

Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG)	
<b>Nachweis von replikativen Adenoviren</b>	<b>AM016</b>
Erstellt vom Ausschuss Methodenentwicklung der LAG, Februar 2005	
Status: verabschiedet	

### **1. Zweck und Anwendungsbereich**

Diese Methode dient als Anleitung zum Nachweis von biologisch aktiven Adenoviren des Typs 5 (Ad5) und zur Unterscheidung zwischen der natürlichen und der gentechnisch veränderten Form dieses Virus.

### **2. Kurzbeschreibung**

Mit dieser Anleitung können Adenoviren des Typs 5 (Ad5), welche zuvor auf Laboroberflächen abgewischt wurden (Methode „**Abwischen von Viren von Laboroberflächen**“ des Unterausschusses „Methodenentwicklung“ des LAG) oder als Identifikationsproben während Inspektionen erhoben wurden, auf ihre biologische Funktion hin überprüft werden.

Die für gentechnische Arbeiten verwendeten Adenoviren des Typs 5 (Ad5) enthalten normalerweise eine Deletion in der E1-Region am 5'-Ende ihres Genoms. Dies führt dazu, dass sich solche genetisch veränderten Adenoviren in normalen menschlichen Zellen nicht selbständig vermehren können (Replikationsdefizienz). Eine Vermehrung dieser Virenpartikel kann daher nur in einer zellulären Umgebung erfolgen, welche die fehlenden genetischen Informationen komplementiert. Diese Voraussetzung ist bei der Zelllinie HEK-293 gegeben. Der Test zum Unterscheiden von replikationsdefizienten und natürlichen Adenoviren (Wildtyp) oder wildtyp-ähnlichen Ad5 erfolgt daher über einen „Bioassay“ mit zwei Zelllinien. Die HELA Zelllinie erlaubt es nur den natürlichen oder wildtyp-ähnlichen Adenoviren, sich zu replizieren. Im Gegensatz dazu können sich die in Forschungslaboratorien verwendeten replikationsdefizienten Adenoviren in HEK-293 Zellen jedoch nicht in HELA Zellen vermehren.

Die Vermehrung dieser Viren führt bei den betroffenen Zellen beider Zelllinien zu einem „cytopathologischen Effekt“ (CPE), welcher mittels eines Phasenkontrastmikroskopes sichtbar ist. Um sicherzustellen, dass der CPE durch eine Vermehrung von Ad5 hervorgerufen wurde, wird die Zunahme an Ad5 Genomen im Überstand der Zellkultur während des Bioassays durch einen quantitativen TaqMan-PCR-Assay („**Quantitativer Nachweis von Adenovirus DNA mittels Real Time PCR**“ des Unterausschusses „Methodenentwicklung“ des LAG) überwacht.

### **3. Material**

#### **3.1. Geräte**

Kunststoff- und Glasmaterialien müssen vor der Verwendung sterilisiert werden. Die Verwendung von aerosolgeschützten Pipettenspitzen dient als Schutz vor Kontamination

- Zentrifuge
- Sicherheitswerkbank (Klasse II)
- Halter für graduierte 15ml und 50ml Plastikröhrchen
- Mikroskop mit Phasenkontrast
- Pipetboy
- Kryostat (Flüssigstickstoffbehälter zum Aufbewahren von Zelllinien in Kryoröhrchen)
- Ampullenträger für Kryoröhrchen
- Zellkultur Inkubator mit HEPA-Filter und CO<sub>2</sub> Zumischung (37°C, mit 5% CO<sub>2</sub>)

### **3.2. Verbrauchsmaterial:**

- 15ml und 50ml graduierte Zentrifugenröhrchen mit verschraubbarem Plastikdeckel
- Einweg Serologische-Pipetten 25ml, 10ml, 5ml
- Sterile Zellkulturflaschen mit Filterdeckel, 75cm<sup>2</sup>
- Sterile Zellkultur Testplatten mit 24 Löchern zu je 1,9 cm<sup>2</sup>

### **3.3. Reagenzien und Lösungen**

Es sind grundsätzlich analysenreine, für die Zellkultur und die Molekularbiologie geeignete Reagenzien zu verwenden. Soweit nicht anders angegeben, ist unter „Lösung“ eine wässrige Lösung zu verstehen.

- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)
- Fetal Bovine Serum (FBS)
- 1x Trypsin-EDTA-Lösung
- Geneticin-Lösung [30mg/ml]
- Kulturmedium bestehend aus:
  - 500ml DMEM
  - 50ml FBS (ca. 10%)
  - 300µl Geneticin-Lösung
- HELA-Zellen, HEK-293-Zellen

## **4. Durchführung**

Alle Arbeiten werden, soweit dies möglich ist, in der Sicherheitswerkbank durchgeführt.

### **4.1. Auftauen der Zellen**

(Es können auch die Standardanleitungen aus entsprechenden Methodensammlungen verwendet werden)

- Wasserbad auf 37°C vorwärmen.
- 2 x ca. 50 ml Kulturmedium auf 37°C vorwärmen.
- Kryoröhrchen (je eines für HELA- und HEK-293-Zellen) aus dem Kryostat entnehmen und während 1 Minute im Wasserbad auftauen (Der Wasserstand sollte wegen der Kontaminationsgefahr die Füllmenge des Kryoröhrchens nicht übersteigen).
- Kryoröhrchen mit Alkohol aussen abspritzen und aufgetaute Zellsuspensionen in je 5 ml vorgewärmtes Kulturmedium (15 ml Zentrifugenröhrchen) transferieren.
- Zellen während 5 Minuten bei 100 x g sedimentieren.
- Überstand entfernen und sedimentierte Zellen in je 1 ml Kulturmedium aufnehmen und danach in je 30 ml vorgewärmtes Kulturmedium (Zellkulturflaschen mit 75 cm<sup>2</sup> Boden) transferieren.
- Zellkulturen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubieren und mindestens alle 2 Tage mit dem Mikroskop kontrollieren. Die verwendeten Zelllinien benötigen nach dem Auftauen zum Erreichen der Konfluenz auf dem Boden der Zellkulturflaschen zwischen 3 und 5 Tage.

#### **4.2. Umsetzen der Zellen (Passagieren)**

- Kulturmedium vorsichtig entfernen.
- Zellrasen 2 x vorsichtig mit 1x PBS waschen.
- Mit 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung die Zellen vom Boden der Zellkulturflächen lösen (dauert ca. 5 Min. bei 37°C).
- Neue Kulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) mit je 30 ml Kulturmedium vorbereiten.
- Abgelöste Zellen mit 5 ml Kulturmedium versetzen (Inaktivieren von Trypsin) und mit einer 10 ml Serologischen Pipette resuspendieren.
- Mit je 1/5 bis 1/3 der Zellsuspension die vorbereiteten Kulturflaschen animpfen.
- Zellkulturen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubieren und mindestens alle 2 Tage mit dem Mikroskop kontrollieren. Die verwendeten Zelllinien benötigen beim Passagieren zum Erreichen der Konfluenz auf dem Boden der Zellkulturflaschen zwischen 2 und 3 Tagen.

#### **4.3. Infizieren der Zelllinien**

- 500 µl jeder zu untersuchenden Wischprobe oder maximal 107 Pfu eines Adenoviren-Überstandes werden mit 1 ml Kulturmedium versetzt.
- Je 100 µl dieser verdünnten Wischproben werden auf je 4 Löcher zweier 24 Loch Zellkultur-Testplatten transferiert (Zellkulturtestplatte A und B).
- Als Negativ-Kontrolle dient das reine Kulturmedium.
- Als Positiv-Kontrolle können mit Kulturmedium verdünnte schon zuvor validierte Adenovirensuspensionen verwendet werden (im Minimum 10 Pfu pro Loch).
- Zellen aus je einer 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche mit der HELA- und der HEK-293-Zelllinie, welche ca. 70% Konfluenz erreicht haben, werden wie unter Punkt 4.2. beschrieben trypsinisiert.
- Die Zellsuspensionen aus dem Trypsinisierungsvorgang werden mit Kulturmedium auf 50 ml ergänzt.
- Je 2 ml verdünnte HEK-293 Zellsuspension wird zu den Löchern der vorbereiteten Zellkultur-Testplatte A gegeben.
- Je 2 ml verdünnte HELA Zellsuspension wird zu den Löchern der vorbereiteten Zellkultur-Testplatte B gegeben.

#### **4.4. Inkubation und Überwachen der Zellkulturen**

- Die Zellkultur-Testplatten werden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert.
- Mindestens 16 Stunden nach dem Infektionsvorgang werden bei allen Zellkulturen 1,8 ml des Überstandes entfernt und mit 2 ml frischem Kulturmedium ersetzt.
- Die Zellkultur-Testplatten werden danach bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für maximal 14 Tage weiter inkubiert.
- Alle 2 Tage werden die Kulturen mit dem Mikroskop auf das Erscheinen von CPE hin untersucht.
- Jede Beobachtung wird in einem entsprechenden Raster schriftlich festgehalten.

#### **5. Überprüfung der CPE mittels quantitativer PCR**

Aus jedem beimpften Loch wird 3 Stunden nach dem Ersetzen des Kulturmediums (nach der über Nacht Inkubation) und am Ende des Bioassays (nach spätestens 14 Tagen) ein Aliquot von 200 µl Zellkulturüberstand entnommen.

Aus diesen Zellkulturüberständen wird gemäß der Methode „**Extraktion von Virus-DNA**“ des Unterausschusses „Methodenentwicklung“ des LAG die DNA extrahiert und nach der Methode „**Quantitativer Nachweis von Adenovirus DNA mittels Real Time PCR**“ des Unterausschusses „Methodenentwicklung“ des LAG auf die Menge an Ad5-Genomen hin untersucht. (Aus Kostengründen wird emp-

fohlen, im ersten Durchgang diese Schritte nur mit den Zellkulturüberständen einer der 4 mit derselben Probe infizierten Zellkultur durchgeführt. Bei einer Unklarheit im Resultat, können die Untersuchungen mit weiteren Replikaten wiederholt werden.)

#### **6. Ringversuch**

In den Jahren 2003 und 2004 wurde diese Methode durch den Unterausschuss „Methodenentwicklung“ des LAG in einem Ringversuch validiert, an dem insgesamt 7 bundesdeutsche und ein Schweizer Überwachungslabor teilnahmen.

Alle 8 Laboratorien wendeten die vorliegende Nachweismethode „*mit Erfolg*“ an.

An jeden Teilnehmer wurden fünf codierte Proben, jeweils 4 mit unterschiedlichen Mengen rekombinanter Adenoviren sowie eine Negativprobe (Puffer), verschickt. Diese fünf Proben wurden von allen beteiligten Laboren richtig erkannt.

Diese Methode beruht auf einer Standard Arbeitsanweisung (SOP) des kantonalen Laboratoriums Basel-Stadt (SOP P284), deren Entwicklung finanziell durch das Schweizer Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaften (BUWAL) unterstützt wurde.