

BSL2-019 számú munkafolyamat dokumentálása

Melléklet-1 Lentivírus termelése HEK293FT sejtekben					
A vizsgálat dátuma:					
Kód	A munkafolyamat lépései	végrehajtás			Megjegyzés
		igen	nem	N/A	
5.01.01	0. nap: A sejteket úgy növesztjük fel, hogy a kísérlet tervezett napjára 70%-os konfluenciát érjenek el.				
5.01.02	1. nap: Transzfektálás előtt 6 órával lecseréljük a tápfolyadékot és csak 10 ml komplett DMEM-et adunk a sejtekhez.				
5.01.03	<p>1. nap: 1. nap: A szükséges plazmidokat egy 50 ml-es centrifugacsőbe mérjük. A következő reagenseket adjuk hozzá, a következő sorrendben:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 0,667 ml TE 0,1x oldat - 0,346 ml steril Milli-Q víz - 113,3 µl 2,5 M CaCl₂-oldat <p>Az elegyhez autoklávozott filteres Pasteur-pipettán pipettorral keresztül buborékolatott levegővel, folyamatosan keverve, lassan, cseppenként hozzáadunk 1,13 ml HBS2x oldatot.</p> <p>Az így kapott szuszpenziót minimum 5, maximum 30 percig szobahőmérsékleten állni hagyjuk (optimálisan 20 perc).</p> <p>Állás után 0,9 ml szuszpenziót csepegtetünk óvatosan, egyenletesen egy T75-ös sejtenyésző edényben lévő HEK 293FT sejtekre.</p> <p>Gyengéden, éppen csak megkeverve a sejtenyésző edényben a folyadékot. Ezután másnap reggelig inkubáljuk a sejteket (kb. 14-16 óra).</p>				
5.01.04	2. nap: A következő nap reggel szívjuk le a sejtekről a transzfekciós tápfolyadékot, és cseréljük le 10 ml komplett DMEM-re. A leszívott felülúszóval úgy bánjunk, ami már potenciálisan tartalmazhat fertőzőképes vírusokat!				
5.01.05	A 3. és 4. napon a reggeli órákban egyaránt gyűjtjük össze a vírust tartalmazó felülúszót és adjunk a sejtekhez 10 ml komplett DMEM-et. A felülúszót 1500 RPM-el centrifugáljuk 5 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 tárolhatjuk, de azonnal frakciókban fagyaszthatjuk is.				
5.01.06	A vírust tartalmazó felülúszót koncentrálnak 50 ml-es centrifugális koncentrátor csövekkel: A centrifugált, szűrt vírusos felülúszót a koncentrátor csőbe töltjük, majd a cső lezárása, fertőtlenítése után a centrifugában 2500-3000 RPM-mel (mindenképp kevesebb, mint 4000g) koncentrálnak a kívánt térfogatra. Alikvotokban fagyaszthatjuk és felhasználásig -70 °C-on tároljuk.				
5.01.07	Ha szükséges a vírust tartalmazó egyesített felülúszókat ultracentrifugálással (2 óra, 100 000 g, 4 °C) koncentrálnak. A felülúszókat tartalmazó ultracentrifuga csöveket lemérjük, majd fecskendővel és injekciós tűvel adagolt steril Milli-Q 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 visszaoldjuk. Szétosztjuk 50 µl-es részletekbe és felhasználásig -70 °C-on tároljuk.				
A vizsgálat eredményének rövid értékelése:					
A vizsgálatot végezte:					
A vizsgálatot ellenőrizte:					