

## BSL2-001 számú munkafolyamat dokumentálása

Melléklet-1 293T sejtek transzfekciója					
A vizsgálat dátuma:					
Kód	A munkafolyamat lépései	végrehajtás			Megjegyzés
		igen	nem	N/A	
5.01.01	A sejteket úgy passzáljuk, hogy a kísérlet napjára 70%-os konfluenciát érjen el.				
5.01.02	A plazmidokat összekeverjük és sterilre szűrt 150 mM-os NaCl-oldattal 1 ml-re egészítjük ki. Egy Eppendorf csőben 56.3 µl PEI-oldatot összekeverünk 943.7 µl 150 mM-os sterilre szűrt NaCl-oldattal. 1 ml-es pipettával a PEI-oldatot cseppenként (kb. 1 csepp/másodperc sebességgel) hozzáadjuk a DNS-oldathoz és 15-30 percet szobahőn inkubáljuk.				
5.01.03	Szívjuk le a sejtekről a tápfolyadékot, mossuk a sejteket 10 ml PBS-el, majd adjunk hozzá 5 ml csak 1% FBS-t tartalmazó DMEM-t. Adjuk a sejtekhez a transzfekciós komplexet (PEI + plazmidok). 5-7 óra termosztátban való inkubálás után cseréljük le 15 ml 10% FBS-t tartalmazó DMEM-re.				
5.01.04	A 2. 3. és 4. napon szívjuk le a vírust tartalmazó felülúszót és adjunk a sejtekhez 15 ml 10% FBS-t tartalmazó DMEM-t. A felülúszót 2500 RPM-el centrifugáljuk 10 percig, 4 °C-on, majd 0.45 µm PVDF fecskendőszűrőn, fecskendő és injekciós tű segítségével átszűrjük. Másnapig hűtőben, 4 °C-on tartjuk.				
5.01.05	A vírust tartalmazó felülúszókat ultracentrifugálással (2 óra, 100 ezer g, 4 °C) koncentrálnak. Sejtlaborban, a fülke alatt, a felülúszót óvatosan leszívjuk és a pelletet 200 µl PBS-ben oldjuk. Kiporciózzuk 50 µl-es részletekben és felhasználásig -70 °C-on tároljuk.				
5.01.06	Reverse transcriptase assay az 5.01.05 lépésből származó preparátumból.				
Az 5.01.06-os lépésben meghatározott reverz transzkriptáz koncentráció:					
A vizsgálat eredményének rövid értékelése:					
A vizsgálatot végezte:					
A vizsgálatot ellenőrizte:					