

DE AOK BMBI Szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-019	
	Érvényessége: 2014. november 1-től	
Lentivírus termelése HEK293FT sejtekben és sejtek virális transzdukciója		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum
Tartalma: 9 oldal	A három egyoldalas melléklettel együtt	
Referenciák: http://www.lifetechnologies.com : 293FT Cell Line Manual; http://tronolab.epfl.ch/webdav/site/tronolab/shared/Vector%20Production%20EPFL%202007.pdf		

Felülvizsgálta (dátum/aláírás):	Ellenőrizte:	Jóváhagyta:

DE AOK BMBI szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-019	
Lentivírus termelése HEK293FT sejtekben		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum

1. Tartalma

HEK293FT sejtek transzfekciója a lentivírus termeléshez szükséges plazmidokkal, vírustermelés, gyűjtés és koncentráció. Az itt felvázolt munkautasítások lehetővé teszik a lentivírusok termelését 2 db T75-ös sejttenyésztő edényben, biztonságos kinyerését és tárolását további munkafolyamatokhoz.

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: HEK293FT emlős sejtek (Life Technologies)

Alap tápfolyadék: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)

Fetal Bovine Serum (FBS),

Komplett tápfolyadék: DMEM/ RPMI tápfolyadék a következőkkel kiegészítve: 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin oldat, 1% Piruvát oldat (100 mM törzsoldatból), 2% L-glutamin (200 mM törzsoldatból).

Mosófolyadék: PBS

TE 0,1x: 1 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8,8

HBS2x: 280 mM NaCl, 100 mM HEPES, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 7,11-7,13

2,5 M CaCl₂

Steril Milli-Q víz

DE AOK BMBI szabványműveleti előírás	Szám: BSL2-019	
Lentivírus termelése HEK293FT sejtekben		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum

Endotoxin mentes plazmid midiprepek:

22,4 µg transzferálandó gént tartalmazó lentivirális vektor

7,46 µg pMD2G VSV-G envelop kódoló vektor

14,5 µg psPAX2

3.2 Eszközök

Eppendorf centrifuga

15 és 50 ml-es Falcon műanyag centrifugacsövek

1,5 ml-es Eppendorf csövek

T75-ös sejttenyésztő flaskák

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 (1000 µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl steril hegyekkel)

50 ml-es centrifugális koncentrátor csövek (Amicon Ultra-15 – 100 kDa, Millipore)

4. A vizsgálathoz használt minták előkészítése

A HEK293FT (LifeTechnologies) sejteket 70%-os konfluenciára növesztjük. A BSL2 laboratóriumban termelt víruspreparátumot a feldolgozás előtt vagy közben tilos kivinni, illetve más laboratóriumban tárolni.

A transzfekcióhoz szükséges oldatokat előre el kell készíteni és a BSL2 laboratórium 4 °C-os hűtőjében kell tárolni. Minden preparált oldat és tápfolyadék esetében jelezni kell, hogy ki készítette az oldatot és a lejáratit időt is fel kell tüntetni.

DE AOK BMBI szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-019	
Lentivírus termelése HEK293FT sejtekben		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum

5. A vizsgálat lépései

5.01. HEK293FT sejtek transzfekciója és a termelt vírus gyűjtése:

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 6 órával lecseréljük a tápfolyadékot és csak 10 ml komplett DMEM-et adunk a sejtekhez.

5.01.03. 1. nap: A szükséges plazmidokat egy 50 ml-es centrifugacsőbe mérjük. A következő reagenseket adjuk hozzá, a következő sorrendben:

0,667 ml TE 0,1x oldat

0,346 ml steril Milli-Q víz

113,3 µl 2,5 M CaCl₂-oldat

Az elegyhez folyamatosan keverve, autoklávozott filteres Pasteur-pipettán pipettorral keresztül buborékoltatott levegővel, lassan, cseppenként hozzáadunk 1,13 ml HBS2x oldatot.

Az így kapott szuszpenziót minimum 5, maximum 30 percig szobahőmérsékleten állni hagyjuk (optimálisan 20 perc).

Állás után 0,9 ml szuszpenziót csepegtetünk óvatosan, egyenletesen egy T75-ös sejttenyésztő edényben lévő HEK 293FT sejtekre. Gyengéden, éppen csak megkeverve a sejttenyésztő edényben a folyadékot. Ezután másnap reggelig inkubáljuk a sejteket (kb. 14-16 óra).

5.01.04. A 2. nap reggel (kb. 14-16 óra elteltével) szívjuk le a sejtekről a transzfekciós tápfolyadékot, és cseréljük le 10 ml komplett DMEM-re. A leszívott felülúszóval úgy bánjunk, ami már potenciálisan tartalmazhat fertőzőképes vírusokat!

5.01.05. A 3. és 4. napon a reggeli órákban egyaránt gyűjtjük össze a vírust tartalmazó felülúszót és adjuk a sejtekhez 10 ml komplett DMEM-et. A felülúszót 1500 RPM-el centrifugáljuk 5

DE AOK BMBI szabványműveleti előírás	Szám: BSL2-019	
Lentivírus termelése HEK293FT sejtekben		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum

percig, 4 °C-on, majd 0.45 µm PVDF fecskendőszűrőn fecskendő segítségével átszűrjük. A felülúszókat a következő napig hűtőben, 4 °C-on tárolhatjuk, de azonnal frakciókban fagyaszthatjuk is.

5.01.06. A vírust tartalmazó felülúszót koncentrálhatjuk 50 ml-es centrifugális koncentrátor csövekkel: A centrifugált, szűrt vírusos felülúszót a koncentrátor csőbe töltjük, majd a cső lezárása, fertőtlenítése után a centrifugában 2500-3000 RPM-mel (mindenképp kevesebb, mint 4000g) koncentráljuk a kívánt térfogatra.

Alikvotokban fagyaszthatjuk és felhasználásig -70 °C-on tároljuk.

5.01.07. Ha szükséges a vírust tartalmazó egyesített felülúszókat ultracentrifugálással (2 óra, 100 000 g, 4 °C) koncentrálhatjuk. A felülúszókat tartalmazó ultracentrifuga csöveket lemérjük, majd fecskendővel és injekciós tűvel adagolt steril Milli-Q 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.

Visszahozva a mintákat, a sejtlaborban fülke alatt a felülúszót óvatosan leszívjuk és a pellet-et 200 µl PBS-ben visszaoldjuk. Szétosztjuk 50 µl-es részletekbe és felhasználásig -70 °C-on tároljuk.

5.02. Letapadó sejtek transzdukciója a vírust tartalmazó felülúszóval:

5.02.01. 0. nap: A transzdukálni kívánt emlős sejteket 6 lyukú lemezre helyezük úgy, hogy a kísérlet napjára 70%-os konfluenciát érjenek el.

DE AOK BMBI szabványműveleti előírás	Szám: BSL2-019	
Lentivírus termelése HEK293FT sejtekben		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum

5.02.02. 1. nap: A tápfolyadékot leszívjuk (NEM mossuk PBS-sel!), majd a sejtekhez 1 ml komplett DMEM-et/ RPMI-t adunk sejtvonaltól függően. Ezt követően pipettával cseppenként hozzáadunk 1 ml vírust tartalmazó felülúszót a sejtekhez.

5.02.03. 2. nap: A következő nap reggel szívjuk le a sejtekről a vírust tartalmazó tápfolyadékot és cseréljük le 2 ml komplett médiumra.

5.02.04. 3. nap: Leszívjuk a tápfolyadékot a sejtekről és 2 ml, a szelekciós komponenst megfelelő koncentrációban tartalmazó komplett médiumot teszünk a sejtekre. (A target sejteken korábban hígítási sort készítünk a szelekciós reagens hatékony koncentrációjának megállapítása céljából).

5.02.05. A 3. naptól kezdve minden másnap lecseréljük a szelekciós komponenst tartalmazó tápfolyadékot, így eltávolítjuk az elpusztult sejteket. Kontrollként 1 lyukban vírusos transzdukción nem átesett sejtekre is szelekciós komponenst tartalmazó tápfolyadékot teszünk, egy további lyukban pedig szelekciós komponenst nem tartalmazó tápfolyadékkal tesztelünk. A szelekciót addig alkalmazzuk, amíg a vírusos transzdukción át nem esett sejtek elpusztulnak (4-7 nap). Ezután a szelekciós komponenst a felére csökkentjük a médiumban.

5.03. Úszó sejtek transzdukcója a vírust tartalmazó felülúszóval:

5.03.01. 0. nap: A transzdukálni kívánt emlős sejteket 6 lyukú lemezre helyezük úgy, hogy a kísérlet napjára 70%-os konfluenciát érjenek el.

5.03.02. 1. nap: Az úszó sejteket centrifugáljuk (1000 rpm, 8 perc), majd a felülúszó leszívása után a pelletet 1 ml komplett DMEM-ben/ RPMI-ben visszaoldjuk sejtvonaltól függően és visszamérjük a lyukakba. Ezt követően pipettával cseppenként hozzáadunk 1 ml vírust tartalmazó felülúszót a sejtekhez.

DE AOK BMBI szabványműveleti előírás	Szám: BSL2-019	
Lentivírus termelése HEK293FT sejtekben		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum

5.03.03. 2. nap: A következő nap reggel centrifugáljuk a sejteket, majd a vírust tartalmazó felülúszó leszívása után a pelletet oldjuk vissza 2 ml komplett tápfolyadékban és rakjuk vissza a megfelelő lyukba.

5.03.04. 3. nap: A sejteket centrifugáljuk, majd a pelletet oldjuk vissza 2 ml, a szelekciós komponenst megfelelő koncentrációban tartalmazó komplett médiumot teszünk a sejtekre. (A target sejteken korábban hígítási sort készítünk a szelekciós reagens hatékony koncentrációjának megállapítása céljából).

5.03.05. A 3. naptól kezdve minden másnap lecseréljük a szelekciós komponenst tartalmazó tápfolyadékot, így eltávolítjuk az elpusztult sejteket. Kontrollként 1 lyukban vírusos transzdukción nem átesett sejtekre is szelekciós komponenst tartalmazó tápfolyadékot teszünk, egy további lyukban pedig szelekciós komponenst nem tartalmazó tápfolyadékkal tesztelünk. A szelekciót addig alkalmazzuk, amíg a vírusos transzdukción nem átesett sejtek elpusztulnak (4-7 nap). Ezután a szelekciós komponenst a felére csökkentjük a médiumban.

6. Értékelés

6.01. A transzfekció eredményeként meg kell határozni, hogy mennyi viriont tartalmaz az 5.02. folyamatban keletkezett vírust tartalmazó preparátum. A virion mennyiségének meghatározása reverz transzkriptáz assay (Reverse Transcriptase Assay, colorimetric, Roche), vagy jelenlétének kimutatása p24 ELISA (HIV-1 p24 Antigen ELISA2.0 Kit, Zeptometrix) segítségével történik. Továbbá a szelekciós markeren növesztett túlélése is jelzi, hogy sikeres volt-e a transzdukción.

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

A transzdukción esetében pontosan rögzíteni kell a kísérlet körülményeit (alkalmazott vírismennyiség, esetleges adalékanyagok, gátlószerek koncentrációja), valamint a későbbi

DE AOK BMBI szabványműveleti előírás	Szám: BSL2-019	
Lentivírus termelése HEK293FT sejtekben		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum

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 transzfekció során a plazmidokat, illetve a transzfekciós elegyet steril fülke alatt mérjük össze. 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 ráceppe 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

DE AOK BMBI szabványműveleti előírás	Szám: BSL2-019	
Lentivírus termelése HEK293FT sejtekben		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum

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, transzfekciónál az első vírus felülűszó gyűjtésétől (2. nap.), transzdukció alatt pedig a folyamat minden lépésénél.