



**ÚOCHB** AV  
ČR  
**IOCB PRAGUE**

Ústav organické chemie a biochemie  
Akademie věd České republiky, v. v. i.  
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry  
of the Czech Academy of Sciences

Prague, 14 September 2021

Re: Information Provided in Response to a Request for Information Filed in accordance with Act No. 106/1999 Coll.

On 1 September 2021, the following request for information was delivered to the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences (*Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i.*) ("**Institute**"). The request was filed by David Šubík ("**Applicant**") in accordance with Act No. 106/1999 Coll., the Freedom of Information Act, as in effect ("**Freedom of Information Act**"):

- 1) **What method was used by the Institute to carry out the full purification and isolation of the virus referred to as SARS- CoV-2? Provide a citation referring to a scientific paper or a verifiable methodology.**
- 2) **Provide electron microscope imagery demonstrating the full purification and isolation of viral particles of the virus referred to as SARS-CoV-2.**
- 3) **What method was used to identify the fully purified and isolated viral particles to be part of the virus referred to as SARS-CoV-2? Provide a citation referring to a scientific paper or a methodology.**

The Institute has fully complied with the request and hereby provides the following information to the Applicant in accordance with Section 14(5)(d) of the Freedom of Information Act:

#### Re 1)

- a) A nasopharyngeal swab specimen in a collection tube with a transport medium was agitated briefly five times.
- b) The medium was filtered using a 0.22 µm filter and added to Vero cells in a 25 cm<sup>2</sup> cultivation bottle and incubated in an incubator at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>.
- c) Cytopathic effect on the cells was monitored on a daily basis.
- d) After three days, the cultivation bottle containing the cells was twice frosted and defrosted.
- e) The culture containing Vero cells was centrifuged for five minutes at 1,000 g.
- f) The supernatant was filtered using a 0.45 µm filter, and 0.5 ml was transferred to fresh Vero cells in a 25 cm<sup>2</sup> cultivation bottle and incubated in an incubator at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.
- g) After three days, the cultivation bottle containing the cells was frosted and defrosted twice.
- h) The culture containing Vero cells was centrifuged for five minutes at 1,000 g.
- i) The supernatant was filtered using a 0.45 µm filter, and 1.5 ml was transferred to fresh Vero cells in a 75 cm<sup>2</sup> cultivation bottle and incubated in an incubator at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.
- j) After three days, the cultivation bottle containing the cells was twice frosted and defrosted.
- k) The culture containing Vero cells was centrifuged for five minutes at 1,000 g.

- l) The supernatant was filtered using a 0.45 µm filter, aliquoted, and frozen to -80 °C.
- m) Thus obtained supernatant contained purified, infectious particles of SARS CoV-2 with a 10e6 IU/ml titer, capable of infecting fresh cells.

### Re 2)

SARS-CoV-2 was not examined by means of electron microscopy in the Institute's laboratory; however, imagery obtained this way has been described in numerous instances in literature, such as

- a) *Turonova, B.; Sikora, M.; Schurmann, C.; Hagen, W.J.H.; Welsch, S.; Blanc, F.E.C.; von Bulow, S.; Gecht, M.; Bagola, K.; Horner, C., et al. In situ structural analysis of SARS-CoV-2 spike reveals flexibility mediated by three hinges. Science 2020, 370, 203-208, doi:10.1126/science.abd5223.*
- b) *Ke, Z.; Oton, J.; Qu, K.; Cortese, M.; Zila, V.; McKeane, L.; Nakane, T.; Zivanov, J.; Neufeldt, C.J.; Cerikan, B., et al. Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. Nature 2020, 588, 498-502, doi:10.1038/s41586-020-2665-2.*

### Re 3)

- a) The virus aliquot was defrosted, and 70 µl was used to isolate RNA using a QIAamp Viral RNA kit (Qiagen).
- b) cDNA was prepared using a LunaScript RT SuperMix kit (New England Biolabs).
- c) cDNA was amplified by means of multiplex PCR using an Artic nCov-2019 V3 panel (IDT) with a Q5 HotStart High Fidelity 2x master mix.
- d) The products of the PCR procedure were purified, quantified, and fragmented using a NEB Next Ultra II FS DNA module (New England Biolabs).
- e) Adaptors for Illumina sequencing were added using NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep and indexation was carried out using NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina (New England Biolabs).
- f) Virus sequencing was performed using an Illumina Miniseq device, and the sequence was analyzed using the DNASTAR Lasergene software.
- g) The sequences were entered into the GISAID database, specifically an isolate designated as hCoV-19/Czech Republic/NRL\_6632\_2/2020 under the code EPI\_ISL\_3050767. The sequence corresponds to SARS-CoV-2 line B.1.
- h) The isolated virus contained the described viral proteins (demonstrated by means of specific antibodies using immunofluorescence and the Western Blot method) and was able to infect sensitive mammalian cells, which subsequently produced viral particles.

### Notice

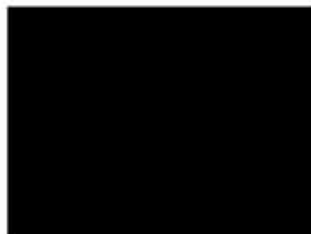
The Applicant may file a complaint against the manner in which the request has been processed in accordance with Section 16a(1)(a) of Act No. 106/1999 Coll., the Freedom of Information Act, as in effect. A complaint must be filed with the Institute within 30 days of the delivery of this document. Complaints are reviewed by the supervisory authority, specifically the Office for Personal Data Protection.

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry  
RNDr. PhDr. Zdeněk Hostomský, CSc.  
Director



**ÚOCHB** AV  
**IOCB PRAGUE** ČR

Ústav organické chemie a biochemie  
Akademie věd České republiky, v. v. i.  
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry  
of the Czech Academy of Sciences



V Praze dne 14. 9. 2021

**Věc: Sdělení ve věci žádosti o poskytnutí informace dle zákona č. 106/1999 Sb.**

Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i. („povinný“ nebo „ÚOCHB“) byla dne 1. 9. 2021 doručena žádost Davida Šubíka („žadatel“) dle zákona č. 106/1999 Sb., o svobodném přístupu k informacím, v platném znění („InfZ“), o poskytnutí informací („žádost“) v následujícím znění:

- 1) **Jak na pracovišti povinného subjektu bylo provedeno dokonalé vyčištění a izolace viru SARS-CoV-2? Uveďte citaci vědecké práce nebo ověřitelný metodologický postup.**
- 2) **Poskytnutí fotografie z elektronového mikroskopu, která doloží dokonalé vyčištění a izolaci virových částic viru SARS-CoV-2.**
- 3) **Jakým způsobem bylo identifikováno, že dokonale vyčištěné a izolované virové částice jsou SARS-CoV-2? Uveďte citaci vědecké práce nebo metodologický postup.**

Povinný žádosti v plném rozsahu vyhověl a v souladu s § 14 odst. 5 písm. d) InfZ poskytuje žadateli následující informace:

**Ad 1)**

- a) Nosohltanový stěr byl pětkrát krátce protřepán v odběrové zkumavce s transportním médiem.
- b) Médium bylo přefiltrováno skrze 0,22  $\mu\text{m}$  filtr a přidáno k Vero buňkám v 25cm<sup>2</sup> kultivační láhvi a inkubováno při 37°C, 5% CO<sub>2</sub> v inkubátoru.
- c) Cytopatický efekt na buňkách byl monitorován denně.
- d) Po třech dnech byla kultivační láhev s buňkami dvakrát zamrazena a rozmrazena.
- e) Kultura s Vero buňkami byla stočena 5 minut při 1000g.

- f) Supernatant byl přefiltrován přes 0.45 µm filtr a 0,5 ml bylo přendáno na čerstvé Vero buňky v 25cm<sup>2</sup> kultivační láhvi a inkubováno při 37°C, 5% CO<sub>2</sub> v inkubátoru.
- g) Po třech dnech byla kultivační láhev s buňkami dvakrát zamražena a rozmražena.
- h) Kultura s Vero buňkami byla stočena 5 minut při 1000g.
- i) Supernatant byl přefiltrován přes 0.45 µm filtr a 1,5 ml bylo přendáno na čerstvé Vero buňky v 75cm<sup>2</sup> kultivační láhvi a inkubováno při 37°C, 5% CO<sub>2</sub> v inkubátoru.
- j) Po třech dnech byla kultivační láhev s buňkami dvakrát zamražena a rozmražena.
- k) Kultura s Vero buňkami byla stočena 5 minut při 1000g.
- l) Supernatant byl přefiltrován přes 0.45 µm filtr, alikvotován a zamražen na -80°C.
- m) Takto získaný supernatant obsahoval purifikované, infekční částice SARS CoV2 o titru 10<sup>6</sup> IU/ml schopné infikovat čerstvé buňky.

### Ad 2)

Elektronová mikroskopie SARS-CoV-2 nebyla v laboratoři ÚOCHB prováděna, ale je již mnohokrát doložena v literatuře např.

- a) *Turonova, B.; Sikora, M.; Schurmann, C.; Hagen, W.J.H.; Welsch, S.; Blanc, F.E.C.; von Bulow, S.; Gecht, M.; Bagola, K.; Horner, C., et al. In situ structural analysis of SARS-CoV-2 spike reveals flexibility mediated by three hinges. Science 2020, 370, 203-208, doi:10.1126/science.abd5223.*
- b) *Ke, Z.; Oton, J.; Qu, K.; Cortese, M.; Zila, V.; McKeane, L.; Nakane, T.; Zivanov, J.; Neufeldt, C.J.; Cerikan, B., et al. Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. Nature 2020, 588, 498-502, doi:10.1038/s41586-020-2665-2.*

### Ad 3)

- a) Alikvot viru byl rozmražen a 70 µl bylo použito pro izolaci RNA pomocí QIAamp Viral RNA kitu (Qiagen).
- b) cDNA byla připravena pomocí LunaScript RT SuperMix kitu (New England Biolabs).
- c) cDNA byla amplifikována pomocí multiplex PCR za použití Artic nCov-2019 V3 panelu (IDT) s Q5 HotStart High Fidelity 2x master mix.
- d) Produkty PCR byly purifikovány, kvantifikovány a fragmentovány pomocí NEB Next Ultra II FS DNA modulu (New England Biolabs).
- e) Adaptory pro Illumina sekvenování byly přidány pomocí NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep a indexace pomocí NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina (New England Biolabs).
- f) Sekvence viru proběhla na Illumina Miniseq přístroji a analýza sekvence proběhla v programu DNASTAR Lasergene.
- g) Sekvence byly uloženy do databáze GISAID např. izolát hCoV-19/Czech Republic/NRL\_6632\_2/2020 pod kódem EPI\_ISL\_3050767. Sekvence odpovídá SARS-CoV-2 linie B.1.

- h) Isolovaný virus obsahoval popsané virové proteiny (prokázáno specifickými protilátkami pomocí imunofluorescence a metodou Western blot) a byl schopen infikovat citlivé savčí buňky, které pak produkovaly další virové částice.

#### **Poučení**

Žadatel může proti způsobu vyřízení žádosti podat stížnost dle § 16a odst. 1 písm. a) zákona č. 106/1999 Sb., o svobodném přístupu k informacím, v platném znění, která se podává u ÚOCHB do 30 dnů ode dne doručení tohoto sdělení. O stížnosti rozhoduje nadřízený orgán, kterým je Úřad pro ochranu osobních údajů.

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i.

RNDr. PhDr. Zdeněk Hostomský, CSc.

ředitel ÚOCHB