

RNAi Core Lentiviral Vector 操作規範

前言

操作 lentiviral vector 防護等級，視病毒量多寡而定。中央研究院生物安全委員會 94 年第 3 次會議通過中央研究院 RNAi 試劑使用者可以用 BSL2 標準設施防操作 lentiviral vector 相關實驗，惟必須以 BSL2+實驗規範操作之。且每一單次實驗，病毒種類不得超過 96 種(可產生一種特定序列的 shRNA 的 lentiviral vector 定義為一種 lentiviral vector)；每一單次實驗，病毒量不得超過 1×10^9 總病毒數。超出設限的病毒種類或數目量，則必須在 BSL2+設施房操作之。防護守則以國科會基因重組實驗守則第二章(物理性防護)第二節(20 公升以下規模實驗之物理性防護)內所述之 BSL2 及 BSL2+物理性防護標準為標準。以下 lentiviral vector 操作防護守則節錄自國科會基因重組實驗守則。

BSL2 及 BSL2+物理性防護 (Physical Containment)

第一節 物理性防護之目的

物理性防護的目的是將重組體隔離在設施或設備內，防止實驗人員和其他物品受到污染，並且防止其向外界擴散。

第二節 20 公升以下規模實驗之物理性防護

1. 實驗室物理性防護之區分

(1) 20 公升以下規模實驗之物理性防護，由隔離的設備、實驗室的設計及實驗實施要項等三要素所組成。因封閉程度的不同，區分為 **P1**、**P2**、**P3** 和 **P4** 四等級(相當於 BSL-1、BSL-2、BSL-3 及 BSL-4 四等級)。

(2) 另訂 **P2⁺** 等級供每次操作最後總量不超過 200 ml，且總病毒數不超過 1×10^9 之 HIV 或 HTLV 之操作規範。

2. 物理性防護的等級

[1] **P2** 級

(1) 隔離的設備

- 1) 為了處理重組體，而使用容易產生大量氣霧的磨碎機 (Blender)、超音波細胞打碎機及離心機等儀器時，應避免氣霧外洩，或把這些儀器放置在生物安全操作台 (Biological Safety Cabinet, BSC) 中。但若機器已經有防止氣霧外洩的裝置，則不在此限。
- 2) 需設置生物安全操作台 (第一級或第二級，第 5 至 7 頁)，且要做定期檢查。高效率空氣過濾器 (High Efficiency Particulate Airfilter, HEPA) 的更換及使用甲醛燻蒸等操作時，需在不必移動生物安全操作台的情形下就可操作。生物安全操作台設置後需立即檢查，之後每年必需定期檢查一次。向實驗室內排氣之生物安全操作台，則每年需檢查兩次。
檢查項目包括：
 - a) 風速、風量試驗。
 - b) 密閉度試驗。
 - c) HEPA 過濾器性能試驗。

(2) 實驗室的設計

實驗室所在之建物內，需具備處理污染物及廢棄物滅菌用之高壓滅菌器。

(3) 實驗實施要項

- 1) 進行實驗時，需關閉實驗室的門窗。
- 2) 每天實驗結束之後一定要滅菌實驗台及生物安全操作台。如實驗中發生污染，需立即加以滅菌。
- 3) 與實驗有關之生物材料之廢棄物，在丟棄前需做滅菌處理。被污染的器具需先經高壓滅菌後，再清洗使用或丟棄。
- 4) 不得用口做吸量操作。
- 5) 實驗室內禁止飲食、吸煙及保存食物。
- 6) 操作重組體時需戴手套以防污染，操作完畢後及離開實驗室前需洗手。
- 7) 在所有的操作中，應儘量避免產生氣霧 (例如，把燒熱的接種用白金環及接種針插入培養基時，若發生大量氣霧，就可能造成污染)。亦應避免將吸管或針筒內之液體用力射出。
- 8) 要從實驗室搬離被污染物品時，必需將其放入堅固且不外漏的容器，並在實驗室內密封之後，才可運出。
- 9) 防除實驗室的非實驗用生物，如昆蟲及鼠類等。
- 10) 若有其他方法可用，應避免使用針頭。
- 11) 實驗室內，要穿著實驗衣，離開前要脫掉。
- 12) 禁止對實驗性質不了解的人進入實驗室。
- 13) 實驗進行中，要在實驗室之入口，標示「P2 級實驗室」，並掛上「P2 級實驗進行中」的標示。而且保存重組體之冰箱及冷凍庫也要做同樣的標示。

- 14)實驗室要經常清理，保持清潔，不得放置與實驗無關的物品。
- 15)生物安全操作台內的 HEPA 過濾器，在更換前、定期檢查時，需密封生物安全操作台，每立方公尺用 10 公克的甲醛燻蒸 1 小時，去除污染。
- 16)若在此級實驗室內同時進行 P1 級的實驗時，需明確劃分實驗區域，小心進行操作。
- 17)需遵守計畫主持人所規定之其他事項。

[2] P2⁺級

(1)隔離的設備

- 1)為了處理重組體，而使用容易產生大量氣霧的磨碎機 (Blender)、超音波細胞打碎機及離心機等儀器時，應避免氣霧外洩，且把這些儀器放置在生物安全操作台中。但若機器已經有防止氣霧外洩的裝置，則不在此限。
- 2)需設置生物安全操作台 (第二級或以上，第 5 至 7 頁)，且要做定期檢查。HEPA 過濾器的更換及使用甲醛燻蒸等操作時，需在不必移動生物安全操作台的情形下就可操作。生物安全操作台設置後需立即檢查，之後每年必需定期檢查一次。向實驗室內排氣之生物安全操作台，則每年需檢查兩次。

檢查項目包括：

- a)風速、風量試驗。
- b)密閉度試驗。
- c)HEPA 過濾器性能試驗。

(2)實驗室的設計

- 1)實驗區域之入口應有前室，其前後二扇門無法同時開啟，而且應有更衣室的設計，並需有紫外燈裝置。
- 2)實驗區域內需放置高壓滅菌器，以供污染物及廢棄物之滅菌用。
- 3)實驗區域的窗戶需保持關閉狀態。
- 4)實驗室內前室附近，需設有可用腳或肘操作或自動的洗手、噴臉和沖眼的設備。

(3)實驗實施要項

- 1)進行實驗時，需關閉實驗室的門窗。
- 2)每天實驗結束之後一定要滅菌實驗台及生物安全操作台。如實驗中發生污染，需立即加以滅菌。
- 3)與實驗有關之生物材料之廢棄物，在丟棄前需做滅菌處理。被污染的器具需先經高壓滅菌後，再清洗使用或丟棄。
- 4)不得用口做吸量操作。
- 5)實驗室內禁止飲食、吸煙及保存食物。

- 6) 進入此級實驗室前室內需穿實驗衣、戴口罩、面罩/安全眼鏡、雙層鞋套（或包覆式實驗室鞋及一層鞋套）、帽套及雙層手套。所穿著之實驗衣需為長袖且胸前不開口之形式。
- 7) 在所有的操作中，應儘量避免產生氣霧（例如，把燒熱的接種用白金環及接種針插入培養基時，若發生大量氣霧，就可能造成污染）。亦應避免將吸管或針筒內之液體用力射出。
- 8) 要從實驗室搬離被污染物品時，必需將其放入堅固且不外漏的容器，並在實驗室內密封之後，才可運出。
- 9) 防除實驗室的非實驗用生物，如昆蟲及鼠類等。
- 10) 若有其他方法可用，應避免使用針頭。
- 11) 離開實驗室進入前室前，需脫掉外層手套後再脫掉面罩/安全眼鏡、帽套、實驗衣、外層鞋套（或鞋套）。最後脫口罩及內層手套，洗手後進入前室，脫掉內層鞋套（或包覆式實驗室鞋）後離開。脫換後之實驗衣、口罩、面罩/安全眼鏡、鞋套、帽套及手套在實驗室內消毒後方能攜出。
- 12) 禁止與進行實驗無關之人員進入。
- 13) 實驗進行中，要在實驗室之入口，標示「**P2⁺**級實驗室」，並掛上「**P2⁺**級實驗進行中」的標示。而且保存重組體之冰箱及冷凍庫也要做同樣的標示。
- 14) 實驗室要經常清理，保持清潔，不得放置與實驗無關的物品。
- 15) 生物安全操作台內的 HEPA 過濾器，在更換前、定期檢查時，需密封生物安全操作台，每立方公尺用 10 公克的甲醛燻蒸 1 小時，去除污染。
- 16) 在此級實驗室內，如欲同時進行級數較低之實驗，需按照本級之規定實施。
- 17) 需遵守計畫主持人所規定之其他事項。

附表一、生物安全操作台

安全箱櫃及 HEPA 過濾器之規格

第一級

用途	操作低度危險性之微生物、病原體時，作業空間不需要清淨空氣時使用。
構造規格	為一有抽氣裝置之操作箱，其氣流向內流動以保護操作者，排出廢氣需經 HEPA 過濾器，其平均流速為 0.40 公尺/秒以上（排氣量/前面進氣口之面積）。此級操作箱依操作方式不同可分為三種： (1)正面全開。 (2)正面裝有可關閉之面板，上有四個開口。 (3)正面裝有可關閉之面板，上加齊臂長之橡膠手套。

第二級

用途	進行低度或中度危險性之微生物、病原體之無菌操作時，保持作業空間空氣的清淨。 通常可分為一般生物性作業時使用之 A 型，及操作含有少量有害危險化學物質、放射性物質、氣體物質等 HEPA 過濾器無法有效捕集去除之物質之作業時使用之 B 型。
構造規格	具備前面開口部及排氣口，由前面開口部流入之氣流，可防止內部污染氣體流出，經 HEPA 過濾器過濾之清淨空氣，流入作業空間，排氣時要經過 HEPA 過濾器處理後排出箱櫃之外。 密閉度： 箱櫃內以空氣加壓到 50 毫米水柱時，經 30 分鐘後，內壓下降須在 10% 內。將肥皂水或專用之防漏檢查發泡劑塗佈或噴霧，在箱櫃內所有的融接部份時，不會觀察到有因漏氣而產生發泡現象。 作業的安全性試驗： 以 $5\sim 10\times 10^8$ cfu (colony forming unit) 之枯草菌芽胞作噴霧檢查時，在四台液體沖擊瓶(impinger)能夠補集到的菌落總共在十個以下。實驗開始後 5-15 分鐘能採獲之 slit sampler 的菌落數，每次實驗在五個以下，經連續三次測試才算合格。 試料保護試驗： 以枯草菌芽胞 $5\sim 10\times 10^6$ cfu 噴霧檢查時，在 10 公分培養皿之洋菜平板上所採到的菌落數為五個以下，連續三次實驗則合格。

試料間相互污染之防止試驗：

以枯草菌芽胞 $5-10 \times 10^4$ cfu 噴霧檢查時，在洋菜板中心以外離 355 毫米以上的位置所採集到的菌落數為二個以下，左右各三次連續測試則合格。

排氣速度：

在 15 公分內之格子測試，各測定點排氣之風速在平均值的 $\pm 20\%$ 之內，在指定範圍內設計一個能均勻排氣風速之箱櫃。

進氣風速：

由前門開口部流進來的風速平均為 0.4 公尺/秒以上，(B 型則在 0.5 公尺/秒以上)。

送風機：

送風機的濾片壓力損失在 20% 以上時，不做迴轉控制處理，風量減少在 25% 以內。

氣流方向：

以目測發煙管流出來的狀態來制定，在前面開關下端 100 ± 10 毫米上的高度，作業空間的下層前後之吸氣流分散位置，前面開關之下端 150 毫米之高度，前面開關 20-30 毫米內側之位置，檢查側面空間左右側面時，煙能慢慢向地下流動。沒有煙流下來的部分，煙不可向上逆流，又不可使煙漏出安全箱櫃外。

在前面開口部之外側 30-40 毫米位置檢查其周圍時不會使煙漏出箱櫃，或不可使煙漏入作業空間。

溫度上升：

在 4 小時連續運轉後，室溫和箱櫃內之溫差相差在 8°C 以內。

噪音程度：

噪音要保持在 67 分貝以下。

照明度：

平均照明度為 800-1200 lux。

震動：

直角 3 方向作業震動變位在 5 微米 RMS 以下。

液體接收皿：

	液體接收皿要容易清洗，且至少可以裝 4 公升之容量。
清洗與滅菌之考慮事項	<p>在表面上由流體之飛沫所污染時，能夠不用工具就可洗除，實驗台及實驗空間需局部處理清除。</p> <p>不移動安全箱櫃之下，能夠用甲醛滅菌，前面的開口部、排氣口等用金屬板、塑膠板、黏膠紙可密封。為了能夠容易清掃，地板與安全箱櫃最下面之間隔要保持 80 毫米之空間，或地板或實驗台要使用密封紙封密。</p>
檢查	HEPA 過濾器設置後每年施行一次檢查。

有關於安全箱櫃之 HEPA 過濾器

性能等	<p>HEPA 過濾器之外側以氣霧作負荷的檢查時，各為小區域之氣體透過率（內側之氣霧濃度和外側濃度之比）不超過百分之 0.01 用相對濃度計或用 28.3 公升/分吸收粒子計，檢查時，0.3 微米附近的氣霧透過率不超過百分之 0.01。需使用鋁製之分離器，設置 HEPA 過濾器之差壓計以測壓力損失。</p>
-----	--

