



B95-8 cell line and BLCL tissue culture technique.

Created: Jul 16, 2008; **Last modified:** Mar 23, 2021, **Version:** 3.0

Este protocolo describe los procedimientos empleados para expandir Líneas Celulares B-Linfoblásticas (LCBL) incluyendo a la línea celular B95-8 (ECACC 85011419) con el objeto de incrementar el número de células y/o para producir sobrenadante de virus de Epstein-Barr (EBV). La línea celular B95-8 se deriva de linfocitos B del Tití Cabezablanca (*Sanguinus oedipus*). Mientras que las líneas celulares humanas EBV-transformadas permanecen en estado de latencia produciendo cantidades insignificantes de virus, la línea celular B95-8 posee la capacidad de volver a ingresar a la fase de replicación viral activa y liberar grandes cantidades de partículas de EBV al medio de cultivo (sobrenadante). **¡PELIGRO!** Las partículas de EBV generadas por esta línea celular son viables y poseen la capacidad de infectar a linfocitos humanos. La infección por EBV en humanos puede ocasionar neoplasias hematológicas o trastornos inmunes. **¡La manipulación de alícuotas/líneas celulares EBV-transformadas solamente deberá realizarse dentro del cuarto de cultivo celular (CCC) y dentro del gabinete de seguridad biológica (GSB) en apego a los lineamientos de nivel de bioseguridad-3 (BSL-3) estipulados por los Centers for Disease Control & Prevention (Alanta, GA. EEUUAA)!**

Procedimiento (Expansión de la línea celular)

1. Descongele el volumen apropiado de Medio Básico al 20% (MB20%, ver nota #1) en baño de agua a 37°C durante 5 o 10 minutos considerando que deberán resuspenderse las células a razón de 0.5×10^6 cels/mL.
2. Un asistente deberá colocarse el equipo de crioprotección personal y retirar un criovial de la línea celular del tanque de LN₂ #2 y descongelarlo por inmersión parcial en baño de agua a 37°C agitando gentilmente durante 2 minutos, sin sumergir totalmente al criovial!
3. El investigador principal deberá ingresar al transfer del CCC y colocarse el equipo de protección biológica personal (botas, gorro, cubreboca, goggles/careta, bata y guantes) y esperar a que le sea transferido el criovial.
4. Límpiase el exterior del criovial con Etanol al 70% sin importar el rotulo ya que el criovial será desechado.
5. Desinfecte nuevamente el exterior del criovial con Etanol al 70% antes de introducirlo al GSB.
6. Agregue 75% del volumen del MB20% estimado a un tubo cónico de 15 ml y vierta el contenido del criovial.
7. Enjuague el criovial cuantas veces sea posible empleando el volumen restante de MB20%virtiéndolo cada vez en el tubo cónico con el objeto de recuperar la mayor parte de las células.
8. Deseche el criovial colocándolo en Solución de Descontaminación de NaOCl al 0.5% (nota # 2).





9. Homogeneice el contenido de tubo cónico por pipeteo gentil empleando una pipeta serológica de 10 mL y transfírase lentamente hacia una esquina de un frasco de cultivo T25 previamente rotulado (ver nota #9). Enrósquese la tapa completamente y documente el estado basal del cultivo con microfotografías a 4x y 25x (ver nota #3).
10. Incubese el frasco de cultivo T25 entre 3 y 4 días a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa, en posición vertical y con la tapa ligeramente desenroscada. Las LCBL en fase exponencial duplican su población cada 72 hrs.
11. Evalúe en base diaria la coloración macroscópica del medio de cultivo. Una tonalidad amarilla indica crecimiento vigoroso y la necesidad de adicionar MB20% mientras que las tonalidades naranjas o rojizas son indicativas de pobre o lento crecimiento (ver nota #4). Documentétese por razón necesaria con microfotografías a 4x y 25x (ver nota #3).
12. Cuando el medio de cultivo adquiera una coloración amarillenta se deberá retirar el frasco T25 de la incubadora y realizar la *Adición de Medio*. Para ello se añaden 10 mL de MB20% gota a gota. Los frascos de cultivo T25 no deberán contener volúmenes superiores a los 20 mL.
13. A las 72 hrs de haber realizado la adición de medio, y cuando nuevamente adquiera una coloración amarillenta, se deberá realizar la *Partición del Cultivo*. Durante la *Partición de Cultivo* el cultivo inicial es repartido a cuatro frascos T25 nuevos. Para particionar el cultivo se homogeneiza la suspensión celular por agitación gentil para luego transferir alícuotas de 5 mL a tres frascos T25 nuevos (el primer frasco es reutilizado). El volumen de los cuatro frascos es entonces suplementado con un volumen similar (5 mL) de MB10% fresco adicionado gota a gota. Este procedimiento permite expandir la línea celular en número a la vez que se disminuye gradualmente el aporte de FBS. Estos pasos de adición de medio y partición de cultivo deberán continuarse hasta recolectar el volumen de sobrenadante (ver nota #5) requerido o tras expandir un número apropiado de alícuotas de la línea celular.

Procedimiento (criopreservación de la línea celular B95-8)

1. Descongele el FBS a temperatura ambiente. ¡No colocar en baño de agua ni en microondas!
2. Rotúlese una cantidad apropiada de crioviales (estimando un total de 1.6 mL de Solución de Criopreservación por criovial) con los siguientes datos: nombre de cepa y # de pase, fecha, número de células totales en el criovial expresadas en millones y porcentaje de viabilidad. Por Ejemplo: B95-8 P1, 20AGO08, 3.5, 90%. Coloque los crioviales en hielo (ver nota # 6).
3. Dispense a cada criovial 500 µL de HI-FBS y 100 µL de DMSO (Solución de criopreservación, ver nota #8).





4. Retire los frascos de cultivo T25 de la incubadora y homogeneice la suspensión celular por agitación gentil. Transfiera dicha suspensión a un tubo de fondo redondo de 15 mL o a uno cónico de 50 mL y centrifuge a 400 G durante 15 minutos.
5. Rescate el medio de cultivo sobrenadante para procesarlo (refiérase al *Procesamiento del Sobrenadante de EBV*).
6. Resuspenda el pellet celular en 1 mL de RPMI-1640 y realice el conteo de células y la evaluación de su viabilidad de acuerdo al "*Protocolo de Conteo y Viabilidad de CMN*".
7. Ajuste la suspensión celular con RPMI-1640 para lograr una concentración celular de 5×10^6 células/mL. Agregue 1 mL de esta suspensión celular lentamente a cada criovial previamente cargado con solución de criopreservación.
8. Homogeneice por agitación gentil (ver nota #7) y mantenga los crioviales en hielo.
9. Coloque los crioviales en el congelador de -20°C durante al menos 2 horas.
10. Transfiera los crioviales al ultracongelador (-80°C) durante al menos 8 horas (NOTA: pero no más de 24 hrs).
11. Transfiera los crioviales al tanque #2 de LN_2 en fase líquida (-196°C).

Procedimiento (procesamiento del sobrenadante de EBV)

1. Centrifugue el sobrenadante recolectado en el psao #4 del *Procedimiento de Criopreservación de la Línea Celular B95-8* en un tubo cónico de 15 o 50 mL a 2,500 G durante 15 minutos. Este paso permite sedimentar las células o detritus celular presente en el sobrenadante.
2. Recupere el sobrenadante centrifugado sin perturbar al sedimento y esterilícelo por filtración a través de una membrana de Acetato de Celulosa o PVDF con poros de $0.22 \mu\text{m}$.
3. Congele el sobrenadante en crioviales de 1.5 o de 2 mL a -80°C para uso mediato (dentro de los siguientes 3 meses) o a -196°C en el Tanque de LN_2 #2 para el largo plazo.

Notas

1. El Medio Básico al 20% (MB20%) consta de RPMI-1640 + 20% HI-FBS (Suero Bovino Fetal Inactivado por Calor) + 1% Pen-Strep (10,000 UI/mL de Penicilina Sódica + 10mg/ml de Estreptomicina). El HI-FBS se obtiene calentando el FBS a 56°C durante 30 minutos en baño de





agua. Este medio debe esterilizarse por filtración a través de una membrana de Acetato de Celulosa o PVDF con poros de 0.22 μm . Manténgase refrigerado entre 4 y 8°C.

2. Todos los implementos, desechables o reutilizables, que entren en contacto con alícuotas de EBV o líneas celulares deberán ser descontaminados por inmersión en NaOCl al 0.5% antes de salir del CCC. Para preparar 1 litro de la solución de NaOCl al 0.5% se aforan 100 ml de NaOCl al 5% (concentración doméstica) hasta 1 litro con agua del grifo. Para producir una solución menos concentrada (al 0.1%) se aforan 20 ml de NaOCl al 5% hasta 1 litro.
3. La nomenclatura para las imágenes fotomicrográficas es la siguiente: **00001a2-d3-4x** donde 00001=#ID de la Colección Genómica Mexicana, a2=pozo A2 de la placa P24 en la cual se cultiva (para monocultivos en frascos T25 no es necesario especificar este parámetro), d3 = días de cultivo y 4x = objetivo del microscopio que fue empleado.
4. Cuando existen datos de pobre crecimiento, se puede transferir el cultivo a una placa de 24 pozos a razón de 1 ml por pozo y se continúa con la incubación.
5. Por norma general 1 mL del sobrenadante permite transformar $1-2 \times 10^6$ células.
6. Todos los pasos del procedimiento de criopreservación deberán realizarse bajo hielo.
7. Las células que sobren del procedimiento de criopreservación pueden sembrarse nuevamente en un frasco de cultivo T25 a razón de 0.5 millones/mL (5×10^6 de células en 10 mL de MB10%).
8. La composición final del medio de criopreservación en cada criovial, debe ser de 50% HI-FBS, X% RPMI y 10% DMSO. Por convención generalmente se preparan alícuotas de tan solo 1 mL por criovial, cada uno con 5 a 10×10^6 células/mL.
9. Los frascos T25 y placas P24 deberán rotularse con el número de identificador único y la fecha de inicio del cultivo de tal modo en que el rótulo no interfiera con las ventanas ópticas.

Referencias

1. Mayor N, Marsh SGE. EBV Supernatant Production, Protocol for BLCL Generation. Anthony Nolan Research Institute. University College and Royal Free Hospital School of Medicine, London, United Kingdom.
2. Genomic Medicine Biorepository. Growth of B95.8 Cell Line and Production of Human EBV Virus. Protocol GMB008rA:031104REW.
3. Shaw JE, Petit RG, Leung K. Growth of B95-8 cells and expression of Epstein-Barr virus lytic phase in serum-free medium. J Virol. 1987 Dec;61(12):4033-7.





Revision history

- 1.0 Original document.
- 2.0 Optimized protocol.
- 3.0 Changes to document format only.

