



---

# Bioassay zum Nachweis von infektiösen Lentiviren (HIV1)

## SOP 525

1. Version

---

**Verfasser: M. Schmidlin, C. Bagutti**

**Die Entwicklung dieser Methode wurde zum Teil durch das BAG finanziert.**

Erstellt		Geprüft und freigegeben		Version-Nr.:	Dateiname:
am	durch	am	durch	1	SOP525_v1.doc
21/10/11	CB	21.10.11	CB		

## 1. ZWECK UND ANWENDUNGSBEREICH

Diese Methode beschreibt ein semiquantitatives Verfahren zum spezifischen Nachweis von infektiösen lentiviralen Partikeln (HIV1).

## 2. PRINZIP

Proben (z.B. Wischproben gemäss SOP220), welche auf das Vorhandensein von infektiösen Lentiviren untersucht werden sollen, werden zu human embryonic kidney cells (HEK 293T) gegeben. Infektiöse virale Partikel in der Probe können mit der Zellmembran fusionieren, ihre genomische RNA revers transkribieren und die genetische Information stabil ins Wirtsgenom integrieren. Zum Nachweis der erfolgten Infektion wird die genomische DNA der Wirtszellen extrahiert. Mittels quantitativer real-time PCR wird die Anzahl der viralen HIV-Ψ-Sequenzen („Packaging Signal Sequence“, Genbank Acc No. AF033819) in der extrahierten Zell-DNA (SOP527) ermittelt. Um DNA-Kontaminationen in der Probe (Plasmid-DNA oder Zell-DNA von der Herstellung der Viren), sowie nicht-infektiöse Partikel zu beseitigen, werden die Zellen vor der DNA Extraktion über ca. 2 Wochen passagiert. Da die virale DNA stabil ins Genom der Zellen integriert, bleibt das Verhältnis von infizierten zu nicht infizierten Zellen während der Passagen konstant, unter der Annahme, dass sich die Infektion nicht auf das Zellwachstum auswirkt. Diese Methode erlaubt eine semiquantitative Bestimmung der Menge an infektiöser Viren in der Probe. Als Kontrolle werden Zellen mit lentiviralem Überstand von bekanntem Virentiter infiziert. Zusätzlich wird die DNA Extraktionseffizienz und die Zellzahl zum Zeitpunkt der Extraktion durch Amplifikation eines humanen „housekeeping genes“, (hRNaseP) kontrolliert, welches in einem diploiden Genom in zwei Kopien vorliegt.

## 3. PRÜFEINRICHTUNGEN

(Die Validierung dieser Methode wurde mit den Geräten, Chemikalien und Lösungsmittel der angegebenen Lieferanten bzw. Hersteller durchgeführt. Prinzipiell können auch andere Lieferanten bzw. Hersteller berücksichtigt werden. Bei den Materialien, welche mit einem \* markiert sind, sollte in einem solchen Falle eine vorherige Vergleichsvalidierung durchgeführt werden.)

### 3.1. MATERIAL & GERÄTE

(Kunststoff- und Glasmaterialien müssen steril sein. Die Verwendung von aerosolgeschützten Pipettenspitzen dient als Schutz vor Kontamination)

- Zentrifuge (z.B. BeckmanCoulter, Allegra 64R)
- Mikrozentrifuge
- Sicherheitswerkbank (Klasse II)
- Mikroskop mit Phasenkontrast (z.B. Axiovert von Zeiss)
- Zellkultur Inkubator mit HEPA-Filter und CO<sub>2</sub> Zumischung (37°C, mit 6% CO<sub>2</sub>; z. B. Forma Scientific)
- Thermocycler mit Fluoreszenzdetektionseinheit (z.B. Applied Biosystems: StepOnePlus™)\*. Für die Einstellungen am Gerät folge man dem Handbuch des Geräteherstellers.
- Pipetboy
- diverse Kolbenhubpipetten
- Sterile Werkbank (z.B. SKANAIR)
- Mikroskop mit Phasenkontrast (z.B. Axiovert von Zeiss)

Plastikverbrauchsmaterial:

- 15 ml und 50 ml graduierte Zentrifugenröhrchen mit verschraubbarem Plastikdeckel (z.B. Fischer Scientific (TPP); Art. Nr. 91015, 91050)
- Einweg Serologische-Pipetten 25 ml, 10 ml, 5 ml (Fisher Scientific (TPP); Art. Nr. A94024, A94010, A94005)
- Sterile, mit poly-L-Lysine beschichtete Zellkultur Testplatten mit 6 Löchern zu je 9 cm<sup>2</sup> (BD Biocoat™ Poly-L-Lysine Art. Nr. 354515)
- HEK-293T Zellen (DSMZ Nr. ACC 635)
- QIAamp® DNA Mini Kit \* (Qiagen, Art. Nr. 51306)
- TaqMan Fast Universal PCR MasterMix, no UNG (ABI Art.Nr. 4352042\*)

- Nitrilhandschuhe (puderfrei)
- PCR-Verbrauchsmaterial
  - PCR-Platten (z.B. MicroAmp® Fast Optical/96-well Reaction Plate, ABI Art.Nr. 4346906)
  - Klebefolien (z.B. Klebefolie optisch klar, Sarstedt Art.Nr.95.1994)
- aerosolgeschützte Pipettenspitzen (diverse)
- Reaktionsgefäße (diverse)

### 3.2. REAGENZIEN

(Es sind grundsätzlich analysenreine, für die Molekularbiologie geeignete Reagenzien zu verwenden)

- sterilisiertes deion. Wasser
- Ethanol puriss
- Primer :

HIV1_PSS_F <sup>1</sup>	5'-cgc agg act cgg ctt gct-3'
HIV1_PSS_R <sup>1</sup>	5'-gac gct ctc gca ccc at-3'
RnaseP F <sup>2</sup>	5'-aga ttt gga cct gcg agc g-3'
RnaseP R <sup>2</sup>	5'-gag cgg ctg tct cca caa gt-3'

- Sonde:

HIV1_PSS_FAM <sup>1</sup>	5'-ccy ctc gcc tct tgc ygt gyg cro-3'
RnaseP FAM <sup>2</sup>	5'-ttc tga cct gaa ggc tct gcg cg-3'

- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS; Sigma Art.Nr. D8537)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma Art.Nr. D6046)
- Fetal Bovine Serum (FBS; Sigma Art.Nr. F2442)
- Hexadimethrine bromide (Polybrene; Sigma Art.Nr. H9268)

### 3.3. LÖSUNGEN

- L-Glutamine-Penicillin-Streptomycin Lösung (Sigma Art.Nr. G1145 50 mg/ml)
- 1x Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma Art.Nr. T3924)
- Kulturmedium bestehend aus:
  - 500 ml DMEM
  - 50 ml FBS (ca. 10%)
  - 5 ml L-Glutamine-Penicillin-Streptomycin-Lösung
- HIV\_PSS\_F: 10µM Primer-Lösung<sup>3</sup>
- HIV\_PSS\_R: 10µM Primer-Lösung<sup>3</sup>
- HIV\_PSS\_FAM: 10µM Primer-Lösung<sup>3</sup>
- RnaseP F: 10µM Primer-Lösung<sup>3</sup>
- RnaseP R: 10µM Primer-Lösung<sup>3</sup>
- RnaseP FAM: 10µM Primer-Lösung<sup>3</sup>
- Polybrene-Lösung: 10mg/ml

#### • Referenzlösung für Lentiviren PCR

Als Referenzmaterial für die Abschätzung der Menge an Lentivirus-Partikeln dient eine Messreihe von mindestens 4 unterschiedlichen Konzentration des Plasmides pLL3.7 (Rubinson et al. 2003) das die virale HIV-Ψ-Sequenz enthält.

<sup>1</sup> aus SOP347.

<sup>2</sup> Die Oligonukleotid Sequenzen für die Detektion des humanen RNaseP Gens wurden vom „CDC protocol of real-time RTPCR for swine influenza A(H1N1)“ übernommen; siehe SOP494.

<sup>3</sup> Primer und Sonden werden durch Zugabe des entsprechenden Volumens an TE-Buffer (1mM Tris, pH 8; 0.01 mM EDTA) auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

#### • **Positivkontrolle**

Wird diese Methode zur Analyse von Wischproben (SOP220) verwendet, wird eine zusätzliche Positivkontrolle eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine mit Sicherheit Lentiviren enthaltende Probe, welche durch den ganzen Abwisch-, Infektions-, Extraktions- und Analyseprozess mitbearbeitet wird.

#### • **Negativkontrolle**

Als Negativkontrolle wird Zellkulturmedium ohne Viren verwendet, welches ebenfalls durch den ganzen Abwisch-, Infektions-, Extraktions- und Analyseprozess mitbearbeitet wird.

## 4. AUSFÜHRUNG

Die für ein analytisches PCR-Labor notwendigen Vorsichtsmassnahmen (räumliche Trennung, DNA-Dekontamination, etc.) sind in einer separaten QS-Richtlinie (RL L001) beschrieben.

Hinweis: Die Arbeiten mit den Viren und den HEK 293T Zellen werden in der Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Zellen werden behandelt wie in SOP526 beschrieben.

### 4.1 INFEKTION

- Die HEK 293T Zellen werden am Tag vor der Infektion frisch in poly-L-Lysine beschichtete 6-Loch Platten ausgesät, damit sie am Infektionstag 50-80% konfluent sind.
- Eine Stunde vor der Infektion werden die HEK 293T Zellen mit 1.8ml frischem Kulturmedium (+ 1.4µl Polybrene-Lösung) pro Loch versetzt und für 1h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.
- 200 µl einer Probe (möglichst ohne zwischenzeitliches Einfrieren der Probe) werden zu je einem Loch mit vorbereiteten Zellen gegeben.
- Als Kontrolle wird 1 Loch mit 200 µl einer Viren enthaltenden Lösung infiziert und ein Loch mit 200 µl Kulturmedium.
- Die Zellen werden für 4-5 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.
- Die Zellen werden 2 mal mit 1ml PBS gewaschen. (vergleiche SOP526 Kapitel 4.2)
- PBS wird entfernt und 3ml frisches Kulturmedium werden zugegeben.

### 4.2 ZELLPASSAGE

Um DNA-Kontaminationen von der Virenherstellung zu beseitigen werden die Zellen 3-mal (alle 3-4 Tage für ca. 2 Wochen) passagiert, sodass die Zellen jeweils vor der nächsten Passage ca. 100% Konfluenz erreicht haben. Das genaue Vorgehen wird in SOP526 ‚Kultivierung von Säugetierzellen‘ beschrieben.

### 4.3 ERNTEN DER ZELLEN UND VORBEREITUNG FÜR DIE DNA EXTRAKTION

- Die Zellen werden mit Trypsin abgelöst (siehe SOP526) und für 5min bei 1'500rpm zentrifugiert.
- Der Überstand wird verworfen und der Zellniederschlag wird in 200µl PBS aufgeschlämmt und bei -20°C bis zur DNA Extraktion aufbewahrt.
- DNA wird mit dem QIAamp® DNA Mini Kit nach dem "blood or body fluids (Spin)"-Protokoll des Herstellers extrahiert. Das Elutionsvolumen beträgt 200µl (SOP527).

### 4.4 NACHWEIS DER LENTIVIRALEN SEQUENZEN

#### 4.4.1. Herstellung des Mastermixes für den Nachweis

Die folgenden Angaben gelten für **25 µl** Ansätze (**5 µl** extrahierte DNA + **20 µl** Mastermix). **Alle Reaktionen werden auf Eis pipettiert.**

Folgende Lösungen werden in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert:

Reagenzien	Endkonzentration	µl für einen Ansatz *
Primer HIV1_PSS_F [10 µmol/l]	400 nmol/l	1.0
Primer HIV1_PSS_R [10 µmol/l]	400 nmol/l	1.0
Sonde HIV1_PSS_FAM [10 µmol/l]	150 nmol/l	0.38
RNase freies Wasser	-	5.12
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2x)	1x	12.5

Reagenzien	Endkonzentration	µl für einen Ansatz *
Primer huRNaseP_F [10 µmol/l]	400 nmol/l	1.0
Primer huRNaseP_R [10 µmol/l]	400 nmol/l	1.0
Sonde huRNaseP_FAM [10 µmol/l]	150 nmol/l	0.38
RNase freies Wasser	-	5.12
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2x)	1x	12.5

\* gilt als Rechenhilfe.

Die Gesamtmenge der einzelnen zu pipettierenden Lösungen ergibt sich aus der Anzahl durchgeführter PCR-Reaktionen und einem Überschuss von mindestens 5%.

#### 4.4.2. Ansetzen und Durchführung der PCR-Reaktionen

- Den Mastermix kurz mischen.
- Je 20 µl Mastermix in sterile PCR-Platte (Microamp<sup>®</sup> Fast Optical/96-well Reaction Plate) vorgeben.
- Jeweils 5 µl der zu untersuchenden DNA-Lösungen hinzupipettieren.
- Mit Klebefolie oder Deckel verschließen.
- PCR-Platte gemäß folgendem Temperatur-Zeit-Programm inkubieren:

Schritt	
Aktivierung der Taq Polymerase	20 sec./ 95°C
Amplifikation (45 Zyklen)	3 sec./ 95°C
	30 sec./ 60°C

- Eingabe des Reaktionsvolumens „25 µl“ und Eingabe der Anzahl Zyklen „45“.
- Standort und probenspezifische Angaben der Referenz-, Kontroll-, und Untersuchungsproben in den Eingabevorlagen für den Fluoreszenzmarker FAM eingeben.
- Messung starten.

## 5. AUSWERTUNG

### 5.1. QUANTITATIVE PCR

Die Auswertung der PCR-Reaktion erfolgt gemäss Manual des Herstellers des PCR-Gerätes.

Hinweise:

- Nulllinie in der linearen Darstellung festlegen (in der Regel zwischen dem 5. und 15. Zyklus)
- Wahl eines geeigneten „Thresholds“ in der logarithmischen Darstellung (in der Regel <0,2)
- Die Menge vorhandener Lentiviren-DNA wird anhand der  $c_T$ -Werte der Referenz-DNA-Proben definiert.
- Falls die Amplifikationskurven unklar sind, müssen die jeweiligen „Multicomponent“ Darstellungen sowie die Rohdaten geöffnet und interpretiert werden.
- Die Menge vorhandener RNase P-DNA wird nur unter den verschiedenen Proben eines Bioassay-Ansatzes verglichen aber nicht anhand einer Referenz quantifiziert. Die  $c_T$ -Werte sollten innerhalb einer höchsten zweier Größenordnung liegen. Andernfalls muss davon ausgegangen sein, dass entweder die Zellzahl aufgrund Kontamination oder Zelltoxizität der Probe, oder eines Pipettierfehler beim Aussähen reduziert war oder in der DNA-Extraktionseffizienz reduziert war. Diese Probe darf somit nicht in die Gesamtauswertung des betroffenen Ansatzes einfließen.

### 5.2. BERECHNUNG DER ANZAHL LENTIVIREN-DNA-GENOMKOPIEN

Kopienzahl pro ml Wischprobe: Mittelwert x 40 (5µl von 200µl Eluat) x 5 (200µl von einem ml Probe) = Mittelwert x 200

## 6. HINWEISE ZUR QUALITÄTSSICHERUNG

Die Qualität der verwendeten Referenzmaterialien und Reagenzien wird bei jeder Untersuchung „ad hoc“ überprüft. Dies erlaubt das Verwenden von Reagenzien über ihr angegebenes Verfalldatum hinaus. Ein möglicher Einfluss auf das Resultat wird damit erkannt.

Die Vorgaben des QS-HB Kap. 6, Anhang „Die Polymerase Chain Reaction (PCR) Analytik“ sind zu erfüllen.

In jeder Analysenreihe müssen folgende Kontrollen mitgeführt werden:

- ein **Reagenzien-Blindwert**: Mastermix, der mit Wasser anstatt DNA-Extraktionslösung versetzt wird. Der Reagenzien-Blindwert muss negativ sein, ansonsten ist der Mastermix kontaminiert.
- eine **Negativkontrolle** (eine negative Extraktionskontrolle): eine Probe, die durch den ganzen Extraktionsschritt mitgeführt wurde, die aber mit Sicherheit keine Lentiviren-DNA enthält, z.B. Puffer). Die Negativkontrolle muss negativ sein, ansonsten ist eine Kontamination bei der DNA-Extraktion zu vermuten.
- **Verdünnungsreihe der Referenzlösungen**: die mitbearbeitete Verdünnungsreihe der Referenzlösung für Lentiviren mit mindestens 4 Konzentrationen. Sämtliche Extrakte müssen eine sichtbare Amplifikation in der PCR ergeben. Die Steigung der Geraden bei der Auswertung dieser Messreihe muss zwingend zwischen -3.3 und -3.7 liegen.

Wenn die Kontrollen nicht das erwartete Resultat ergeben, müssen die Resultate dieser Versuchsreihe verworfen und die Untersuchung nach einer geeigneten Fehleranalyse und der Beseitigung von Fehlerquellen wiederholt werden.

## 7. VALIDIERUNGSUNTERLAGEN

Die Validierungsunterlagen bilden ein eigenes Dokument, um eine problemlosere Anpassung zu ermöglichen.

## 8. LITERATUR

- **Handbuch des QIAamp® Blood DNA Mini Kits der Firma QIAGEN**
- **Holland P.M., Abramson R.D., Watson R. and Gelfand D.H.** (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 357-362.
- **Zufferey R., et al.** (1998) Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient In Vivo Gene Delivery. Journal of Virology, Dec 1998, Vol. 72, No.12, p.9873-9880
- **Rubinson Da Fau - Dillon, C. P. et al.** (2003). "A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference." *Nat Genet.* 33(3) 401-406.