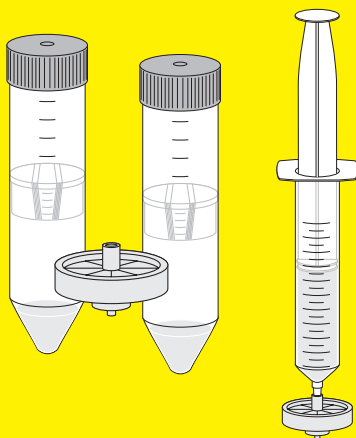


Инструкция по применению

# Vivapure<sup>®</sup> Lentiselect 40

Набор для концентрирования и очистки лентивируса (псевдотип VSV-G)  
из клеточных культур объемом до 40 мл (например, 1-2 планшета × 15 см) |  
Только для использования in vitro



85032-549-64



SARTORIUS

## Введение

### Условия хранения | срок годности

Содержимое набора следует хранить при комнатной температуре.

Комплект необходимо использовать в течение 24 месяцев.

### Рекомендации по обеспечению безопасности

Предупреждение: Вирус, для очистки которого применяется данный набор, способен инфицировать клетки человека или животного, а также, в зависимости от гена-вставки, подвергнуть пользователя воздействию потенциально опасного биологического материала. Лентивирусы относятся к биологическим агентам 2 группы. Все протоколы, подробно описанные в данных инструкциях, должны выполняться в рабочих условиях, соответствующих как минимум условиям работы с ПБА второй группы биологической опасности.

Концентрированный вирус подходит для трансфекции *in vitro* и исследований на животных после замены буфера на физиологический раствор.

Данный набор НЕ предназначен для использования в диагностических целях или лечения людей или животных.

### Основные характеристики:

- Очистка происходит с помощью мембраны, на которой происходит избирательное связывание частиц лентивируса;
- Легко воспроизводимый протокол;
- Процесс очистки менее чем за 1 час;
- Масштабируемая технология очистки.

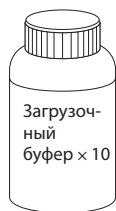
### Рекомендации по использованию:

Следите за тем, чтобы в мембранный адсорбер или в шприцевой фильтр не попадал воздух, так как это ведет к снижению степени связывания вируса.

Для получения оптимального результата пробу необходимо тщательно очистить перед введением.

## Vivapure Lentiselect 40

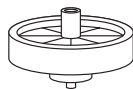
Код заказа	VS-LVPQ040
Мембранный адсорбер Vivapure Lentiselect	4
Шприц объемом 50 мл	4
Шприц объемом 10 мл	4
Комплект трубок с одноходовым клапаном	4
Загрузочный буфер (10 ×)	30 мл
Промывочный буфер	170 мл
Буфер для элюирования	30 мл
Концентратор Vivaspin 20, порог отсечения 100 кДа	8
Инструкции	по 1 на набор и на концентраторы Vivaspin



Загрузочный  
буфер × 10



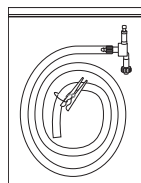
Буфер для элюирования



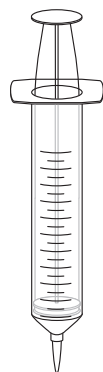
Мембранный  
адсорбер  
Lentiselect



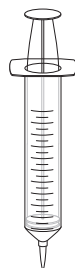
Промывочный  
буфер



Комплект трубок  
с односторонним  
клапаном



Шприцы  
объемом 50 мл



Шприцы  
объемом 10 мл



Концентратор  
Vivaspin 20  
с мембраной  
100 кДа

### **Дополнительные требуемые материалы, не входящие в комплект поставки**

Центрифуга с угловым ротором для пробирок типа Фалькон объемом 50 мл

Штатив для реторт с зажимом

Стерильные пробирки объемом 50 мл или пластиковые ёмкости для работы с пробами

Пластиковый стакан с носиком на 100 мл для сбора отработанного загрузочного и промывочного раствора

5 мл сбалансированного солевого раствора Хенкса HBSS (1 ×): 5,3 мМ KCl, 0,4 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4,2 мМ  $\text{NaHCO}_3$ , 133 мМ NaCl, 0,3 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 5,6 мМ декстрозы

Пробирки типа Эппендорф

## Протокол очистки – методика

### А) Культивирование вируса

В процессе каждого этапа подготовки необходимо культивировать клетки НЕК 293 в общей культуральной среде максимальным объёмом 40 мл (например, в планшетах 2 × 15 см) до достижения степени конфлюентности 50–70%.

Замените среду для культивирования клеток новой средой для выращивания и трансфицируйте клетки с помощью реагента для трансфекции, включая плазмиды упаковки/экспрессии, в соответствии с инструкциями производителя.

В зависимости от протокола трансфекции рекомендуется инкубировать клетки в течение ночи, а затем заменить среду свежей полной культуральной средой.

### В) Подготовка оборудования

Разведите 5 мл 10x загрузочного буфера в 45 мл стерильной ультраочищенной воды в стерильной пробирке типа Фалькон объемом 50 мл. Подсоедините комплект трубок к шприцу объемом 50 мл, как показано на рисунке, и закрепите шприц зажимом на штативе. Поместите подающую трубку в 1 × загрузочный буфер и наберите немного раствора в шприц (а). Слейте эту жидкость вместе с воздухом из шприца через одноходовой клапан обратно в контейнер (b). Повторяйте эту процедуру до тех пор, пока из шприца не будет удален весь воздух (см. рисунок 1).

Наполните шприц 40 мл 1 × загрузочного буфера.

Наденьте на выходной коннектор мембранный адсорбер Lentiselect (см. рисунок 2) и профильтруйте 30–35 мл загрузочного буфера через мембранный адсорбер Lentiselect. Оставьте в шприце 1–2 мл 1 × загрузочного буфера, чтобы воздух не попал внутрь фильтра.

### С) Подготовка пробы

Примечание: Важным условием является устойчивое вертикальное положение собранной системы на протяжении всего введения пробы. Это значительно легче сделать, если собранный заполненный шприц прикрепить к штативу с помощью зажима.

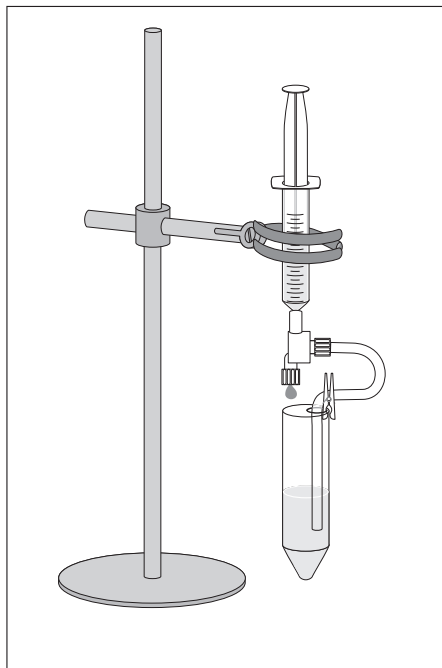


Рисунок 1

### Введение пробы

Соберите супернатант в стерильную пробирку типа Фалькон объемом 50 мл

Поместите конец подающей трубки в пробирку с 1 × загрузочным буфером и набирайте жидкость в шприц до тех пор, пока трубка не будет полностью заполнена загрузочным буфером, а супернатант с вирусом не окажется полностью в шприце.

Медленно пропустите подготовленный раствор пробы через мембранный адсорбер. Оптимальная скорость потока для введения пробы составляет 20 мл/мин. Данная скорость обеспечивается, если вы можете посчитать каждую каплю. Оставьте 1 – 2 мл жидкости в шприце в конце этапа, чтобы предотвратить поступление воздуха в мембранный адсорбер.

Внимание: Нажимайте на плунжер шприца мягко. Слишком быстрое введение пробы снизит степень улавливания вирусных частиц.

#### D) Промывка

Примечание: Чтобы обеспечить эффективный обмен от введения пробы до промывки, пропустите буфер для промывки в количестве, достаточном для заполнения трубки, а затем пропустите его через мембранный адсорбер, чтобы вымыть оставшееся количество пробы перед главным этапом промывки.

Поместите конец подающей трубки в ёмкость с промывочным буфером и наберите 30 мл раствора. Внимание: Не допускайте прохождения воздуха в подающую трубку. Если же это произошло, см. раздел «Устранение проблем».

Пропустите буфер для промывки через мембранный адсорбер. Скорость потока при промывке может быть выше, чем при введении пробы. Внимание: Не допускайте прохождения воздуха через мембранные адсорберы во время промывки.

Оставьте 1 – 2 мл жидкости в шприце в конце этапа, чтобы предотвратить попадание воздуха в мембранные адсорберы, и продолжите работу, переходя к этапу элюирования.

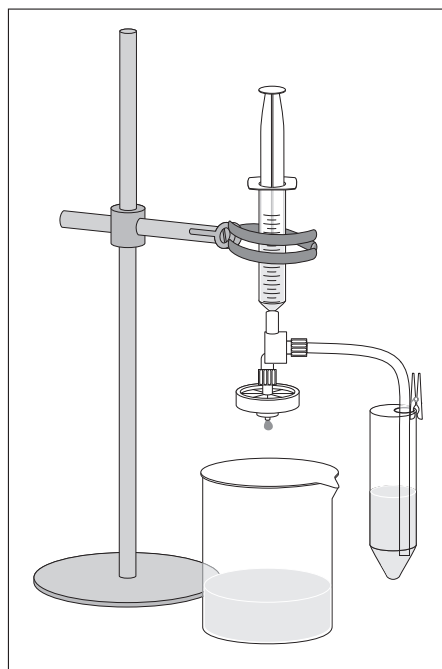


Рисунок 2

## Протокол очистки – методика

### Е) Элюирование

Примечание: Вирусные частицы элюируются с помощью буферного раствора с высоким содержанием хлорида натрия. Для поддержания инфицирующей способности вирусов необходимо поместить очищенные вирусы в буфер для хранения сразу же после элюирования.

Возьмите шприц на 10 мл и наполните его 4 мл буфера для элюирования. Удалите пузырьки воздуха.

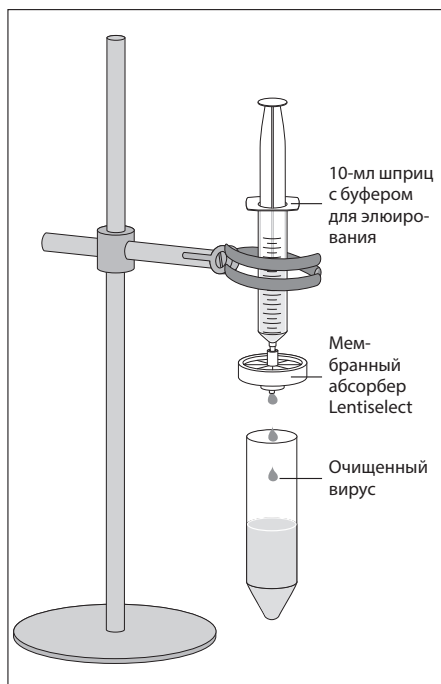
Снимите мембранный адсорбер Lentiselect с 50-мл шприца и подсоедините его к наполненному шприцу на 10 мл.

Держите шприц вертикально. В течение 1–2 минут медленно пропустите 4 мл буфера для элюирования через мембранный адсорбер Lentiselect, мягко перемещая плунжер шприца вверх и вниз для того, чтобы удалить из адсорбера попавший туда воздух.

Соберите элюат в пробирку или непосредственно в концентратор Vivaspin 20, входящий в объем поставки.

С помощью шприца медленно пропустите воздух через мембранный адсорбер, чтобы максимально извлечь элюат.

Закройте пробирку, переверните ее несколько раз для перемешивания.



### Ф) Заключительное концентрирование

Примечание: Дополнительно сконцентрируйте элюат с вирусом, чтобы увеличить титр.

Переместите 4 мл элюата в концентратор Vivaspin 20. Поместите концентратор Vivaspin 20 в центрифугу и уравновесьте ротор с использованием пробирки от другого концентратора типа Фалькон, заполненного водой или PBS эквивалентного объема. В угловых роторах нанесённая градуировка должна быть повернута от центра ротора. Центрифугируйте в течение 10 минут при  $3000 \times g$  в бакетном роторе или при  $6000 \times g$  в угловом роторе с углом  $25^\circ$  и отверстиями для конических пробирок объемом 50 мл.

Слейте фильтрат, затем добавьте в вирусный концентрат 3,5 мл сбалансированного солевого раствора Хенкса (или иного обычного буфера). Центрифугируйте при 3000 × g в течение 20 минут.

Проверьте объем вирусного концентрата, оставшегося в верхней части концентратора, при необходимости повторите центрифугирование.

Извлеките концентрированный вирус с помощью дозатора. Повторно суспендируйте концентрат вируса, осторожно набирая и сливая его наконечником дозатора несколько раз перед извлечением.

Избегайте пузырьков.  
Определите титр вируса. Разделите на соответствующие аликвоты и храните при температуре –80°C.

### **Г) Дополнительно: замена буфера**

Примечание: Иногда возникает необходимость заменить буфер вирусных частиц на физраствор перед использованием в культурах ткани или пробах клеток или на обычный буфер для длительного хранения при температуре –80°C. Буферы для хранения, содержащие глицерин, требуют значительно больше времени для концентрирования, чем первоначальный раствор вирусного элюата. Увеличьте время центрифугирования и при необходимости охладите при температуре +4°C.

Слейте фильтрат, когда объем пробы достигнет 1 мл, а затем добавьте к концентрату буфер для хранения | физраствор, доведя объем до 10 мл.

Центрифугируйте снова, как описано ранее, и при необходимости повторите замену буфера.

Извлеките концентрированный вирус с помощью дозатора. Повторно суспендируйте концентрат вируса, осторожно набирая и сливая его наконечником дозатора несколько раз перед извлечением. Соедините концентраты.

Определите титр вируса. Разделите на соответствующие аликвоты и храните при температуре –80°C.

### **Характерные результаты**

В зависимости от уровня содержания в первоначальной пробе в 4 мл элюата должно быть  $8 \times 10^8$  вирусных частиц. Более высокого титра можно добиться при помощи концентрирования в концентраторах Vivaspin, входящих в объем поставки.

### **(Дополнительно) Стерилизация**

В некоторых областях применения требуется стерилизация проб с вирусом. Для этой цели можно использовать шприцевую насадку Minisart RC 15 0,2 мкм (номер заказа 17761 АСК), не входящую в данный комплект.

1. Наберите пробу концентрированного вируса в шприц с насадкой с соединением типа Луер Лок.
2. Достаньте насадку Minisart из коробки.
3. Подсоедините шприц к выходному отверстию Луер Лок насадки Minisart.
4. Отфильтруйте пробу концентрированного вируса в пробирку.
5. Стерилизованный с помощью насадки вирус теперь готов к дальнейшему использованию.
6. После завершения процесса фильтрации снимите насадку Minisart.

Sartorius Stedim Lab Ltd.  
Sperry Way, Stonehouse Park  
GL10 3UT Stonehouse, Gloucestershire, UK

Тел.: +44 1453 821972  
www.sartorius.com

Содержащаяся в данном руководстве информация и рисунки соответствуют состоянию, указанному ниже. Компания «Sartorius» оставляет за собой право изменять технические характеристики, комплектацию и дизайн устройств, приведенные в данном руководстве. Из соображений удобочитаемости в данном руководстве могут использоваться языковые формы только мужского или только женского рода. Во всех случаях та или иная языковая форма заменяет языковую форму другого рода.

Примечание об авторских правах:

Настоящее руководство, включая все его части, защищено авторским правом.

Всякое использование настоящего руководства, превышающее пределы авторского права, без нашего согласия не допускается.

Согласие требуется, в частности, для копирования, перевода и обработки настоящего руководства в СМИ всех видов.

Состояние:  
08 | 2021

© 2021 Sartorius Stedim Lab Ltd.  
Sperry Way, Stonehouse Park  
GL10 3UT Stonehouse, Gloucestershire, UK

AM | Publication No.: SLU6111-r210802