

BSL2-002 számú munkafolyamat dokumentálása

Melléklet-2 HUVEC sejtek transzdukciója koncentrált vírussal					
A vizsgálat dátuma:					
Kód	A munkafolyamat lépései	végrehajtás			Megjegyzés
		igen	nem	N/A	
5.02.01	HUVEC sejteket 24 lyukú plate-re kell tenni (4 well-re), hogy másnapra 50-60% -os konfluenciát érjen el.				
5.02.02	2. nap: A következő nap a tápfolyadékot leszívjuk (NEM mossuk PBS-el!), majd 120 µl tiszta M-199-t (FBS, Hepes, L-glutamin, Penicillin-Streptomycin, amphotericin és EGM2 NÉLKÜL!) médiumot adunk hozzá. Majd ezt követően pipettával vírust tartalmazó PBS-t adunk cseppenként a sejtekhez.				
5.02.03	3. nap: A sejteken lévő tápfolyadékot kiegészítjük 120 µl olyan M-199-el, amely dupla mennyiségű FBS-t, glutamint és Penicillin-Streptomycin-t, amphotericint és EGM2-t tartalmaz.				
5.02.04	6. nap: A tápfolyadékot eltávolítjuk és a sejteket PBS-el mossuk majd. 500 µl bekevert M-199-t (10% FBS, 1% L-glutamin, 1% Pen-Strep., 1% Amphotericin, 2% Hepes, 10%EGM-2) adunk a sejtekhez.				
5.02.05	7. nap: Leszívjuk a tápfolyadékot a sejtekről és 500 µl a szelekciós komponenst megfelelő koncentrációban tartalmazó M-199-t teszünk a sejtekre. A Pbabe -neo hTert vektor esetén G418-at alkalmazunk szelekciós komponensként. (HUVEC sejtekken tesztelve korábban hígítási sort készítettünk a G418 hatékony koncentráció megállapítása céljából, ennek alapján 10 mg/ml törzsoldatból 900 µl-t teszünk 50 ml M-199 tápfolyadékba).				
5.02.06	8. naptól naponta tápfolyadékot cserélünk, így eltávolítjuk az elpusztult sejteket. Kontrollként 1 well-en vírusos transzdukción nem átesett sejtekre is szelekciós komponenst tartalmazó M-199-t teszünk, egy további well-en pedig szelekciós komponenst nem tartalmazó M-199-t tesztelünk. A szelekciós tápfolyadékot addig alkalmazzuk, amíg a vírusos transzdukción nem átesett sejtek el nem pusztulnak. Ezután a szelekciós komponenst a felére csökkentjük a médiumban.				
A vizsgálat eredményének rövid értékelése:					
A vizsgálatot végezte:					
A vizsgálatot ellenőrizte:					