

BSL2-002 számú munkafolyamat dokumentálása

Melléklet-1 Retrovírus termelés: főnix A sejtek transzfekeciója					
A vizsgálat dátuma:					
Kód	A munkafolyamat lépései	végrehajtás			Megjegyzés
		igen	nem	N/A	
5.01.01	A sejteket úgy növesztjük fel, hogy a kísérlet tervezett napjára 70%-os konfluenciát érjenek el.				
5.01.02	Transzfekeelés előtt 2 órával tápfolyadékot cserélünk és csak 10 ml DMEM-t (2% FBS tartalmú) teszünk egy T75-ös sejttenyésztő flakára.				
5.01.03	1. nap: Lipofectamine-t Eppendorf csőben összekeverünk Opti-mem-mel (végtérfogat: 300µl/T75 flaska), illetve ezzel párhuzamosan a plazmidot (DNS-t) egy másik Eppendorf csőben elkeverjük az Opti-mem-mel (végtérfogat: 300µl/T75 flaska). A DNS-t a lipofectammal végül 1:2.5 arányban kell majd használni, ennek megfelelően kell az opti-mem-mel kiegészíteni őket (36 µg DNS (plazmid) egy T75 flaskához; a midipreppel nyert plazmid koncentrációjából kiszámoljuk, hogy hány µl kell a plazmid-ból, hogy a kívánt 36µg plazmid-ot vigyük be a transzfekeelés során. A kiszámolt X µl-t kivonjuk 300 µl-ből, ennyi Opti-mem-mel egészítjük ki. Ezután a lipofectamine mennyiségét is kiszámoljuk, $36 \times 2.5 = 90 \mu\text{l}$, így 210µl Opti-memet adunk hozzá, hogy a végtérfogat 300µl legyen. 5 percig szobahőmérsékleten kell inkubálni a két keveréket (300 + 300 µl), majd ezt követően a lipofectamine-os oldatot hozzá kell adni a DNS-es keverékhez és 20 percig inkubálni szobahőmérsékleten (végtérfogat 600 µl). Végezetül a sejtekhez kell adni az oldatot, óvatosan elkeverve. Ezt a lépést délután érdemes elkezdni mivel a termosztátban 37 oC-on kell őket inkubálni 15 órán át.				
5.02.04	2. nap: A következő nap reggel szívjuk le a sejtekről a transzfekeelési tápfolyadékot, és cseréljük le 15 ml 10% FBS-t tartalmazó DMEM-re.				
5.01.05	A 3. és 4. napon egyaránt szívjuk le a vírust tartalmazó felülúszót és adjunk a sejtekhez 15 ml 10% FBS-t tartalmazó DMEM-et. A felülúszót 2500 RPM-el centrifugáljuk 10 percig, 4 °C-on, majd 0.45 µm PVDF fecskendőszűrőn fecskendő és injekciós tű segítségével átszűrjük. A felülúszókat a következő napig hűtőben, 4 °C-on tároljuk.				
5.01.06	4. nap: A vírust tartalmazó egyesített felülúszókat ultracentrifugálással (2 óra, 100 ezer g, 4 °C) koncentrálnak. A felülúszókat tartalmazó ultracentrifuga csöveket lemérjük és fecskendővel, injekciós tűvel adagolt steril MQ vízzel kiegyensúlyozzuk. Jégen visszük át a másik épületbe, ügyelve arra, hogy a centrifugacsövekhez már ne érjen jég vagy víz! A centrifugába a csövön lévő feliratnak megfelelően tesszük be, annak érdekében, hogy akkor is tudjuk, hogy hol a pellet ha kevésbé látszana. Visszahozva a mintákat, a sejtlaborban fülke alatt a felülúszót óvatosan leszívjuk és a pellet-et 200 µl PBS-ben oldjuk. Majd szétosztjuk 50 µl-es részletekben és felhasználásig -70 °C-on tároljuk.				
A vizsgálat eredményének rövid értékelése:					
A vizsgálatot végezte:					
A vizsgálatot ellenőrizte:					