). Végezetül a sejtekhez kell adni az oldatot, óvatosan elkeverve. Ezt a lépést délután érdemes elkezdeni mivel a termosztátban 37 °C-on kell őket inkubálni 15 órán át.

5.01.04. 2. nap: A következő nap reggel szívjuk le a sejtekről a transzfekciós tápfolyadékot, és cseréljük le 15 ml 10% FBS-t tartalmazó DMEM-re.

5.01.05 A 3. és 4. napon egyaránt szívjuk le a vírust tartalmazó felülúszót és adjunk a sejtekhez 15 ml 10% FBS-t tartalmazó DMEM-et. A felülúszót 2500 RPM-el centrifugáljuk 10 percig, 4 °C-on, majd 0.45 μ m 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 és fecskendővel, injekciós tűvel adagolt steril MQ vízzel kiegyensúlyozzuk. Jégen visszük át a

DE OEC BMBI szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-002	
Retrovírus termelés és sejtek virális transzdukciója		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum

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.

Visszahozva a mintákat, a sejtlaborban fülke alatt a felülúszót óvatosan leszívjuk és a pellet-et 200 µl PBS-ben oldjuk. Majd szétszítjuk 50 µl-es részletekben és felhasználásig -70 °C-on tároljuk.

5.02. HUVEC sejtek transzdukciója a koncentrált vírussal:

5.02.01. 0. nap: a transzdukálni kívánt emlős sejteket 24 lyukú lemezre helyezzük 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 M-199(FBS, Hepes, L-glutamin, Penicillin-Streptomycin, amphotericin és EGM2 NÉLKÜL!) médiumot adunk hozzá. Majd ezt követően pipettával vírust tartalmazó PBS-t adunk cseppenként a sejtekhez.

5.02.03. 2. nap: A sejteken lévő tápfolyadékot kiegészítjük 120 µl olyan M-199-el, amely dupla mennyiségű FBS-t, glutamint, Penicillin-Streptomycin-t, amphotericint és EGM2-t tartalmaz.

5.02.04. 6. nap: A tápfolyadékot eltávolítjuk és a sejteket PBS-sel mossuk, majd 500 µl bekevert M-199-et (10% FBS, 1% L-glutamin, 1% Pen-Strep, 1% Amphotericin, 2% Hepes, 10%EGM-2) adunk a sejtekhez.

5.02.04. 7. nap: Leszívjuk a tápfolyadékot a sejtekről és 500 µl, a szelekciós komponenst megfelelő koncentrációban tartalmazó M-199-et teszünk a sejtekre. A Pbabe -neo hTert vektor esetén G418-at alkalmazunk szelekciós komponensként. (HUVEC sejteken tesztelve korábban hígítási sort készítettünk a G418 hatékony koncentráció megállapítása céljából, ennek alapján 10 mg/ml törzsoldatból 900 µl-t teszünk 50 ml M-199 tápfolyadékba).

5.02.04 8. naptól naponta tápfolyadékot cserélünk, így eltávolítjuk az elpusztult sejteket.

Kontrollként 1 well-en vírusos transzdukción nem átesett sejtekre is szelekciós komponenst

DE OEC BMBI szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-002	
Retrovírus termelés és sejtek virális transzdukciója		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum

tartalmazó M-199-et teszünk, egy további well-en pedig szelekciós komponens nem tartalmazó M-199-e t teszünk. A szelekciós tápfolyadékot addig alkalmazzuk, amíg a vírusos transzdukción nem átesett sejtek el nem pusztulnak. Ezután a szelekciós komponens felére csökkentjük a médiumban.

6. Értékelés

6.01. A transzfekeció eredményeként meg kell határozni, hogy mennyi virion tartalmaz az 5.01.05. lépésnél keletkezett PBS-ben beoldott preparátum. A virion mennyiségének meghatározása reverz transzkriptáz assay (Reverse Transcriptase Assay, colorimetric, Roche) segítségével történik. Továbbá a szelekciós markert tartalmazó M-199 tápfolyadékon lévő sejtek túlélése is jelzi, hogy sikeres volt-e a transzdukció.

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 transzfekeció és a porciózás pontos dátumát, valamint a tömény minta koncentrációját és mennyiségét.

A transzdukció esetében pontosan rögzíteni kell a kísérlet körülményeit (alkalmazott vírusmennyiség, esetleges adalékanyagok, gátlószerek koncentrációja), valamint a későbbi analízisek pl. citometriás mérések eredményeit. Az eredmények dokumentálásához a mellékelt két darab táblázat használata kötelező.

8. Munkavédelmi, higiénés rendszabályok

A BSL2 laboratórium általános szabályai ennél a munkafolyamatnál is érvényesek, s szigorúan betartandók. A steril sejtenyésztő 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 transzfekeció során a plazmidokat, illetve a transzfekeciós elegyet steril fülke alatt mérjük össze.

DE OEC BMBI szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-002	
Retrovírus termelés és sejtek virális transzdukciója		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum

Továbbá a vírust tartalmazó felülúszó gyűjtése, ill. centrifugacsövekbe való kitöltése, majd későbbi szűrése is csak a steril fülke alatt végezhető. Továbbá a steril fülke alatt történnek a transzdukció lépései és a fertőzött sejtek gyűjtése is. Természetesen az ultracentrifuga csövek kiegyensúlyozása, az esetleges áramlási citometriás analízis és a sejtek/vírusok centrifugálása a fülkén kívül történik. Ezekben 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 SUMA D4 (hipót) oldatot 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 véletlen mégis rácseppen a biológiai anyagot tartalmazó folyadék a fülke felületére vagy oldalára, akkor azonnal fertőtlenítő szerrel (SprayIn-TEVA/Mikozid AF Liquide) 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 használat: 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, transzdukciónál az első vírus felülúszó gyűjtésétől (2. nap.), transzdukció alatt pedig a folyamat minden lépésénél.