DEBRECENI EGYETEM

SZAKMAI BESZÁMOLÓ

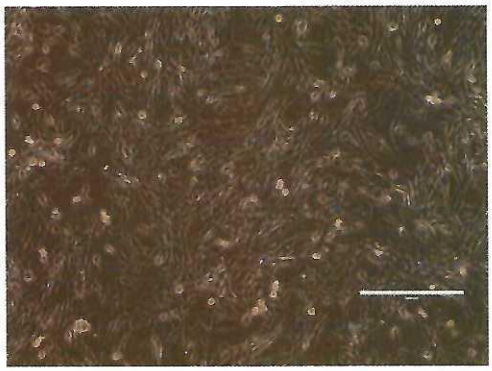
KUT-JEL_LIP-117-02-001

Projekt azonosítója és címe: GINOP-2.3.4.-15-2016-00002 A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban			
Cégnév:	LipidArt Kutató Fejlesztő és Tanácsadó Kft.	**Beszámolási időszak:**	2017 május – 2017 december
Projektben betöltött szerep:	Külső szolgáltató		

Az elvégzett tevékenységek összefoglalása

1.1 <u>részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott MEF-145 immortalizált egér embrionális fibroblaszt sejtvonalon történő jellemzése</u>

A vad típusú immortalizált MEF-145 (egér embrionális fibroblaszt) sejtek 2017.06.08-án 13.00-kor megérkeztek a LipidArt Kft sejtlaborjába. 2db T-75-ös vent cup flaskában (parafilmmel szigetelve). A sejtek kb 80-90%-ig konfluensek, passzázs számuk 47 volt. Ez a sejtvonal nem tartalmaz semmilyen genetikai módosítást, a kísérlesorozat kontroll objektumát képviseli.



A sejtsűrűség fénymikroszkóppal megjelenítve

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

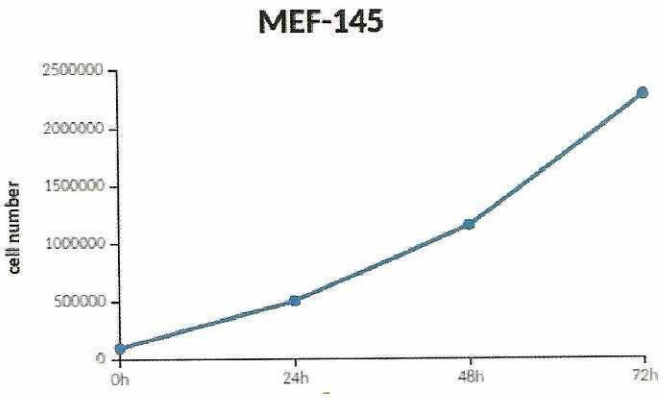
Növekedési időgörbe számítás

A cél a sejtvonal növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez. Ehhez elengedhetetlenül szükséges a sejtvonal bazális növekedési karakterisztikájának jellemzése, növekedési időgörbe segítségével. A mérést sejtszámolással (Bürker kamra) végeztük, a megadott időpontokban, 3 párhuzamos mintán/időpont. Eredménye az alábbi ábrán látható.

MEF-145 növekedési görbe
2017.06.20

Kiindulási sejtszám: 10.000 sejt/cm²
3.5cm-es plate==9.62cm² azaz ~100.000 sejt/csésze

idő		RAW	AVG	SD	norm.
0h	paralell 1	100000			
	paralell 2	100000			
	paralell 3	100000	100000	0	1
24h	paralell 1	500000			
	paralell 2	540000			
	paralell 3	465000	501667	37528	5.1
48h	paralell 1	1020000			
	paralell 2	1170000			
	paralell 3	1260000	1150000	121244	11.5
72h	paralell 1	2430000			
	paralell 2	2100000	2265000	233345.23	22.65



A növekedési időgörbe nyers adatai és ábrázolása vonaldiagrammal.

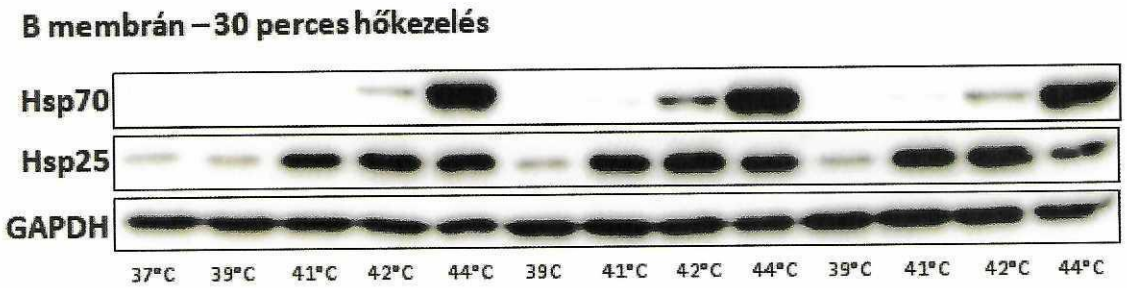
MEF-145 sejtvonal dajkafehérje expresszió fehérjeszintű dokumentációja

Különböző hőmérsékleteken (37, 39, 40, 42 és 44°C) 15, 30 és 60 percig hőkezeltük a sejteket, melyet 16 óra pihentetési (recovery) fázis követett sejtinkubátorban 37°C-on. A bazális dajkafehérje szint megállapításához western blot technikát alkalmaztunk. Dajkafehérjék közül a legjobban indukálhatókat választottuk, a Hsp70-et és a Hsp25-öt, mivel ezek szintje bizonyos stresszorok hatására jelentősen változik (pl. hő), valamint a szakirodalomban is jól dokumentáltak.

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

A feldolgozásra váró sejteket 1 x RIPA lízis pufferben tártuk fel intenzív rázatással. A lizátumokban meghatároztuk az összfehérje koncentrációt (BCA Protein Assay, Pierce). A mintákból azonos összefehérje mennyiségeket futtattunk meg SDS-poliakrilamid gélen, majd a fehérjéket PVDF membránra (0,45 µm, Pierce) vittük át. Loading kontrollnak GAPDH (Glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz) fehérjét használtuk. Anti-Hsp ellenanyagokkal (elsődleges, és torma-peroxidáz konjugált anti-egér (Sigma) másodlagos antitesttel jelöltük és a létrejött immunkomplexet a kemilumineszcens detekciós módszerrel (Pierce) géldokumentációs képalkotással rögzítettük, majd képelemzés segítségével elvégeztük a minták mennyiségi analízisét 3 techikai párhuzamban.



A hőmérséklet emelés hatása a MEF-145 sejtek Hsp70 és Hsp25 szintjére.

A kísérlet eredményeképpen a 30 perces hőkezelés 42° bizonyult a leghatékonyabbnak (ezeket a körülményeket használtuk további kísérleteinkben), mivel ezen a hőmérsékleten és időtartam alatt mindkét jól indukálható hősokk fehérje jelentős mennyiségi emelkedést mutat. Fontos azonban, hogy ez a hőmérséklet még csak közepesen erős stressz a sejteknek, szemben a 44°C-os úgynevezett severe, vagy denaturáló hőmérséklettel.

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

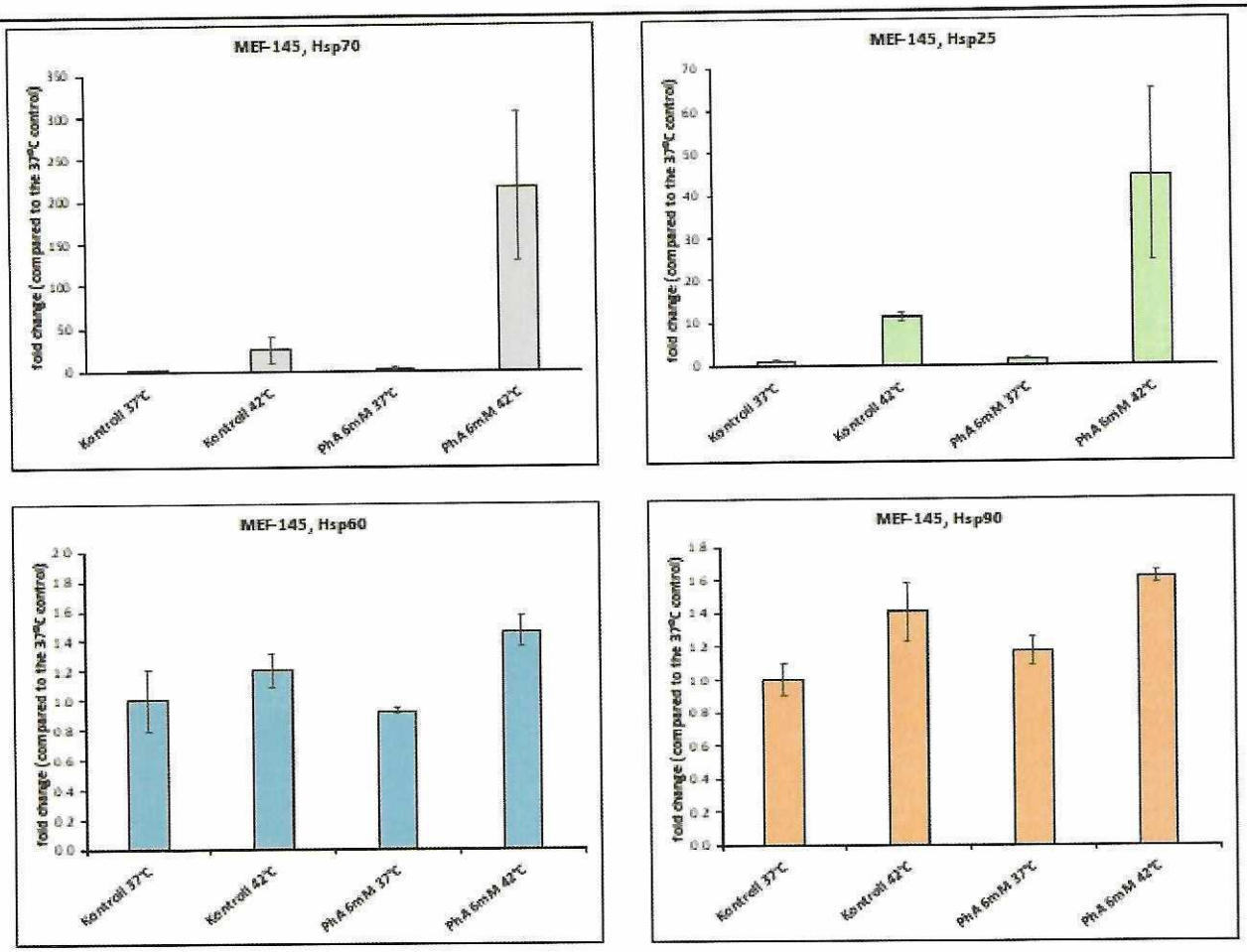
SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

1.2 részfeladat: Jellemzett MEF-145 sejtvonalon a dajkafehérje szint specifikus és nem specifikus modulációja

Az előző kísérletben meghatározott hőfokon és időtartamig (30 perc, 42°C) hőkezeltük és ezzel egyidejűleg specifikus, bizonyos szignalitációs útvonalon keresztül ható kismolekulák (LA1011, LA1030 és LA1050), illetve nem specifikus modulációját idéztük elő különböző membrán perturbációt okozó vegyületekkel, benzil alkohol (BA), illetve fenetil alkohol (PhA) alkalmazásával MEF-145 sejteken. A kezelőanyagként alkalmazott vegyületek egy kivételével ko-inducerként hatottak, azaz stersszmentes körülmények között nem, csak valamilyen stressz jelenlétében (ebben az esetben hőstressz) fejtették ki hősokk válasz indukáló hatásukat. Ilyen ko-inducerek voltak a BA, PhA, LA1011 és LA1050. Az egyetlen silencerként, vagyis hősokkválasz csendesítőként ható molekula az LA1030 volt, melynek hatása a korábbi kísérleteink eredményei alapján erősen függ a lipid környezettől (sejttípustól), így két, különböző sejtvonalon akár ellentétes hatást is mutathat. A sejtvonalak növekedési stabilitásának szmpontjából e vegyület nem mutat semmilyen negatív hatást, azonban fehérje túltermeltetés folyamán a stabilizáló dajkafehérjék expressziójának csökkentése nem feltétlenül jáma előnyös hatással. Igen jó hősokkválasz indukáló szernek bizonyult ugyanakkor az LA1011 és a PhA, mindkettőjük jelentősen emelte a Hsp70 és Hsp25 szintet, sőt a PhA még az ezen a hőfokon viszonylag ritkán indukálódó Hsp60 ésHsp90 expresszióját is növelni tudta.Valószínűsíthető, hogy az ilyen mértékű dajkafehérje moduláció előnyös hatással járhat a sejtek stabilitása, valamint a termeltetett fehérje stabilitása szempontjából egyaránt.

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

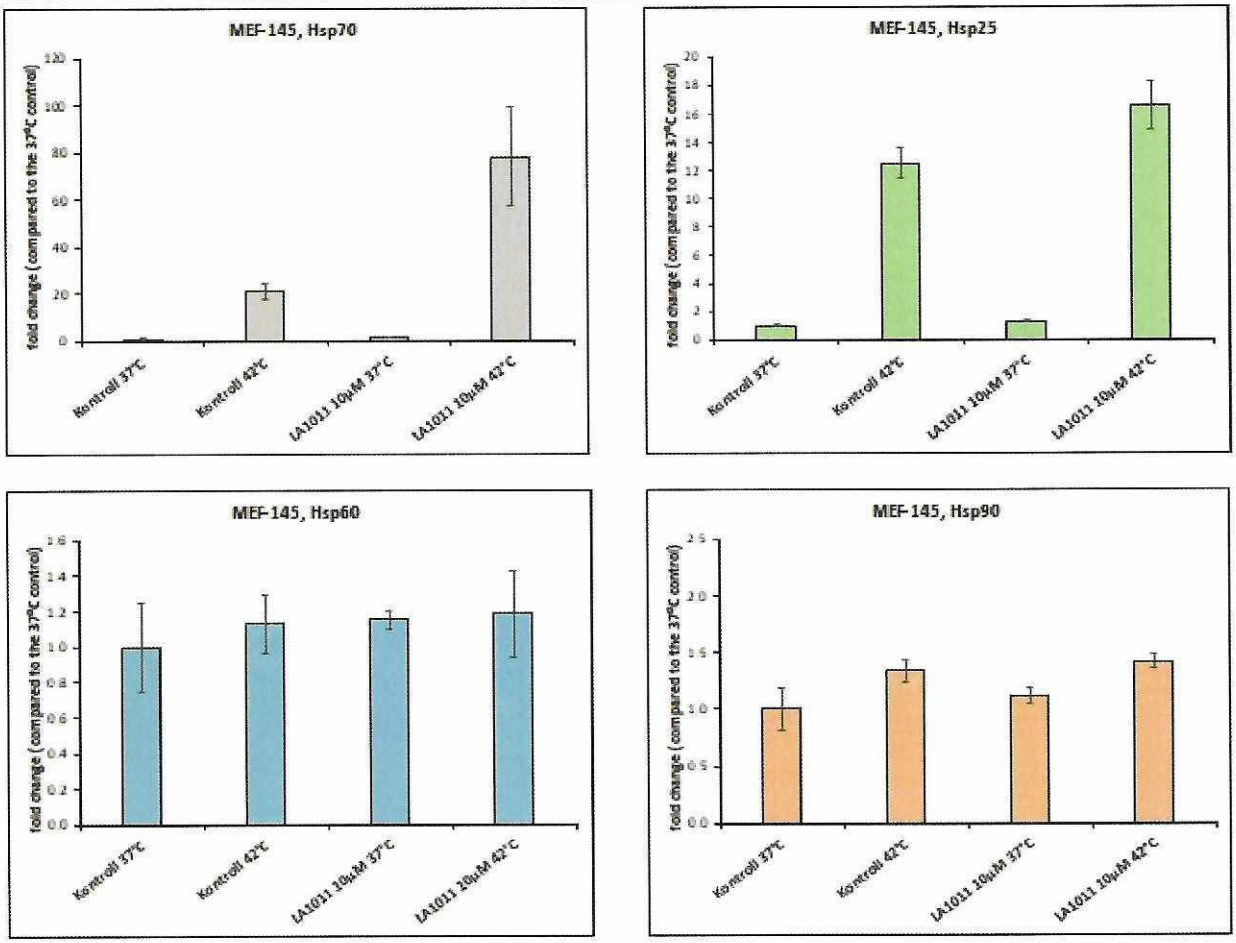
SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE



A fenetil alkohol (6 mM) hatása a legfőbb dajkafehérje osztályokra.

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE



LA1011 hatása a legfontosabb dajkafehérjékre

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

Folyamatban lévő vizsgálatok és tervek

A CSEVES sejtek dajkafehérje expresszió fehérjeszintű dokumentációja. A CSEVES sejtek igen lassú (7-12 napos passzázs idő) növekedése miatt nem tudtunk a sejtvonal dajkafehérje profiljának felállításával elkészülni. A növesztési körülményeket még jelentősen optimalizálnunk kell, fermentorban történő alkalmazáshoz.

A CSEVES csirke vesehám sejtek a dajkafehérje szint nem specifikus (kémiai induktorokkal) ill. specifikus modulációja ko-induktor kismolekulákkal (1,4-dihidropiridin származék LA vegyületek), stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával. Az 1.1 részfeladathoz hasonlóan tenyésztett sejteket a megfelelő hőmérsékletre (± 0.1 °C) beállított vízfürdőbe helyezzük majd benzil-alkohol (BA), fenetil-alkohol (PhA) ill. specifikus membrán kölcsönható HSP ko-indoktor kismolekulákkal LA1011, LA1030, LA1050 stb. kezeljük őket. A különböző ideig ill. hőmérsékleten történő előkezelést követően az 1.1 részfeladatban beállított dajkafehérje profil követésével optimalizáljuk a kezelési körülményeket (médium, hőmérséklet, sejt- és kémiai induktor koncentráció) az ideális dajkafehérjeszerkezet eléréséhez. Ezt követően a tervezzük a tenyésztési körülmények (szérum, médium, hőmérséklet, stb.) optimalizálását az 1.2 feladat során optimalizált dajkafehérje szintet módosító kezeléshez a sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása érdekében fermentorban történő növesztéshez.

DEBRECENI EGYETEM

Csatolt mellékletek felsorolása
-

Debrecen, 2017 év. október hónap 4. nap

.....

Dr. Török Zsolt
LipidArt Kft.

LipidArt Kutató Fejlesztő és Tanácsadó Kft. 6726 Szeged, Temesvári krt. 62. Adószám: 13984770-2-06

A teljesítést igazolom:

.....

Prof. Dr. Szilvássy Zoltán
szakmai vezető aláírása

.....

Dr. Prépost Eszter
Alprojekt/ Kutatócsoport vezető

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

SZAKMAI BESZÁMOLÓ

KUT-JEL-LIP-117-03-001

Projekt azonosítója és címe: GINOP-2.3.4.-15-2016-00002 **A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban**			
Cégnév:	LipidArt Kutató Fejlesztő és Tanácsadó Kft.	**Beszámolási időszak:**	2017 május – 2017 december
Projektben betöltött szerep:	Külső szolgáltató		

Az elvégzett tevékenységek összefoglalása

1.3. részfeladat. A tenyésztési körülmények optimalizálása az előző részfeladat során kiválasztott stresszfehérje szintet módosító kezeléshez (MEF-145 sejtek)

Az 1.1 és 1.2 részfeladatokban részletezett kísérletek alapján optimalizáltuk a tenyésztési körülményeket a lehető legnagyobb Hsp ko-indukció elérése érdekében, a toxicitás kiküszöbölése mellett. Az alábbiakban részletezett optimális tenyésztési körülmények további finomhangolása válhat szükségessé a termeltetett idegen fehérjék előre nem látható hatásai következtében.

Optimális tenyésztési körülmények leirata:

1) A sejtekről (10 cm-es csésze) eltávolítjuk az elhasznált tenyésztő tápoldatot
2) a sejteket 5 mL steril PBS-sel mossuk
3) a sejtekre 2 mL Trypsin-EDTA oldatot mérünk, majd 2 percre 37°C-os CO2 inkubátorba helyezzük őket
4) a 2 perc inkubációs idő letelte után vízlégszivattyú vákuumához csatlakoztatott Pasteur pipettával óvatosan leszívjuk a Trypsin-EDTA oldatot
5) üvegpipettával alaposan felszuszpendáljuk a sejteket, majd 10 mL friss DMEM-high glucose + 10% FBS + 1 x- es Penicillin-Streptomycin tápoldattal

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

6) ebből a szuszpenzióból osztunk, új steril 10 cm-es csészékbe 1:10 arányban. Az összes csészében a folyadéktérfogatot kiegészítjük 10 mL-re friss tápldattal
7) A sejteket 48 órára sejttenyésztő inkubátorba helyezzük (37°C, 5% CO_2)
8) A második nap végére elérik a konfluens állapotot
9) 10 mM BA vagy 10 μM LA1011 vagy 6 mM PhA vegyülettel történő kezelés
10) Hősokk 30 perc 42°C
11) 16 óra recovery

Folyamatban lévő vizsgálatok és tervek

A CSEVES sejtek dajkafehérje expresszió fehérjeszintű dokumentációja. A CSEVES sejtek igen lassú (7-12 napos passzázs idő) növekedése miatt nem tudtunk a sejtvonal dajkafehérje profiljának felállításával elkészülni. A növesztési körülményeket még jelentősen optimalizálnunk kell, fermentorban történő alkalmazáshoz.

DEBRECENI EGYETEM

Csatolt mellékletek felsorolása
-

Debrecen, 2017 év. december hónap 1. nap

.....

Dr. Török Zsolt
LipidArt Kft.

LipidArt Kutató Fejlesztő és Tanácsadó Kft. 6726 Szeged, Temesvári krt. 62. Adószám: 13994779-2-06

A teljesítést igazolom:

.....

Prof. Dr. Szilvássy Zoltán
szakmai vezető aláírása

.....

Dr. Prépost Eszter
Alprojekt/ Kutatócsoport vezető

ÁTADÁS – ÁTVÉTELI JEGYZŐKÖNYV

Átadás - átvételi jegyzőkönyv projektkódja:117				
Átadott tétel neve	**Azonosító**	**Mennyisége**	**Szállítási köv.**	**Tárolás köv.**
Emlős (egér) immortalizált sejtvonal	**MEF-145**	2 **x T75 flaska**	**Szobahőmérséklet**	**37°C, 5%CO2**
Átadás ideje (dátum, időpont): 13 02 **2017.06.08.** **Átadás szállításra:** **2017.06.08.** 8:40		**Átadó cég:** **Debreceni Egyetem** **Anton Pál, kutatási asszisztens**		
Átvétel ideje (dátum, időpont): 13 04 **2017.06.08.**		**Átvevő cég:** **LipidArt Kft.** **Dr. Hunya Ákos, kutató**		
Szállító neve és kézjegye: **Bardóci Sámuel/**		**Megjegyzés:** **A sejtek hungarocell dobozba zárva lettek szállítva.**		

Készült: 2 példányban

..... átadó aláírása

..... átvevő aláírása

DEBRECENI EGYETEM	Azonosító kód: *KUT-TERV-LIP-117-01v01*	Oldal: 1/5

KUTATÁSI TERV

Cím:	***A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott MEF-145 immortalizált egér embrionális fibroblaszt sejtvonalon történő jellemzése***
Hivatkozás:	-

Készítette:	Dátum:	Aláírás:
Dr. Hunya Ákos Gábor	*2017.06.07.*	

Mellékletek:	-

MEGJEGYZÉSEK/INTÉZKEDÉSEK:

A kutatási terv jóváhagyása Dátum: 2017.06.07.	Jóváhagyó neve/aláírása Dr. Török Zsolt/ ügyvezető LipidArt Kft.

LipidArt Kutató Fejlesztő és Tanácsadó Kft. 6726 Szeged, Temesvári krt. 62. Adószám: 13984779-2-06

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

1. A MEGBÍZÓ, A MEGBÍZOTT ÉS A KUTATÓHELY(EK) ADATAI

1.1. Megbízó neve	*DEBRECENI EGYETEM*
1.2. Megbízó címe, telefon, telefax	4032 Debrecen, Egyetem tér 1. Tel: +36 52 512 900 Fax: +36 52 512-965
1.3. Megbízott neve	LipidArt Kft.
1.4. Megbízott címe, telefon, telefax	6726 Szeged, Temesvári krt.62. Tel: +36 62 432038 Fax: +36-62-432048
1.5. Témafelelős (megbízó részéről)	Dr. Prépost Eszter
1.6. A témafelelős (megbízó részéről) nyilatkozata	Nyilatkozom, miszerint felelősséggel tartozom az elvégzett tevékenység jelen kutatási tervek megfelelő lefolytatását illetően. Dátum: 2017.6.07. .Aláírás: .....
1.7. A megbízásra vonatkozó dokumentum(ok) megnevezése	300086971-es nyilvántartási számú vállalkozási szerződés
1.8. Kutatást végző intézmény neve	*LIPIDART KUTATÓ FEJLESZTŐ ÉS TANÁCSADÓ KFT.*
1.9. Kutatást végző intézmény címe, telefon, telefax	6726 Szeged, Temesvári krt. 62. Tel: +36 62 432038 Fax: +36-62-432048
1.10. A kutatásba bevont egyéb intézmény(ek)/ alvállalkozó megnevezése	-
1.11. Témafelelős (megbízott részéről)	Dr. Török Zsolt
1.12. Témafelelős (megbízó részéről) nyilatkozata	Nyilatkozom, miszerint felelősséggel tartozom az elvégzett tevékenység jelen kutatási tervek megfelelő lefolytatását illetően. Dátum: 2017.06.07..Aláírás:.....

2. A KUTATÁS AZONOSÍTÁSA

2.1. Leíró cím	A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott MEF-145 immortalizált egér embrionális fibroblaszt sejtvonalon történő jellemzése
2.2. A kutatás célja, elvárt eredményei A vizsgált sejtvonal/ak dajkafehérje expresszió gén és fehérje szintű dokumentációja	
2.3. A kutatás egyedi azonosítója	11-LIP-117-01
2.4. A kutatás tervezett kezdési időpontja	2017.06.08.
2.5. A kutatás tervezett befejezési időpontja	2017.12.01.

3. A KUTATÁS KIVITELEZÉSÉNEK/VÉGREHAJTÁSÁNAK LEÍRÁSA

3.1. A kutatás végzésének helye, minősítése, felszereltsége	A LipidArt Kft. laboratóriumai az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpontban

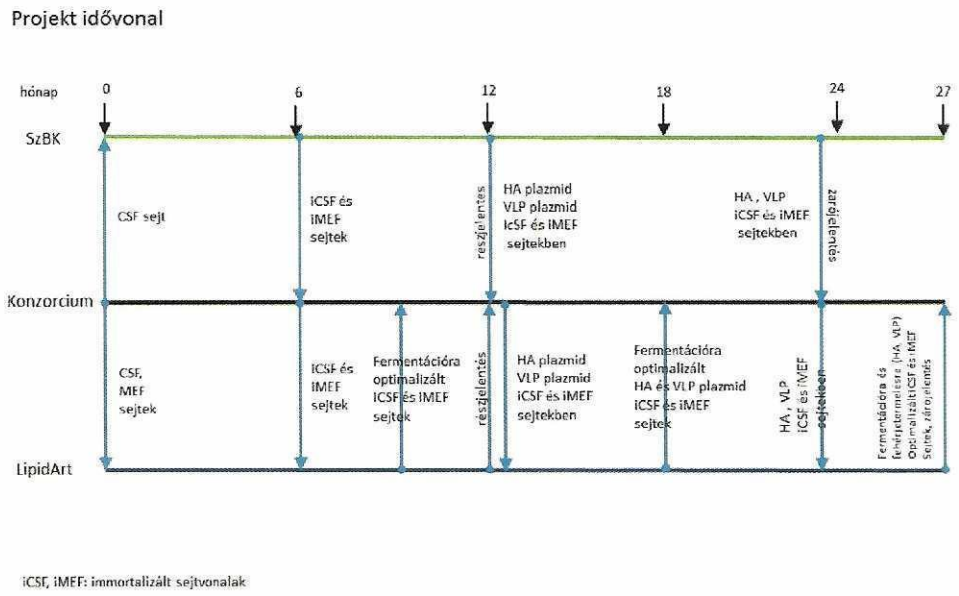
3.2. A kutatás részfolyamatainak/lépéseinek/feladatainak meghatározása, felsorolása és várható eredménye

1. **Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez**

   1.1. **Részfeladat**: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott MEF-145 immortalizált egér embrionális fibroblaszt sejtvonalon történő jellemzése.

   Eredmény: A vizsgált MEF-145 sejtvonal dajkafehérje expresszió gén és fehérjeszintű dokumentációja (részletes kutatási jegyzőkönyvek).

3.3. A kutatás végrehajtásának ütemterve/folyamatábra



3.4. A kutatási folyamat során tervezett vizsgálati módszerek

- sejttenyésztés
- mikroszkópia
- sejthomogenizálás
- poliakrilamid gélelektroforézis
- western blot

3.5. Felhasználásra kerülő szakirodalom, külső szabályozó dokumentum(ok) megnevezése, védett/nem védett eljárások/anyagok használata

-

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

3.6. A feladatokban résztvevő személyek neve, pozíciója	Dr. Horváth Ibolya, vezető kutató Dr. Hunya Ákos Gábor, tudományos munkatárs Dr. Pilbat Ana Maria, tudományos munkatárs Bogdán Istvánné, technikus, laborasszisztens
3.7. A tervezett felhasználásra kerülő anyagok/reagensek felsorolása	• Sejtkultúra reagensek • Molekuláris biológiai reagensek • Biokémiai reagensek
3.8. A tervezett felhasználásra kerülő gépek és berendezések felsorolása	• steril laminális sejttenyésztő fülke • CO_2 inkubátor • invert, fázis kontraszt fénymikroszkóp • Mini-PROTEAN Tetra Cell gél ELFO rendszer • nedves blottoló rendszer • géldokumentációs képalkotó rendszer
3.9. Egyéb feltételek felsorolása	-

4. A KUTATÁS RÉSZFOLYAMATAINAK RÉSZLETES LEÍRÁSA

1.1. A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott MEF-145 immortalizált egér embrionális fibroblaszt sejtvonalon történő jellemzése

A hőkezelés hatásának meghatározása a fő dajkafehérje osztályok (Hsp90, Hsp70, HSP60, HSP27) mennyiségére a különböző sejtvonalakon.

A megbízó által rendelkezésre bocsátott sejtvonalakat 37°C-on, párás környezetben, 5% CO2–ot tartalmazó termosztátban a sejtvonalakhoz a megbízó által ajánlott kezdő összetételű médiumban tenyésztjük. A hősokk kezelésekhez a Petri csészéket Parafilmmel lezárjuk, és a megfelelő hőmérsékletre (± 0.1 °C) beállított vízfürdőbe helyezzük őket. A hősokk fehérjék (Hsp90, Hsp70, HSP60, HSP27), mennyiségének jellemzésére Western blot technikát alkalmazunk. A feldolgozásra váró sejteket 2 x Laemli SDS minta pufferben tárjuk fel intenzív keveréssel és 5 perces forralással. A lizátumokban meghatároztuk az összfehérje koncentrációt (RC DC Protein Assay, BioRad). A mintákból azonos összefehérje mennyiségeket futtatunk meg SDS-poliakrilamid gélen, majd a fehérjéket PVDF membránra (0,45 µm, Pierce) visszük át. Anti-Hsp ellenanyagokkal (elsődleges, és torma-peroxidáz konjugált anti-egér (Sigma) másodlagos antitesttel jelöljük és a létrejött immunkomplexet a kemilumineszcens detekciós módszerrel (Pierce) géldokumentációs képalkotással rögzítjük, majd képelemzés segítségével elvégezzük a minták mennyiségi analízisét. Meghatározzuk a hőkezelés hatását a fő dajkafehérje osztályok mennyiségére a különböző sejtvonalakon. Az eredményeket jegyzőkönyvben rögzítjük.

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 1/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek fenotipusos vizsgálata fénymikroszkóp segítségével.	
Dátuma: 2017.06.08.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-001***

A művelet végzésének helye

A LipidArt Kft. kutatólaboratóriuma, 6726 Szeged, Temesvári krt. 62.

A műveletet végző személyek

	Beosztás K/T	**Aláírás**
Dr. Horváth Ibolya, vezető kutató	Vezető kutató	
Dr. Hunya Ákos Gábor	Tudományos munkatárs	
Dr. Pilbat Ana Maria	Tudományos munkatárs	
Bogdán Istvánné	Laborasszisztens	

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 2/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek fenotipusos vizsgálata fénymikroszkóp segítségével.	
Dátuma: 2017.06.08.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-001***

Célja és rövid leírása:

Cél: Annak kiderítése, hogy a Megbízó által rendelkezésünkre bocsátott MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtvonal fertőzött-e mikoplazmával.

Leírás: A LipidArt Kft. laboratóriumának biztonsági protokollja alapján egy újonnan beérkező sejtet minden esetben rögtön karanténba kell helyezni, bizonyos kontaminációk (pl. Mikoplazma fertőzés) elkerülése érdekében. A sejtnek mindaddig elkülönítő (karantén) inkubátorban kell maradnia, amíg be nem bizonyosodik, hogy mikoplazma negatív. A tesztet bioluminescens elven működő MicoAlert® Mycoplasma Detection (LONZA; LT07-218) kit segítségével végeztük el. A mérést lumineszcencia detekcióra alkalmas plate-readerrel végeztük, az adatokat LibreOffice Calc 5.4.2.2 táblázatkezelő szoftverrel értékeltük ki.

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 3/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek fenotipusos vizsgálata fénymikroszkóp segítségével.	
Dátuma: 2017.06.08.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-001***

Felhasznált anyagok

Anyag neve	Gyártó	Gyártási szám v. azonosító	Steril-e? x	Lejárati idő
MycoAlert MicoAlert® Mycoplasma Detection Kit	LONZA	LT07-218		2018.01.
15 mL-es centrifuga cső	DeltaLab	22,429920	x	2020.02.
Fehér, nem áttetsző, kerek aljú, 96-lyukú mikroplate	Costar	3789		2019.11.
1,5 mL-es mikrocentrifuga cső	Greiner Bio-One	616-201	x	2020.02.
1 mL-es műanyag pipettahegy	Greiner Bio-One	740290	x	2020.02.

Felhasznált gépek, berendezések, mérőeszközök

Berendezés neve	Azonosító	Ellenőrzés Kvalifikált/kalibrált-e: x, kvalifikálási azonosító
Steril fülke	ADS Laminaire BIO II. 12	x, 025/MTA:20-1801-3034
37°C-os CO_2 inkubátor	Jouan LC	N/A
Fluoreszcens/lumineszcens mikroplate olvasó (reader)	Thermo Scientific FluoScan Ascent FL	N/A
Keverő-vortex	Vortex-Genie 2	N/A
20-200 µL-es manuális pipetta	Biohit ProLine	N/A

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 4/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek fenotipusos vizsgálata fénymikroszkóp segítségével.	
Dátuma: 2017.06.08.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-001***

Előzmények:
01_MEF-145_atadas_jegyzokonyv a 2017.06.08-án érkezett MEF-145 sejtekről

Lépések (névvel,szignóval):
Készítette Dr. Hunya Ákos Gábor
A mikoplazma tesztet a gyártói protokoll instrukciói alapján végeztem (LONZA MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit; LT07-218) . Lépései:

1) A kit összes komponensét szobahőmérsékletre hagytuk melegedni használat előtt
2) 600 µL MycoAlert Assay puffer-t mértem a liofilizált MycoAlert Reagent-et tartalmazó fiolába, majd vortexeltük, míg teljesen fel nem oldódott
3) 600 µL MycoAlert Assay puffer-t mértem a liofilizált MycoAlert Substrate-ot tartalmazó fiolába, majd vortexeltük, míg teljesen fel nem oldódott
4) 15 percig szobahőn állni hagytuk őket
5) a MEF-145 sejtekről steril fülke alatt eltávolítottunk 2-2 mL felülúszót mindkét T-75-ös flaskáról (fontos, hogy a sejtek már legalább 24 órája ebben a tápoldatban voltak)
6) a begyűjtött felülúszókat 15 mL-es centrifugacsőbe pipettáztuk
7) lecentrifugáltuk 1500 rpm-en (200 *x g*), 5 percig
8) a tiszta felülúszóból 200 µL-t 1,5 mL-es mikrocentrifuga csövekbe pipettáztunk
9) a csövekből 100-100 µL-t fehér luminecszcens 96-lyukú platekbe pipettáztunk, a pozitív és a negatív kontrollokkal együtt
10) a lumineszcens plate-readert 1s integrated reading-re állítottuk, majd lemértük az összes minta lumineszcenciáját (*Blank*)
11) ezután az egyes mintákra 100 µL MycoAlert Reagent-et pipettáztuk, a plate-t rázattuk 1 percig, majd 4 percig sötétben inkubáltuk, az inkubáció letelte után lemértük a minták lumuneszcenciáját (*Reading A*)
12) a mintákra 100 µL MycoAlert Substrate-ot pipettáztunk, majd szintén 1 percig rázattuk a plate-t, melyet 9 perc sötét inkubáció követett. Ezután mértük a minták lumineszcenciáját (*Reading B*)
13) Kiértékelésnél (LibreOffice Calc 5.4.2.2 szoftver) először az összes mért adatból levontuk a *Blank* értékeket, majd a *Reading B* értékeket elosztottuk a *Reading A* értékekkel (*ReadigB/ReadingA*)
14) A sejtek mikoplazma negatívnak tekinthetők, ha a ReadigB/ReadingA 1-nél kisebb

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE
GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 5/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek fenotipusos vizsgálata fénymikroszkóp segítségével.	
Dátuma: 2017.06.08.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-001***

Összefoglalása, eredménye:

A MEF-145 sejtek a vizsgálat eredményei (1.sz. melléklet) alapján mikoplazma fertőzés mentesnek bizonyultak, így nincs szükség további kezelésre, antibiotikumos beavatkozásra. A 2 db. T-74-es flaska kikerülhet a karanténból, a kísérletek biztonságosan folyhatnak.

Csatolmányok felsorolása:

1.sz. melléklet - MEF-145 sejtek mikoplazma tesztjének eredménye

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 6/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek fenotipusos vizsgálata fénymikroszkóp segítségével.	
Dátuma: 2017.06.08.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-001***

Csatolmányok

	Neg. ctrl.	Mef-145	Mef-145	Pos. ctrl.
0'	3.84E-05	0.0001	0	6.47E-05
5'	0.0032	0.0015	0.0018	0.0027
10'	0	0.0004	0.0006	0.0243
baseline corrected				
A (5')	0.0031616	0.0014	0.0018	0.0026353
B (10')	-0.0000384	0.0003	0.0006	0.0242353
res (B/A)	**0.0**	**0.2**	**0.3**	**9.2**

1.sz. melléklet. MEF-145 sejtek mikoplazma tesztjének eredménye. Ha a B/A érték <1, akkor a sejtek negatívak

Jelmagyarázat: **0'** = Blank; **5'** = Reading A; **10'** = Reading B

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 7/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek fenotipusos vizsgálata fénymikroszkóp segítségével.	
Dátuma: 2017.06.08.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-001***

Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor	***Kiadásért felel: Dr. Hunya Ákos Gábor***

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 1/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 sejtek fenotipusos vizsgálata fénymikroszkóp segítségével	
Dátuma: 2017.06.09.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-002***

A művelet végzésének helye

A LipidArt Kft. kutatólaboratóriuma, 6726 Szeged, Temesvári krt. 62.

A műveletet végző személyek

	Beosztás K/T	**Aláírás**
Dr. Horváth Ibolya, vezető kutató	Vezető kutató	
Dr. Hunya Ákos Gábor	Tudományos munkatárs	
Dr. Pilbat Ana Maria	Tudományos munkatárs	
Bogdán Istvánné	Laborasszisztens	

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 2/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 sejtek fenotipusos vizsgálata fénymikroszkóp segítségével	
Dátuma: 2017.06.09.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-002***

Célja és rövid leírása:

Cél: MEF-145 fibroblaszt sejtvonal morfológiai és sejtsűrűség vizsgálata fénymikroszkóp segítségével.

Leírás: A Debreceni Egyetem által rendelkezésünkre bocsátott MEF-145 sejtvonalat vizsgáltuk alak, sejtméret, nyúlványozottság mértéke, valamint körülbelüli sejtsűrűség szempontjából fénymikroszkóp alatt.

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 3/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Álcím:* MEF-145 sejtek fenotipusos vizsgálata fénymikroszkóp segítségével	
Dátuma: 2017.06.09.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-002***

Felhasznált anyagok

Anyag neve	Gyártó	Gyártási szám v. azonosító	Steril-e? x	Lejárati idő
N/A	N/A	N/A		N/A

Felhasznált gépek, berendezések, mérőeszközök

Berendezés neve	Azonosító	Ellenőrzés Kvalifikált/kalibrált-e: x, kvalifikálási azonosító
XD-2 invert fázis kontraszt sejtbiológiai mikroszkóp	1218364	-
CCD kamera	N/A	-

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 4/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 sejtek fenotipusos vizsgálata fénymikroszkóp segítségével	
Dátuma: 2017.06.09.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-002***

Előzmények:
KUT-AJK-LIP-117-01-001 - jegyzokonyv a 2017.06.08-án érkezett MEF-145 sejtekről

Lépések (névvel,szignóval):
Készítette Dr. Hunya Ákos Gábor

1) A sejteket tartalmazó T-75-ös flaskákat az inkubátorból kivettük
2) A flaskákat egyenként a mikroszkóp tárgyasztalára helyeztük
3) Mikroszkóp alatt vizsgáltuk 10-es (100x nagyítás), 25-ös (250x nagyítás) és 40-es (400x nagyítás) objektívvel (lásd 1. melléklet)
4) Felvételeket készítettünk a mikroszkóppal összekapcsolt CCD kamerával
5) Passzálások alkalmával és után a sejteket különböző időközönként újra vizsgáltuk, különböző sejtsűrűségű állapotban (lásd 2-3. mellékletek)

Összefoglalása, eredménye:

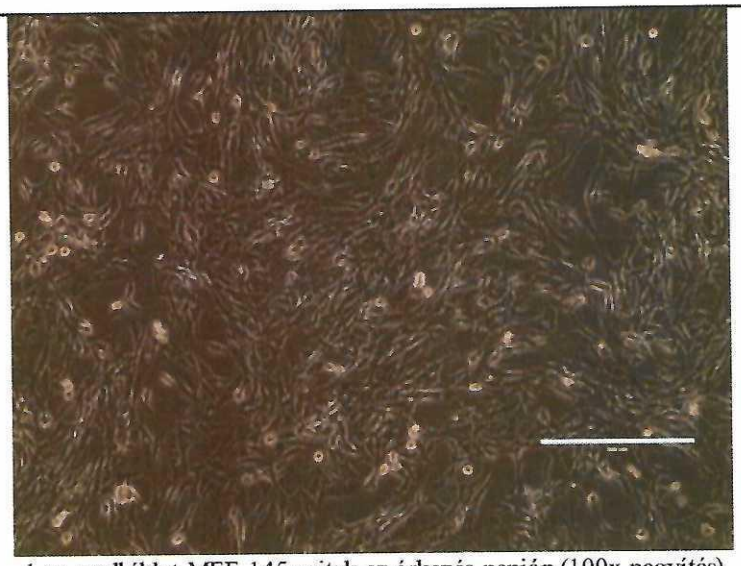
A MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek 2db T-75-ös vent cup flaskában (parafilmmel szigetelve). A sejtek kb 80-90%-ig konfluensek, passzázs számuk 47 volt. Ez a sejtvonal nem tartalmaz semmilyen genetikai módosítást, a kísérlesorozat kontroll objektumát képviseli. A sejtek tipikus fibroblaszt morfológiájúak, kissé elnyúlt, hosszúkás sejttest, zömében rövid, tömzsi nyúlványok, egyes sejtek azonban hosszú tűszerű nyúlványokat is képesek növeszteni.

Csatolmányok felsorolása:
1.sz. melléklet - MEF-145 sejtek az érkezés napján
2.sz. melléklet - MEF-145 sejtek kb. 70%-os konfluenciával
3.sz. melléklet - MEF-145 sejtek kb. 55-60%-os konfluenciával
4.sz. melléklet - MEF-145 sejtek kb. 40% konfluencia
5.sz. melléklet - MEF-145 sejtek passzálás után 5 órával

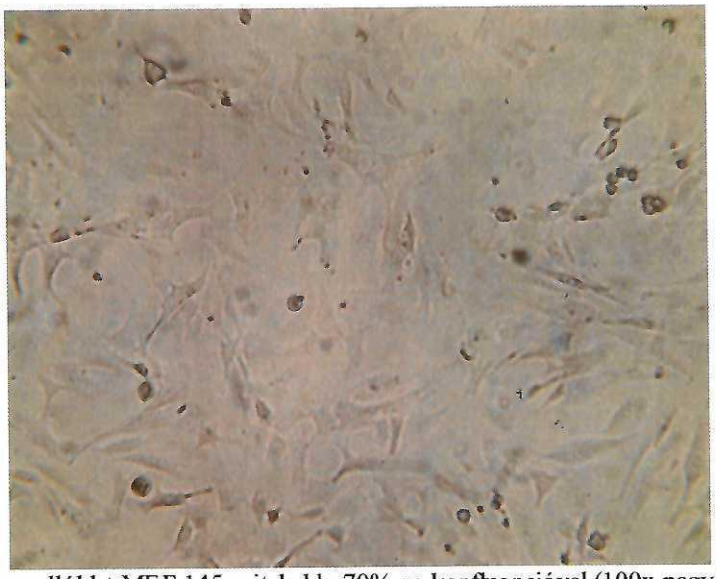
SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 5/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 sejtek fenotipusos vizsgálata fénymikroszkóp segítségével	
Dátuma: 2017.06.09.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-002***



1.sz. melléklet MEF-145 sejtek az érkezés napján (100x nagyítás)



2.sz. melléklet MEF-145 sejtek kb. 70%-os konfluenciával (100x nagyítás)

SZÉCHENYI 2020

MAGYARORSZÁG KORMÁNYA

Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap

BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 6/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 sejtek fenotipusos vizsgálata fénymikroszkóp segítségével	
Dátuma: 2017.06.09.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-002***

3.sz. melléklet MEF-145 sejtek kb. 55-60%-os konfluenciával (100x nagyítás)

4.sz. melléklet: MEF-145 sejtek kb. 40% konfluencia (200x nagyítás)

SZÉCHENYI 2020

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

MAGYARORSZÁG KORMÁNYA

Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap

BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 7/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 sejtek fenotipusos vizsgálata fénymikroszkóp segítségével	
Dátuma: 2017.06.09.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-002***

5.sz. melléklet: MEF-145 sejtek passzálás után 5 órával (400x nagyítással)

Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor	***Kiadásért felel: Dr. Hunya Ákos Gábor***

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 1/6 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtvonal fenntartása, passzálása	
Dátuma: 2017.06.09.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-003***

A művelet végzésének helye

A LipidArt Kft. kutatólaboratóriuma, 6726 Szeged, Temesvári krt. 62.

A műveletet végző személyek

	Beosztás K/T	**Aláírás**
Dr. Horváth Ibolya, vezető kutató	Vezető kutató	
Dr. Hunya Ákos Gábor	Tudományos munkatárs	
Dr. Pilbat Ana Maria	Tudományos munkatárs	
Bogdán Istvánné	Laborasszisztens	

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 2/6 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtvonal fenntartása, passzálása	
Dátuma: 2017.06.09.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-003***

Célja és rövid leírása:

Cél: A MEF-145 sejtvonal fenntartása, passzálása

Leírás: A Debreceni Egyetemtől kapott egér embrionális fibroblaszt sejtek tenyésztése optimális körülmények között, megfelelő technikával, megfelelő tápoldatban, valamint kísérletekhez történő előkészítése

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 3/6 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtvonal fenntartása, passzálása	
Dátuma: 2017.06.09.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-003***

Felhasznált anyagok

Anyag neve	Gyártó	Gyártási szám v. azonosító	Steril-e? x	Lejárati idő
DMEM high glucose	Biowest	P0103-N50L	x	2020.02.
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco	1027-106	x	2019.12.
L-Glutamine	Sigma	G5792-1KG	x	2020.03.
Penicillin-Streptomycin solution	Sigma	P4333-100ML	x	2021.01
10 cm-es műanyag Petri csésze	VWR	734-2321	x	2020.06.03.
10 mL-es üveg szerológiai pipetta	N/A	N/A	x	N/A
5 mL-es üveg szerológiai pipetta	N/A	N/A	x	N/A
Üveg Pasteur pipetta (2 mL)	N/A	N/A	x	N/A
Trypsin-EDTA solution	Lonza	BE17-161E	x	2020.05
PBS	N/A	N/A	x	N/A

Felhasznált gépek, berendezések, mérőeszközök

Berendezés neve	Azonosító	Ellenőrzés Kvalifikált/kalibrált-e: x, kvalifikálási azonosító
Steril fülke	ADS Laminaire BIO II. 12	x, 025/MTA:20-1801-3034
37°C-os CO_2 inkubátor	Jouan IG-150	N/A
Pipettor	Drummond PipettAid XL	N/A
OLYMPUS fázis kontraszt fénymikroszkóp	OLYMPUS CK30	N/A
Vízlégszivattyú	N/A	N/A

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 4/6 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtvonal fenntartása, passzálása	
Dátuma: 2017.06.09.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-003***

Előzmények:
01_MEF-145_atadas_jegyzokonyv a 2017.06.08-án érkezett MEF-145 sejtekről

Lépések (névvel,szignóval):
Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor

1) A MEF-145 sejtekről (2 db T-75-ös flaska, passzázs száma: 48) eltávolítjuk az elhasznált tenyésztő tápoldatot
2) a sejteket 5 mL steril PBS-sel mossuk
3) a MEF-145 sejtekre 2 mL Trypsin-EDTA oldatot mérünk, majd 2 percre 37°C-os CO_2 inkubátorba helyezzük őket
4) a 2 perc inkubációs idő letelte után vízlégszivattyú vákuumához csatlakoztatott Pasteur pipettával óvatosan leszívjuk a Trypsin-EDTA oldatot
5) üvegpipettával alaposan felszuszpendáljuk a sejteket, majd 10 mL friss tápoldattal
6) ebből a szuszpenzióból osztunk, új steril 10 cm-es csészékbe 1:10 arányban. Az összes csészében a folyadéktérfogatot kiegészítjük 10 mL-re. A MEF-145 sejtek így elérték a 49. passzázst.
7) Most 10 db 10 cm-es csésze sejtre lesz szükségünk, fagyasztáshoz, illetve további passzáláshoz, kísérletindításhoz.

Összefoglalása, eredménye:

A MEF-145 sejteket a 2 db. T-75-ös flaskából 10 db. 10-cm-es sejttenyésztő Petri csészébe osztottuk. A sejtek passzázs száma így elérte a 49-et.

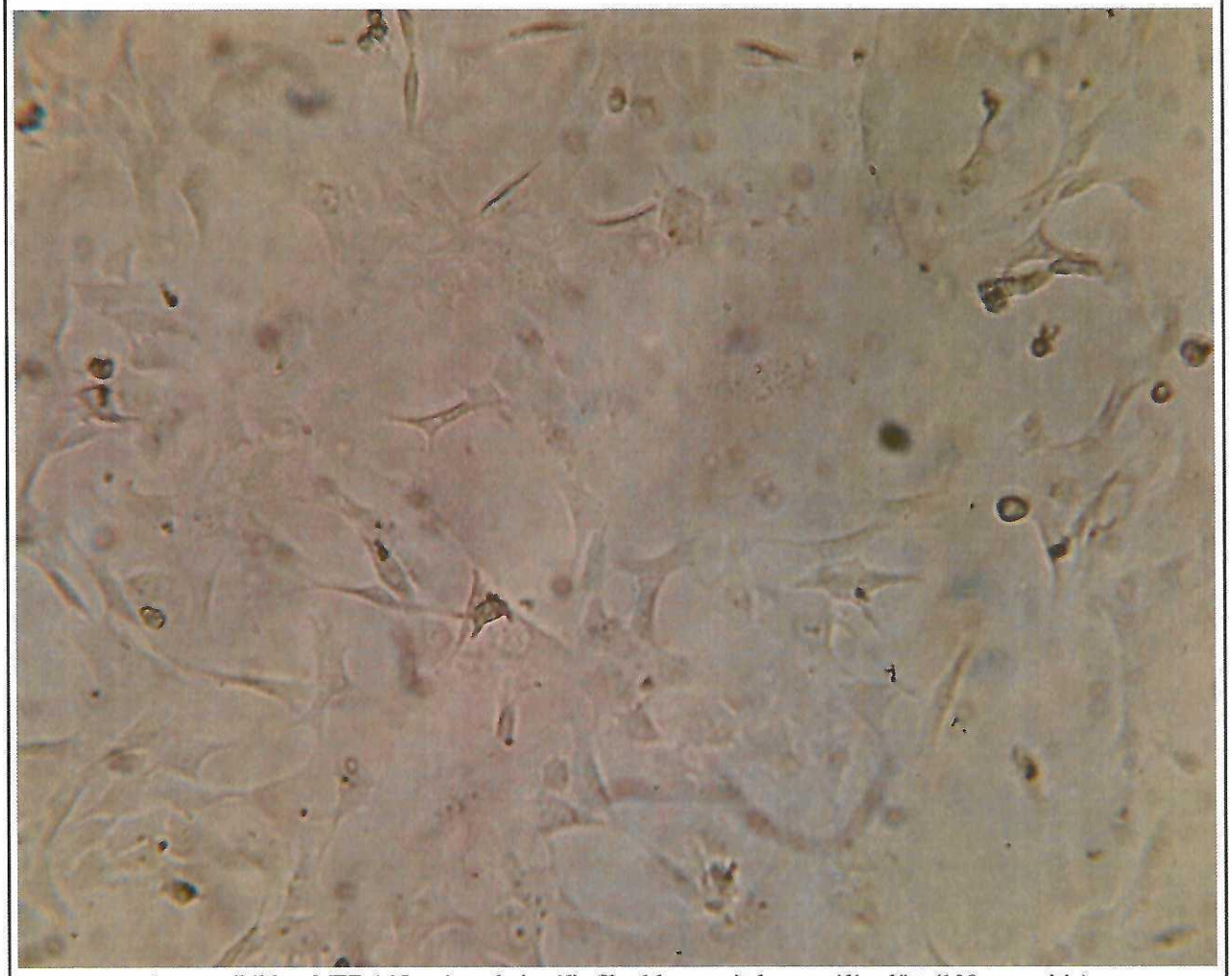
Csatolmányok felsorolása:
1.sz. melléklet – MEF-145 passzálás előtt

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 5/6 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtvonal fenntartása, passzálása	
Dátuma: 2017.06.09.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-003***

Csatolmányok



1.sz. melléklet: MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek passzálás előtt (100x nagyítás)

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 6/6 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtvonal fenntartása, passzálása	
Dátuma: 2017.06.09.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-003***

Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor	***Kiadásért felel: Dr. Hunya Ákos Gábor***

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal:1/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek fagyasztása és fenntartó passzálása	
Dátuma: 2017.06.12.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-004***

A művelet végzésének helye

A LipidArt Kft. kutatólaboratóriuma, 6726 Szeged, Temesvári krt. 62.

A műveletet végző személyek

	Beosztás K/T	**Aláírás**
Dr. Horváth Ibolya, vezető kutató	Vezető kutató	
Dr. Hunya Ákos Gábor	Tudományos munkatárs	
Dr. Pilbat Ana Maria	Tudományos munkatárs	
Bogdán Istvánné	Laborasszisztens	

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal:2/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek fagyasztása és fenntartó passzálása	
Dátuma: 2017.06.12.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-004***

Célja és rövid leírása:

Cél: A MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek kriopreszerválása.

Leírás: A Debreceni Egyetemtől kapott MEF-145 sejtvonal fagyasztása, fenntartó tenyésztése (passzálása) és kísérleti előkészítése.

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal:3/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek fagyasztása és fenntartó passzálása	
Dátuma: 2017.06.12.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-004***

Felhasznált anyagok

Anyag neve	Gyártó	Gyártási szám v. azonosító	Steril-e? x	Lejárati idő
DMEM high glucose	Biowest	P0103-N50L	x	2020.02.
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco	1027-106	x	2019.12.
L-Glutamine	Sigma	G5792-1KG	x	2020.03.
Penicillin-Streptomycin solution	Sigma	P4333-100ML	x	2021.01
10 cm-es műanyag Petri csésze	VWR	734-2321	x	2020.06.03.
10 mL-es üveg szerológiai pipetta	N/A	N/A	x	N/A
5 mL-es üveg szerológiai pipetta	N/A	N/A	x	N/A
Üveg Pasteur pipetta (2 mL)	N/A	N/A	x	N/A
1.5 ml-es Eppendorf cső	Greiner Bio-One	616201	x	2020.06
Trypsin-EDTA solution	Lonza	BE17-161E	x	2020.05
PBS	N/A	N/A	x	N/A
15 mL-es centrifugacső	Deltalab	22,429920	x	2020.02.
Dimethyl-sulfoxide	Molar	02610-203-340	-	2019.10.
Csavaros tetejű fagyasztócső (CRYO.S)	Greiner Bio-One	121263	x	2020.03.

Felhasznált gépek, berendezések, mérőeszközök

Berendezés neve	Azonosító	Ellenőrzés Kvalifikált/kalibrált-e: x, kvalifikálási azonosító
Steril fülke	ADS Laminaire BIO II. 12	x, 025/MTA:20-1801-3034
37°C-os CO_2 inkubátor	Jouan IG-150	N/A
Pipettor	Drummond PipettAid XL	N/A
OLYMPUS fázis kontraszt fénymikroszkóp	OLYMPUS CK30	N/A
Vízlégszivattyú	N/A	N/A
Izopropil-alkoholos fagyasztódoboz	Nalgene Cryo 1C	N/A
100-1000 µL-es manuális pipetta	Biohit ProLine	N/A
Sejtcentrifuga	Janetzki T32C	N/A
-80°C-os mélyfagyasztó hűtőszekrény		N/A

SZÉCHENYI 2020

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

MAGYARORSZÁG KORMÁNYA

Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal:4/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése	
Alcím: MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek fagyasztása és fenntartó passzálása	
Dátuma: 2017.06.12.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-004***

Előzmények:
KUT-JKV-LIP-01-003 passzálási jegyzőkönyv

Lépések (névvel,szignóval):
Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor

I. fagyasztási protokoll

1) A MEF-145 (10 db. 10 cm-es Petri csésze) sejtekről eltávolítjuk az elhasznált médiumot
2) A MEF-145 sejteket 5-5 mL 37°C-os 1x PBS-sel mossuk
3) A sejtekre ezután egyenként 2-2 mL Tripszin-EDTA oldatot pipettázunk, majd 2 percre 37°C-os sejttenyésztő inkubátorba helyezzük őket
4) 2 perc inkubációs idő letelte után 5 csészéből 10 mL 37°C-ra előmelegített DMEM tápoldattal üvegpipetta segítségével alaposan felszuszpendáljuk, majd egy 15 mL-es centrifugacsőbe pipettázzuk át a sejteket.
5) az így összegyűjtött sejteket 1200 rpm-el 5 percig centrifugáljuk sejtcentrifuga segítségével
6) centrifugálás után a leülepített sejttömegről eltávolítjuk a felülúszót
7) a sejtpelletet ezután 10 mL sejtfagyasztó tápoldatban (DMEM tápoldat + 10% FBS + 10% DMSO) újraszuszpendáljuk
8) a 10 mL sejtszuszpenziót végül 10 db fagyasztócsőbe (minden 10 cm-es Petri csésze sejtből 2 fagyasztócsőnyi sejtet készítünk, ez kb. 5 x 10^6 sejt / cső sejtkoncentrációt jelent) pipettázzuk (mindegyikbe 1-1 mL-t).
9) a fagyasztócsöveket izopropil-alkoholos fagyasztódobozba helyezzük (ez biztosítja a lassú, kb. 1°C / perces hűtést) és -80°C-os mélyfagyasztó hűtőszekrénybe tesszük

II. fenntartó passzálási protokoll

1) a maradék 5 db 10 cm-es Petri csésze MEF-145 (az I./1-4. pontokban) már feltripszinezett sejteket 10 mL DMEM tápoldatban üvegpipetta segítségével alaposan felszuszpendáljuk
2) a 10 mL sejtszuszpenzióból 2 mL-t (ez 1:5 higítási arányt jelent) átpipettázunk egy steril 15 mL-es centrifuga, a többit megsemmisítjük
3) a csőben a 2 mL szuszpenziót kiegészítjük 10 mL-re, majd 1200 rpm-el 5 percig centrifugáljuk sejtcentrifuga segítségével
4) centrifugálás után a leülepített sejttömegről eltávolítjuk a felülúszót és felszuszpendáljuk 10 mL DMEM tápoldatban
5) egyenlően elosztjuk a sejteket 5 db 10 cm-es Petri csészében (2 mL), majd a csészék végtérfogatát kiegészítjük 10 mL-re
6) a sejtek így elérték az 50. passzázst

A fenntartó passzálást innentől hetente háromszor (hétfő, szerda, péntek) végezzük, a passzázs szám értelemszerűen minden passzáláskor eggyel (50. passzázshoz képest) növekszik.

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE
GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal:5/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése	
Alcím: MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek fagyasztása és fenntartó passzálása	
Dátuma: 2017.06.12.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-004***

Összefoglalása, eredménye:
A Debreceni Egyetemről 2017.06.08-án érkezett MEF-145 sejteket 10 db 10 cm-es Petri csészében felszaporítottuk (KUT-JKV-LIP-01-003 passzálási jegyzőkönyv), majd 5 db csészében található sejteket lefagyasztottuk 10 db fagyasztócsőbe, a maradék 5 db csésze sejtet 1:5 arányban kihígítva tovább passzáltuk 5 db. 10 cm-es Petri csészébe (így a sejtek elérték az 50. passzázst).

Csatolmányok felsorolása:

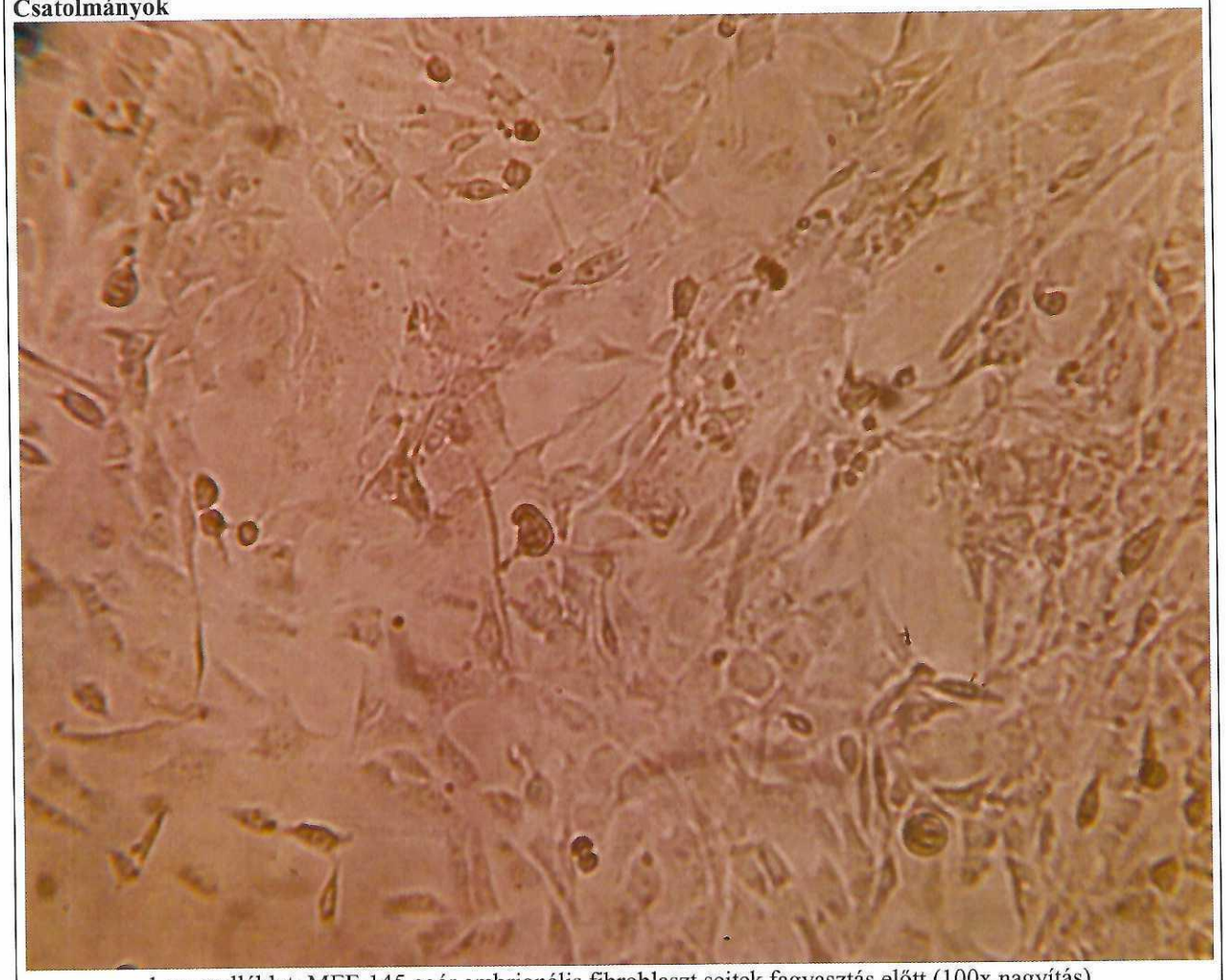
1.sz. melléklet – MEF-145sejtek fagyasztás előtt 100x nagyításban

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal:6/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek fagyasztása és fenntartó passzálása	
Dátuma: 2017.06.12.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-004***

Csatolmányok



1.sz. melléklet: MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek fagyasztás előtt (100x nagyítás)

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal:7/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek fagyasztása és fenntartó passzálása	
Dátuma: 2017.06.12.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-004***

Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor	***Kiadásért felel: Dr. Hunya Ákos Gábor***

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal:1/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 sejtvonal növekedési görbe számítás:	
Dátuma: 2017.06.19-23.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-005***

A művelet végzésének helye

A LipidArt Kft. kutatólaboratóriuma, 6726 Szeged, Temesvári krt. 62.

A műveletet végző személyek

	Beosztás K/T	Aláírás
Dr. Horváth Ibolya, vezető kutató	Vezető kutató	
Dr. Hunya Ákos Gábor	Tudományos munkatárs	
Dr. Pilbat Ana Maria	Tudományos munkatárs	
Bogdán Istvánné	Laborasszisztens	

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal:2/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 sejtvonal növekedési görbe számítás*:*	
Dátuma: 2017.06.19-23.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-005***

Célja és rövid leírása:

Cél: A sejtvonal növekedésének és stabilitásának osztódási gyakoriságának megismerése, jellemzése, növekedési időgörbe segítségével.

Leírás: A sejtvonal növekedésének és stabilitásának fokozása a fermentorban történő növesztéshez, melynek előfeltétele a sejtvonal bazális növekedési, osztódási karakterisztikájának jellemzése, növekedési időgörbe segítségével.

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal:3/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 sejtvonal növekedési görbe számítás*:*	
Dátuma: 2017.06.19-23.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-005***

Felhasznált anyagok

Anyag neve	Gyártó	Gyártási szám v. azonosító	Steril-e? x	Lejárati idő
DMEM high glucose	Biowest	P0103-N50L	x	2020.02.
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco	1027-106	x	2019.12.
L-Glutamine	Sigma	G5792-1KG	x	2020.03.
Penicillin-Streptomycin solution	Sigma	P4333-100ML	x	2021.01
10 mL-es üveg szerológiai pipetta	N/A	N/A	x	N/A
5 mL-es üveg szerológiai pipetta	N/A	N/A	x	N/A
Üveg Pasteur pipetta (2 mL)	N/A	N/A	x	N/A
Trypsin-EDTA solution	Lonza	BE17-161E	x	2020.05
PBS	N/A	N/A	x	N/A
3.5 cm-es műanyag Petri csésze	VWR	734-2318	x	2020.06.03
1.5 ml-es Eppendorf cső	Greiner Bio-One	616201	x	2020.06
Trypan Blue stain 0.4%	Thermo-Fisher Scientific	T10282	x	2019.10.20.
Bürker-kamra sejtszámoló	VWR	631-0921		N/A

Felhasznált gépek, berendezések, mérőeszközök

Berendezés neve	Azonosító	Ellenőrzés Kvalifikált/kalibrált-e: x, kvalifikálási azonosító
Steril fülke	ADS Laminaire BIO II. 12	x, 025/MTA:20-1801-3034
37°C-os CO_2 inkubátor	Jouan IG-150	N/A
Pipettor	Drummond PipettAid XL	N/A
OLYMPUS fázis kontraszt fénymikroszkóp	OLYMPUS CK30	N/A
Vízlégszivattyú	N/A	N/A

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal:4/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 sejtvonal növekedési görbe számítás:	
Dátuma: 2017.06.19-23.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-005***

Előzmények:
KUT-JKV-LIP-01-003 passzálási jegyzőkönyv

Lépések (névvel,szignóval):
Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor

1) Hétvége után passzáltam (53. Passzázs) a sejteket 1:2 arányban (eredmény 4 csésze) a kísérleti kiosztáshoz
2) Növekedési időgörbe számítási kísérlethez standard kiindulási sejtmennyiségre van szükség. Ez minden mintánál azonos, 10.000 sejt/cm^2, amely (a 3,5 cm-es Petri csészék esetén 9,62 cm^2 felülettetl számolva) 1 x 10^5 sejt/csésze sejtet jelent
3) Megfigyelési, sejtszámolási időpontok a kiosztástól (0 h) számított 24h, 48h és 72h
4) A kísérletet minden időpontban 3 párhuzamos mintával végzem, azaz 9db 3.5cm-es csészére lesz szükségem. Ez 9 x 10^5 sejtet jelent, vagyis kis ráhagyással ~1 M sejt
5) 2017.06.21-én a 24h-ás csészék sejtjeiről eltávolítom az elhasznált médiumot
6) A MEF-145 sejteket 2-2 mL 37°C-os 1x PBS-sel mosom
7) A sejtekre ezután egyenként 1-1 mL Tripszin-EDTA oldatot pipettázok, majd 2 percre 37°C-os sejttenyésztő inkubátorba helyezem őket
8) 2 perc inkubációs idő letelte után 3 csészéből 2 mL 37°C-ra előmelegített DMEM tápoldattal üvegpipetta segítségével alaposan felszuszpendálom, majd 3 x 10 µL-t 3 db 1.5 mL-es Eppendorf csőbe pipettázok
9) Ezekre az elkülönített mintákra egyenként 10-10 µL 0.4%-os Trypan Blue festéket pipettázok
10) 5 percig inkubálom a csöveket
11) A festék-sejt szuszpenziót (10 µL-t) a Bürker-kamra zsebébe pipettázom
12) Mikroszkóp alatt leszámolom az egységnyi területen látható sejteket, mindhárom csésze esetében, legalább 3 technikai párhuzamban
13) Az egységnyi felületen összeszámolt sejtek száma szorozva a higítással (ebben az esetben 1:2, tehát 2) és szorozva 10^4-nel, adja meg a sejtek számát mL-ben
14) Ugyanígy járok el 2017.06.22-én a 48h-ás mintákkal, leszámoltam Bürker-kamra segítségével 3 párhuzamosban.
15) Ugyanígy járok el 2017.06.23-án a 72h-ás mintákkal, leszámoltam Bürker-kamra segítségével 3 párhuzamosban.
16) A sejtszámolási adatokat táblázatban rögzítem (lásd 1.sz. melléklet)
17) A nyers adatokat átlagolom, szórást (SD) számolok, majd az átlagokat szórással együtt vonaldiagrammon ábrázolom (lásd 2.sz. melléklet)

Összefoglalása, eredménye:

A Debreceni Egyetemtől kapott MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek igen gyorsa nőnek, kevesebb mint 24h alatt megduplázódnak. A lineárisnak tekintjük a növekedési görbéjüket (lsd. 2.sz. melléklet), akkor a számitott adatok szerint kb. 5 óra a duplázódási idejük. 3.5 cm-es csészékben kb. 72 óra inkubációt követően elérik a szaturáltsági állapotot (100 % konfluencia), ez a sejtszámolási adatok alapján kb. 2 x 10^6 sejtet jelent, ami 10 cm-es csészékre (78.54 cm^2-es felület) kb. 1.6 x 10^7 db sejtet jelent.

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal:5/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 sejtvonal növekedési görbe számítás:	
Dátuma: 2017.06.19-23.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-005***

Csatolmányok felsorolása:

1.sz. melléklet – nyers sejtszámolási adatok táblázatos ábrázolásban
2.sz. melléklet – növekedési görbe vonaldiagramm ábrázolásban
3.sz. melléklet – tenyésztőedények felületi adatai

Csatolmányok

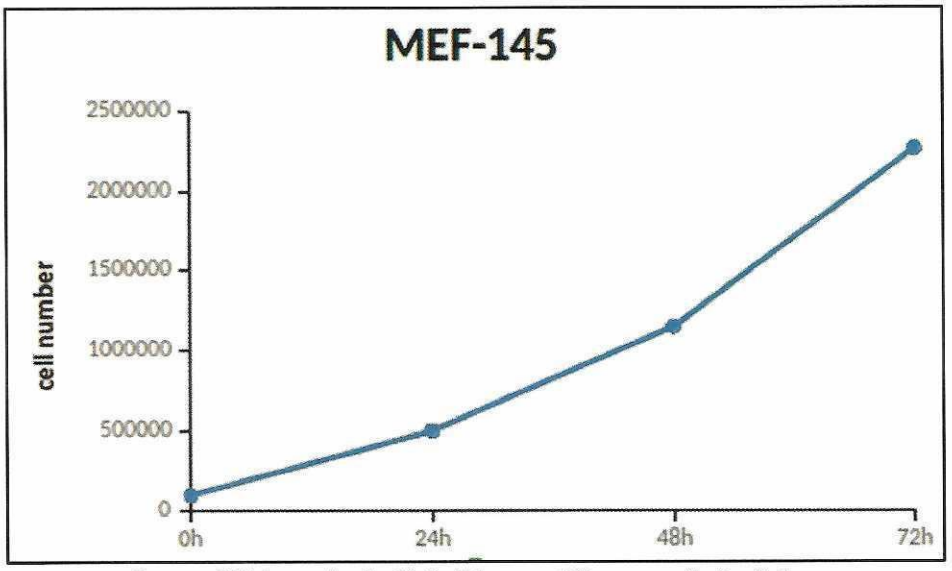
MEF-145 növekedési görbe					
2017.06.20.					
Kiindulási sejtszám: 10.000 sejt/cm²					
3.5cm-es plate==9.62cm²		azaz ~100.000 sejt/csésze			
idő		RAW	AVG	SD	norm.
0h	paralell1	100000			
	paralell2	100000			
	paralell3	100000	100000	0	1
24h	paralell1	500000			
	paralell2	540000			
	paralell3	465000	501667	37528	5.1
48h	paralell1	1020000			
	paralell2	1170000			
	paralell3	1260000	1150000	121244	11.5
72h	paralell1	2430000			
	paralell2	2100000	2265000	233345.23	22.65

1.sz. melléklet – nyers sejtszámolási adatok táblázatos ábrázolásban

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal:6/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 sejtvonal növekedési görbe számítás*:*	
Dátuma: 2017.06.19-23.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-005***



2.sz. melléklet – növekedési görbe vonaldiagramm ábrázolásban

	Surface area (cm^2)
Dishes	
35 mm	9.62
60 mm	28.27
100 mm	78.54
150 mm	176.71
Custer plates	
6-well	9.62
12-well	4.01
24-well	2
48-well	0.88
96-well	0.32
Flasks	
T-25	25
T-75	75
T-150	150

3.sz melléklet - tenyésztőedények felületi adatai (gyártói adatok alapján)

SZÉCHENYI 2020

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

MAGYARORSZÁG KORMÁNYA

Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal:7/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 sejtvonal növekedési görbe számítás*:*	
Dátuma: 2017.06.19-23.	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-005***

Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor	***Kiadásért felel: Dr. Hunya Ákos Gábor***
Hunya Á.	

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal:1/8 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek kísérleti sejtkiosztási protokollja	
Dátuma: 2017.06.26-	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-006***

A művelet végzésének helye

A LipidArt Kft. kutatólaboratóriuma, 6726 Szeged, Temesvári krt. 62.

A műveletet végző személyek

	Beosztás K/T	Aláírás
Dr. Horváth Ibolya, vezető kutató	Vezető kutató	
Dr. Hunya Ákos Gábor	Tudományos munkatárs	
Dr. Pilbat Ana Maria	Tudományos munkatárs	
Bogdán Istvánné	Laborasszisztens	

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal:2/8 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek kísérleti sejtkiosztási protokollja	
Dátuma: 2017.06.26-	*Azonosító:**KUT-JKV-LIP-01-006***

Célja és rövid leírása:

Cél: A MEF-145 sejtek standardizált protokoll alapján történő kísérleti előkészítése sejttoxicitási és western blot analízishez

Leírás: A KUT-JKV-LIP-01-005 azonosítójú jegyzőkönyvben kiszámított növekedési görbe eredményei alapján a különböző nagyságú felülettel rendelkező tenyésztőedényekhez optimalizált standard sejtkiosztási protokollt dolgoztunk ki.

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal:3/8 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek kísérleti sejtkiosztási protokollja	
Dátuma: 2017.06.26-	*Azonosító:**KUT-JKV-LIP-01-006***

Felhasznált anyagok

Anyag neve	Gyártó	Gyártási szám v. azonosító	Steril-e? x	Lejárati idő
DMEM high glucose	Biowest	P0103-N50L	x	2020.02.
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco	1027-106	x	2019.12.
L-Glutamine	Sigma	G5792-1KG	x	2020.03.
Penicillin-Streptomycin solution	Sigma	P4333-100ML	x	2021.01
10 mL-es üveg szerológiai pipetta	N/A	N/A	x	N/A
5 mL-es üveg szerológiai pipetta	N/A	N/A	x	N/A
Üveg Pasteur pipetta (2 mL)	N/A	N/A	x	N/A
Trypsin-EDTA solution	Lonza	BE17-161E	x	2020.05
PBS	N/A	N/A	x	N/A
96-well plate	Orange Scientific	4430100N	x	2018.08.
6 cm-es műanyag Petri csésze	VWR	734-2321	x	2020.06.03
1.5 ml-es Eppendorf cső	Greiner Bio-One	616201	x	2020.06
12 csatornás multichannel pipetta 50-300µL	Orange Scientific	3590130	-	N/A
8 csatornás multichannel pipetta 50-300µL	Orange Scientific	3590115	-	N/A
Sejtkiosztó autoklávozható műanyag V-alakú reservoir 12 és 8 csatornás pipettákhoz	Biohit	783500	-	N/A
Autoklávozható műanyag V-alakú 12 lyukú reservoir 12 és 8 csatornás pipettákhoz	Biologix	25-1202	-	N/A

Felhasznált gépek, berendezések, mérőeszközök

Berendezés neve	Azonosító	Ellenőrzés Kvalifikált/kalibrált-e: x, kvalifikálási azonosító
Steril fülke	ADS Laminaire BIO II. 12	x, 025/MTA:20-1801-3034
37°C-os CO_2 inkubátor	Jouan IG-150	N/A
Pipettor	Drummond PipettAid XL	N/A
OLYMPUS fázis kontraszt fénymikroszkóp	OLYMPUS CK30	N/A
Vízlégszivattyú	N/A	N/A

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal:4/8 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek kísérleti sejtkiosztási protokollja	
Dátuma: 2017.06.26-	*Azonosító:**KUT-JKV-LIP-01-006***

Előzmények:
KUT-JKV-LIP-01-002 MEF-145 fénymikroszkópos vizsgálat jegyzőkönyv
KUT-JKV-LIP-01-003 MEF-145 passzálási jegyzőkönyv
KUT-JKV-LIP-01-005 MEF-145 növekedési görbe

Lépések (névvel,szignóval):
Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor

A MEF-145 növekedési görbe számítási kísérlet eredményei alapján kidolgoztuk a különböző nagyságú felülettel rendelkező tenyésztőedényekhez optimalizált standard sejtkiosztási protokollt. A továbbiakban minden kísérlet előkészítéséhez ezeket a standard protokollokatt használjuk:

I. sejttoxicitási mérésekhez:

1) A MEF-145 (szaturációhoz közeli kb. 80-90%-os konfluens 10 cm-es Petri csésze, 1.sz. melléklet) sejtekről eltávolítom az elhasznált médiumot
2) A MEF-145 sejteket 5-5 mL 37°C-os 1x PBS-sel mosom
3) A sejtekre ezután egyenként 2-2 mL Tripszin-EDTA oldatot pipettázok, majd 2 percre 37°C-os sejttenyésztő inkubátorba helyezem őket
4) 2 perc inkubációs idő letelte után a csészé(k)ből 10 mL 37°C-ra előmelegített DMEM tápoldattal üvegpipetta segítségével alaposan felszuszpendálom, majd egy 15 mL-es centrifugacsőbe pipettázom át a sejteket, innen 20 µL-t egy steril 1.5 µL-es Eppendorf csőbe pipettázok
5) Erre az elkülönített mintára 10 µL 0.4%-os Trypan Blue festéket pipettázok
6) 5 percig inkubálom
7) A festék-sejt szuszpenziót (10 µL-t) a Bürker-kamra zsebébe pipettázom
8) Mikroszkóp alatt leszámolom az egységnyi területen látható sejteket, legalább 3 technikai párhuzamban
9) Az egységnyi felületen összeszámolt sejtek száma szorozva a higítással (ebben az esetben 1:2, tehát 2) és szorozva 10^4-nel, adja meg a sejtek számát mL-ben
10) A sejttoxicitási tesztek előkészítéséhez az eddigi vizsgálatok eredményeit felhasználva (fénymikroszkópos vizsgálat, passzálási jegyzőkönyv, növekedési görbe) határoztuk meg a megfelelő sejtszámot. Fontos kritérium: a sejtek a kioszást követően 1 nappal 60%-os konfluens állapotban legyenek (lsd. 2.sz. melléklet). Így a leghatékonyabb a kezelés.
11) A toxicitási teszteket 96-well plate-kben végzem, wellenként 100 µL munkatérfogattal
12) A standard kiosztási sejtszám 96-well plate esetén **1 x 10^4 sejt/well**, vagyis 1 x 10^5 sejt / mL
13) A kiszámított térfogatú sejtszuszpenziót a 15 mL-es centrifugacsőből átpipettázom a V-alakú reservoir-ba, kiegészítem a kiszámított arányban friss DMEM tápoldattal
14) 8 csatornás pipetta sejítségével a higított szuszpenziót a 96-well plate-k welljeibe pipettázom

SZÉCHENYI 2020
GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

II. Western blot kísérletekhez:

1) A MEF-145 (szaturációhoz közeli kb. 80-90%-os konfluens 10 cm-es Petri csésze, 1.sz. melléklet) sejtekről eltávolítom az elhasznált médiumot
2) A MEF-145 sejteket 5-5 mL 37°C-os 1x PBS-sel mosom
3) A sejtekre ezután egyenként 2-2 mL Tripszin-EDTA oldatot pipettázok, majd 2 percre 37°C-os sejttenyésztő inkubátorba helyezem őket
4) 2 perc inkubációs idő letelte után a csészé(k)ből 10 mL 37°C-ra előmelegített DMEM tápoldattal üvegpipetta segítségével alaposan felszuszpendálom, majd egy 15 mL-es centrifugacsőbe pipettázom át a sejteket, innen 20 µL-t egy steril 1.5 µL-es Eppendorf csőbe pipettázok
5) Erre az elkülönített mintára 10 µL 0.4%-os Trypan Blue festéket pipettázok
6) 5 percig inkubálom
7) A festék-sejt szuszpenziót (10 µL-t) a Bürker-kamra zsebébe pipettázom
8) Mikroszkóp alatt leszámolom az egységnyi területen látható sejteket, legalább 3 technikai párhuzamban
9) Az egységnyi felületen összeszámolt sejtek száma szorozva a higítással (ebben az esetben 1:2, tehát 2) és szorozva 10^4-nel, adja meg a sejtek számát mL-ben
10) A western blot kísérletek előkészítéséhez az eddigi vizsgálatok eredményeit felhasználva (fénymikroszkópos vizsgálat, passzálási jegyzőkönyv, növekedési görbe) határoztuk meg a megfelelő sejtszámot. Fontos kritérium: a sejtek a kioszást követően 1 nappal 60%-os konfluens állapotban legyenek (lsd. 2.sz. melléklet). Így a leghatékonyabb a kezelés.
11) A western blot kísérletekhez a sejteket 6 cm-es műanyag Petri csészékbe osztottam ki, csészénként 5 mL munkatérfogattal
12) A standard kiosztási sejtszám 6 cm-es Petri csészék esetén **5 x 10^5 sejt/csésze**, vagyis 1 x 10^5 sejt / mL

Összefoglalása, eredménye:

A KUT-JKV-LIP-01-002, KUT-JKV-LIP-01-003, valamint a KUT-JKV-LIP-01-005 azonosítójú jegyzőkönyvek adatai, eredményei alapján a különböző nagyságú felültettel rendelkező tenyésztőedényekhez optimalizált standard sejtkiosztási protokollt dolgoztunk ki 96-well plate-ekre (citotoxicitási kísérletek) és 6 cm-es Petri csészékre (western blot analízis). A jövőben minden kísérletre történő sejtkiosztást ezek alapján fogunk elvégezni.

Csatolmányok felsorolása:

1.sz. melléklet: 80-90%-os konfluens sejteloszlás
2.sz. melléklet, MEF-145 sejtek 60%-os konfluens állapotban

SZÉCHENYI 2020

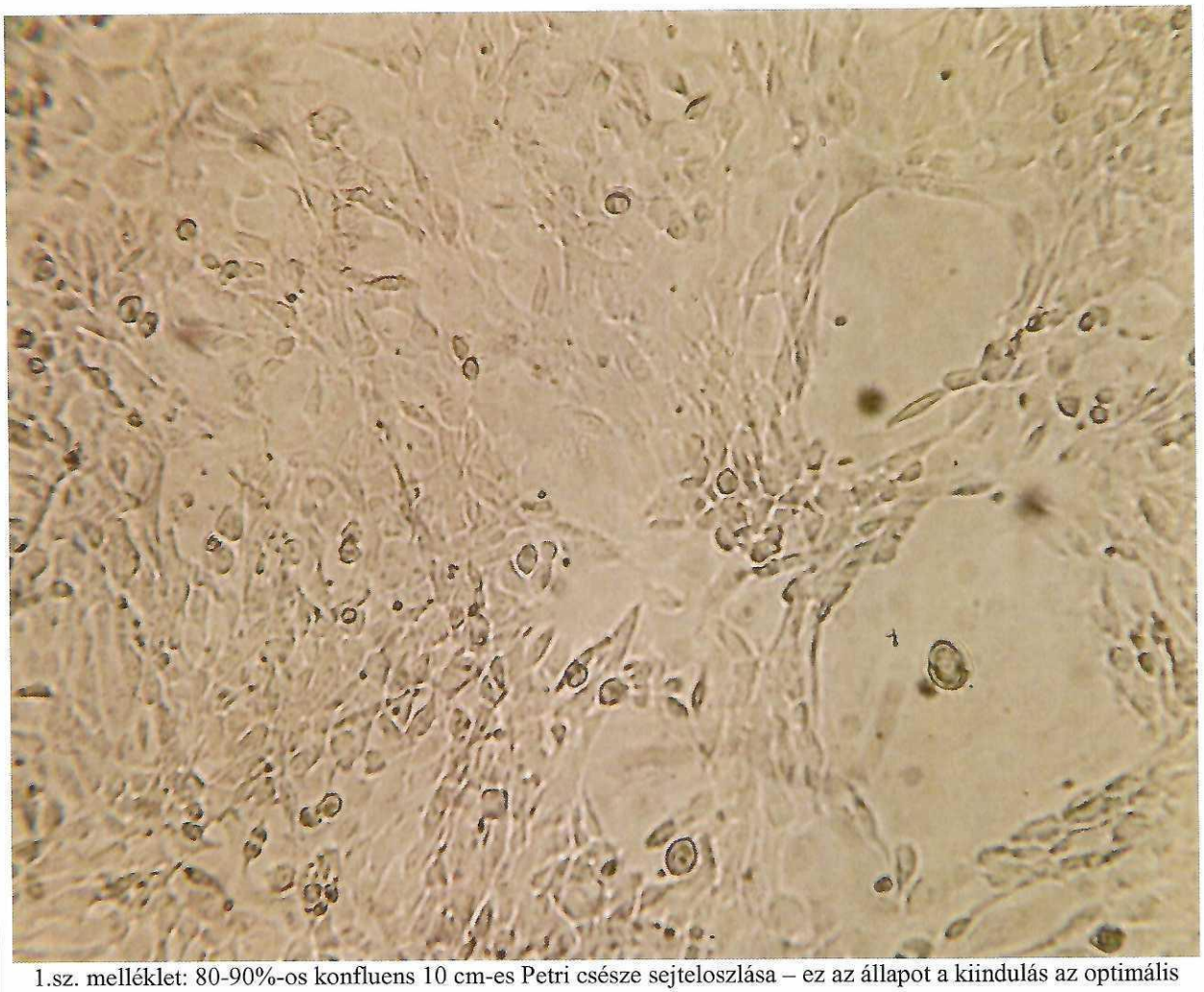
GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

MAGYARORSZÁG KORMÁNYA

Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal:6/8 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek kísérleti sejtkiosztási protokollja	
Dátuma: 2017.06.26-	*Azonosító:**KUT-JKV-LIP-01-006***

Csatolmányok

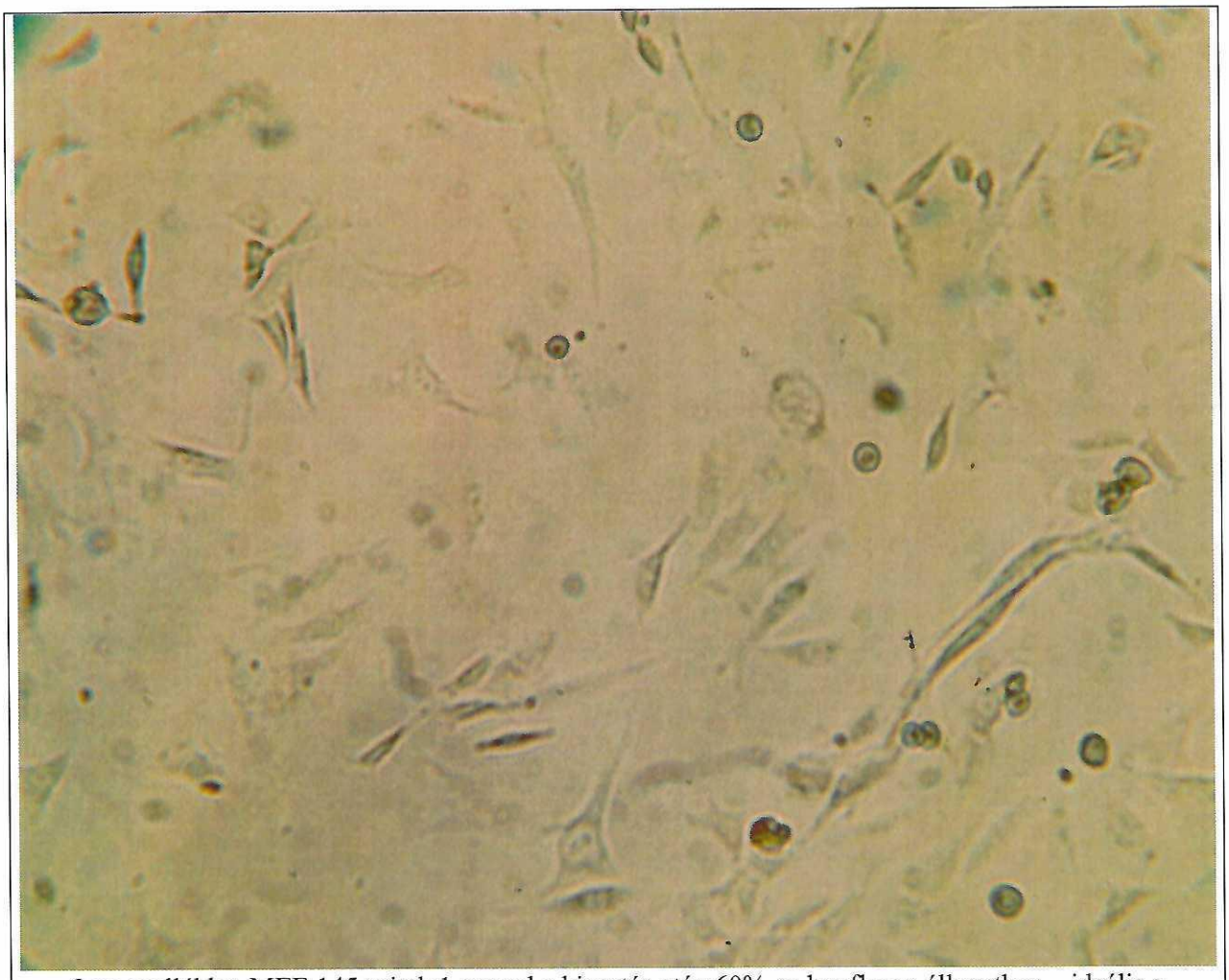


1.sz. melléklet: 80-90%-os konfluens 10 cm-es Petri csésze sejteloszlása – ez az állapot a kiindulás az optimális kísérleti sejtkiosztáshoz (100x nagyítás)

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal:7/8 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek kísérleti sejtkiosztási protokollja	
Dátuma: 2017.06.26-	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-006***



2.sz. melléklet, MEF-145 sejtek 1 nappal a kiosztás után 60%-os konfluens állapotban – ideális a stresszorokkal, gyógyszerjelöltekkel történő kezeléshez

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal:8/8 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek kísérleti sejtkiosztási protokollja	
Dátuma: 2017.06.26-	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-006***

Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor	***Kiadásért felel: Dr. Hunya Ákos Gábor***

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal:1/10 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* Western blot standardizált protokoll	
Dátuma: 2017.07.03-	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-007***

A művelet végzésének helye

A LipidArt Kft. kutatólaboratóriuma, 6726 Szeged, Temesvári krt. 62.

A műveletet végző személyek

	Beosztás K/T	**Aláírás**
Dr. Horváth Ibolya, vezető kutató	Vezető kutató	
Dr. Hunya Ákos Gábor	Tudományos munkatárs	
Dr. Pilbat Ana Maria	Tudományos munkatárs	
Bogdán Istvánné	Laborasszisztens	

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal:2/10 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* Western blot standardizált protokoll	
Dátuma: 2017.07.03-	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-007***

Célja és rövid leírása:

Cél: Western blot analízis standardizált protokoll létrehozása

Leírás: Dajkafehérjék expressziójának és működésének a Debreceni Egyetem által rendelkezésre bocsátott MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtvonalon történő jellemzéséhez használt western blot technika optimalizálása, standardizálása, leítarának elkészítése.

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal:3/10 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* Western blot standardizált protokoll	
Dátuma: 2017.07.03-	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-007***

Felhasznált anyagok

Anyag neve	Gyártó	Gyártási szám v. azonosító	Steril-e? x	Lejárati idő
RIPA puffer	Sigma-Aldrich	R0278-50ML	-	2020.02.23.
Protease inhibitor coctail	Sigma-Aldrich	P8340-1ML	-	2019.12.20.
Mintapuffer, Laemmli 4× koncentrált	BIO-RAD	161-0747	-	2019.12.20.
vízjég	N/A	N/A	-	N/A
1.5 mL-es Eppendorf cső	Greiner Bio-One	616201	-	2020.06.
Pierce BCA Protein Assay kit	Pierce	23225	-	2020.01.
96 well plate fehérjeméréshez	Greiner Bio-One	655101	-	2020.05.10.
Üveglapok 0.75 mm vastagságú poliakrilamid gélhez	BIO-RAD	1653308 és 1653310	-	N/A
Protein molekulatömeg marker	BIO-RAD	1610375	-	2019.11.
PVDF membrán Immobilon-P .45mm	Millipore	IPVH00010	-	2019.10.
Whatmann szűrőpapír	VWR	732-4093	-	2020.01.
Műanyag tálka membránokhoz	N/A	N/A	-	N/A
PBS	N/A	N/A	-	N/A
ECL (Immobilon Western)	Millipore	WBKLS0100	-	2019.01.05.

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

Felhasznált gépek, berendezések, mérőeszközök

Berendezés neve	Azonosító	Ellenőrzés Kvalifikált/kalibrált-e: x, kvalifikálási azonosító
Sejtkaparó pálca	N/A	N/A
Manuális pipetta 100-1000 µL	Biohit ProLine	N/A
Hűthető síkrázó mikro centrifugacsövekhez	Eppendorf Thermomixer Comfort	N/A
Vízlégszivattyú	N/A	N/A
Centrifuga mikro centrifugacsövekhez	Sorvall RMC 14	N/A
Plate olvasó fotométer	Thermo MultSkan EX	N/A
Poliakrilamid gél elekrtoforézis kit	BIO-RAD Mini-PROTEAN TETRA System	N/A
Blottoló berendezés	BIO-RAD Mini Trans-Blot Cell	N/A
Billegő tér-rázó rázógép	Labnet Rocker 25	N/A
AlphaImager HP nagysebességű CCD kamera	Alpha Innotech Inc.	N/A

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal:5/10 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* Western blot standardizált protokoll	
Dátuma: 2017.07.03-	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-007***

Előzmények:
KUT-JKV-LIP-01-006 sejtkiosztási protokoll

Lépések (névvel,szignóval):
Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor

A standardizált protokollt a BIO-RAD cég „A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection" valamint a „Protein Blotting Giude" című protokolljai alapján készítettük (a pufferek, oldatok receptjei is innen származnak), lépései:

1) A vizsgálat kezdetét megelőzően 48 órával 5 x 10^5 sejt/csésze MEF-145 sejtet oltottunk ki 6 cm-es Petri csészére.
2) A 24 órás inkubációt (37°C, 5% CO_2) követően a sejteket a hővel (hősokk), gyógyszerjelölt molekulákkal, stresszorokkal kezeljük meghatározott koncentrációban és ideig
3) Ezt követi egy minimum 6 órás, de általában overnight (16 órás) recovery
4) Ezután a sejtekről eltávolítom az elhasznált médiumot
5) Innentől minden lépést jégen végzek, illetve minden edényt puffert, eszközt lehűtök legalább +4°C-ra
6) A sejteket háromszor mosom jéghideg PBS-el, a maradék folyadékot leszívom a sejtekről amennyire csak tudom vízlégszivattyú segítségével
7) Ezt követően 200 µL jéghideg proteáz inhibitor koktélt tartalmazó RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) puffert pipettázok a sejtekre
8) Sejtkaparó pálca segítségével a sejteket összekaparom, majd átpipettázom előhűtött, feliratozott 1.5 mL-es Eppendorf csövekbe
9) A csöveket ezután rázatom hűthető síkrázóban 2 órán keresztül
10) 12000 rpm-en 10 percig centrifugálom őket, majd a felülúszót átszívom új csövekbe
11) Ezt követően az egyes minták sejtlizátumainak összfehérje koncentrációját megmérem BCA reagen kit-tel (a gyártói protokoll alapján)
12) A fehérjemérés eredményeit felhasználva a minták protein koncentrációját egységesítetem (a legkisebb koncentrációjú mintahoz normálva, általában 1-2 mg/mL közé esik)
13) Új előhűtött Eppendorf csövekben elkészítem az egységesített fehérjekoncentrációjú minták higításait a számítások alapján
14) az így elkészített mintákhoz a térfogat aránynak megfelelő mennyiségű 4 x Laemmli puffert adok, majd a mintákat forralom 5 percig
15) az 1.sz. mellékletben található táblázat alapján 12 %-os 15 zsebes 0.75 mm vastag SDS-Poliakrilamid gélt készítek
16) A gél zsebeibe 5 µL mintát viszek fel, a két szélső zsebbe csak 1 x Laemmli puffert pipettázok
17) A második zsebbe protein molekulatömeg markert, a fennmaradó zsebekbe pedig mintákat viszek fel, ez utóbbiakat 3 technikai párhuzamban
18) A futtatást 160 V feszültséggel végzem, nagyjából 45 percig, amíg a front éppen nem fut le a gélről
19) A futás végeztével a gél(eke)t blottoló pufferbe helyezem 5 percig

SZÉCHENYI 2020
GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

20) Közben előre méretere vágott (8 x 5 cm) PVDF membrán(oka)t metanolban áztatom (aktiválom) 5 percig, majd szintén 5 percig blottoló pufferbe rakom
21) Majd ugyanebben a pufferben előáztatott 2 db egymára illesztett Whatman szűrőpapír felszínére helyezem a membránt
22) A membrán felszínét blottoló pufferrel alaposan megnedvesítem, majd ráhelyezem a gélt, erre pedig újabb 2 db. előnedvesített Whatman papírt.
23) Az így keletkezett „szendvics"-ből alaposan kinyomkodom a buborékokat, majd a megfelelő orientációban (a futás az áram irányának megfelelően, vagyis a negatív pólus felől a pozitív pólus felé zajlik) a blottoló készülékbe helyezem és hűtve 500 mA áramerősséggel 1 órán át blottolom.
24) Blottolás befejeztével a membrán(oka)t 1 x TBS-0.1% Tween-20 (TTBS) pufferrel 3 x 5 percig mosom
25) Mosást követően 5%-os nem zsíros tejport tartalmazó TTBS-ben blokkolom a membrán(oka)t 1 órán át
26) Ezt újabb mosási lépés követi 1 x TTBS pufferrel 3 x 5 percig
27) Ezután a membránokat a megfelelő elsődleges antitesttel, a megfelelő higításban overnight +4°C-on inkubálom
28) Az inkubáció leteltével a membrán(oka)t mosom 1 x TTBS pufferrel 3 x 5 percig
29) Majd a membránokat 1 órán át inkubáltom torma peroxidáz-konjugált anti-egér vagy anti-nyúl IgG másodlagos antitest (3% nem zsíros tejport tartalmazó PBS-ben oldva, megfelelő higításban) jelenlétében
30) A fehérje-antitest komplexeket a torma peroxidáz enzim kemilumineszcens szubsztrátjának (ECL) segítségével mutatom ki
31) A membránokról készült digitális felvételeket az AlphaEase FC szoftver segítségével analizálom
32) Az egyes minták denzitometriás analízisének eredményeit az ugyanabból a mintából mért GAPDH fehérje szintjéhez normalizálom

Összefoglalása, eredménye:

Dajkafehérjék expressziójának és működésének a Debreceni Egyetem által rendelkezésre bocsátott MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtvonalon történő jellemzéséhez, a BIO-RAD cég ingyenesen elérhető guide-jainak felhasználásával hoztunk létre egy standardizált western blot protokoll leiratot.

Csatolmányok felsorolása:
1.sz. melléklet: Kézzel öntött poliakrilamid gélek összetétele
2.sz. melléklet: SDS-PAGE-hez használt pufferek összetétele
3.sz. melléklet: Blottoláshoz használt oldatok pufferek összetétele

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal:7/10 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* Western blot standardizált protokoll	
Dátuma: 2017.07.03-	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-007***

Csatolmányok

TABLE 18.3 Solutions for Preparing Resolving Gels for Tris-glycine SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Solution components	Component volumes (ml) per gel mold volume of 5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
6%								
H_2O	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
30% acrylamide mix	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8%								
H_2O	2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9	18.5	23.2
30% acrylamide mix	1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	10.7	13.3
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10%								
H_2O	1.9	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8
30% acrylamide mix	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	13.3	16.7
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12%								
H_2O	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
30% acrylamide mix	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15%								
H_2O	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
30% acrylamide mix	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	20.0	25.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

TABLE 18.4 Solutions for Preparing 5% Stacking Gels for Tris-glycine SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Solution components	Component volumes (ml) per gel mold volume of 1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	8 ml	10 ml
H_2O	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
30% acrylamide mix	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1.0	1.25
10% SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
10% ammonium persulfate	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

Tables 18.3 and 18.4 are modified from Harlow and Lane (1988).

1.sz. melléklet: Kézzel öntött különböző töménységű poliakrilamid gélek (Stacking és resolving) összeállítása. A táblázat Harlow és Lane (1988) alapján készült.

Buffer Formulations

Sample Preparation Buffers

1 M Tris-HCl, pH 7.6 (100 ml)

Tris base	12.11 g
Deionized H_2O (dH_2O)	80 ml
Adjust pH to 7.6 with HCl.	
dH_2O	to 100 ml

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 (100 ml)

Tris base	6.06 g
dH_2O	~60 ml
Adjust to pH 6.8 with HCl.	
dH_2O	to 100 ml

Store at 4°C.

10% SDS (10 ml)

SDS	1.00 g
dH_2O	to 10 ml

1.0% Bromophenol Blue (10 ml)

Bromophenol blue	100 mg
dH_2O	to 10 ml

RIPA Solubilization Buffer (100 ml)

25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40 or 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS

NaCl	0.88 g
EDTA	0.15 g
NP-40 or Triton X-100	1 g
Sodium deoxycholate	1 g
SDS	0.10 g
dH_2O	80 ml
1 M Tris-HCl, pH 7.6	2.5 ml
dH_2O	to 100 ml

Phosphate Buffered Saline (PBS, 1 L)

0.9% (w/v) sodium chloride in 10 mM phosphate buffer pH 7.4

NaCl	8.00 g
KCl	0.20 g
Na_2HPO_4	1.44 g
KH_2PO_4	0.24 g
dH_2O	800 ml
Adjust pH to 7.4 with HCl or NaOH.	
dH_2O	to 1 L

SDS-PAGE Sample Buffer (2x, 8 ml)

(, 30 ml)

62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 0.01% bromophenol blue

0.5 mM Tris-HCl, pH 6.8	1.0 ml
25% Glycerol	2.0 ml
1.0% Bromophenol blue	0.08 ml
10% SDS	1.6 ml
dH_2O	2.92 ml

Store as 1–2 ml aliquots at –70°C and add β-mercaptoethanol (0.4 ml) or 3% DTT immediately before use.

Protein Precipitation Solution (100 ml)

20% Trichloroacetic acid (TCA), 0.2% DTT in ice-cold acetone (–20°C)

TCA	20.00 g
DTT	0.20 g
Acetone	80 ml
Dissolve	
Acetone	to 100 ml

Store at –20°C.

Wash Solution (100 ml)

0.2% DTT in ice-cold acetone (–20°C)

DTT	0.20 g
Acetone	80 ml
Dissolve	
Acetone	to 100 ml

Store at –20°C.

Lysis Buffer (50 ml)

2 M thiourea, 7 M urea, 4% (w/v) CHAPS, 1% (w/v) DTT, 2% (w/v) carrier ampholytes (pH 3–10)

Urea	21.00 g
Thiourea	7.60 g
dH_2O	to 45 ml
CHAPS	2.00 g
Bio-Lyte® ampholytes	1.0 ml
DTT	0.50 g
dH_2O	to 50 ml

SDS Sample Solubilization Buffer (50 ml)

1% (w/v) SDS, 100 mM Tris-HCl (pH 9.5)

SDS	0.50 g
Tris base	0.60 g
dH_2O	40 ml
Titrate to pH 9.5 with diluted HCl.	
dH_2O	to 50 ml

Buffer Formulations

Gel Casting Reagents

Acrylamide/Bis (30% T, 2.67% C)

Acrylamide (29.2 g/100 ml)	87.60 g
N'N'-bis-methylene-acrylamide	2.40 g
dH_2O	to 300 ml

Filter and store at 4°C in the dark (30 days).

Premade alternatives:
Catalog #161-0125, 37.5:1 acrylamide/bis powder
Catalog #161-0158, 30% acrylamide/bis solution

1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 (150 ml)

(, 1 L)

Tris base (18.15 g/100 ml)	27.23 g
dH_2O	80 ml
Adjust to pH 8.8 with 6 N HCl.	
dH_2O	to 150 ml

Store at 4°C.

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

(, 1 L)

Tris base	6.00 g
dH_2O	60 ml
Adjust to pH 6.87 with 6 N HCl.	
dH_2O	to 100 ml

Store at 4°C.

10% (w/v) SDS (100 ml)

SDS	10.00 g
dH_2O	90 ml
Dissolve with gentle stirring	
dH_2O	to 100 ml

10% (w/v) APS (fresh daily)

Ammonium persulfate	0.10 g
dH_2O	1 ml

Water-Saturated *n*-Butanol

n-Butanol	50 ml
dH_2O	5 ml

Combine in a bottle and shake. Use the top phase only. Store at room temperature.

Sample Buffers

2x SDS-PAGE (Laemmli, 30 ml)

62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 25% glycerol, 0.01% bromophenol blue, 5% β-mercaptoethanol (added fresh)

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	3.75 ml
50% Glycerol	15.0 ml
1.0% Bromophenol blue	0.3 ml
10% SDS	6.0 ml
dH_2O	to 30 ml

Add β-mercaptoethanol (50 µl to 950 µl sample buffer) before use.

2x Native PAGE (30 ml)

62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 40% glycerol, 0.01% bromophenol blue

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	3.75 ml
50% Glycerol	24.0 ml
1.0% Bromophenol blue	0.3 ml
dH_2O	to 30 ml

2x Tricine (30 ml)

200 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 40% glycerol, 0.04% Coomassie Brilliant Blue G-250, 2% β-mercaptoethanol (added fresh)

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	12.0 ml
50% Glycerol	24.0 ml
10% SDS	6.0 ml
Coomassie Blue G-250	12.00 mg
dH_2O	to 30 ml

Add β-mercaptoethanol (20 µl to 980 µl sample buffer) before use.

2.sz. melléklet: SDS-PAGE-hez használt pufferek, oldatok receptjei a BIO-RAD „A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection" protokoll alapján

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

General Detection Buffers

Tris-buffered saline (TBS)	20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl (pH 7.5) Dissolve 4.84 g Tris base and 58.48 g NaCl in 1.5 L deionized H_2O; adjust pH to 7.5 with HCl; adjust volume to 2 L with deionized H_2O.
TTBS wash solution	20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0.05% Tween 20 (pH 7.5) Add 0.5 ml Tween 20 to 1 L TBS.
Wash solution for chemiluminescence	20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0.1% Tween 20 (pH 7.5) Add 1 ml Tween 20 to 1 L TBS.
Citrate-buffered saline (CBS)	20 mM citrate, 500 mM NaCl (pH 5.5) Included in Immun-Blot® protein G kits.
TCBS wash solution	20 mM citrate, 500 mM NaCl, 0.05% Tween 20 (pH 5.5) Add 0.5 ml Tween 20 to 1 L CBS.
Blocking solution	3% gelatin-TBS Add 3.0 g gelatin to 100 ml TBS. Heat to 50°C; stir to dissolve. **or** 1% BSA-TBS Add 1.0 g BSA to 100 ml TBS; stir to dissolve. **or** 5% nonfat milk-TBS Add 5.0 g nonfat dry milk to 100 ml TBS; stir to dissolve. **Note:** Gelatin will clog the membrane and cut off the vacuum flow of the microfiltration units; an alternative blocking solution and antibody buffer must be used with the Bio-Dot® or Bio-Dot SF apparatus.
Blocking solution for chemiluminescence (general)	2% nonfat milk-TBS Add 0.2 g of nonfat dry milk to 10 ml TBS, stir to dissolve. **Note:** This blocker is not recommended for avidin-biotin systems.
Antibody buffer	1% gelatin-TTBS Add 2.0 g gelatin to 200 ml TTBS. Heat to 50°C; stir to dissolve. **or** 1% BSA-TTBS Add 2.0 g BSA to 200 ml TTBS, stir to dissolve **or** 5% nonfat milk-TTBS Add 10.0 g nonfat dry milk to 200 ml TTBS, stir to dissolve. **Note:** Gelatin will clog the membrane and cut off the vacuum flow of the microfiltration units; an alternative blocking solution and antibody buffer must be used with the Bio-Dot or Bio-Dot SF apparatus.
Antibody buffer for chemiluminescence (Immun-Star™ AP only)	0.2% nonfat milk-TTBS Add 0.4 g nonfat milk to 200 ml TTBS; stir to dissolve.
Antibody buffer for protein G-HRP	1% gelatin-TCBS Add 1.0 g gelatin to 100 ml TCBS. Heat to 50°C; stir to dissolve.
Primary antibody solution	Dilute the primary antibody to the appropriate titer in 100 ml antibody buffer.
Secondary antibody solution	Dilute the secondary antibody conjugate at 1:3,000 by mixing 33 µl antibody conjugate in 100 ml antibody buffer.
Protein G-HRP conjugate solution	Mix 33 µl protein G conjugate solution in 100 ml 1% gelatin in TCBS.
Streptavidin-biotinylated AP complex	Add 33 µl of streptavidin to 100 ml TTBS. Add 33 µl of biotinylated AP to this solution. Allow the complex to incubate 1–3 hr at room temperature before use.

3.sz. melléklet: Blottoláshoz használt oldatok pufferek összetétele a BIO-RAD „Protein Blotting Giude” című protokollja alapján

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal:10/10 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* Western blot standardizált protokoll	
Dátuma: 2017.07.03-	*Azonosító:* ***KUT-JKV-LIP-01-007***

Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor	***Kiadásért felel: Dr. Hunya Ákos Gábor***

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 1/10 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 sejtek optimális hősokk hőmérsékletének-, és idejének meghatározása	
Dátuma: 2017.07.10-2017.07.21.	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-01-008*

A művelet végzésének helye

A LipidArt Kft. kutatólaboratóriuma, 6726 Szeged, Temesvári krt. 62.

A műveletet végző személyek

	Beosztás K/T	Aláírás
Dr. Horváth Ibolya, vezető kutató	Vezető kutató	
Dr. Hunya Ákos Gábor	Tudományos munkatárs	
Dr. Pilbat Ana Maria	Tudományos munkatárs	
Bogdán Istvánné	Laborasszisztens	

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 2/10 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 sejtek optimális hősokk hőmérsékletének-, és idejének meghatározása	
Dátuma: 2017.07.10-2017.07.21.	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-01-008*

Célja és rövid leírása:

Cél: A MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek optimális hősokk hőmérsékletének-, és idejének meghatározása western blot technika segítségével

Leírás: A Debreceni Egyetem által rendelkezésünkre bocsátott MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek legfontosabb dajkafehérje (Hsp70, Hsp25, Hsp60 és Hsp90) expressziójának jellemzése céljából meghatározzuk azt legrövidebb időtartamot, valamint azt a - még fehérje denaturációval nem járó – legideálisabb hősokk hőmérsékletet, melyen a dajkafehérjék szignifikáns mértékben expresszálódnak. A dajkafehérjék közül a két legjobban indukálhatót, a Hsp70-et és Hsp25-öt választottam ehhez a kísérlethez.

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 3/10 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 sejtek optimális hősokk hőmérsékletének-, és idejének meghatározása	
Dátuma: 2017.07.10-2017.07.21.	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-01-008*

Felhasznált anyagok

Anyag neve	Gyártó	Gyártási szám v. azonosító	Steril-e? x	Lejárati idő
RIPA puffer	Sigma-Aldrich	R0278-50ML	-	2020.02.23.
Protease inhibitor coctail	Sigma-Aldrich	P8340-1ML	-	2019.12.20.
Mintapuffer, Laemmli 45× koncentrált	N/A	N/A	-	N/A
vízjég	N/A	N/A	-	N/A
1.5 mL-es Eppendorf cső	Greiner Bio-One	616201	-	2020.06.
Pierce BCA Protein Assay kit	Pierce	23225	-	2020.01.
96 well plate fehérjeméréshez	Greiner Bio-One	655101	-	2020.05.10.
Üveglapok 0.75 mm vastagságú poliakrilamid gélhez	BIO-RAD	1653308 és 1653310	-	N/A
Protein molekulatömeg marker	BIO-RAD	1610375	-	2019.11.
PVDF membrán Immobilon-P .45mm	Millipore	IPVH00010	-	2019.10.
Whatmann szűrőpapír	VWR	732-4093	-	2020.01.
Műanyag tálka membránokhoz	N/A	N/A	-	N/A
PBS	N/A	N/A	-	N/A
ECL (Immobilon Western)	Millipore	WBKLS0100	-	2019.01.05.
Hsp27 poliklonális antitest	Abcam	ADI-SPA-803	-	2020.02.20.
Hsp70 monoklonális antitest	Abcam	ADI-SPA-810	-	2020.02.20.
Hsp60 monoklonális antitest	Abcam	ADI-SPA-806	-	2020.02.20.
Hsp90 monoklonális antitest	Abcam	ADI-SPA-830	-	2020.02.20.
GAPDH poliklonális antitest	Sigma-Aldrich	G9545	-	2020.03.10.
Coomassie brilliant blue oldat	N/A	N/A	-	N/A

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

Felhasznált gépek, berendezések, mérőeszközök

Berendezés neve	Azonosító	Ellenőrzés Kvalifikált/kalibrált-e: x, kvalifikálási azonosító
Sejtkaparó pálca	N/A	N/A
Manuális pipetta 100-1000 µL	Biohit ProLine	N/A
Hűthető síkrázó mikro centrifugacsövekhez	Eppendorf Thermomixer Comfort	N/A
Vízlégszivattyú	N/A	N/A
Centrifuga mikro centrifugacsövekhez	Sorvall RMC 14	N/A
Plate olvasó fotométer	Thermo MultiSkan EX	N/A
Poliakrilamid gél elekrtoforézis kit	BIO-RAD Mini-PROTEAN TETRA System	N/A
Blottoló berendezés	BIO-RAD Mini Trans-Blot Cell	N/A
Billegő tér-rázó rázógép	Labnet Rocker 25	N/A
AlphaImager HP nagysebességű CCD kamera	Alpha Innotech Inc.	N/A
Állítható hőmérsékletű vízfürdő	Memmert	N/A

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 5/10 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 sejtek optimális hősokk hőmérsékletének-, és idejének meghatározása	
Dátuma: 2017.07.10-2017.07.21.	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-01-008*

Előzmények:
KUT-JKV-LIP-117-01-007 western blot standardizált protokoll

Lépések (névvel,szignóval):
Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor

1) A vizsgálat kezdetét megelőzően 48 órával 5 x 10^5 sejt/csésze MEF-145 sejtet oltottam ki 13 db. 6 cm-es Petri csészére.
2) A 24 órás inkubációt (37°C, 5% CO_2) követően a csészéket 4 csoportra osztottam, csoportok a hőkezelés hőmérséklete alapján lettek kijelölve (39°C, 41°C, 42°C és 44°C)
3) Mindegyik csoportba 3 db csésze került, 3 különböző kőkezelési időtartam alapján (15 perc, 30 perc és 60 perc)
4) A csészéket megfelelő hőmérsékletre beállított hőfürdőbe helyezem a megfelelő időtartamra
5) 16 óra recovery idő után a sejteket felkaparom, rázatom, centrifugálom, majd pedig összfehérje koncentrációt mérek az egyes mintákból a KUT-JKV-LIP-117-01-007 western blot standardizált protokoll alapján. A fehérjemérés és eredménye és nyers adatai az 1.sz. mellékletben tekinthetők meg
6) Mindeközben öntöttem 3 db. 15 zsebes 12%-os SDS-Poliakrilamid gélt
7) A koncentrációkat 1.6μg/μL-re állítottam és a gélre 5 μL mintát terveztem felvinni, így a teljes gélre vitt fehérjemennyiség 8 μL
8) Elkészítettem a minta higításokat az 1.sz. mellékletben kiszámított módon, hozzáadtam a terfogat aránynak megfelelő 5 x Laemmli mintapuffert
9) 30 percig rázattam szobahőmérsékleten
10) Forraltam 5 percig
11) A gél zsebeibe 5-5 μL mintát vittem fel a 2.sz mellékletben látható módon
12) A mitákat megfuttattam, blottoltam, ezután a membránokat blokkoltam (lsd. KUT-JKV-LIP-117-01-007)
13) majd a membránokat a legjobban indukálható két dajkafehérje, a Hsp70 (1:8000 higításban) és Hsp25 (1:1000 higításban) elsődleges ellenanyagával inkubáltam overnight
14) másnap mosást követően a megfelelő másodlagos ellenanyaggal (anti-egér, 1:80000; anti-nyúl, 1:160000 arányban) inkubáltam 1 órán át szobahőmérsékleten
15) előhívtam kemilumineszcens módon nagysebességű CCD kamera segítégével
16) a felvitt fehérjemennyiség ellenőzéséhez (loading kontroll) anti-GAPDH (1:20000 higításban) háztartási fehérjét használok, az egyes protein band-eket a GAPDH band-ekhez normálom
17) az összes antitestes előhívást követően a membránokat Coomassie brilliant blue oldattal festem (3.sz. melléklet)
18) A western blot felvételek a 4, 5 és 6. sz mellékletekben láthatóak

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE
GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 6/10 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése	
Alcím: MEF-145 sejtek optimális hősokk hőmérsékletének-, és idejének meghatározása	
Dátuma: 2017.07.10-2017.07.21.	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-01-008*

Összefoglalása, eredménye:

Elvégeztem a MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtek Hsp70 és Hsp27 indukciójának vizsgálatát különböző hőmérsékleten és időtartam alatt, arra keresve a választ, hogy melyik az a legrövidebb hőkezelési idő, illetve az az ideális, még nem denaturáló hőmérséklet, melyen a két választott hősokkfehérje jól elkülöníthető, szignifikáns módon indukálódik.A választott hőmérsékletek: 37°C, 39°C, 41°C, 42°C és 44°C voltak. A hőkezelések időtartama pedig 15 perc, 30 perc és 60 perc voltak. Mivel az irodalom (valamint saját korábbi kísérleti eredményeink is ezt támasztják alá) a 44°C-ot már úgynevezett „severe" (fehérjedenaturációval járó) stressznek tartja, ezért ezt a hőmérsékletet csak demonsrációs céllal használtam. A kísérlet eredménye alapján az ideális hőkezelési hőmérséklet 42°C, az ideális hőkezelési idő pedig 30 perc. Ezeket a paramétereket fogom a további kísérletek aklalmával használni.

Csatolmányok felsorolása:

1.sz. melléklet - MEF-145 hősokk-, és idősor minták fehérjemérésének eredményei
2.sz. melléklet - MEF-145 hősokk-, és idősor minták gélre vitelének sorrendje
3.sz. melléklet - MEF-145 hősokk-, és idősor membránok Coomassie festése
4.sz. melléklet - 15 perces hőkezelés előhívott membrán felvételei
5.sz. melléklet - 30 perces hőkezelés előhívott membrán felvételei
6.sz. melléklet - 60 perces hőkezelés előhívott membrán felvételei

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 7/10 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 sejtek optimális hősokk hőmérsékletének-, és idejének meghatározása	
Dátuma: 2017.07.10-2017.07.21.	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-01-008*

Csatolmányok

	kezelés
M01	37°C Kontroll
M02	39°C, 15 min
M03	39°C, 30 min
M04	39°C, 60 min
M05	41°C, 15 min
M06	41°C, 30 min
M07	41°C, 60 min
M08	42°C, 15 min
M09	42°C, 30 min
M10	42°C, 60 min
M11	44°C, 15 min
M12	44°C, 30 min
M13	44°C, 60 min

	µg/mL	µg/µL		8 µg felviteléh	30 µL ben RIPA		5 x cc Laemmli
M01	2396.33		2.40	1.50	20.0	10.0	8
M02	2366.00		2.37	1.48	20.3	9.7	8
M03	2477.24		2.48	1.55	19.4	10.6	8
M04	2417.96		2.42	1.51	19.9	10.1	8
M05	2466.30		2.47	1.54	19.5	10.5	8
M06	2033.38		2.03	1.27	23.6	6.4	8
M07	1982.51		1.98	1.24	24.2	5.8	8
M08	1893.21		1.89	1.18	25.4	4.6	8
M09	2254.42		2.25	1.41	21.3	8.7	8
M10	1946.74		1.95	1.22	24.7	5.3	8
M11	2054.49		2.05	1.28	23.4	6.6	8
M12	2553.29		2.55	1.60	18.8	11.2	8
M13	2387.52		2.39	1.49	20.1	9.9	8

Koncentráció	1.6 µg/µL
Gélre vitt:	8 µg

1.sz. melléklet – MEF-145 hősokk-, és idősor minták fehérjemérésének eredményei. Gélre vitt összfehérje mennyiség 8µg volt

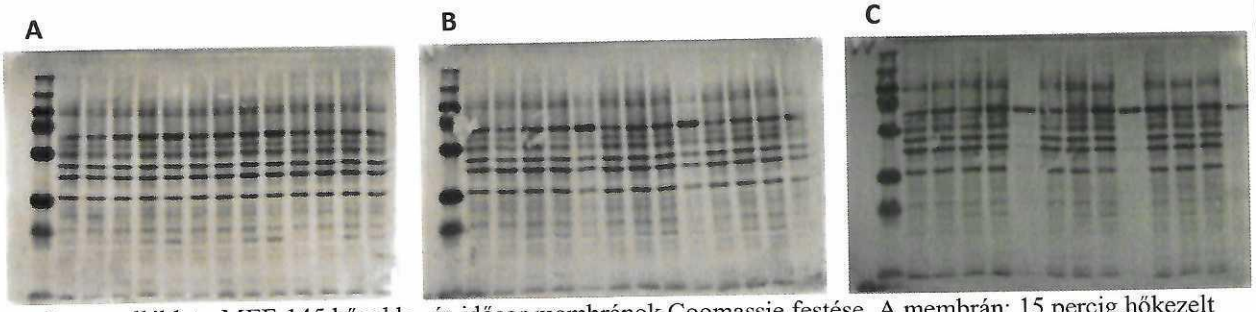
GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

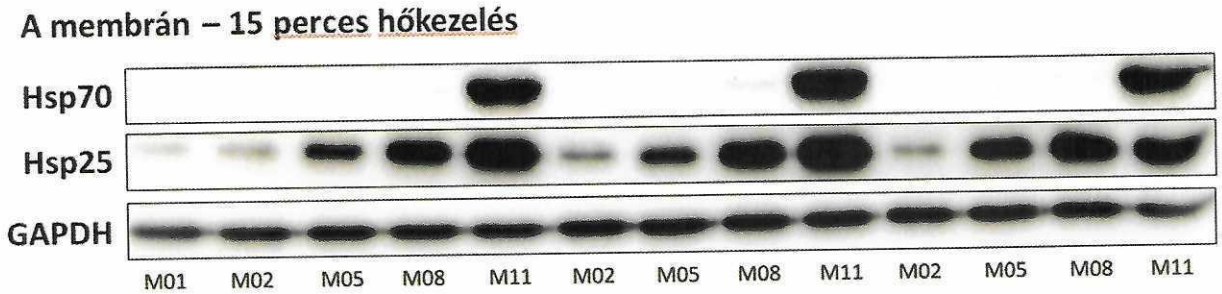
KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 8/10 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 sejtek optimális hősokk hőmérsékletének-, és idejének meghatározása	
Dátuma: 2017.07.10-2017.07.21.	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-01-008*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
A	mintapuffer	marker	M01	M02	M05	M08	M11	M02	M05	M08	M11	M02	M05	M08	M11
B	mintapuffer	marker	M01	M03	M06	M09	M12	M03	M06	M09	M12	M03	M06	M09	M12
C	mintapuffer	marker	M01	M04	M07	M10	M13	M04	M07	M10	M13	M04	M07	M10	M13

2.sz. melléklet - MEF-145 hősokk-, és idősor minták gélre vitelének sorrendje, 3 technikai párhuzamban. A membrán: 15 percig hőkezelt minták; B membrán: 30 percig hőkezelt minták; C membrán: 60 percig hőkezelt minták. Minták kódolása az 1.sz. mellékletben látható.



3.sz. melléklet - MEF-145 hősokk-, és idősor membránok Coomassie festése. A membrán: 15 percig hőkezelt minták; B membrán: 30 percig hőkezelt minták; C membrán: 60 percig hőkezelt minták.

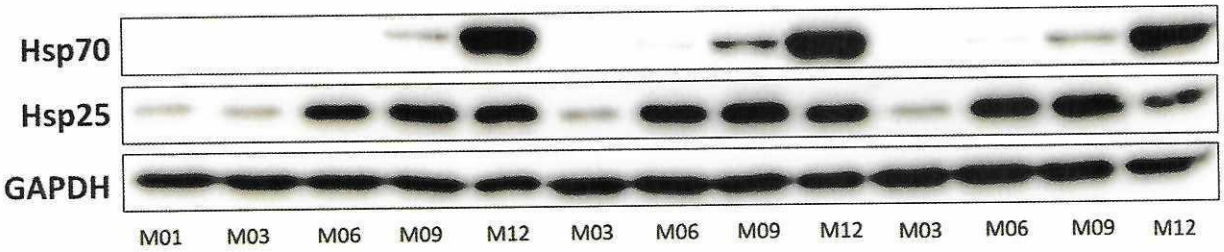


4.sz. melléklet – 15 perces hőkezelés előhívott membrán felvételei, a Hsp70 indukcióhoz ez az időtartam csak a már részleges fehérjedenaturációval járó 44°C-os hőkezelés esetén volt elegendő (a jel szaturált, mennyiségi analízisre nem alkalmas). A Hsp25 viszont már 41°C-on is szépen indukálódik 15 perc alatt.

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE
GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

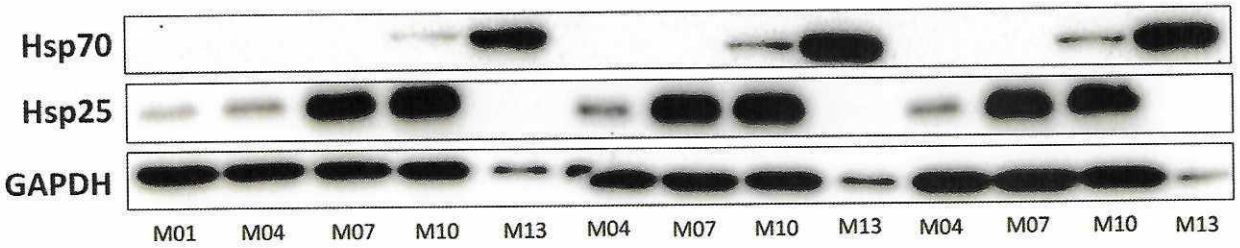
KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 9/10 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* MEF-145 sejtek optimális hősokk hőmérsékletének-, és idejének meghatározása	
Dátuma: 2017.07.10-2017.07.21.	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-01-008*

B membrán – 30 perces hőkezelés



5.sz. melléklet –30 perces hőkezelés előhívott membrán felvételei, Hsp70 indukcióhoz ez az időtartam már elegendő volt 42°C-on, a Hsp25 is ugyanezen a hőmérsékleten jól aktiválódik. A 44°C-os minták Hsp70 felvételei túlszaturáltak.

C membrán – 60 perces hőkezelés



6.sz. melléklet – 60 perces hőkezelés előhívott membrán felvételei, sem a Hsp70 indukció, sem pedig a Hsp25 szint nem változik lényegesen a 30 perces hőkezeléshez viszonyítva. A 44°C-os minta Hsp25 és GAPDH felvétele viszont hiányos, valószínűleg a minta degradálódhatott, ezt mutatja a Coomassie felvétel is (3.sz melléklet C membrán).

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 10/10 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése	
Alcím: MEF-145 sejtek optimális hősokk hőmérsékletének-, és idejének meghatározása	
Dátuma: 2017.07.10-2017.07.21.	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-01-008*

Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor	***Kiadásért felel: Dr. Hunya Ákos Gábor***

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 1/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: Standardizált protokoll citotoxicitási mérésekhez	
Dátuma: 2017.07.24-	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-001*

A művelet végzésének helye

A LipidArt Kft. kutatólaboratóriuma, 6726 Szeged, Temesvári krt. 62.

A műveletet végző személyek

	Beosztás K/T	**Aláírás**
Dr. Horváth Ibolya, vezető kutató	Vezető kutató	
Dr. Hunya Ákos Gábor	Tudományos munkatárs	
Dr. Pilbat Ana Maria	Tudományos munkatárs	
Bogdán Istvánné	Laborasszisztens	

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 2/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: Standardizált protokoll citotoxicitási mérésekhez	
Dátuma: 2017.07.24-	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-001*

Célja és rövid leírása:

Cél: Sejttoxicitási tesztek standardizált protokolljának létrehozása

Leírás: Jellemzett MEF-145 sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus benzil-alkohol és fenetil-alkohol (BA, PhA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák: LA1011, LA1030, LA1050) modulációjához szükséges a ezen molekulák toxicitási profiljának felderítése. Kíváncsiak vagyunk, hogy az egyes vegyületek milyen koncentráció tartományban használhatóak számottevő toxicitás nélkül a MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejteken. Keressük továbbá azt a legmagasabb koncentrációt, ahol az adott molekula még nem toxikus, viszont a membrán perturbáló / jelátviteli folyamatok célzottan aktiváló hatását maximálisan kifejti.

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 3/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: Standardizált protokoll citotoxicitási mérésekhez	
Dátuma: 2017.07.24-	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-001*

Felhasznált anyagok

Anyag neve	Gyártó	Gyártási szám v. azonosító	Steril-e? x	Lejárati idő
DMEM high glucose	Biowest	P0103-N50L	x	2020.02.
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco	1027-106	x	2019.12.
L-Glutamine	Sigma	G5792-1KG	x	2020.03.
Penicillin-Streptomycin solution	Sigma	P4333-100ML	x	2021.01
10 mL-es üveg szerológiai pipetta	N/A	N/A	x	N/A
5 mL-es üveg szerológiai pipetta	N/A	N/A	x	N/A
Üveg Pasteur pipetta (2 mL)	N/A	N/A	x	N/A
Trypsin-EDTA solution	Lonza	BE17-161E	x	2020.05
PBS	N/A	N/A	x	N/A
96-well plate	Orange Scientific	4430100N	x	2018.08.
12 csatornás multichannel pipetta 50-300µL	Orange Scientific	3590130	-	N/A
8 csatornás multichannel pipetta 50-300µL	Orange Scientific	3590115	-	N/A
Sejtkiosztó autoklávozható műanyag V-alakú reservoir 12 és 8 csatornás pipettákhoz	Biohit	783500	-	N/A
Autoklávozható műanyag V-alakú 12 lyukú reservoir 12 és 8 csatornás pipettákhoz	Biologix	25-1202	-	N/A
Resazurin festék	Sigma	R-7017-1G	-	2019.11.04.

Felhasznált gépek, berendezések, mérőeszközök

Berendezés neve	Azonosító	Ellenőrzés Kvalifikált/kalibrált-e: x, kvalifikálási azonosító
Steril fülke	ADS Laminaire BIO II. 12	x, 025/MTA:20-1801-3034
37°C-os CO_2 inkubátor	Jouan IG-150	N/A
Pipettor	Drummond PipettAid XL	N/A
OLYMPUS fázis kontraszt fénymikroszkóp	OLYMPUS CK30	N/A
Vízlégszivattyú	N/A	N/A
Fluoreszens/lumineszcens plate olvasó	Thermo Fluoskan FL	N/A

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 4/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával	
Alcím: Standardizált protokoll citotoxicitási mérésekhez	
Dátuma: 2017.07.24-	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-001*

Előzmények:
KUT-JKV-LIP-117-01-006 kísérleti sejtkiosztási jegyzőkönyv
KUT-JKV-LIP-117-01-008 MEF-145 sejtek optimális hősokk hőmérsékletének-, és idejének meghatározása

Lépések (névvel,szignóval):
Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor

1) Előzetesen a KUT-JKV-LIP-01-006 sejtkiosztási protokoll alapján citotoxicitási tesztre kiosztottam a sejteket
2) 24 órát inkubálom őket sejttenyésztő inkubátorban (37°C, 5% CO_2)
3) A kezelőanyagokból elkészítem a megfelelő törzsoldatot (por állagú anyagokból bemérek egy adott előzetesen kiszámított tömeget, majd a megfelelő oldószerben feloldom)
4) A törzsoldatot lépésenként higítva, higítási sort készítek egy előzetesen meghatározott (pl. irodalmi adatok, vagy előzetes mérések alapján) koncentráció tartományban, a V-alakú 12 csatornájú reservoirban
5) A plate-k welljeiben lévő kitapadt sejtekről leszívom az elhasznált tápoldatot, vízlégszivattyú segítségével
6) 12 csatornás pipetta segítségével a wellekbe pipettázom a vegyületeket tartalmazó higítási sort 6 technikai párhuzamban az 1.sz mellékletben látható módon
7) 30 percig előinkubálom a vegyületekkel a sejteket sejttenyésztő inkubátorban
8) A plate-k felét 42°C-os vízfürdőbe helyezem 30 percre (A KUT-JKV-LIP-117-01-008 jegyzőkönyv eredményei alapján)
9) A plate-k másik felét visszahelyezem a sejttenyésztő inkubátorba 37°C, 5% CO_2-ra
10) A hőkezelési időtartam lejárta után a vízfürdőből a plate-eket átteszem 37°C-os inkubátorba 20 órára (recovery)
11) A sejttoxicitás mérését resazurin festékkel végzem, a gyártói protokoll alapján:
12) 10 x –es töméységű törzsoldatot készítek (0.3 mg/mL Resazurin, PBS-ben)
13) A kiszámított össztérfogatra szükséges mennyiséget kiveszek a törzsoldatból, majd friss DMEM tápoldattal kihigítom 1 x –es koncentrációra, V-alakú reservoir-ban
14) Vízlégszivattyú segítségével leszívom a wellek sejtjeiről a használt médiumot
15) Ezután 8 csatornás pipetta segítségével az 1 x-es festék-DMEM oldatból 100-100 µL-t pipettázok a wellekre
16) 4 órát inkubálom a sejteket a festékkel
17) Az inkubáció lejárta után a plate-ket fluoreszcens plate readerrel mérem 530/25 nm gerjesztési és 590/35 nm emissziós tartományban
18) A keletkező nyers adatokból kivonom a sejtmentes festék+DMEM negatív kontroll értékekeket (blanking)
19) A 6 technikai replikátum értékeit átlagolom, szórást (SD) számítok belőlük
20) A kiszámított átlagokat oszlopdiagrammon, szórással együtt ábrázolom

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 5/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: Standardizált protokoll citotoxicitási mérésekhez	
Dátuma: 2017.07.24-	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-001*

Összefoglalása, eredménye:
Jellemzett MEF-145 sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus benzil-alkohol és fenetil-alkohol ill. specifikus modulációjához alkalmazott kezelőanyagok (BA, PhA, LA1011, LA1030, LA1050) toxicitásának feltárásához létrehoztunk egy standardizált protokollt. A protokoll alapján végzett kísérletekkel a következő kérdésekre kaphatunk választ: Milyen koncentráció tartományban használhatóak a vegyületek számottevő toxicitás nélkül MEF-145 sejtvonalon? Melyik az a legmagasabb koncentráció, ahol az adott molekula még nem toxikus, viszont a membrán perturbáló / jelátviteli folyamatok célzottan aktiváló hatását maximálisan képes kifejteni MEF-145 sejteken?

Csatolmányok felsorolása:

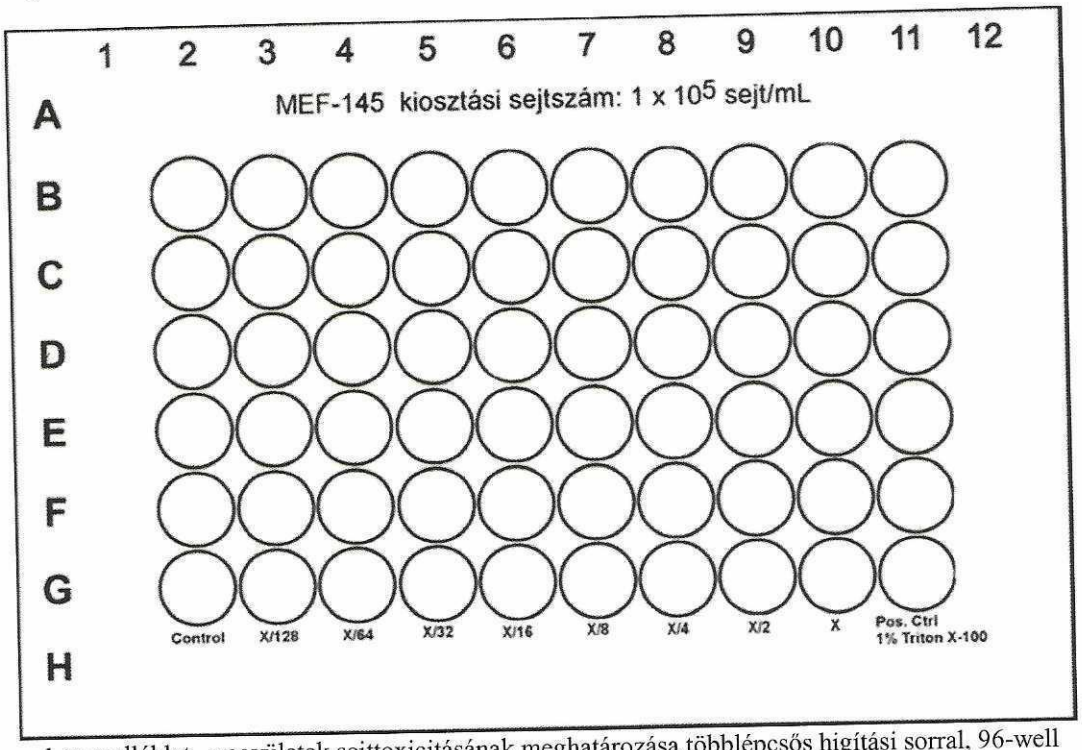
1.sz melléklet - vegyületek sejttoxicitásának meghatározása többlépcsős higítási sorral, 96-well plate-en

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 6/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával	
Alcím: Standardizált protokoll citotoxicitási mérésekhez	
Dátuma: 2017.07.24-	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-001*

Csatolmányok



1.sz melléklet - vegyületek sejttoxicitásának meghatározása többlépcsős higítási sorral, 96-well plate-en. Pozitív kontrollnak a Triton X-100 detergens 1%-os oldatát használtam, mivel ilyen töménységben biztosan megöli a sejteket. Negatív kontrollként pedig friss tápoldatot alkalmaztam.

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 7/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: Standardizált protokoll citotoxicitási mérésekhez	
Dátuma: 2017.07.24-	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-001*

Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor	***Kiadásért felel: Dr. Hunya Ákos Gábor***

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 1/15 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: DMSO és BA toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma:2017.08.21-2017.08.25	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-002*

A művelet végzésének helye

A LipidArt Kft. kutatólaboratóriuma, 6726 Szeged, Temesvári krt. 62.

A műveletet végző személyek

	Beosztás K/T	Aláírás
Dr. Horváth Ibolya, vezető kutató	Vezető kutató	
Dr. Hunya Ákos Gábor	Tudományos munkatárs	
Dr. Pilbat Ana Maria	Tudományos munkatárs	
Bogdán Istvánné	Laborasszisztens	

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 2/15 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: DMSO és BA toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma:2017.08.21-2017.08.25	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-002*

Célja és rövid leírása:

Cél: A dimetil-szulfoxid (DMSO), illetve a benzil-alkohol (BA) sejttoxicitásának tesztje MEF-145 sejtvonalon

Leírás: A DMSO-t, mint szerves oldószert, széles körben alkalmazzák a sejtbiológiában különböző appoláros kezelőanyagok oldószereként. Mivel a DMSO-nak is lehet - bizonyos koncentráció felett, szerves oldószer lévén – sejtmembránra, így sejtéletképességre gyakorolt hatása és e DMSO-val szembeni tolerancia sejttípusonként jelentősen különbözhet. Emiatt szükséges a kezelőmolekulák toxicitásának mérését megelőzően feltérképezni a MEF-145 DMSO-val szembeni tűrőképességét. A BA, mint nem specifikus dajkafehérje induktor vegyület, hatását a membrán fluiditásának növelésével éri el. Az irodalomban (Nagy et al. 2007) használt effektív koncentráció tartománya in vitro kísérletekben mM-os range-ben van. Bizonyos sejtek (pl. B16-F10 egér melanóma) akár a 40 mM-os koncentrációban is kezelhetőek BA-lal számottevő sejpusztulás nélkül. A feladat annak kiderítése, hogy a MEF-145 sejtek esetén melyi az a legmagasabb BA koncentráció, amely még nem toxikus mM-os tartományban, valószínűsíthetően ez a koncentráció fogja kifejteni a maximális membrán perturbáló hatást.

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 3/15 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: DMSO és BA toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma:2017.08.21-2017.08.25	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-002*

Felhasznált anyagok

Anyag neve	Gyártó	Gyártási szám v. azonosító	Steril-e? x	Lejárati idő
DMEM high glucose	Biowest	P0103-N50L	x	2020.02.
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco	1027-106	x	2019.12.
L-Glutamine	Sigma	G5792-1KG	x	2020.03.
Penicillin-Streptomycin solution	Sigma	P4333-100ML	x	2021.01
10 mL-es üveg szerológiai pipetta	N/A	N/A	x	N/A
5 mL-es üveg szerológiai pipetta	N/A	N/A	x	N/A
Üveg Pasteur pipetta (2 mL)	N/A	N/A	x	N/A
Trypsin-EDTA solution	Lonza	BE17-161E	x	2020.05
PBS	N/A	N/A	x	N/A
96-well plate	Orange Scientific	4430100N	x	2018.08.
12 csatornás multichannel pipetta 50-300µL	Orange Scientific	3590130	-	N/A
8 csatornás multichannel pipetta 50-300µL	Orange Scientific	3590115	-	N/A
Sejtkiosztó autoklávozható műanyag V-alakú reservoir 12 és 8 csatornás pipettákhoz	Biohit	783500	-	N/A
Autoklávozható műanyag V-alakú 12 lyukú reservoir 12 és 8 csatornás pipettákhoz	Biologix	25-1202	-	N/A
Resazurin festék	Sigma	R-7017-1G	-	2019.11.04.

Felhasznált gépek, berendezések, mérőeszközök

Berendezés neve	Azonosító	Ellenőrzés Kvalifikált/kalibrált-e: x, kvalifikálási azonosító
Steril fülke	ADS Laminaire BIO II. 12	x, 025/MTA:20-1801-3034
37°C-os CO_2 inkubátor	Jouan IG-150	N/A
Pipettor	Drummond PipettAid XL	N/A
OLYMPUS fázis kontraszt fénymikroszkóp	OLYMPUS CK30	N/A
Vízlégszivattyú	N/A	N/A
Fluoreszens/lumineszcens plate olvasó	Thermo Fluoskan FL	N/A

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 4/15 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: DMSO és BA toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma:2017.08.21-2017.08.25	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-002*

Előzmények:
KUT-JKV-LIP-117-01-006 - kísérleti sejtkiosztási jegyzőkönyv
KUT-JKV-LIP-117-01-008 - MEF-145 sejtek optimális hősokk hőmérsékletének-, és idejének meghatározása
KUT-JKV-LIP-117-02-001 - standardizált sejttoxicitási protokoll

Lépések (névvel,szignóval):
Készítette Dr. Hunya Ákos Gábor

I. DMSO tox. teszt

1) Előzetesen a KUT-JKV-LIP-01-006 sejtkiosztási protokoll alapján citotoxicitási tesztre kiosztottam a sejteket
2) 24 órát inkubálom őket sejttenyésztő inkubátorban (37°C, 5% CO_2)
3) Az irodalomban található adatok alapján az elfogadható DMSO koncentráció tartomány különböző sejtvonalak esetében 0.1 és 1% között mozog
4) A legtöbb LA molekula hatásos (dajkafehérje ko-indukáló hatás) koncentráció tartománya µM-os (max. 40-50 µM), a legideálisabb törzsoldat koncentráció pedig 10 mM-os, így ez a molekula higítása során max. 0.5% DMSO végkoncentrációt jelent
5) Ennek alapján a molekulák higítási tartományát is figyelembe véve a DMSO max. kezelési koncentrációját 1 mM-ban határoztam meg. A higítási sor erről a koncentrációról indulva lépésenként feleződik, lásd 1.sz. melléklet.
6) A kezelést, inkubálást, hősokkot, recovery inkubációt és fluoreszcens mérést a KUT-JKV-LIP-117-02-001 standardizált sejttoxicitási protokoll alapján végeztem el
7) A platekről készített fotók a 2.sz. mellékletben láthatóak
8) A DMSO toxicitás nyers adatait a 3.sz. melléklet tartalmazza
9) A kiértékelt eredményeket oszlopdiagrammon ábrázoltam (lsd. 4.sz. melléklet)

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 5/15 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: DMSO és BA toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma:2017.08.21-2017.08.25	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-002*

II. BA tox. teszt

1) Előzetesen a KUT-JKV-LIP-01-006 sejtkiosztási protokoll alapján citotoxicitási tesztre kiosztottam a sejteket
2) 24 órát inkubálom őket sejttenyésztő inkubátorban (37°C, 5% CO_2)
3) Irodalmi adatok (Nagy et al. 2007) B16-F10 egér melanóma sejtvonalon használt effektív (jelentős membrán perturbáló hatást mutató) koncentráció 40 mM volt. Ezt alapul véve a max. kezelési koncentrációnak ennek 4 x -ét, vagyis 160 mM-t alkalmazom (valószínűleg ez már toxikus lesz) A kezelési terv az 5.sz. mellékletben tekinthető meg
4) A kezelést, inkubálást, hősokkot, recovery inkubációt és fluoreszcens mérést a KUT-JKV-LIP-117-02-001 standardizált sejttoxicitási protokoll alapján végeztem el
5) A platekről készített fotók a 6.sz. mellékletben láthatóak
6) A DMSO toxicitás nyers adatait a 7.sz. melléklet tartalmazza
7) A kiértékelt eredményeket oszlopdiagrammon ábrázoltam (lsd. 8.sz. melléklet)

SZÉCHENYI 2020

MAGYARORSZÁG KORMÁNYA

Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap

BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 6/15 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: DMSO és BA toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma:2017.08.21-2017.08.25	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-002*

Összefoglalása, eredménye:

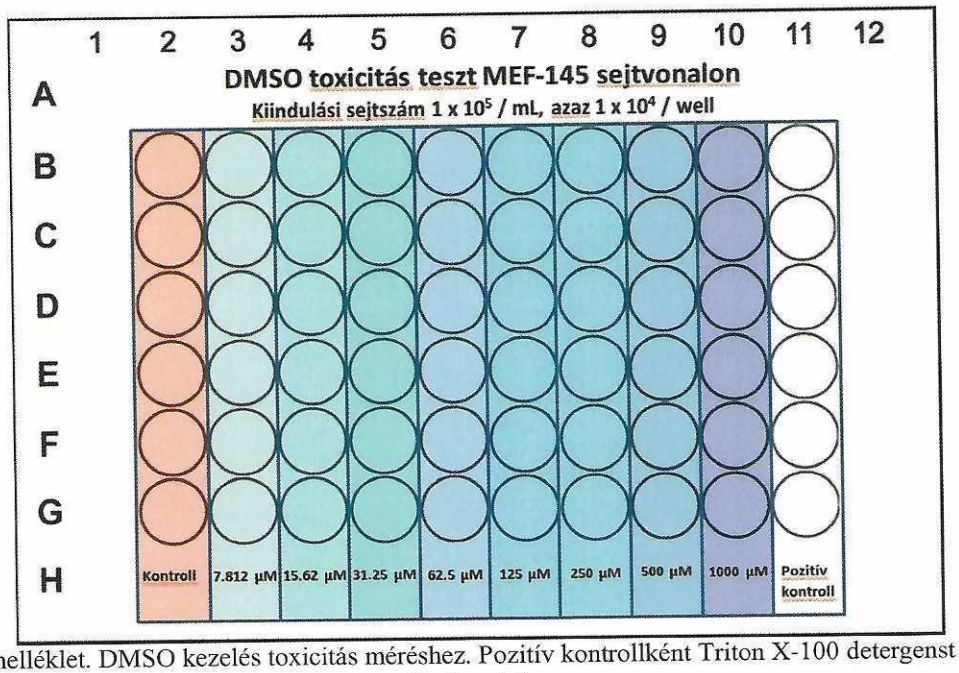
Ezzel a kísérlettel kívántuk meghatározni MEF-145 sejtek DMSO-val szembeni tűrőképességét, valamint azt a legmagasabb BA koncentrációt, amely még nem toxikus mM-os tartományban, és képes elvileg a maximális membrán perturbáló hatást kifejteni. A MEF-145 sejtek bírják akár a 2.5%-os DMSO jelenlétét is (ha 10 mM-os törzsoldatból indulunk ki, akkor a 250 µM 2.5%-os koncentrációt jelent) függetlenül attól, hogy hőkezelve voltak-e, vagy sem. Ez azért fontos, mert a legmagasabb effektív LA molekula koncentráció 50 µM, ami a 10 mM-os törzsoldathoz képest 200 x-os higítást jelent, vagyis 0.5%-os DMSO jelenlétet. Ez biztonsággal használható, nem toxikus koncentráció (lásd 4.sz. melléklet).
A BA toxicitásának meghatározásánál érdekes volt, hogy az irodalomban használt 40 mM (B16-F10) koncentráció jelentősen toxikusnak mutatkozott MEF-145 sejteken. A biztonságos koncentráció tartomány MEF-145 sejtvonalon a 10 mM alatti (lásd 8.sz. melléklet). Western blot kísérletekhez ezt, valamint ennek felét és negyedét fogom használni.

Csatolmányok felsorolása:

1.sz. melléklet - DMSO kezelés toxicitás méréshez
2.sz. melléklet - DMSO-val kezelt platekről készített fotók
3.sz. melléklet - A DMSO toxicitás nyers adatai
4.sz. melléklet - A DMSO toxicitás adatok oszlopdiagrammon ábrázolva
5.sz. melléklet - BA kezelési terv toxicitási kísérlethez
6.sz. melléklet - BA-lal kezelt platekről készített fotók
7.sz. melléklet - A BA toxicitás nyers adatai
8.sz. melléklet - A BA toxicitás adatok oszlopdiagrammon ábrázolva

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 7/15 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: DMSO és BA toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma:2017.08.21-2017.08.25	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-002*

Csatolmányok

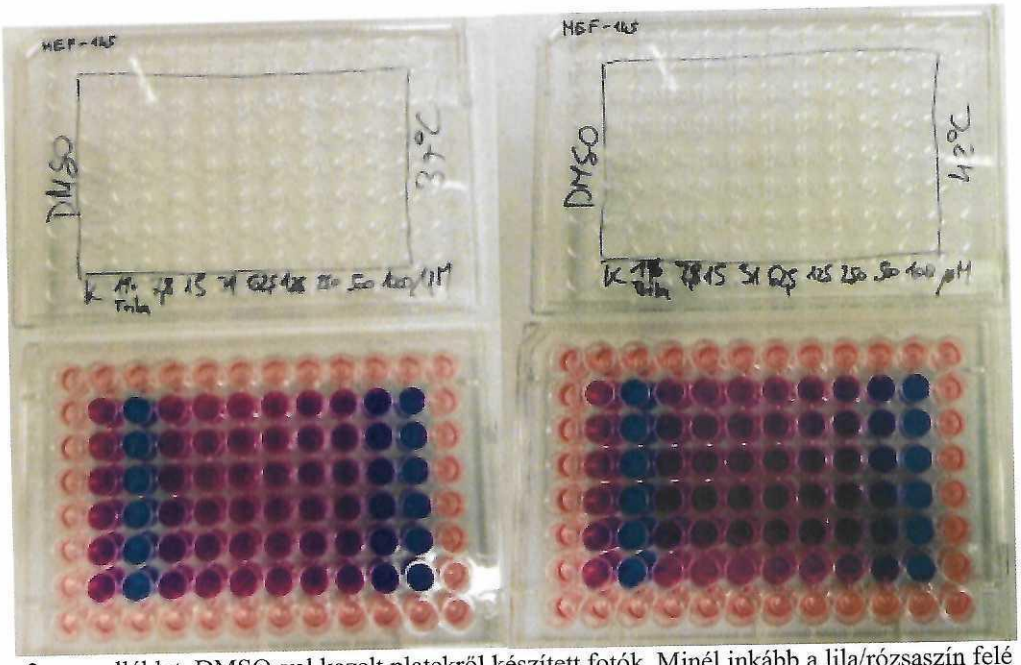


1.sz. melléklet. DMSO kezelés toxicitás méréshez. Pozitív kontrollként Triton X-100 detergenst 1%-os töménységben

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 8/15 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával	
Alcím: DMSO és BA toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma:2017.08.21-2017.08.25	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-002*



2.sz. melléklet. DMSO-val kezelt platekről készített fotók. Minél inkább a lila/rózsaszín felé tolódik el a szín, annál életképesebbek a sejtek. A kék szín markáns sejttoxicitást jelez

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

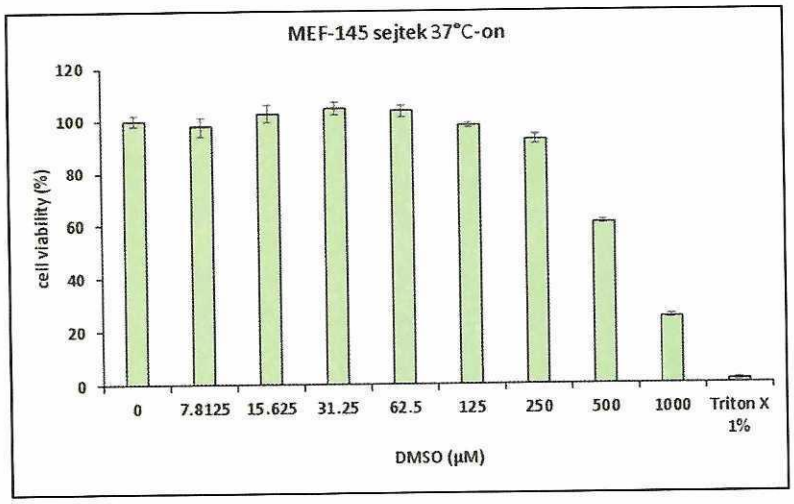
SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 9/15 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: DMSO és BA toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma:2017.08.21-2017.08.25	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-002*

DMSO	0	7.8125	15.625	31.25	62.5	125	250	500	1000	Triton X 1%
37°C	2904	2988	3167	3137	3106	2832	2782	1811	737	72.9
(µM)	2972	2919	3044	3066	3075	2900	2748	1764	745	40.1
	2880	2815	2979	3008	2990	2873	2729	1803	755	32.6
	2904	2708	2942	2952	2969	2811	2672	1745	700.5	33.9
	2845	2765	2941	3045	2994	2857	2641	1770	718.6	38
	3009	2908	2899	3119	2970	2862	2643	1776	735	37.3
	2919	2850.5	2995.333	3054.5	3017.333	2855.833	2702.5	1778.167	731.85	42.46667
%	100	98	103	105	103	98	93	61	25	1
SD %	2.1	3.6	3.3	2.4	2.0	1.1	2.0	0.8	0.7	0.5

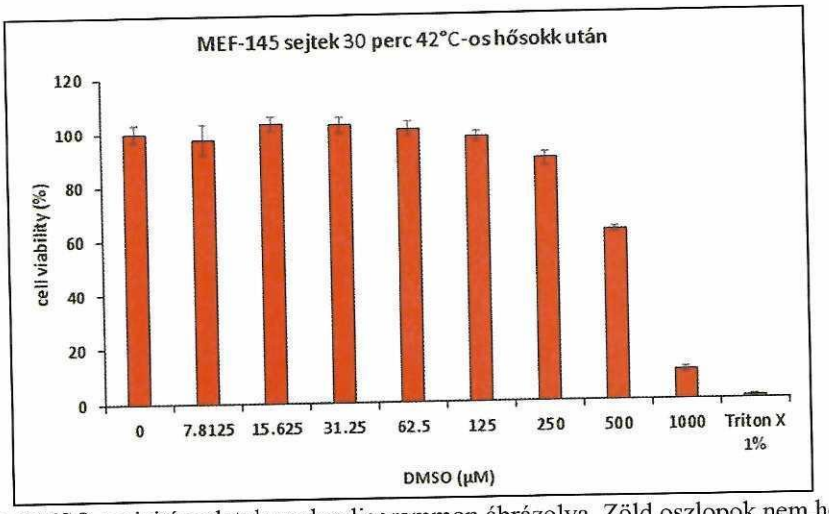
DMSO	0	7.8125	15.625	31.25	62.5	125	250	500	1000	Triton X 1%
42°C	2944	2856	3046	2928	2979	2763	2646	1813	303.1	55.2
(µM)	2790	2694	2969	2861	2887	2747	2526	1786	336.5	37.7
	2795	2756	2855	2900	2804	2707	2503	1733	289.3	29.5
	2811	2615	2842	2800	2830	2789	2437	1758	269.6	32.8
	2692	2584	2868	2852	2799	2709	2461	1761	272.1	33.7
	2918	3010	2934	3044	2806	2862	2555	1782	320.8	18.5
	2825	2752.5	2919	2897.5	2850.833	2762.833	2521.333	1772.167	298.5667	34.56667
%	100	97	103	103	101	98	89	63	11	1
SD %	3.3	5.7	2.8	3.0	2.5	2.1	2.6	1.0	0.9	0.4

3.sz. melléklet - A DMSO toxicitás nyers adatai. Felül 37°C-on, alul 42°C 30 perc hősokk után.



SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 10/15 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: DMSO és BA toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma:2017.08.21-2017.08.25	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-002*

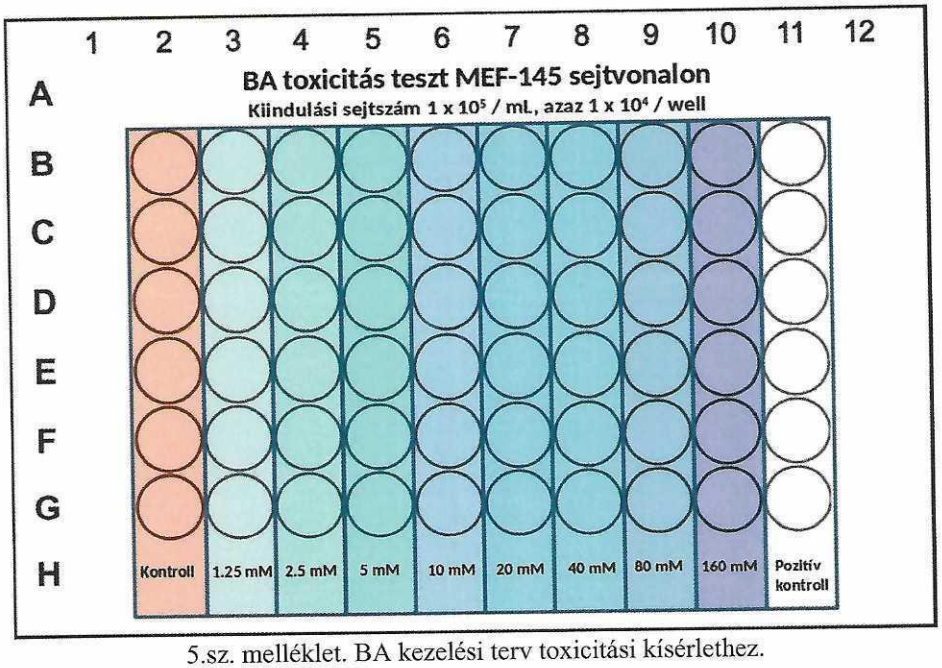


4.sz. melléklet - A DMSO toxicitás adatok oszlopdiagrammon ábrázolva. Zöld oszlopok nem hősokkolt 37°C-os minták, pirossal a 30 percig 42°C-on hőkezelt plateről származó eredmények. Látható, hogy mind 37, mind pedig 42°C-on a sejtek egyaránt jól tűrik akár a 2.5%-os DMSO jelenlétét is (ha 10 mM-os törzsoldatból indulunk ki, akkor a 250 µM 2.5%-os koncentrációt jelent)

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

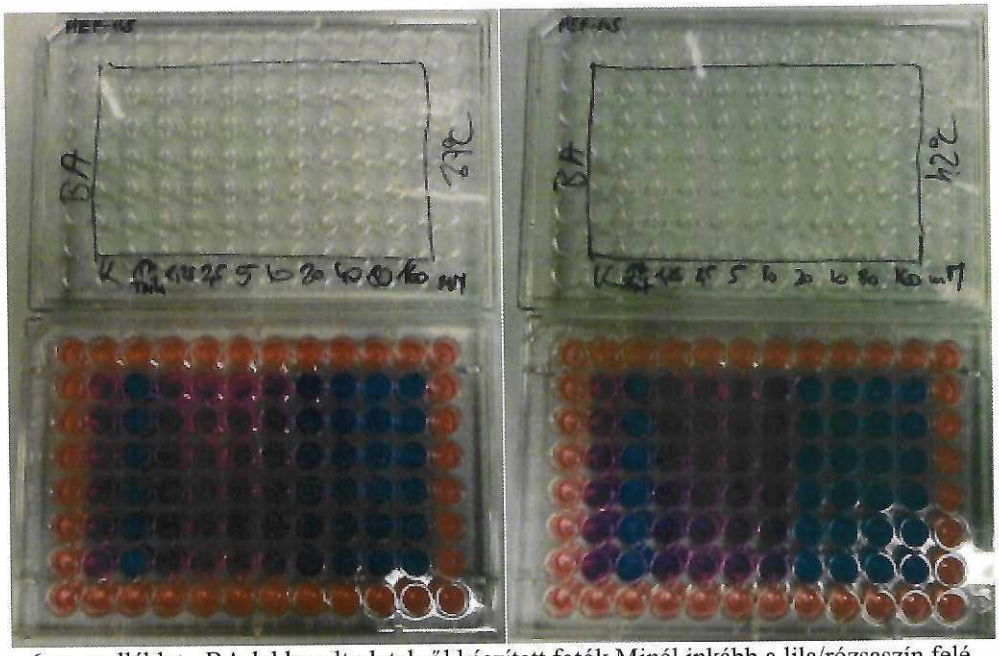
KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 11/15 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: DMSO és BA toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma:2017.08.21-2017.08.25	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-002*



5.sz. melléklet. BA kezelési terv toxicitási kísérlethez.

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 12/15 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: DMSO és BA toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma:2017.08.21-2017.08.25	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-002*



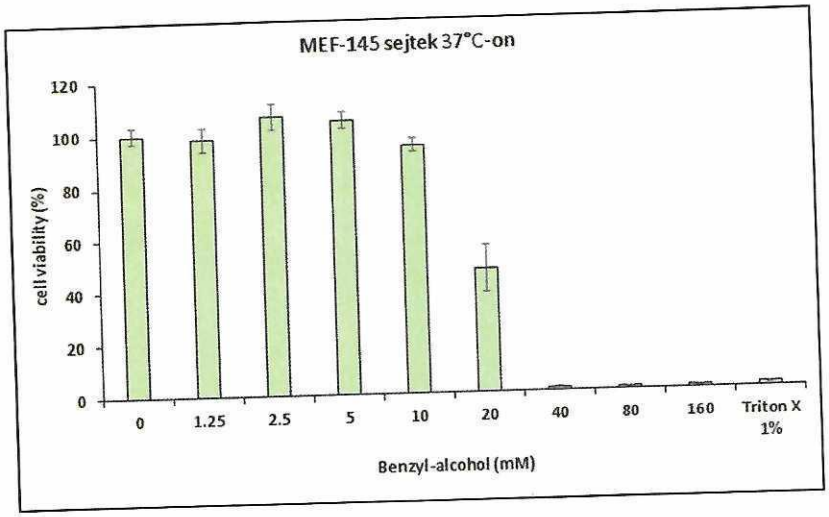
6.sz. melléklet - BA-lal kezelt platekről készített fotók.Minél inkább a lila/rózsaszín felé tolódik el a szín, annál életképesebbek a sejtek. A kék szín markáns sejttoxicitást jelez

Benzyl-alcohol	0	1.25	2.5	5	10	20	40	80	160	Triton X 1%
37°C	2931	2884	3239	3111	2830	1561	48.7	36.1	35.8	56.9
(mM)	2743	2841	3103	2993	2675	1239	37.9	25.4	30.6	35.2
	2824	2859	2942	2935	2648	1071	34	25.1	21.7	29.5
	2744	2535	2921	2868	2652	1138	32.5	22.9	22.5	42.6
	2780	2746	2931	2892	2628	1312	27.4	21.5	19.4	30.2
	2938	2795	2899	2972	2639	1720	26.2	33.7	20.6	39
	2826.667	2776.667	3005.833	2961.833	2678.667	1340.167	34.45	27.45	25.1	38.9
%	100	98	106	105	95	47	1	1	1	1
SD %	3.1	4.5	4.8	3.1	2.7	8.9	0.3	0.2	0.2	0.4

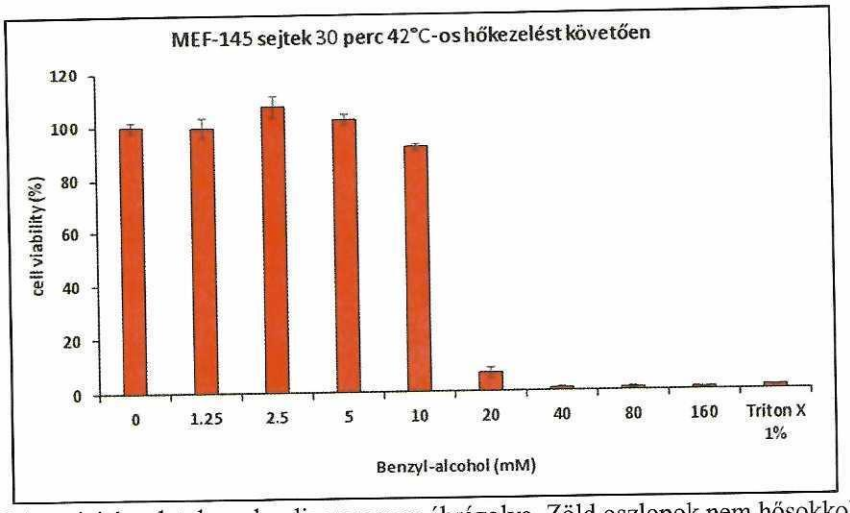
SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

Benzyl-alcohol 42°C (mM)	0	1.25	2.5	5	10	20	40	80	160	Triton X 1%
	2826	2865	3133	2876	2525	167.3	51.5	41.1	32.8	55.8
	2823	2856	3037	2854	2590	156.8	38.3	28.8	28.2	39.8
	2699	2753	2973	2870	2520	151.3	35.6	24.9	23.3	32.5
	2749	2642	2872	2732	2491	143	33.8	23.7	20.1	31.9
	2726	2641	2900	2793	2527	227.8	28.5	25.4	27.1	36.7
	2738	2715	2851	2786	2505	286.1	33.4	37.6	25.7	43.6
	2760.167	2745.333	2961	2818.5	2526.333	188.7167	36.85	30.25	26.2	40.05
%	100	99	107	102	92	7	1	1	1	1
SD %	1.9	3.6	3.9	2.1	1.2	2.0	0.3	0.3	0.2	0.3

7.sz. melléklet. A BA toxicitás nyers adatai. Feljebb 37°C-on, alul 42°C 30 perc hősokk után.



KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 14/15 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: DMSO és BA toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma:2017.08.21-2017.08.25	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-002*



8.sz. melléklet. A BA toxicitás adatok oszlopdiagrammon ábrázolva. Zöld oszlopok nem hősokkolt 37°C-os minták, pirossal a 30 percig 42°C-on hőkezelt platerről származó eredmények láthatóak. Megállapítható, hogy a 40 mM koncentráció, de még ennek fele is jelentősen toxikus a MEF-145 sejtekre. Biztonságos tartomány a 10 mM és az annál kisebb koncentrációk

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 15/15 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: DMSO és BA toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma:2017.08.21-2017.08.25	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-002*

Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor	***Kiadásért felel: Dr. Hunya Ákos Gábor***

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 1/14 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: PhA és LA1011 toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma: 2017.08.28 - 2017.09.01	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-003*

A művelet végzésének helye

A LipidArt Kft. kutatólaboratóriuma, 6726 Szeged, Temesvári krt. 62.

A műveletet végző személyek

	Beosztás K/T	**Aláírás**
Dr. Horváth Ibolya, vezető kutató	Vezető kutató	
Dr. Hunya Ákos Gábor	Tudományos munkatárs	
Dr. Pilbat Ana Maria	Tudományos munkatárs	
Bogdán Istvánné	Laborasszisztens	

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 2/14 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: PhA és LA1011 toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma: 2017.08.28 - 2017.09.01	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-003*

Célja és rövid leírása:

Cél: A fenetil-alkohol (PhA), illetve az LA1011 nevű gyógyszerjelölt vegyület sejttoxicitásának tesztje MEF-145 sejtvonalon

Leírás: A PhA, mint nem specifikus dajkafehérje induktor vegyület, hatását a membrán fluiditásának növelésével éri el. Az irodalomban (Nagy et al. 2007) használt effektív koncentráció tartománya in vitro kísérletekben mM-os range-ben van. Bizonyos sejtek (pl. B16-F10 egér melanóma) akár a 12 mM-os koncentrációban is kezelhetőek PhA-lal számottevő sejpusztulás nélkül. A feladat annak kiderítése, hogy a MEF-145 sejtek esetén melyi az a legmagasabb PhA koncentráció, amely még nem toxikus mM-os tartományban, valószínűsíthetően ez a koncentráció fogja kifejteni a maximális membrán perturbáló hatást. Az LA1011 molekula egy a LipidArt Kft. tulajdonában lévő, szabadalom által védett vízoldékony gyógyszerjelölt vegyület. Bizonyítottan ko-indukciós hatású „smart" drog, amely stresszmentes környezetben nem, csak valamely környezeti (pl. hő), vagy celluláris (pl oxidatív stressz) sressz hatására fejti ki chaperone indukáló hatását. Saját kísérleti eredményeink alapján a vegyület 10 μM koncenrtáció felett már toxikus, de ez a hatás erősen sejtfüggő. A feladat annak kiderítése, hogy a MEF-145 sejtek esetén melyik az a legmagasabb LA1011 koncentráció, amely még nem toxikus, valószínűsíthetően ez a koncentráció fogja kifejteni a maximális chaperone ko-indukciós hatást.

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 3/14 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: PhA és LA1011 toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma: 2017.08.28 - 2017.09.01	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-003*

Felhasznált anyagok

Anyag neve	Gyártó	Gyártási szám v. azonosító	Steril-e? x	Lejárati idő
DMEM high glucose	Biowest	P0103-N50L	x	2020.02.
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco	1027-106	x	2019.12.
L-Glutamine	Sigma	G5792-1KG	x	2020.03.
Penicillin-Streptomycin solution	Sigma	P4333-100ML	x	2021.01
10 mL-es üveg szerológiai pipetta	N/A	N/A	x	N/A
5 mL-es üveg szerológiai pipetta	N/A	N/A	x	N/A
Üveg Pasteur pipetta (2 mL)	N/A	N/A	x	N/A
Trypsin-EDTA solution	Lonza	BE17-161E	x	2020.05
PBS	N/A	N/A	x	N/A
96-well plate	Orange Scientific	4430100N	x	2018.08.
12 csatornás multichannel pipetta 50-300µL	Orange Scientific	3590130	-	N/A
8 csatornás multichannel pipetta 50-300µL	Orange Scientific	3590115	-	N/A
Sejtkiosztó autoklávozható műanyag V-alakú reservoir 12 és 8 csatornás pipettákhoz	Biohit	783500	-	N/A
Autoklávozható műanyag V-alakú 12 lyukú reservoir 12 és 8 csatornás pipettákhoz	Biologix	25-1202	-	N/A
Resazurin festék	Sigma	R-7017-1G	-	2019.11.04.

Felhasznált gépek, berendezések, mérőeszközök

Berendezés neve	Azonosító	Ellenőrzés Kvalifikált/kalibrált-e: x, kvalifikálási azonosító
Steril fülke	ADS Laminaire BIO II. 12	x, 025/MTA:20-1801-3034
37°C-os CO_2 inkubátor	Jouan IG-150	N/A
Pipettor	Drummond PipettAid XL	N/A
OLYMPUS fázis kontraszt fénymikroszkóp	OLYMPUS CK30	N/A
Vízlégszivattyú	N/A	N/A
Fluoreszens/lumineszcens plate olvasó	Thermo Fluoskan FL	N/A

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 4/14 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: PhA és LA1011 toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma: 2017.08.28 - 2017.09.01	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-003*

Előzmények:
KUT-JKV-LIP-117-01-006 - kísérleti sejtkiosztási jegyzőkönyv
KUT-JKV-LIP-117-01-008 - MEF-145 sejtek optimális hősokk hőmérsékletének-, és idejének meghatározása
KUT-JKV-LIP-117-02-001 - standardizált sejttoxicitási protokoll

Lépések (névvel,szignóval):
Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor

I. PhA toxicitás. teszt

1) Előzetesen a KUT-JKV-LIP-01-006 sejtkiosztási protokoll alapján citotoxicitási tesztre kiosztottam a sejteket
2) 24 órát inkubálom őket sejttenyésztő inkubátorban (37°C, 5% CO2)
3) Irodalmi adatok (Nagy et al. 2007) B16-F10 egér melanóma sejtvonalon használt effektív (jelentős membrán perturbáló hatást mutató) koncentráció 12 mM volt. Ezt alapul véve a max. kezelési koncentrációnak ennek 4 x -ét, vagyis 36 mM-t alkalmazom (valószínűleg ez már toxikus lesz) A kezelési terv az 1.sz. mellékletben tekinthető meg
4) A kezelést, inkubálást, hősokkot, recovery inkubációt és fluoreszcens mérést a KUT-JKV-LIP-117-02-001 standardizált sejttoxicitási protokoll alapján végeztem el
5) A platekről készített fotók a 2.sz. mellékletben láthatóak
6) A PhA toxicitás nyers adatait a 3.sz. melléklet tartalmazza
7) A kiértékelt eredményeket oszlopdiagrammon ábrázoltam (lsd. 4.sz. melléklet)

II. LA1011 toxicitás. teszt

1) Előzetesen a KUT-JKV-LIP-01-006 sejtkiosztási protokoll alapján citotoxicitási tesztre kiosztottam a sejteket
2) 24 órát inkubálom őket sejttenyésztő inkubátorban (37°C, 5% CO_2)
3) Kísérleti adataink alapján az effektív (jelentős Hsp ko-indukáló hatást mutató) koncentráció 10 μM volt. Maximális kezelési koncentrációnak 160 μM-t alkalmazom (valószínűleg ez már toxikus lesz) A kezelési terv az 5.sz. mellékletben tekinthető meg
4) A kezelést, inkubálást, hősokkot, recovery inkubációt és fluoreszcens mérést a KUT-JKV-LIP-117-02-001 standardizált sejttoxicitási protokoll alapján végeztem el
5) A platekről készített fotók a 6.sz. mellékletben láthatóak
6) Az LA1011 toxicitás nyers adatait a 7.sz. melléklet tartalmazza
7) A kiértékelt eredményeket oszlopdiagrammon ábrázoltam (lsd. 8.sz. melléklet)

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE
GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 5/14 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: PhA és LA1011 toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma: 2017.08.28 - 2017.09.01	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-003*

Összefoglalása, eredménye:

Ezzel a kísérlettel kívántuk meghatározni MEF-145 sejtek PhA-lal, valamint az LA1011 nevű gyógyszerjelölt vegyülettel szembeni tűrőképességét és azt a legmagasabb PhA és LA1011 koncentrációt, amely még nem toxikus, és képes elvileg a maximális chaperon indukáló/ko-indukáló hatást kifejteni.
A PhA toxicitásának meghatározásánál érdekes volt, hogy az irodalomban használt 12 mM (B16-F10) koncentráció jelentősen toxikusnak mutatkozott MEF-145 sejteken. A biztonságos koncentráció tartomány MEF-145 sejtvonalon a 6 mM alatti (lásd 4.sz. melléklet). Western blot kísérletekhez ezt, valamint ennek felét és negyedét fogom használni.
Az LA1011 nevű gyógyszerjelölt vegyület esetén korábbi saját kísérleti eredményeink alapján a vegyület 10 μM koncenrtáció felett már toxikus - bár ez erősen sejtfüggő hatás- ezt az eredményt látszik megerősíteni a jelen kísérlet is MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtvonalon. Biztonságosan használható koncentráció tartomány MEF-145 sejtvonalon a 10 μM alatti (lásd 4.sz. melléklet). Western blot kísérletekhez így max. Koncentrációként ezt a 10 μM-t fogom használni, illetve ennek felét és negyedét

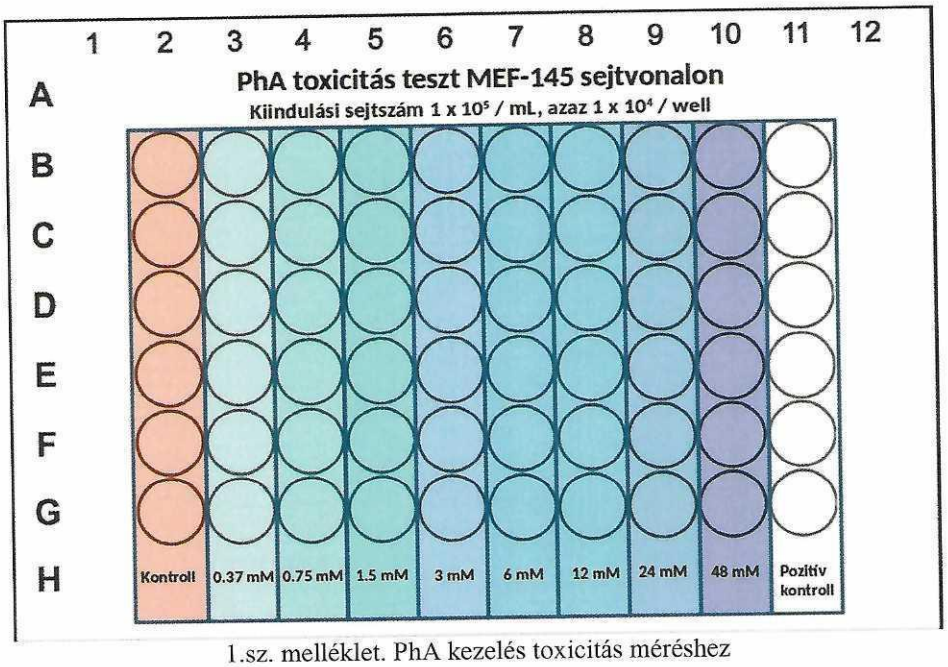
Csatolmányok felsorolása:

1.sz. melléklet - PhA kezelés toxicitás méréshez
2.sz. melléklet - PhA-lal kezelt platekről készített fotók
3.sz. melléklet - A PhA toxicitás nyers adatai
4.sz. melléklet - A PhA toxicitás adatok oszlopdiagrammon ábrázolva
5.sz. melléklet - LA1011 kezelési terv toxicitási kísérlethez
6.sz. melléklet - LA1011-lal kezelt platekről készített fotók
7.sz. melléklet - Az LA1011 toxicitás nyers adatai
8.sz. melléklet - Az LA1011 toxicitás adatok oszlopdiagrammon ábrázolva

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE
GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

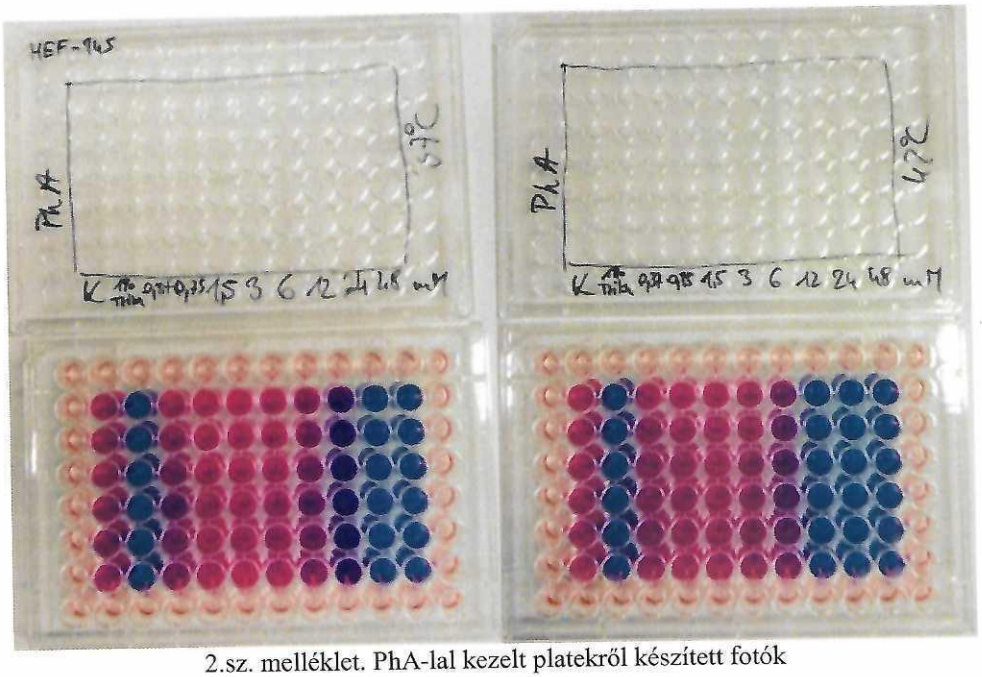
KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 6/14 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: PhA és LA1011 toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma: 2017.08.28 - 2017.09.01	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-003*

Csatolmányok



1.sz. melléklet. PhA kezelés toxicitás méréshez

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 7/14 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: PhA és LA1011 toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma: 2017.08.28 - 2017.09.01	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-003*



2.sz. melléklet. PhA-lal kezelt platekről készített fotók

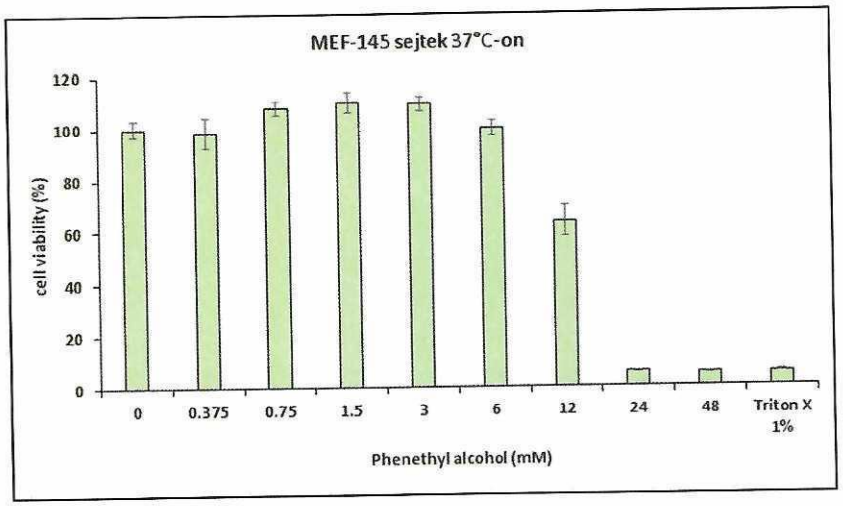
Phenethyl alcohol	0	0.375	0.75	1.5	3	6	12	24	48	Triton X 1%
37°C	3327	3444	3719	3784	3704	3371	2448	180.7	189	200.6
(mM)	3262	3473	3613	3597	3692	3377	2149	178.3	175.7	182
	3300	3227	3509	3583	3666	3323	1984	206.1	171.3	172.9
	3252	2946	3489	3555	3574	3123	1915	177	167.1	177.3
	3238	3222	3598	3521	3489	3368	1961	178	164.9	181.2
	3501	3263	3491	3799	3562	3292	2193	200.5	173.3	186.3
	3313.333	3262.5	3569.833	3639.833	3614.5	3309	2108.333	186.7667	173.55	183.3833
%	100	98	108	110	109	100	64	6	5	6
SD %	2.9	5.7	2.7	3.6	2.6	2.9	6.0	0.4	0.3	0.3

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

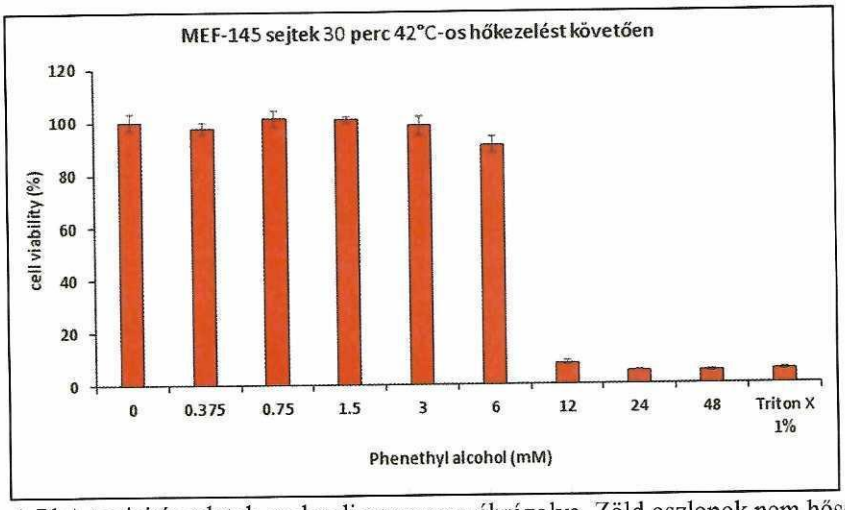
SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

Phenethyl alcohol	0	0.375	0.75	1.5	3	6	12	24	48	Triton X 1%
42°C	3589	3576	3776	3626	3680	3325	315	188.1	190.3	212
(mM)	3424	3502	3641	3530	3584	3242	257.2	177.8	179.7	197.9
	3502	3453	3512	3550	3407	3176	293.5	180.4	171.7	178.3
	3545	3397	3487	3517	3434	3036	251.6	171.4	169.2	175.3
	3473	3376	3570	3576	3417	3190	253.3	170.6	164.6	174.8
	3724	3436	3488	3604	3354	3326	298.8	180	170.6	184.3
	3542.833	3456.667	3579	3567.167	3479.333	3215.833	278.2333	178.05	174.35	187.1
%	100	98	101	101	98	91	8	5	5	5
SD %	3.0	2.1	3.2	1.2	3.5	3.1	0.8	0.2	0.3	0.4

3.sz. melléklet. A PhA toxicitás nyers adatai. Felül 37°C-on, alul 42°C 30 perc hősokk után.



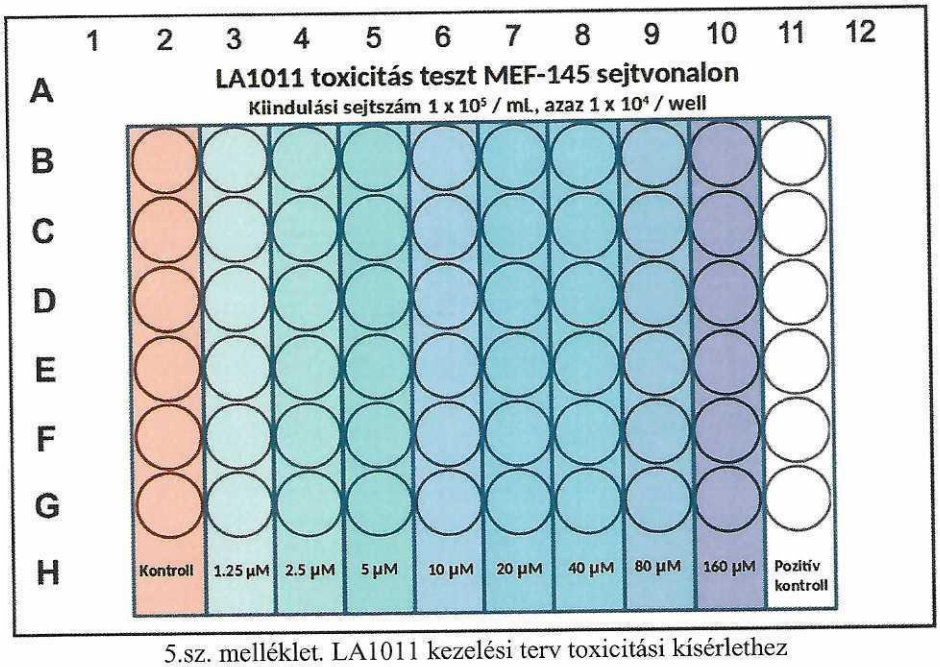
KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 9/14 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: PhA és LA1011 toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma: 2017.08.28 - 2017.09.01	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-003*



4.sz. melléklet. A PhA toxicitás adatok oszlopdiagrammon ábrázolva. Zöld oszlopok nem hősokkolt 37°C-os minták, pirossal a 30 percig 42°C-on hőkezelt plateről származó eredmények lettek feltűntetve. Látható, hogy a 12 mM koncentráció közepesen toxikus a 37°C-on tarott sejtekre, 42°C-os 30 percig hőkezelt MEF-145 sejtekre viszont jelentősen citotoxikus, így ez a koncentráció további kísérletekre nem használható. Biztonságos tartomány a 6 mM és az annál kisebb koncentrációk

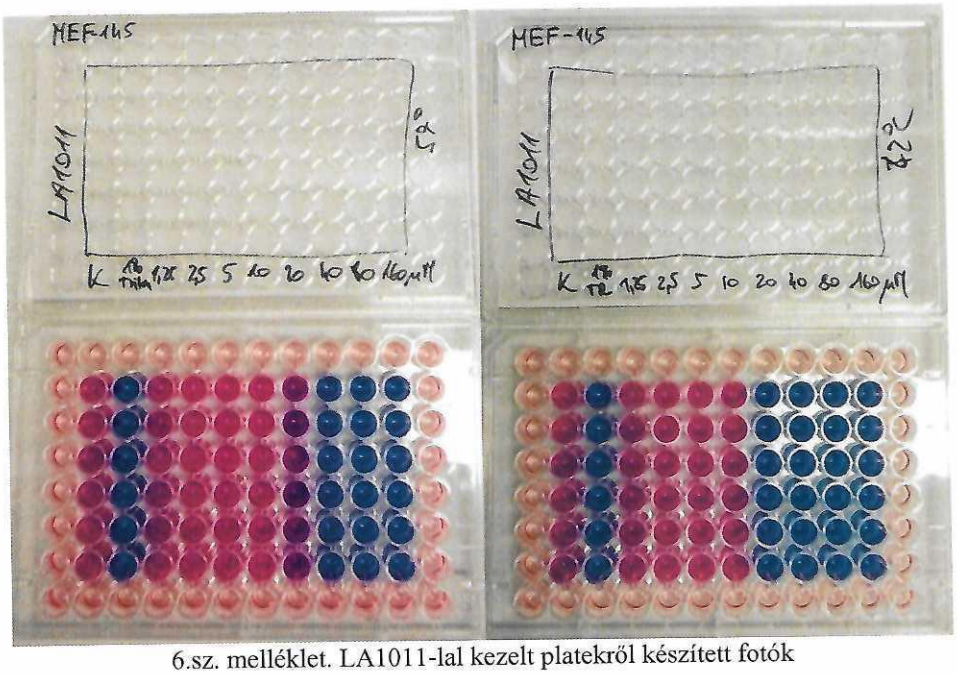
GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE



5.sz. melléklet. LA1011 kezelési terv toxicitási kísérlethez

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 11/14 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: PhA és LA1011 toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma: 2017.08.28 - 2017.09.01	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-003*



6.sz. melléklet. LA1011-lal kezelt platekről készített fotók

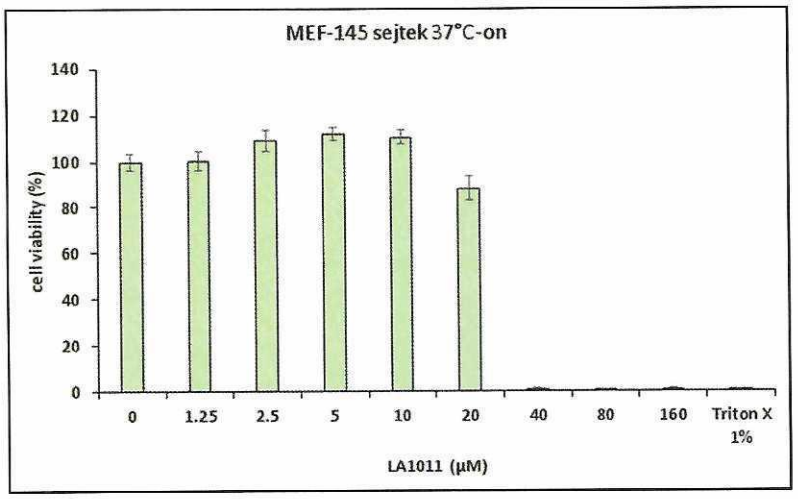
LA1011	0	1.25	2.5	5	10	20	40	80	160	Triton X 1%
37°C	3081	3184	3527	3527	3476	2865	40.3	29.6	36.8	38.1
(µM)	3029	3100	3417	3452	3440	2614	31.8	27.3	26.1	19
	2872	3043	3307	3407	3367	2777	30.8	24.9	22.7	12.6
	2973	2868	3200	3318	3268	2431	26.6	23	20.2	18.8
	3041	2933	3217	3316	3300	2777	24.3	21.5	20	17.9
	3224	3155	3198	3369	3279	2608	20.2	25	18.1	14.9
	3036.667	3047.167	3311	3398.167	3355	2678.667	29	25.21667	23.98333	20.21667
%	100	100	109	112	110	88	1	1	1	1
SD %	3.8	4.1	4.5	2.7	2.9	5.2	0.2	0.1	0.2	0.3

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

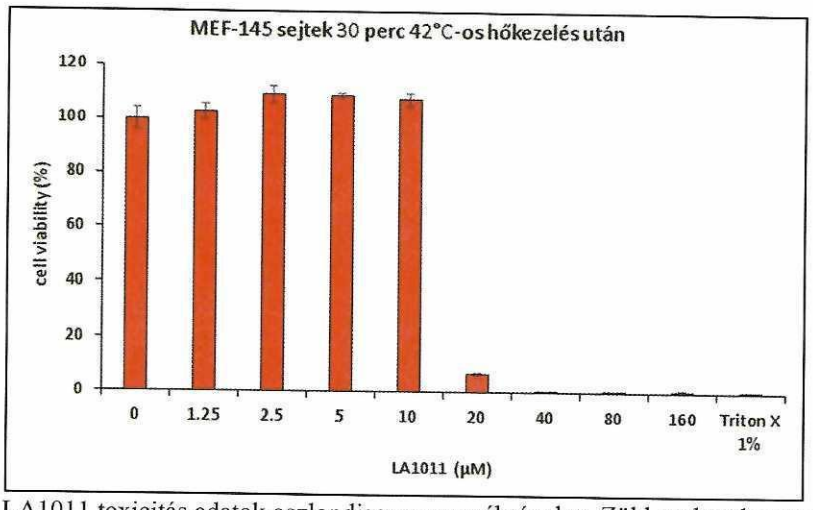
SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

LA1011	0	1.25	2.5	5	10	20	40	80	160	Triton X 1%
42°C	3113	3138	3335	3221	3271	194	28.9	20.2	33.4	24.5
(µM)	3014	2965	3267	3195	3176	224.9	17.4	13.1	24.3	7.1
	2756	3074	3101	3165	3117	178.7	12.9	20.2	22.3	1.9
	2951	2915	3126	3210	3076	213.1	12.5	17.3	18.6	5.1
	2895	2963	3250	3163	3125	177.6	12.2	20.9	14.7	12.7
	2888	3063	3141	3235	3142	202.2	16.3	25	21.2	9.3
	2936.167	3019.667	3203.333	3198.167	3151.167	198.4167	16.7	19.45	22.41667	10.1
%	100	103	109	109	107	7	1	1	1	0
SD %	4.1	2.9	3.2	1.0	2.3	0.6	0.2	0.1	0.2	0.3

7.sz. melléklet. Az LA1011 toxicitás nyers adatai



KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 13/14 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: PhA és LA1011 toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma: 2017.08.28 - 2017.09.01	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-003*



8.sz. melléklet. Az LA1011 toxicitás adatok oszlopdiagrammon ábrázolva. Zöld oszlopok nem hősokkolt 37°C-os minták, pirossal a 30 percig 42°C-on hőkezelt plateről származó eredmények lettek feltűntetve. Látható, hogy a 20 µM koncentráció 37°C-on alig toxikus, míg 42°C-on 30 percig hőkezelt MEF-145 sejteket már majdnem teljesen elpusztította, így ez a koncentráció további kísérletekre nem használható. Biztonságos tartomány a 10 µM és az annál kisebb koncentrációk.

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 14/14 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával	
Alcím: PhA és LA1011 toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma: 2017.08.28 - 2017.09.01	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-003*

Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor	***Kiadásért felel: Dr. Hunya Ákos Gábor***

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 1/14 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával	
Alcím: LA1030 és LA1050 toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma: 2017.09.04 - 2017.09.08	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-004*

A művelet végzésének helye

A LipidArt Kft. kutatólaboratóriuma, 6726 Szeged, Temesvári krt. 62.

A műveletet végző személyek

	Beosztás K/T	Aláírás
Dr. Horváth Ibolya, vezető kutató	Vezető kutató	
Dr. Hunya Ákos Gábor	Tudományos munkatárs	
Dr. Pilbat Ana Maria	Tudományos munkatárs	
Bogdán Istvánné	Laborasszisztens	

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 2/14 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: LA1030 és LA1050 toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma: 2017.09.04 - 2017.09.08	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-004*

Célja és rövid leírása:

Cél: Az LA1030, illetve az LA1050 nevű gyógyszerjelölt vegyület sejttoxicitásának tesztje MEF-145 sejtvonalon

Leírás: Mindkét molekula a LipidArt Kft. tulajdonában lévő, szabadalom által védett appoláros gyógyszerjelölt vegyület. Ko-indukciós hatásúak és stresszmentes környezetben nem, csak valamely környezeti (pl. hő), vagy celluláris (pl oxidatív stressz) sressz hatására fejtik ki chaperone indukáló hatásukat. Saját kísérleti eredményeink alapján egyik vegyület sem mutat toxicitást 50 μM alatti koncenrtációban, ám ez erősen sejtfüggő lehet. A feladat annak kiderítése, hogy a MEF-145 sejtek esetén melyik az a legmagasabb LA1030 és LA1050 koncentráció, amely még nem toxikus, valószínűsíthetően ez a koncentráció fogja mindkét gyógyszerjelölt esetében kifejteni a maximális chaperone ko-indukciós hatást.

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 3/14 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: LA1030 és LA1050 toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma: 2017.09.04 - 2017.09.08	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-004*

Felhasznált anyagok

Anyag neve	Gyártó	Gyártási szám v. azonosító	Steril-e? x	Lejárati idő
DMEM high glucose	Biowest	P0103-N50L	x	2020.02.
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco	1027-106	x	2019.12.
L-Glutamine	Sigma	G5792-1KG	x	2020.03.
Penicillin-Streptomycin solution	Sigma	P4333-100ML	x	2021.01
10 mL-es üveg szerológiai pipetta	N/A	N/A	x	N/A
5 mL-es üveg szerológiai pipetta	N/A	N/A	x	N/A
Üveg Pasteur pipetta (2 mL)	N/A	N/A	x	N/A
Trypsin-EDTA solution	Lonza	BE17-161E	x	2020.05
PBS	N/A	N/A	x	N/A
96-well plate	Orange Scientific	4430100N	x	2018.08.
12 csatornás multichannel pipetta 50-300µL	Orange Scientific	3590130	-	N/A
8 csatornás multichannel pipetta 50-300µL	Orange Scientific	3590115	-	N/A
Sejtkiosztó autoklávozható műanyag V-alakú reservoir 12 és 8 csatornás pipettákhoz	Biohit	783500	-	N/A
Autoklávozható műanyag V-alakú 12 lyukú reservoir 12 és 8 csatornás pipettákhoz	Biologix	25-1202	-	N/A
Resazurin festék	Sigma	R-7017-1G	-	2019.11.04.

Felhasznált gépek, berendezések, mérőeszközök

Berendezés neve	Azonosító	Ellenőrzés Kvalifikált/kalibrált-e: x, kvalifikálási azonosító
Steril fülke	ADS Laminaire BIO II. 12	x, 025/MTA:20-1801-3034
37°C-os CO_2 inkubátor	Jouan IG-150	N/A
Pipettor	Drummond PipettAid XL	N/A
OLYMPUS fázis kontraszt fénymikroszkóp	OLYMPUS CK30	N/A
Vízlégszivattyú	N/A	N/A
Fluoreszens/lumineszcens plate olvasó	Thermo Fluoskan FL	N/A

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 4/14 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: LA1030 és LA1050 toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma: 2017.09.04 - 2017.09.08	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-004*

Előzmények:
KUT-JKV-LIP-117-01-006 - kísérleti sejtkiosztási jegyzőkönyv
KUT-JKV-LIP-117-01-008 - MEF-145 sejtek optimális hősokk hőmérsékletének-, és idejének meghatározása
KUT-JKV-LIP-117-02-001 - standardizált sejttoxicitási protokoll

Lépések (névvel,szignóval):
Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor

I. LA1030 toxicitás. teszt

1) Előzetesen a KUT-JKV-LIP-01-006 sejtkiosztási protokoll alapján citotoxicitási tesztre kiosztottam a sejteket
2) 24 órát inkubálom őket sejttenyésztő inkubátorban (37°C, 5% CO2)
3) Kísérleti adataink alapján az effektív (jelentős Hsp ko-indukáló hatást mutató) koncentráció 40 µM volt. Maximális kezelési koncentrációnak 160 µM-t alkalmazom (elméletileg ez már toxikus lesz) A kezelési terv az 5.sz. mellékletben tekinthető meg
4) A kezelést, inkubálást, hősokkot, recovery inkubációt és fluoreszcens mérést a KUT-JKV-LIP-117-02-001 standardizált sejttoxicitási protokoll alapján végeztem el
5) A platekről készített fotók a 6.sz. mellékletben láthatóak
6) Az LA1030 toxicitás nyers adatait a 7.sz. melléklet tartalmazza
7) A kiértékelt eredményeket oszlopdiagrammon ábrázoltam (lsd. 8.sz. melléklet)

I. LA1050 toxicitás. teszt

1) Előzetesen a KUT-JKV-LIP-01-006 sejtkiosztási protokoll alapján citotoxicitási tesztre kiosztottam a sejteket
2) 24 órát inkubálom őket sejttenyésztő inkubátorban (37°C, 5% CO2)
3) Kísérleti adataink alapján az effektív (jelentős Hsp ko-indukáló hatást mutató) koncentráció 40 µM volt. Maximális kezelési koncentrációnak 160 µM-t alkalmazom (elméletileg ez már toxikus lesz) A kezelési terv az 5.sz. mellékletben tekinthető meg
4) A kezelést, inkubálást, hősokkot, recovery inkubációt és fluoreszcens mérést a KUT-JKV-LIP-117-02-001 standardizált sejttoxicitási protokoll alapján végeztem el
5) A platekről készített fotók a 6.sz. mellékletben láthatóak
6) Az LA1050 toxicitás nyers adatait a 7.sz. melléklet tartalmazza
7) A kiértékelt eredményeket oszlopdiagrammon ábrázoltam (lsd. 8.sz. melléklet)

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE
GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 5/14 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: LA1030 és LA1050 toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma: 2017.09.04 - 2017.09.08	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-004*

Összefoglalása, eredménye:

E kísérlet célja az volt, hogy meghatározzuk a MEF-145 sejtek LA1030 és LA1050 nevű gyógyszerjelölt vegyületekkel szembeni tűrőképességét és azt a legmagasabb LA1030 és LA1050 koncentrációt, amely még nem toxikus, és képes elvileg a maximális chaperon indukáló/ko-indukáló hatást kifejteni.
Mind az LA1030, mind pedig az LA1050 gyógyszerjelölt vegyület a korábbi saját kísérleti eredményeinkhez hasonlóan egyik kipróbált koncentrációban sem mutatott toxicitást MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejtvonalon (4. és 8.sz. mellékletek). Ezek alapján western blot kísérletekhez 40, 20 és 10 μM-os kezeléseket fogok alkalmazni.

Csatolmányok felsorolása:

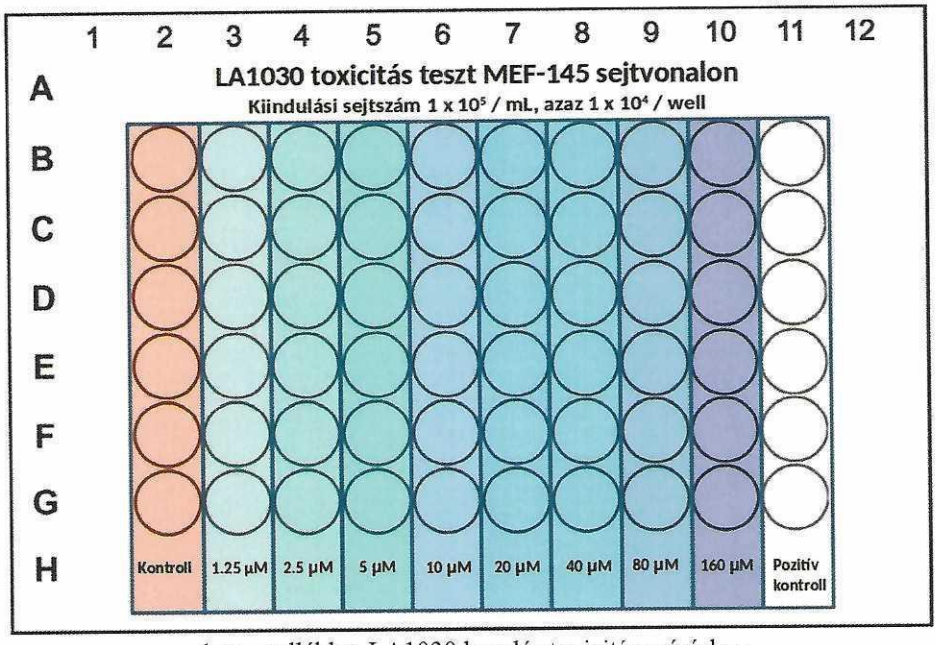
1.sz. melléklet - LA1030 kezelés toxicitás méréshez
2.sz. melléklet - LA1030-cal kezelt platekről készített fotók
3.sz. melléklet - LA1030 toxicitás nyers adatai
4.sz. melléklet - LA1030 toxicitás adatok oszlopdiagrammon ábrázolva
5.sz. melléklet - LA1050 kezelési terv toxicitási kísérlethez
6.sz. melléklet - LA1050-nel kezelt platekről készített fotók
7.sz. melléklet - Az LA1050 toxicitás nyers adatai
8.sz. melléklet - Az LA1050 toxicitás adatok oszlopdiagrammon ábrázolva

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

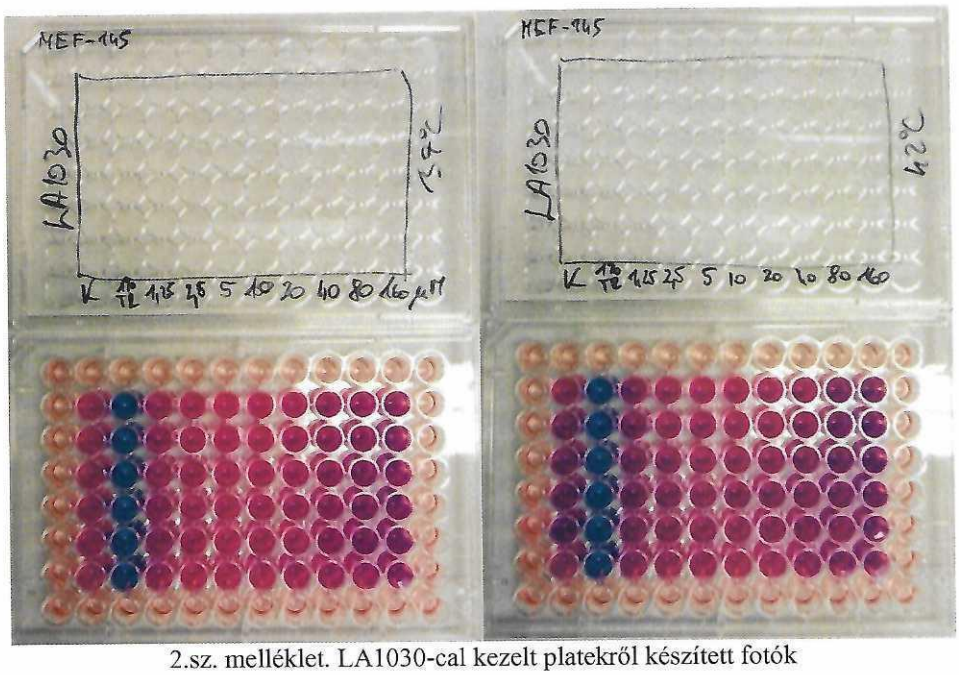
KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 6/14 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: LA1030 és LA1050 toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma: 2017.09.04 - 2017.09.08	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-004*

Csatolmányok



1.sz. melléklet. LA1030 kezelés toxicitás méréshez

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 7/14 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: LA1030 és LA1050 toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma: 2017.09.04 - 2017.09.08	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-004*



2.sz. melléklet. LA1030-cal kezelt platekről készített fotók

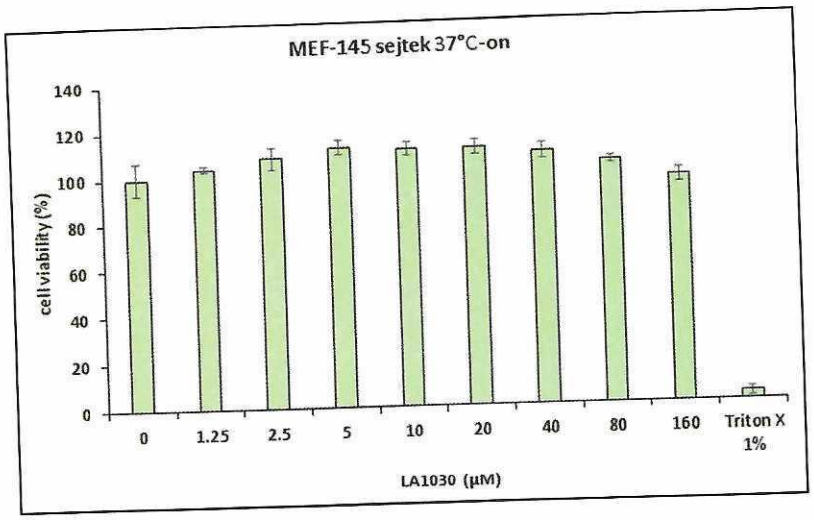
LA1030	0	1.25	2.5	5	10	20	40	80	160	Triton X 1%
37°C	3128	3046	3381	3376	3387	3298	3317	3080	2921	150.1
(µM)	2843	3069	3257	3247	3272	3289	3255	3024	2699	92.7
	2798	3029	3007	3200	3175	3133	3133	2971	2808	46.2
	2898	3041	3080	3310	3212	3181	3208	3086	2850	159.4
	2672	2945	3060	3168	3140	3206	3056	3004	2751	20.5
	3187	3055	3117	3364	3245	3362	3104	3070	2916	107.7
	2921	3030.833	3150.333	3277.5	3238.5	3244.833	3178.833	3039.167	2824.167	96.1
%	100	104	108	112	111	111	109	104	97	3
SD %	6.8	1.5	4.8	3.0	3.0	2.9	3.4	1.6	3.1	1.9

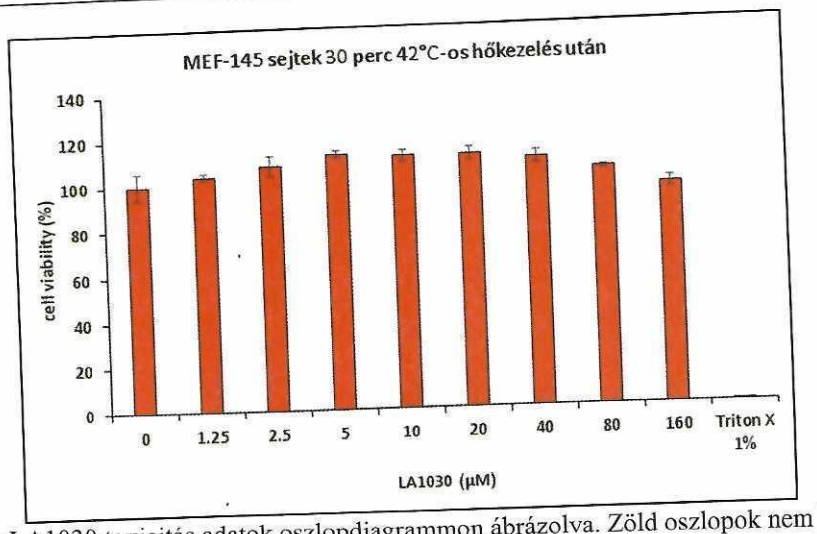
GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

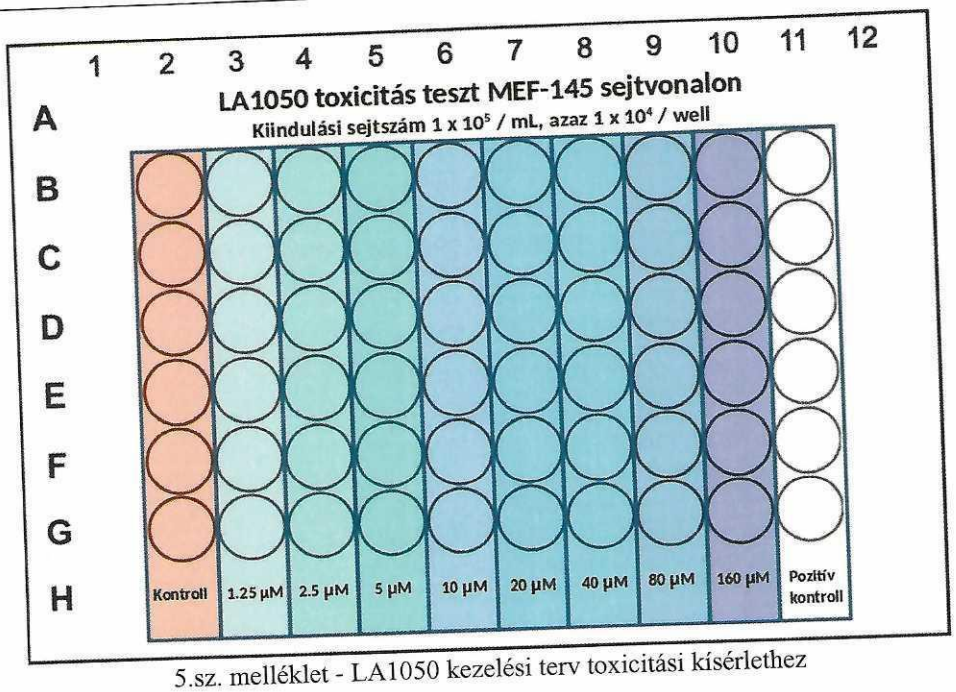
LA1030	0	1.25	2.5	5	10	20	40	80	160	Triton X 1%
42°C	3008	2926	3261	3256	3267	3178	3197	2960	2801	30.1
(µM)	2763	2989	3177	3167	3192	3209	3175	2944	2619	12.7
	2758	2989	2967	3160	3135	3093	3093	2931	2768	6.2
	2748	2891	2930	3160	3062	3031	3058	2936	2700	9.4
	2662	2935	3050	3158	3130	3196	3046	2994	2741	10.5
	3087	2955	3017	3264	3145	3262	3004	2970	2816	7.7
	2837.667	2947.5	3067	3194.167	3155.167	3161.5	3095.5	2955.833	2740.833	12.76667
%	100	104	108	113	111	111	109	104	97	0
SD %	5.9	1.3	4.5	1.8	2.4	3.0	2.7	0.8	2.6	0.3

3.sz. melléklet. LA1030 toxicitás nyers adatai



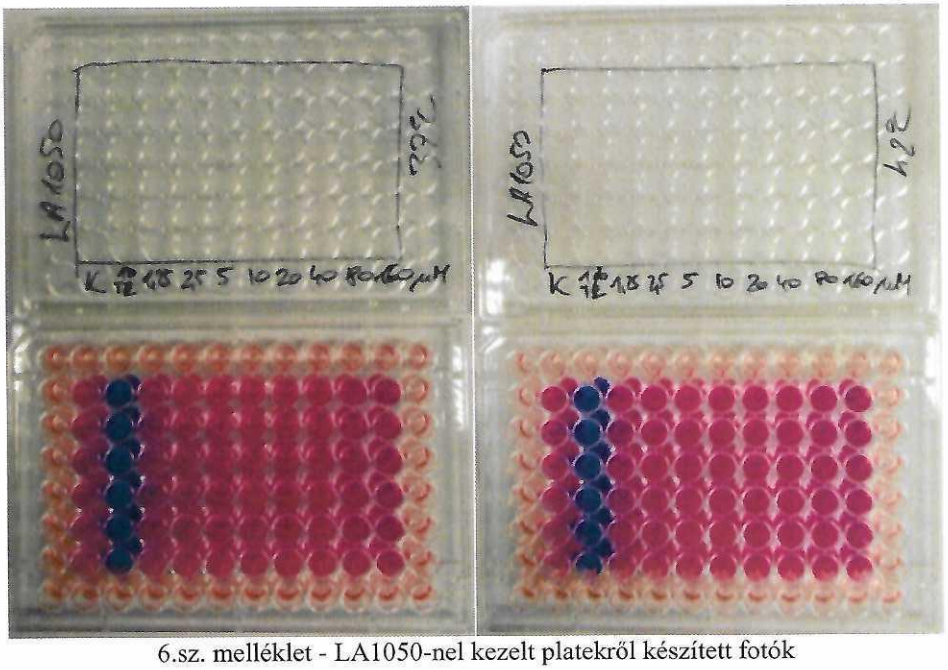


4.sz. melléklet. Az LA1030 toxicitás adatok oszlopdiagrammon ábrázolva. Zöld oszlopok nem hősokkolt 37°C-os minták, pirossal a 30 percig 42°C-on hőkezelt platerről származó eredmények lettek feltűntetve. Látható, hogy egyik alkalmazott molekula koncentráció sem bizonyult toxikusnak,sem 37°C-on, sem pedig a 42°C-on 30 percig hőkezelt MEF-145 sejtekre. Ezek alapján az eddig saját kísérleteinkben használt 40 µM-os végpont biztonságosan alkalmazható további kísérletekben is. Így western blot kísérletekben az LA1030 gyógyszerjelöletet 40, 20 és 10 µM-os koncentrációban fogom alkalmazni.



5.sz. melléklet - LA1050 kezelési terv toxicitási kísérlethez

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 11/14 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: LA1030 és LA1050 toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma: 2017.09.04 - 2017.09.08	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-004*



6.sz. melléklet - LA1050-nel kezelt platekről készített fotók

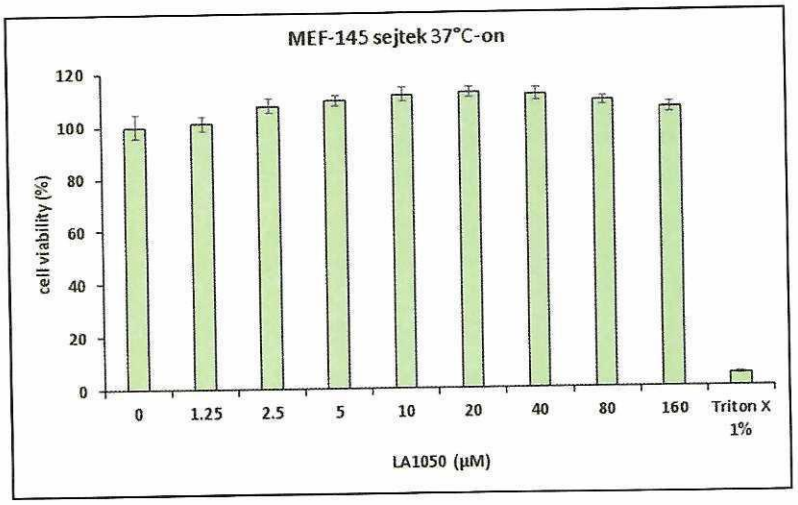
LA1050	0	1.25	2.5	5	10	20	40	80	160	Triton X 1%
37°C	3426	3529	3842	3741	3950	3867	3937	3725	3739	192.4
(µM)	3407	3417	3751	3700	3890	3911	3874	3734	3671	170.5
	3275	3435	3627	3735	3773	3771	3803	3668	3621	166.4
	3326	3339	3621	3688	3842	3772	3794	3701	3622	162.3
	3423	3468	3679	3753	3739	3877	3746	3713	3551	163.8
	3726	3601	3624	3889	3723	3914	3748	3830	3578	160.1
	3430.5	3464.833	3690.667	3751	3819.5	3852	3817	3728.5	3630.333	169.25
%	100	101	108	109	111	112	111	109	106	5
SD %	4.6	2.7	2.6	2.1	2.6	1.9	2.2	1.6	2.0	0.3

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

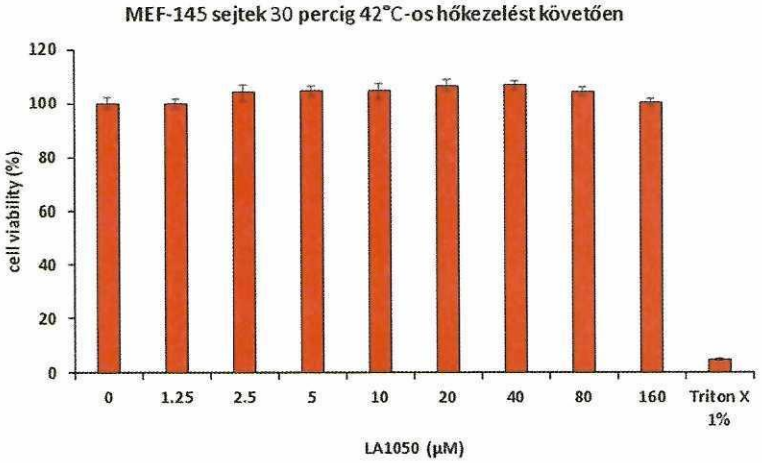
SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

LA1050	0	1.25	2.5	5	10	20	40	80	160	Triton X 1%
42°C	3579	3596	3852	3826	3937	3868	3904	3723	3677	199.2
(µM)	3488	3488	3743	3700	3713	3849	3838	3790	3586	177.2
	3539	3638	3684	3673	3683	3708	3801	3717	3577	167
	3521	3472	3587	3662	3685	3695	3830	3604	3585	166.2
	3568	3612	3796	3752	3727	3854	3759	3721	3514	171
	3717	3594	3577	3765	3652	3839	3739	3758	3555	163.5
	3568.667	3566.667	3706.5	3729.667	3732.833	3802.167	3811.833	3718.833	3582.333	174.0167
%	100	100	104	105	105	107	107	104	100	5
SD %	2.2	1.9	3.1	1.8	2.9	2.2	1.7	1.8	1.5	0.4

7.sz. melléklet - Az LA1050 toxicitás nyers adatai. Felül 37°C-on, alul 42°C 30 perc hősokk után.



KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 13/14 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: LA1030 és LA1050 toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma: 2017.09.04 - 2017.09.08	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-004*



8.sz. melléklet. Az LA1050 toxicitás adatok oszlopdiagrammon ábrázolva. Zöld oszlopok nem hősokkolt 37°C-os minták, pirossal a 30 percig 42°C-on hőkezelt plateről származó eredmények lettek feltűntetve. Látható, hogy egyik alkalmazott molekula koncentráció sem bizonyult toxikusnak,sem 37°C-on, sem pedig a 42°C-on 30 percig hőkezelt MEF-145 sejtekre. Ezek alapján az eddig saját kísérleteinkben használt 40 µM-os végpont biztonságosan alkalmazható további kísérletekben is. Így western blot kísérletekben az LA1050 gyógyszerjelöltet 40, 20 és 10 µM-ban fogom alkalmazni.

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 14/14 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: LA1030 és LA1050 toxicitási teszt MEF-145 sejteken	
Dátuma: 2017.09.04 - 2017.09.08	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-02-004*

Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor	***Kiadásért felel: Dr. Hunya Ákos Gábor***

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

DEBRECENI EGYETEM

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 1/15 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával	
Alcím: BA és PhA hatása a MEF-145 sejtek Hsp70, Hsp25, Hsp60 és Hsp90 chaperone szintjére	
Dátuma: 2017.09.18-2017.09.29	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-02-005*

A művelet végzésének helye

A LipidArt Kft. kutatólaboratóriuma, 6726 Szeged, Temesvári krt. 62.

A műveletet végző személyek

	Beosztás K/T	**Aláírás**
Dr. Horváth Ibolya, vezető kutató	Vezető kutató	
Dr. Hunya Ákos Gábor	Tudományos munkatárs	
Dr. Pilbat Ana Maria	Tudományos munkatárs	Pilbat Ana Maria
Bogdán Istvánné	Laborasszisztens	Bogdán Istvánné

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 2/15 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: BA és PhA hatása a MEF-145 sejtek Hsp70, Hsp25, Hsp60 és Hsp90 chaperone szintjére	
Dátuma: 2017.09.18-2017.09.29	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-02-005*

Célja és rövid leírása:

Cél: Membrán fluiditást növelő szerek, BA és PhA hatásának vizsgálata a MEF-145 sejtek Hsp70, Hsp25, Hsp60 és Hsp90 szintjére western blot technikával.

Leírás: Az előzetesen optimalizált western blot protokoll alapján vizsgáljuk MEF-145 egér embrionális fibroblaszt sejteken a négy legfőbb hősokk fehérje család, a Hsp70, Hsp25, Hsp60 és Hsp90 szintjének alakulását membrán fluiditást növelő szerekkel (benzil alkohol, ill. a fenetil alkohol) történő kezelés hatására.

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

Felhasznált anyagok

Anyag neve	Gyártó	Gyártási szám v. azonosító	Steril-e? x	Lejárati idő
RIPA puffer	Sigma-Aldrich	R0278-50ML	-	2020.02.23.
Protease inhibitor coctail	Sigma-Aldrich	P8340-1ML	-	2019.12.20.
Mintapuffer, Laemmli 45× koncentrált	N/A	N/A	-	N/A
vízjég	N/A	N/A	-	N/A
1.5 mL-es Eppendorf cső	Greiner Bio-One	616201	-	2020.06.
Pierce BCA Protein Assay kit	Pierce	23225	-	2020.01.
96 well plate fehérjeméréshez	Greiner Bio-One	655101	-	2020.05.10.
Üveglapok 0.75 mm vastagságú poliakrilamid gélhez	BIO-RAD	1653308 és 1653310	-	N/A
Protein molekulatömeg marker	BIO-RAD	1610375	-	2019.11.
PVDF membrán Immobilon-P .45mm	Millipore	IPVH00010	-	2019.10.
Whatmann szűrőpapír	VWR	732-4093	-	2020.01.
Műanyag tálka membránokhoz	N/A	N/A	-	N/A
PBS	N/A	N/A	-	N/A
ECL (Immobilon Western)	Millipore	WBKLS0100	-	2019.01.05.
Hsp27 poliklonális antitest	Abcam	ADI-SPA-803	-	2020.02.20.
Hsp70 monoklonális antitest	Abcam	ADI-SPA-810	-	2020.02.20.
Hsp60 monoklonális antitest	Abcam	ADI-SPA-806	-	2020.02.20.
Hsp90 monoklonális antitest	Abcam	ADI-SPA-830	-	2020.02.20.
GAPDH poliklonális antitest	Sigma-Aldrich	G9545	-	2020.03.10.
Coomassie brilliant blue oldat	N/A	N/A	-	N/A

Felhasznált gépek, berendezések, mérőeszközök

Berendezés neve	Azonosító	Ellenőrzés Kvalifikált/kalibrált-e: x, kvalifikálási azonosító
Sejtkaparó pálca	N/A	N/A
Manuális pipetta 100-1000 µL	Biohit ProLine	N/A
Hűthető síkrázó mikro centrifugacsövekhez	Eppendorf Thermomixer Comfort	N/A
Vízlégszivattyú	N/A	N/A
Centrifuga mikro centrifugacsövekhez	Sorvall RMC 14	N/A
Plate olvasó fotométer	Thermo MultiSkan EX	N/A
Poliakrilamid gél elekrtoforézis kit	BIO-RAD Mini-PROTEAN TETRA System	N/A
Blottoló berendezés	BIO-RAD Mini Trans-Blot Cell	N/A
Billegő tér-rázó rázógép	Labnet Rocker 25	N/A
AlphaImager HP nagysebességű CCD kamera	Alpha Innotech Inc.	N/A
Állítható hőmérsékletű vízfürdő	Memmert	N/A

Előzmények:

KUT-JKV-LIP-117-01-006 - MEF-145 kísérleti sejtkiosztás
KUT-JKV-LIP-117-01-007 - Western blot protokoll
KUT-JKV-LIP-117-01-008 - MEF-145 sejtek optimális hősokk hőmérsékletének-, és idejének meghatározása
KUT-JKV-LIP-117-02-002 - DMSO és BA toxicitási teszt MEF-145 sejteken
KUT-JKV-LIP-117-02-003 - PhA és LA1011 toxicitási teszt MEF-145 sejteken

Lépések (névvel,szignóval):
Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor

1) A vizsgálat kezdetét megelőzően 48 órával 5 x 105 sejt/csésze MEF-145 sejtet oltottam ki 2 x 8 db. 6 cm-es Petri csészére.
2) A 24 órás inkubációt (37°C, 5% CO2) követően a csészéket feliratoztam a KUT-JKV-LIP-117-02-002 és KUT-JKV-LIP-117-02-003 jegyzőkönyvek alapján meghatározott koncentrációk szerint
3) Ezek alapján a 6 cm-es csészéket **10, 5 és 2.5 mM BA** val, és **6, 3 és 1.5 mM PhA**-lal kezeltem
4) Majd a csészék felét 42°C-os vízfürdőbe helyeztem 30 percre
5) 16 óra recovery után (sejtek mikroszkópos képeit közvetlenül a feldolgozás előtt az 1.sz. melléklet tartalmazza) a sejteket RIPA pufferben felkapartam, fehérjét mértem a mintákból a KUT-JKV-LIP-117-01-007 és KUT-JKV-LIP-117-01-008 irányelvei alapján (a fehérjemérések eredményét lásd 1.sz. melléklet)
6) **BA** esetén **10 mM** és**PhA** esetén **6 mM**-lal kezelt csészékből származó mintákat, valamint a 37°C és 42°C-os kontroll mintákat (3 technikai párhuzamban, a 2.sz. mellékletben bemutatott sorrendben) vittem fel 15 zsebes 12%-os SDS-poliakrilamid gélre, majd futtattam 160 V feszültséggel.
7) Blottolás, blokkolás és mosás után éjszakára 4°C-on inkubáltam anti-Hsp70 ellenanyaggal (1:8000 higításban)
8) Másnap mosást követően 3%-os nem zsíros tejben 1:160000 arányban higított anti-egér másodlagos ellenanyaggal inkubáltam a membránokat szobahőmérsékleten 1 órán át
9) Ezt mosás, majd előhívás követi
10) Előhívás után a membránokat éjszakán át 4°C-on inkubáltam anti-Hsp25 ellenanyaggal (1:1000 higításban)
11) A következő napon mosást követően 3%-os nem zsíros tejben 1:160000 arányban higított anti-nyúl másodlagos ellenanyaggal inkubáltam a membránokat szobahőmérsékleten 1 órán át
12) Ezt mosás, majd előhívás követi
13) Előhívás után a membránokat éjszakán át 4°C-on inkubáltam anti-Hsp60 ellenanyaggal (1:1000 higításban)
14) A következő napon mosást követően 3%-os nem zsíros tejben 1:160000 arányban higított anti-egér másodlagos ellenanyaggal inkubáltam a membránokat szobahőmérsékleten 1 órán át
15) Ezt mosás, majd előhívás követi

SZÉCHENYI 2020
GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

16) Előhívás után a membránokat éjszakán át 4°C-on inkubáltam anti-Hsp90 ellenanyaggal (1:1000 higításban)
17) A következő napon mosást követően 3%-os nem zsíros tejben 1:160000 arányban higított anti-egér másodlagos ellenanyaggal inkubáltam a membránokat szobahőmérsékleten 1 órán át
18) Ezt mosás, majd előhívás követi
19) Előhívás után a membránokat éjszakán át 4°C-on inkubáltam anti-GAPDH ellenanyaggal (1:20000 higításban)
20) A következő napon mosást követően 3%-os nem zsíros tejben 1:160000 arányban higított anti-nyúl másodlagos ellenanyaggal inkubáltam a membránokat szobahőmérsékleten 1 órán át
21) Ezt mosás, majd előhívás követi
22) Előhívás után a membránokat Coomassie festékkel festem, majd a membránokat szkennelem (4.sz melléklet)
23) Ezután az adatok kiértékelése és ábrázolása következett (az egyes hősokkfehérjékhez tartozó immunoreaktív band-ek felvételeit a 5.sz mellékletben mutatom be).
24) A kiértékelt adatok ábrázolása oszlopdiagrammon az 6. és 7.sz mellékletben látható

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 7/15 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: BA és PhA hatása a MEF-145 sejtek Hsp70, Hsp25, Hsp60 és Hsp90 chaperone szintjére	
Dátuma: 2017.09.18-2017.09.29	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-02-005*

Összefoglalása, eredménye:

Elvégeztük a MEF-145 sejtek BA (10 mM) és PhA (6 mM) kezelését követően a dajkafehérje szint nem specifikus modulációjának vizsgálatát western blot technikával. Mindkét vegyület hatását a membrán fluidizációjával éri el. Előzetes toxicitásvizsgálat eredményeinek figyelembevételével (KUT-JKV-LIP-117-02-002 és KUT-JKV-LIP-117-02-003 jegyzőkönyvek) állapítottuk meg a kezelési dózist. Kísérlet eredményeként megállapítható, hogy mindkét szer azonos módon inkább ko-inducer módon hat a MEF-145 sejteken, nem inducerként ahogyan azt előzőleg feltételeztük. Érdekesség továbbá, hogy a BA csak a Hsp70 és Hsp25, míg a PhA viszont az összes vizsgált hősokkfehérje szintjét emeli, hőkezeléssel kombinálva.

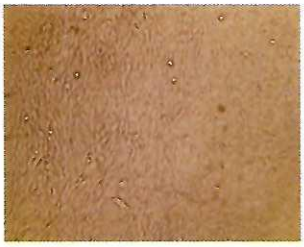
Csatolmányok felsorolása:

1.sz. melléklet - BA és PhA kezelt sejtek mikroszkópos felvételei
2.sz. melléklet - BA és PhA kezelt minták fehérjemérési eredménye
3.sz. melléklet - A BA és PhA kezelt minták gélre vitelének sorrendje
4.sz. melléklet - BA és PhA kezelt minták blottjainak Coomassie festése
5.sz. melléklet - BA és PhA kezelt minták egyes hősokkfehérjéihez tartozó immunoreaktív band-ek felvételei
6.sz. melléklet - A BA kezelt minták western blot eredménye
7.sz. melléklet - A PhA kezelt minták western blot eredménye

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

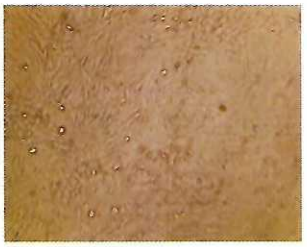
Csatolmányok



37°C, Kontroll

42°C, Kontroll

37°C, 10 mM BA



42°C, 10 mM BA

37°C, 6 mM PhA

42°C, 6 mM PhA

1.sz. melléklet. A BA és PhA kezelt sejtek mikroszkópos felvételei közvetlenül a feldolgozás előtt. Látható, hogy egyik kezelőanyag (az adott koncentrációban) sem okozott különösebb szemmel látható a sejtek alakját vagy mennyiségét érintő hatást.

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

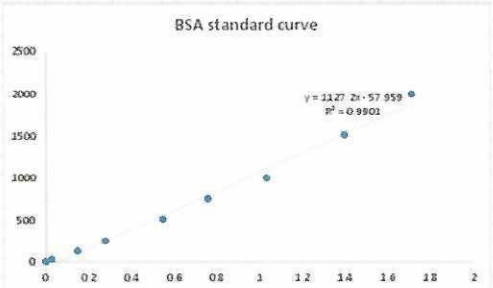
BCA fehérjemeres

M14-33 sz. minták
3 paralell

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.615	2.231	1.283	2.288	1.964	1.097	2.294	1.985	1.219	2.339	1.97	1.182
B	2.08	1.806	1.05	2.232	1.922	1.107	1.841	1.557	0.936	1.972	1.66	0.955
C	2.405	2.059	1.119	2.43	2.076	1.174	2.316	1.94	1.148	2.172	1.841	1.104
D	1.99	1.63	0.98	1.874	1.538	0.925	2.388	2.071	1.236	2.347	2.068	1.224
E	2.402	2	1.213	2.33	1.972	1.195	2.126	1.492	1.084	2.298	2.009	1.186

1.879	1.864	1.805	1.527	1.532	1.546	1.141	1.179	1.175	0.876	0.885	0.916
0.678	0.678	0.685	0.408	0.418	0.416	0.277	0.288	0.279	0.16	0.16	0.161
0.136	0.131	0.13									

	OD	OD-Blnk
2000	1.84933	1.717
1500	1.535	1.40267
1000	1.165	1.03267
750	0.89233	0.76
500	0.68033	0.548
250	0.414	0.28167
125	0.28133	0.149
25	0.16033	0.028
0	0.13233	0



slope	1127.16
intercept	-57.9593

Benzyl alcohol (calculated concentration)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2889.6	2456.7	1388.2	2521.0	2155.8	1178.5	2527.7	2179.4	1316.0	2578.5	2162.5	1274.3
B	2286.5	1977.7	1125.6	2457.9	2108.4	1169.8	2017.1	1697.0	997.1	2164.8	1813.1	1018.5

Benzyl alcohol (considered the dilutions)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2889.6	3070.9	3470.5	2521.0	2694.7	2946.3	2527.7	2724.3	3290.1	2578.5	2703.2	3185.8
B	2286.5	2472.1	2813.9	2457.9	2635.5	2974.5	2017.1	2121.3	2492.6	2164.8	2266.4	2546.2

#	µg/mL	µg/µL	norm.	8 µg-ra	30 µL ben RIPA		5 x cc			
M14	3143.64	3.14	1.42	1.964773	15.5	14.5	8			
M15	2720.67	2.72	1.23	1.70042	17.5	12.5	8	Koncentráció	1.60	µg/µL
M16	2847.38	2.85	1.29	1.779615	17.0	13.0	8	Gélre vitt:	8	µg
M17	2822.49	2.82	1.28	1.764057	17.0	13.0	8			
M18	2524.17	2.52	1.14	1.577607	19.0	11.0	8			
M19	2689.30	2.69	1.22	1.680812	18.0	12.0	8			
M20	2210.35	2.21	1.00	1.38147	21.5	8.5	8			
M21	2325.79	2.33	1.05	1.45362	20.5	9.5	8			

SZÉCHENYI 2020

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

MAGYARORSZÁG KORMÁNYA

Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

Phenethyl alcohol (calculated concentrations)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C	2652.8	2262.9	1203.3	2681.0	2282.0	1265.3	2552.5	2128.7	1236.0	2390.2	2017.1	1186.4
D	2185.1	1779.3	1046.7	2054.3	1675.6	984.7						

Phenethyl alcohol ((considered the dilutions)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C	2652.8	2828.6	3008.3	2681.0	2852.5	3163.3	2552.5	2660.9	3090.0	2390.2	2521.4	2966.1
D	2185.1	2224.1	2616.6	2054.3	2094.5	2461.6						

#	µg/mL	µg/µL	norm.	8 µg-ra számol együtthat ó	30 µL ben	RIPA	5 x cc Laemmli			
M22	2829.91	2.83	1.28	1.768695	**17.0**	**13.0**	**8**			
M23	2898.95	2.90	1.32	1.811844	**16.5**	**13.5**	**8**	Koncentráció	1.60	µg/µL
M24	2767.82	2.77	1.26	1.729891	**17.5**	**12.5**	**8**	Gélre vitt:	**8**	µg
M25	2625.9	2.63	1.19	1.641186	**18.5**	**11.5**	**8**			
M26	2341.95	2.34	1.06	1.463717	**20.5**	**9.5**	**8**			
M27	2203.5	2.20	1.00	1.377185	**22.0**	**8.0**	**8**			

2.sz. melléklet - BA és PhA kezelt minták fehérjemérési eredménye. Feljebb BA alul pedig a PhA-lal kezelt minták eredményei láthatóak. A beállított összfehérje koncentráció 1.6 µg/µL, ami mintánként 8 µg gélre vitt összfehérje mennyiséget jelent. A koncentrációkat a standard egyenes alapján számoltam ki.

SZÉCHENYI 2020

GINOP-2.3.4-15-2016-00002

A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

MAGYARORSZÁG KORMÁNYA

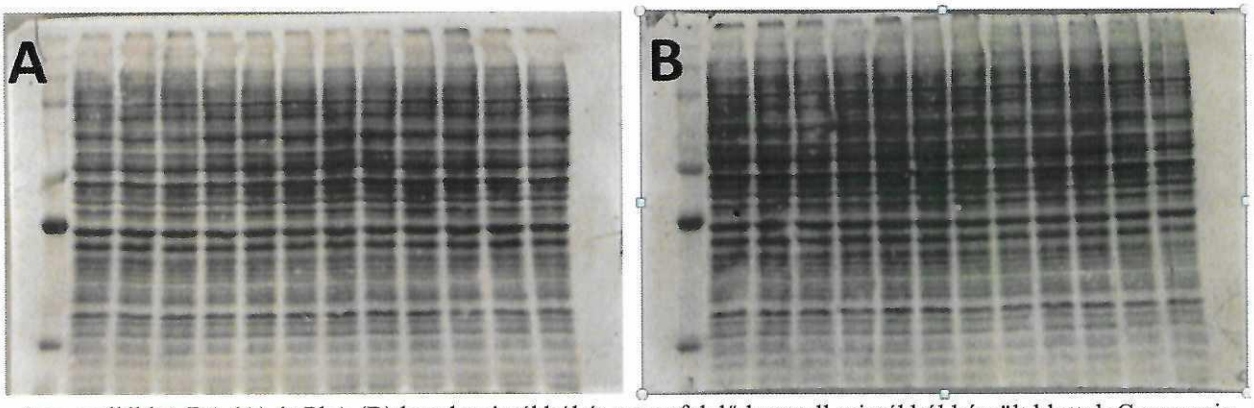
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap

BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

Mintaszám / csésze felirat	hőfok	kezelés
M14	37°C	Kontroll
M15	42°C	Kontroll
M20	37°C	Benzyl alcohol 10mM
M21	42°C	Benzyl alcohol 10mM
M26	37°C	Phenethyl alcohol 6mM
M27	42°C	Phenethyl alcohol 6mM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
"A" gél	mintapuffer	marker	*M14*	*M15*	*M20*	*M21*	*M14*	M15	M20	M21	M14	*M15*	*M20*	*M21*	mintapuffer
"B" gél	mintapuffer	marker	*M14*	*M15*	*M26*	*M27*	*M14*	*M15*	*M26*	*M27*	*M14*	*M15*	*M26*	*M27*	mintapuffer

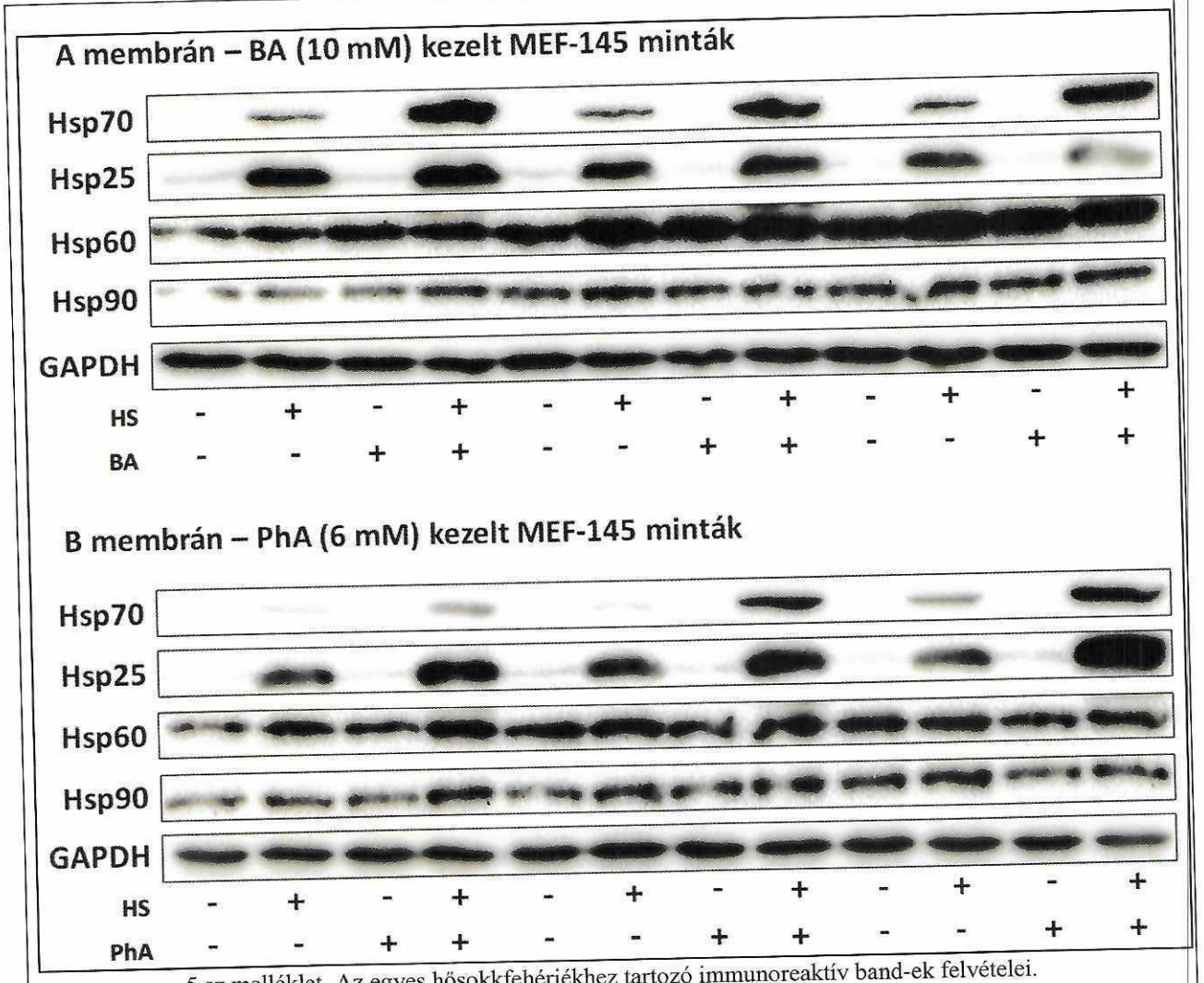
3.sz. melléklet. A BA és PhA kezelt minták gélre vitelének sorrendje 3 technikai párhuzamban



4.sz. melléklet. BA (A) és PhA (B) kezelt mintákból és a megfelelő kontroll mintákból készült blottok Coomassie festéséről készült felvételek

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

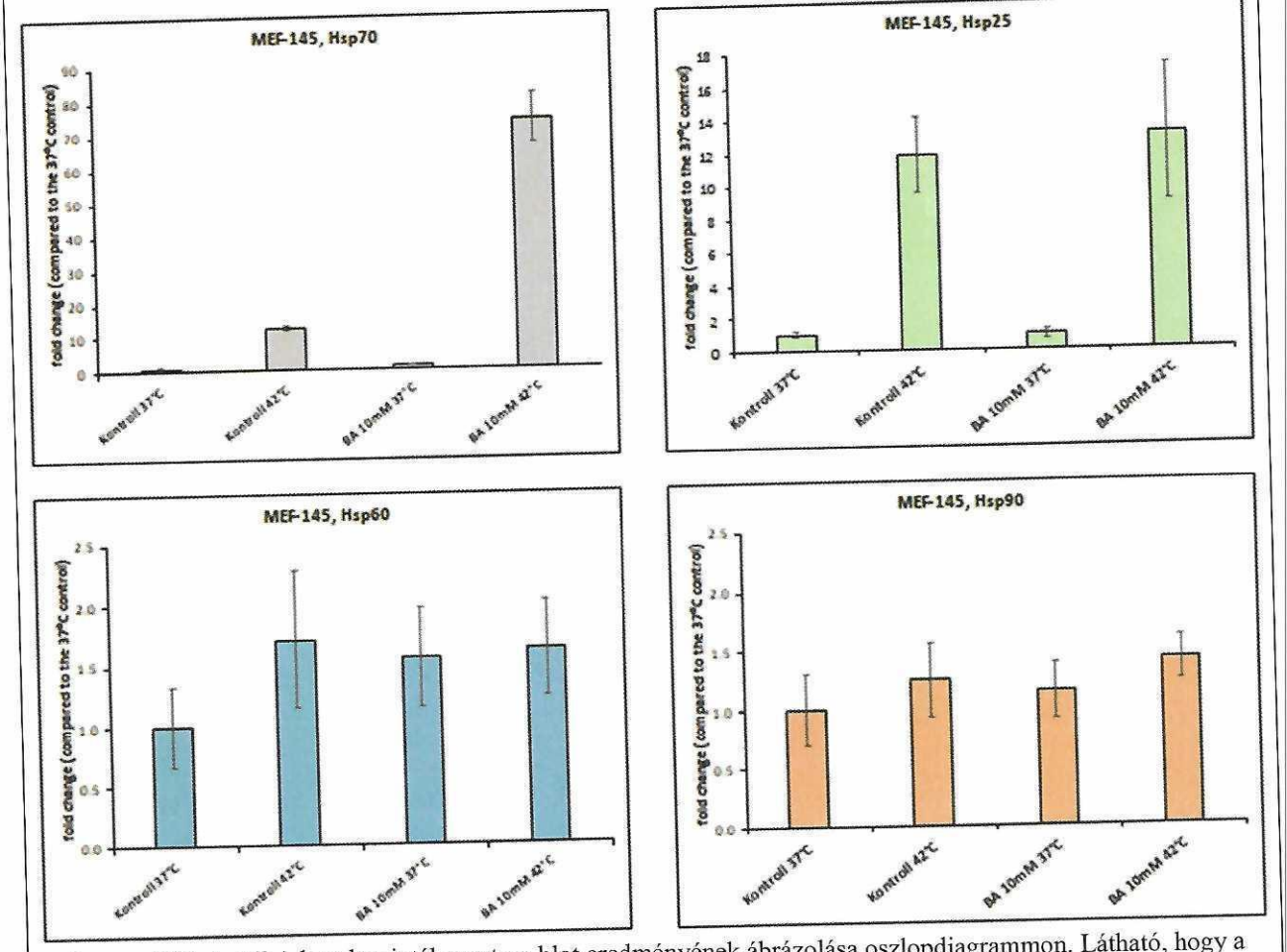
SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE



5.sz melléklet. Az egyes hősokkfehérjékhez tartozó immunoreaktív band-ek felvételei.

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

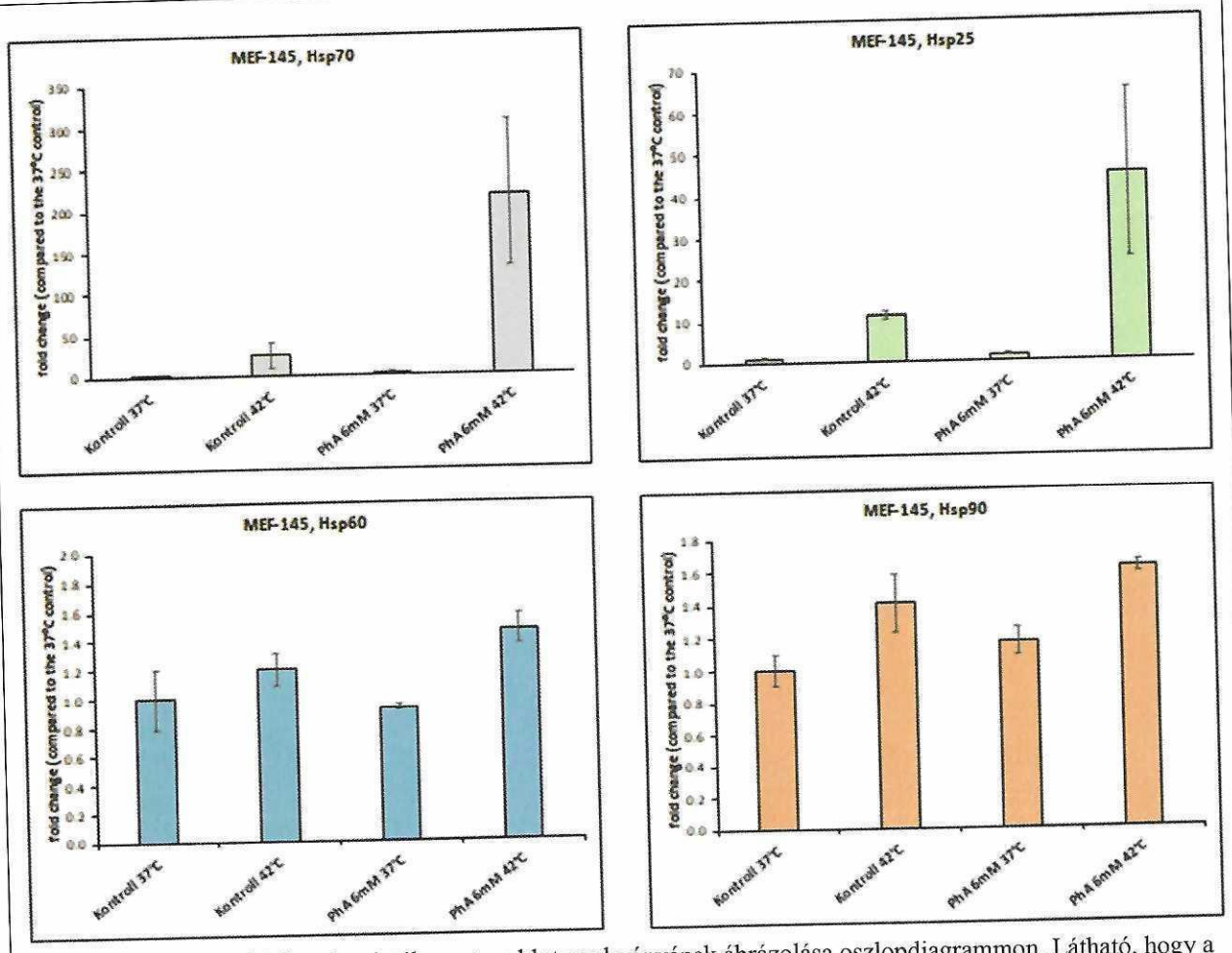
SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE



6.sz. melléklet. A BA kezelt minták western blot eredményének ábrázolása oszlopdiagrammon. Látható, hogy a Hsp60 és Hsp90 szintje BA-kezelés hatására nem változott jelentősen. Meglepő módon e sejtvonalon a BA ko-inducerként viselkedett, legalábbis a Hsp70 szint alakulását tekintve. A Hsp25 expressziót lényegében a hőkezeléshez képest a BA kezelés nem változtatja

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE



7.sz. melléklet. A PhA kezelt minták western blot eredményének ábrázolása oszlopdiagrammon. Látható, hogy a PhA-kezelés mind a négy chaperon család esetén ko-indukciót mutat. A Hsp70 és Hsp25 szint pedig igen markánsan változott PhA kezelés hatására a 42°C-os hőkezelt mintákhoz képest is.

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 15/15 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.2. Részfeladat: Jellemzett csirke/emlős sejtvonalakon a dajkafehérje szint nem specifikus (BA) ill. specifikus (ko-induktor kismolekulák) modulációja membrán perturbáló kezeléssel, stressz-jel képző és jelátviteli folyamatok célzott aktiválásával *Alcím*: BA és PhA hatása a MEF-145 sejtek Hsp70, Hsp25, Hsp60 és Hsp90 chaperone szintjére	
Dátuma: 2017.09.18-2017.09.29	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-02-005*

Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor	***Kiadásért felel: Dr. Hunya Ákos Gábor***

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

DEBRECENI EGYETEM

ÁTADÁS – ÁTVÉTELI JEGYZŐKÖNYV

Átadás - átvételi jegyzőkönyv projektkódja: 112				
Átadott tétel neve	**Azonosító**	**Mennyisége**	**Szállítási köv.**	**Tárolás köv.**
CSEVES p13 (Immortalizált madár eredetű sejtvonal)	CSEVES p13	2 darab T25-ös flaska	Szobahőmérséklet	37 °C-os CO_2 inkubátor

Átadás ideje (dátum, időpont): 2017.10. 19. **Átadás szállításra:** -	**Átadó cég:** Debreceni Egyetem Anton Pál (kutatási asszisztens)
Átvétel ideje (dátum, időpont): 2017.10. 19.	**Átvevő cég:** LipidArt Kft. Dr. Hunya Ákos (tudományos munkatárs)
Szállító neve és kézjegye: -	**Megjegyzés:** A sejtek hungarocell dobozba zárva lettek szállítva.

Készült: 2 példányban

..... átadó aláírása

..... átvevő aláírása

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

DEBRECENI EGYETEM

DEBRECENI EGYETEM	Azonosító kód: *KUT-TERV-LIP-117-01v02*	Oldal: 1/5

KUTATÁSI TERV

Cím:	***A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott CSEVES immortalizált csirke vesehám sejtvonalon történő jellemzése***
Hivatkozás:	-

Készítette:	Dátum:	Aláírás:
Dr. Hunya Ákos Gábor	*2017.10.18.*	

Mellékletek:	-

MEGJEGYZÉSEK/INTÉZKEDÉSEK:

A kutatási terv jóváhagyása Dátum: 2017.10.18..	Jóváhagyó neve/aláírása Dr. Török Zsolt/ ügyvezető LipidArt Kft. LipidArt Kutató Fejlesztő és Tanácsadó Kft. 6726 Szeged, Temesvári krt. 62. Adószám: 13984779-2-06

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

DEBRECENI EGYETEM

1. A MEGBÍZÓ, A MEGBÍZOTT ÉS A KUTATÓHELY(EK) ADATAI

1.1. Megbízó neve	*DEBRECENI EGYETEM*
1.2. Megbízó címe, telefon, telefax	4032 Debrecen, Egyetem tér 1. Tel: +36 52 512 900 Fax: +36 52 512-965
1.3. Megbízott neve	LipidArt Kft.
1.4. Megbízott címe, telefon, telefax	6726 Szeged, Temesvári krt.62. Tel: +36 62 432038 Fax: +36-62-432048
1.5. Témafelelős (megbízó részéről)	Dr. Prépost Eszter
1.6. A témafelelős (megbízó részéről) nyilatkozata	Nyilatkozom, miszerint felelősséggel tartozom az elvégzett tevékenység jelen kutatási tervek megfelelő lefolytatását illetően. Dátum: 2017.10.18. .Aláírás:.....
1.7. A megbízásra vonatkozó dokumentum(ok) megnevezése	300086971-es nyilvántartási számú vállalkozási szerződés
1.8. Kutatást végző intézmény neve	*LIPIDART KUTATÓ FEJLESZTŐ ÉS TANÁCSADÓ KFT.*
1.9. Kutatást végző intézmény címe, telefon, telefax	6726 Szeged, Temesvári krt. 62. Tel: +36 62 432038 Fax: +36-62-432048
1.10. A kutatásba bevont egyéb intézmény(ek)/ alvállalkozó megnevezése	-
1.11. Témafelelős (megbízott részéről)	Dr. Török Zsolt
1.12. Témafelelős (megbízó részéről) nyilatkozata	Nyilatkozom, miszerint felelősséggel tartozom az elvégzett tevékenység jelen kutatási tervek megfelelő lefolytatását illetően. Dátum: 2017.10.18..Aláírás:.....

2. A KUTATÁS AZONOSÍTÁSA

2.1. Leíró cím	A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott CSEVES immortalizált csirke vesehám sejtvonalon történő jellemzése
2.2. A kutatás célja, elvárt eredményei A vizsgált sejtvonal dajkafehérje expresszió gén és fehérje szintű dokumentációja	
2.3. A kutatás egyedi azonosítója	KUT-TERV-LIP-117-01v02
2.4. A kutatás tervezett kezdési időpontja	2017.10.19.
2.5. A kutatás tervezett befejezési időpontja	2018.04.01.

3. A KUTATÁS KIVITELEZÉSÉNEK/VÉGREHAJTÁSÁNAK LEÍRÁSA

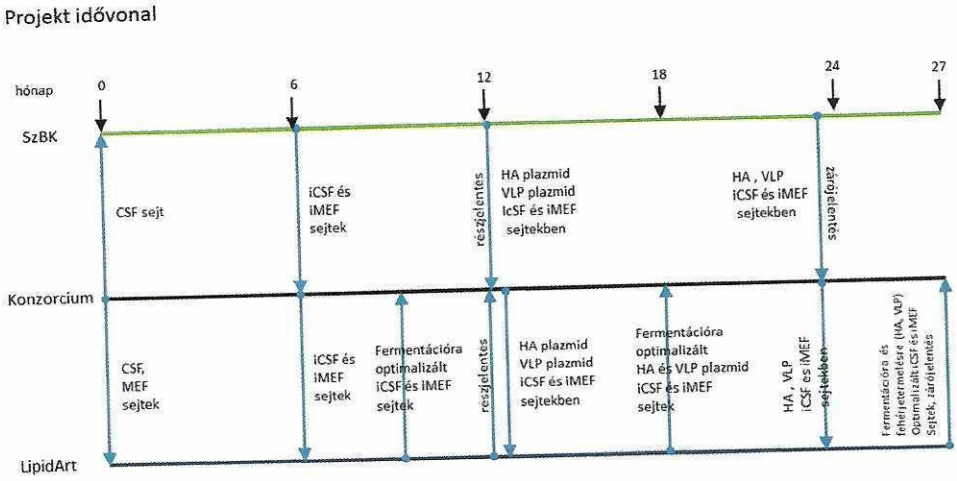
3.1. A kutatás végzésének helye, minősítése, felszereltsége	A LipidArt Kft. laboratóriumai az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpontban

3.2. A kutatás részfolyamatainak/lépéseinek/feladatainak meghatározása, felsorolása és várható eredménye

1. **Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez**
   1.1. **Részfeladat**: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott CSEVES immortalizált csirke vesehám sejtvonalon történő jellemzése.

   Eredmény: A vizsgált CSEVES sejtvonal dajkafehérje expresszió gén és fehérjeszintű dokumentációja (részletes kutatási jegyzőkönyvek).

3.3. A kutatás végrehajtásának ütemterve/folyamatábra



iCSF, iMEF: immortalizált sejtvonalak

3.4. A kutatási folyamat során tervezett vizsgálati módszerek

- sejttenyésztés
- mikroszkópia
- sejthomogenizálás
- poliakrilamid gélelektroforézis
- western blot

3.5. Felhasználásra kerülő szakirodalom, külső szabályozó dokumentum(ok) megnevezése, védett/nem védett eljárások/anyagok használata

-

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

3.6. A feladatokban résztvevő személyek neve, pozíciója	Dr. Horváth Ibolya, vezető kutató Dr. Hunya Ákos Gábor, tudományos munkatárs Dr. Pilbat Ana Maria, tudományos munkatárs Bogdán Istvánné, technikus, laborasszisztens
3.7. A tervezett felhasználásra kerülő anyagok/reagensek felsorolása	• Sejtkultúra reagensek • Molekuláris biológiai reagensek • Biokémiai reagensek
3.8. A tervezett felhasználásra kerülő gépek és berendezések felsorolása	• steril lamináris sejttenyésztő fülke • CO_2 inkubátor • invert, fázis kontraszt fénymikroszkóp • Mini-PROTEAN Tetra Cell gél ELFO rendszer • nedves blottoló rendszer • géldokumentációs képalkotó rendszer
3.9. Egyéb feltételek felsorolása	-

4. A KUTATÁS RÉSZFOLYAMATAINAK RÉSZLETES LEÍRÁSA

1.1. A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott CSEVES immortalizált csirke vesehám sejtvonalon sejtvonalon történő jellemzése

A hőkezelés hatásának meghatározása a fő dajkafehérje osztályok (Hsp90, Hsp70, HSP60, HSP27) mennyiségére a különböző sejtvonalakon.

A megbízó által rendelkezésre bocsátott sejtvonalakat 37°C-on, párás környezetben, 5% CO2–ot tartalmazó termosztátban a sejtvonalakhoz a megbízó által ajánlott kezdő összetételű médiumban tenyésztjük. A hősokk kezelésekhez a Petri csészéket Parafilmmel lezárjuk, és a megfelelő hőmérsékletre (± 0.1°C) beállított vízfürdőbe helyezzük őket. A hősokk fehérjék (Hsp90, Hsp70, HSP60, HSP27), mennyiségének jellemzésére Western blot technikát alkalmazunk. A feldolgozásra váró sejteket 2 x Laemli SDS minta pufferben tárjuk fel intenzív keveréssel és 5 perces forralással. A lizátumokban meghatároztuk az összfehérje koncentrációt (RC DC Protein Assay, BioRad). A mintákból azonos összefehérje mennyiségeket futtatunk meg SDS-poliakrilamid gélen, majd a fehérjéket PVDF membránra (0,45 µm, Pierce) visszük át. Anti-Hsp ellenahyagokkal (elsődleges, és torma-peroxidáz konjugált anti-egér (Sigma) másodlagos antitesttel jelöljük és a létrejött immunkomplexet a kemilumineszcens detekciós módszerrel (Pierce) géldokumentációs képalkotással rögzítjük, majd képelemzés segítségével elvégezzük a minták mennyiségi analízisét. Meghatározzuk a hőkezelés hatását a fő dajkafehérje osztályok mennyiségére a különböző sejtvonalakon. Az eredményeket jegyzőkönyvben rögzítjük.

DEBRECENI EGYETEM

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 1/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* CSEVES immortalizált csirke vesehám sejtek mikoplazma tesztje	
Dátuma: 2017.10.19.	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-01-009*

A művelet végzésének helye

A LipidArt Kft. kutatólaboratóriuma, 6726 Szeged, Temesvári krt. 62.

A műveletet végző személyek

	Beosztás K/T	**Aláírás**
Dr. Horváth Ibolya, vezető kutató	Vezető kutató	
Dr. Hunya Ákos Gábor	Tudományos munkatárs	
Dr. Pilbat Ana Maria	Tudományos munkatárs	
Bogdán Istvánné	Laborasszisztens	

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 2/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése	
Alcím: CSEVES immortalizált csirke vesehám sejtek mikoplazma tesztje	
Dátuma: 2017.10.19.	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-01-009*

Célja és rövid leírása:

Cél: Annak kiderítése, hogy a Megbízó által rendelkezésünkre bocsátott CSEVES immortalizált csirke vesehám sejtvonal fertőzött-e mikoplazmával.

Leírás: A LipidArt Kft. laboratóriumának biztonsági protokollja alapján egy újonnan beérkező sejtet minden esetben rögtön karanténba kell helyezni, bizonyos kontamináció (pl. Mikoplazma fertőzés) elkerülése érdekében. A sejtnek mindaddig elkülönítő (karantén) inkubátorban kell maradnia, amíg be nem bizonyosodik, hogy mikoplazma negatív. A tesztet biolumineszcens elven működő MicoAlert® Mycoplasma Detection (LONZA; LT07-218) kit segítségével végeztem el. A mérést lumineszcencia detekcióra alkalmas plate-readerrel végeztem, az adatokat LibreOffice Calc 5.4.2.2 táblázatkezelő szoftverrel értékeltem ki.

SZÉCHENYI 2020

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

MAGYARORSZÁG KORMÁNYA

Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap

BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

Felhasznált anyagok

Anyag neve	Gyártó	Gyártási szám v. azonosító	Steril-e? x	Lejárati idő
MycoAlert MicoAlert® Mycoplasma Detection Kit	LONZA	LT07-218		2018.01.
15 mL-es centrifuga cső	DeltaLab	22,429920	x	2020.02.
Fehér, nem áttetsző, kerek aljú, 96-lyukú mikroplate	Costar	3789		2019.11.
1,5 mL-es mikrocentrifuga cső	Greiner Bio-One	616-201	x	2020.02.
1 mL-es műanyag pipettahegy	Greiner Bio-One	740290	x	2020.02.

Felhasznált gépek, berendezések, mérőeszközök

Berendezés neve	Azonosító	Ellenőrzés Kvalifikált/kalibrált-e: x, kvalifikálási azonosító
Steril fülke	ADS Laminaire BIO II. 12	x, 025/MTA:20-1801-3034
37°C-os CO_2 inkubátor	Jouan LC	N/A
Fluoreszcens/lumineszcens mikroplate olvasó (reader)	Thermo Scientific FluoScan Ascent FL	N/A
Keverő-vortex	Vortex-Genie 2	N/A
20-200µL-es manuális pipetta	Biohit ProLine	N/A

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 4/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése	
Alcím: CSEVES immortalizált csirke vesehám sejtek mikoplazma tesztje	
Dátuma: 2017.10.19.	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-01-009*

Előzmények:

KUT-AJK-LIP-117-01-002 - CSEVES sejtek átadási jegyzőkönyve

Lépések (névvel,szignóval):
Készítette Dr. Hunya Ákos Gábor

A mikoplazma tesztet a gyártói protokoll instrukciói alapján végeztem (LONZA MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit; LT07-218) . Lépései:

1) A kit összes komponensét szobahőmérsékletre hagytam melegedni használat előtt
2) 600 µL MycoAlert Assay puffer-t mértem a liofilizált MycoAlert Reagent-et tartalmazó fiolába, majd vortexeltem, míg teljesen fel nem oldódott
3) 600 µL MycoAlert Assay puffer-t mértem a liofilizált MycoAlert Substrate-ot tartalmazó fiolába, majd vortexeltem, míg teljesen fel nem oldódott
4) 15 percig szobahőn állni hagytam őket
5) a MEF-145 sejtekről steril fülke alatt eltávolítottam 2-2 mL felülúszót mindkét T-75-ös flaskáról (fontos, hogy a sejtek már legalább 24 órája ebben a tápoldatban voltak)
6) a begyűjtött felülúszókat 15 mL-es centrifugacsőbe pipettáztam
7) lecentrifugáltam 1500 rpm-en (200 *x g*), 5 percig
8) a tiszta felülúszóból 200 µL-t 1,5 mL-es mikrocentrifuga csövekbe pipettáztam
9) a csövekből 100-100 µL-t fehér luminecszcens 96-lyukú platekbe pipettáztam, a pozitív és a negatív kontrollokkal együtt
10) a lumineszcens plate-readert 1s integrated reading-re állítottam, majd lemértem az összes minta lumineszcenciáját (*Blank*)
11) ezután az egyes mintákra 100 µL MycoAlert Reagent-et pipettáztam, a plate-t rázattam 1 percig, majd 4 percig sötétben inkubáltam, az inkubáció letelte után lemértem a minták lumuneszcenciáját (*Reading A*)
12) a mintákra 100 µL MycoAlert Substrate-ot pipettáztam, majd szintén 1 percig rázattam a plate-t, melyet 9 perc sötét inkubáció követett. Ezután mértem a minták lumineszcenciáját (*Reading B*)
13) Kiértékelésnél (LibreOffice Calc 5.4.2.2 szoftver) először az összes mért adatból levontam a Blank értékeket, majd a Reading B értékeket elosztottam a Reading A értékekkel (ReadigB/ReadingA)
14) A sejtek mikoplazma negatívnak tekinthetők, ha a ReadigB/ReadingA 1-nél kisebb

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 5/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése	
Alcím: CSEVES immortalizált csirke vesehám sejtek mikoplazma tesztje	
Dátuma: 2017.10.19.	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-01-009*

Összefoglalása, eredménye:

A CSEVES immortalizált csirke vesehám sejtek a vizsgálat eredményei (1.sz. melléklet) alapján mikoplazma fertőzés mentesnek bizonyultak, így nincs szükség további kezelésre, antibiotikumos beavatkozásra. A 2 db. T-25-ös flaska kikerülhet a karanténból, a kísérletek biztonságosan folyhatnak.

Csatolmányok felsorolása:
1.sz. melléklet - CSEVES sejtek mikoplazma tesztjének eredménye

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

Csatolmányok

2017.10.19-én a Debreceni Egyetemtől érkezett CSEVES (csirke vesehám sejtek) mikoplazma tesztje

	Neg. ctrl.	CSEVES (1)	CSEVES (2)	Pos. ctrl.
0'	0	0.0004	0.0001	0.0002
5'	0.0028	0.0015	0.0015	0.0022
10'	0.0003	0.0006	0.0002	0.0512
baseline corrected				
A (5')	0.0028	0.0011	0.0014	0.002
B (10')	0.0003	0.0002	0.0001	0.051
res (B/A)	**0.1**	**0.2**	**0.1**	**25.5**

1.sz. melléklet. CSEVES sejtek mikoplazma tesztjének eredménye. Ha a B/A érték <1, akkor a sejtek negatívak.
Jelmagyarázat: **0'** = Blank; **5'** = Reading A; **10'** = Reading B

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 7/7 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* CSEVES immortalizált csirke vesehám sejtek mikoplazma tesztje	
Dátuma: 2017.10.19.	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-01-009*

Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor	***Kiadásért felel: Dr. Hunya Ákos Gábor***

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

DEBRECENI EGYETEM

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 1/8 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* CSEVES immortalizált csirke vesehám sejtek fenotipusos vizsgálata fénymikroszkóp segítségével.	
Dátuma: 2017.10.23.	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-01-010*

A művelet végzésének helye

A LipidArt Kft. kutatólaboratóriuma, 6726 Szeged, Temesvári krt. 62.

A műveletet végző személyek

	Beosztás K/T	**Aláírás**
Dr. Horváth Ibolya, vezető kutató	Vezető kutató	
Dr. Hunya Ákos Gábor	Tudományos munkatárs	
Dr. Pilbat Ana Maria	Tudományos munkatárs	Pilbat Ana Maria
Bogdán Istvánné	Laborasszisztens	Bogdán Istvánné

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 2/8 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése	
Alcím: CSEVES immortalizált csirke vesehám sejtek fenotipusos vizsgálata fénymikroszkóp segítségével.	
Dátuma: 2017.10.23.	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-01-010*

Célja és rövid leírása:

Cél: CSEVES immortalizált csirke vesehám sejtvonal morfológiai és sejtsűrűség vizsgálata fénymikroszkóp segítségével.

Leírás: A Debreceni Egyetem által rendelkezésünkre bocsátott CSEVES sejtvonalat vizsgáltuk alak, sejtméret, nyúlványozottság mértéke, valamint körülbelüli sejtsűrűség szempontjából fénymikroszkóp alatt.

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

Felhasznált anyagok

Anyag neve	Gyártó	Gyártási szám v. azonosító	Steril-e? x	Lejárati idő
-	-	-	-	-

Felhasznált gépek, berendezések, mérőeszközök

Berendezés neve	Azonosító	Ellenőrzés Kvalifikált/kalibrált-e: x, kvalifikálási azonosító
XD-2 invert fázis kontraszt sejtbiológiai mikroszkóp	1218364	-
CCD kamera	N/A	-

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 4/8 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése	
Alcím: CSEVES immortalizált csirke vesehám sejtek fenotipusos vizsgálata fénymikroszkóp segítségével.	
Dátuma: 2017.10.23.	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-01-010*

Előzmények:
KUT-AJK-LIP-117-01-002 - jegyzokonyv a 2017.10.19-én érkezett CSEVES immortalizált csirke vesehám sejtekről

Lépések (névvel,szignóval):
Készítette Dr. Hunya Ákos Gábor

1) A sejteket tartalmazó T-25-ös flaskákat az inkubátorból kivettük
2) A flaskákat egyenként a mikroszkóp tárgyasztalára helyeztük
3) Mikroszkóp alatt vizsgáltuk 10-es (100x nagyítás) (lásd 1. melléklet)
4) Felvételeket készítettünk a mikroszkóppal összekapcsolt CCD kamerával
5) Passzálások alkalmával és után a sejteket különböző időközönként újra vizsgáltuk, különböző sejtsűrűségű állapotban (lásd 2-3. mellékletek)

Összefoglalása, eredménye:

A CSEVES immortalizált csirke vesehám sejtek 2db T-25-ös vent cup flaskában (parafilmmel szigetelve). A sejtek kb 40-50%-ig konfluensek, passzázs számuk 13 volt. Ez a sejtvonal nem tartalmaz semmilyen genetikai módosítást, a kísérlesorozat kontroll objektumát képviseli. A sejtek fibroblaszt jellegű morfológiát mutatnak, azonban a MEF-145 sejtekhez képest a CSEVES sejtek zöme inkább hosszú tűszerű nyúlványokat növeszt.

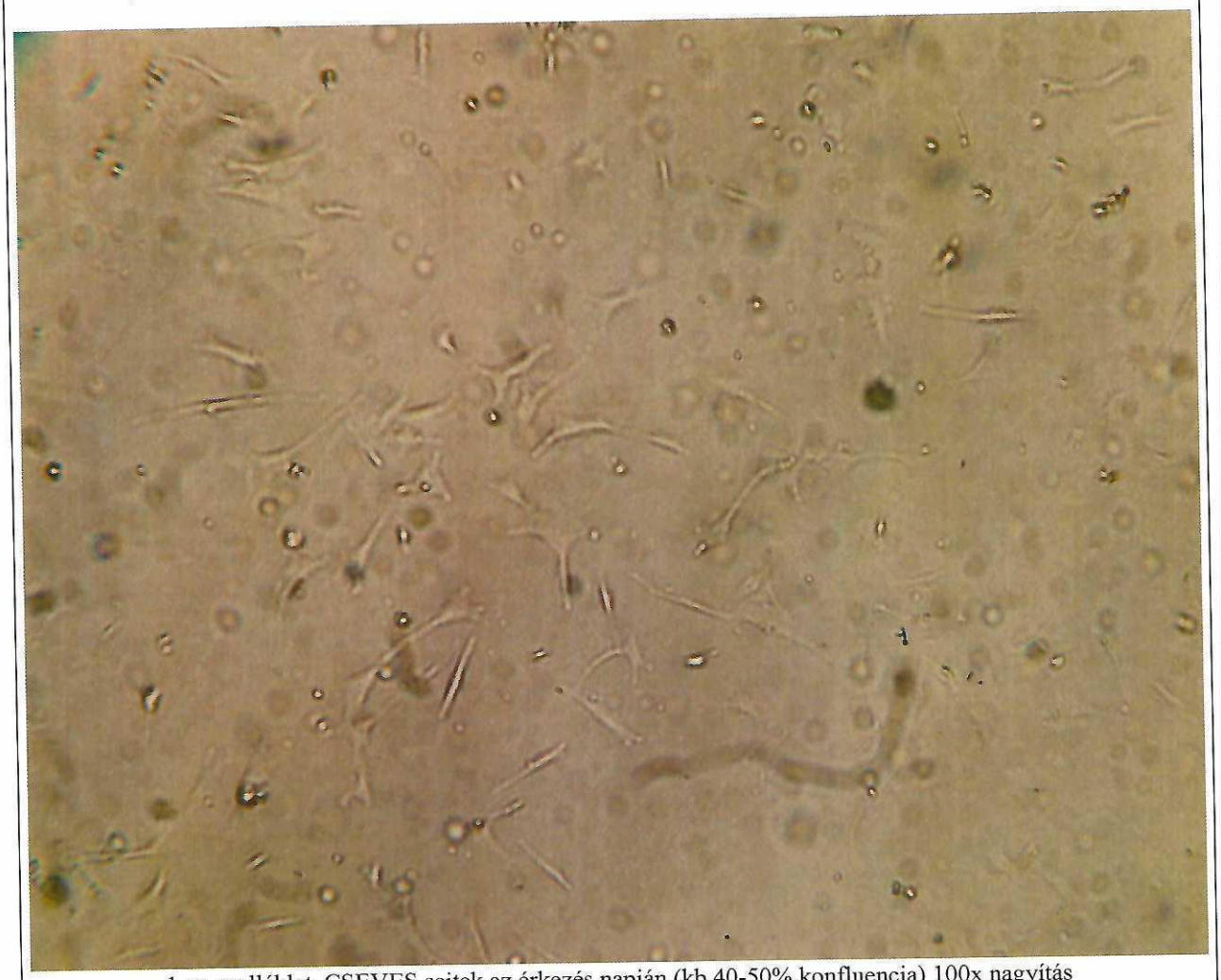
Csatolmányok felsorolása:

1.sz. melléklet - CSEVES sejtek az érkezés napján
2.sz. melléklet - CSEVES sejtek kb.50-60% konfluenciával
3.sz. melléklet. CSEVES sejtek közvetlenül passzálás után

SZÉCHENYI 2020
GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 5/8 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* CSEVES immortalizált csirke vesehám sejtek fenotipusos vizsgálata fénymikroszkóp segítségével.	
Dátuma: 2017.10.23.	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-01-010*

Csatolmányok



1.sz. melléklet. CSEVES sejtek az érkezés napján (kb.40-50% konfluencia) 100x nagyítás

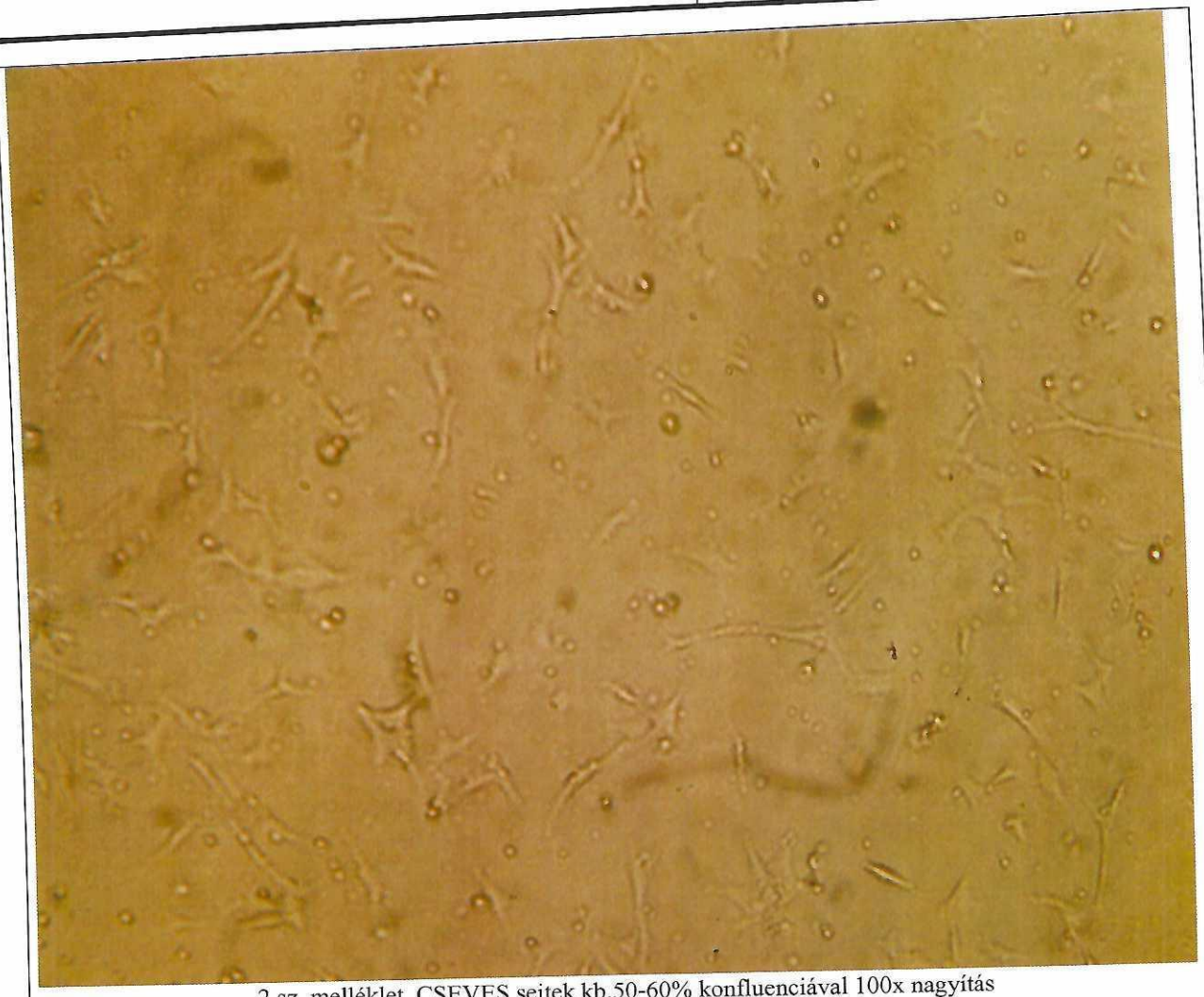
SZÉCHENYI 2020

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

MAGYARORSZÁG KORMÁNYA

Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 6/8 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése	
Alcím: CSEVES immortalizált csirke vesehám sejtek fenotipusos vizsgálata fénymikroszkóp segítségével.	
Dátuma: 2017.10.23.	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-01-010*



2.sz. melléklet. CSEVES sejtek kb.50-60% konfluenciával 100x nagyítás

SZÉCHENYI 2020

GINOP-2.3.4-15-2016-00002

A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

MAGYARORSZÁG KORMÁNYA

Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap

BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

3.sz. melléklet. CSEVES sejtek közvetlenül passzálás után

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 8/8 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* CSEVES immortalizált csirke vesehám sejtek fenotipusos vizsgálata fénymikroszkóp segítségével.	
Dátuma: 2017.10.23.	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-01-010*

Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor	***Kiadásért felel: Dr. Hunya Ákos Gábor***

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

DEBRECENI EGYETEM

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 1/6 Üzleti titok
Tárgy: . Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* CSEVES csirke vesehám sejtvonal fenntartása, passzálása	
Dátuma: 2017.10.27.	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-01-011*

A művelet végzésének helye

A LipidArt Kft. kutatólaboratóriuma, 6726 Szeged, Temesvári krt. 62.

A műveletet végző személyek

	Beosztás K/T	**Aláírás**
Dr. Horváth Ibolya, vezető kutató	Vezető kutató	
Dr. Hunya Ákos Gábor	Tudományos munkatárs	
Dr. Pilbat Ana Maria	Tudományos munkatárs	
Bogdán Istvánné	Laborasszisztens	

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 2/6 Üzleti titok
Tárgy: . Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* CSEVES csirke vesehám sejtvonal fenntartása, passzálása	
Dátuma: 2017.10.27.	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-01-011*

Célja és rövid leírása:

Cél: A CSEVES sejtvonal fenntartása, passzálása

Leírás: A Debreceni Egyetemtő kapott immortalizált csirke vesehám sejtek tenyésztése optimális körülmények között, megfelelő technikával, megfelelő tápoldatban, valamint kísérletekhez történő előkészítése

Felhasznált anyagok

Anyag neve	Gyártó	Gyártási szám v. azonosító	Steril-e? x	Lejárati idő
DMEM high glucose	Biowest	P0103-N50L	x	2020.02.
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco	1027-106	x	2019.12.
L-Glutamine	Sigma	G5792-1KG	x	2020.03.
Penicillin-Streptomycin solution	Sigma	P4333-100ML	x	2021.01
10 cm-es műanyag Petri csésze	VWR	734-2321	x	2020.06.03.
10 mL-es üveg szerológiai pipetta	N/A	N/A	x	N/A
5 mL-es üveg szerológiai pipetta	N/A	N/A	x	N/A
Üveg Pasteur pipetta (2 mL)	N/A	N/A	x	N/A
Trypsin-EDTA solution	Lonza	BE17-161E	x	2020.05
PBS	N/A	N/A	x	N/A

Felhasznált gépek, berendezések, mérőeszközök

Berendezés neve	Azonosító	Ellenőrzés Kvalifikált/kalibrált-e: x, kvalifikálási azonosító
Steril fülke	ADS Laminaire BIO II. 12	x, 025/MTA:20-1801-3034
37°C-os CO_2 inkubátor	Jouan IG-150	N/A
Pipettor	Drummond PipettAid XL	N/A
OLYMPUS fázis kontraszt fénymikroszkóp	OLYMPUS CK30	N/A
Vízlégszivattyú	N/A	N/A

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 4/6 Üzleti titok
Tárgy: . Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* CSEVES csirke vesehám sejtvonal fenntartása, passzálása	
Dátuma: 2017.10.27.	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-01-011*

Előzmények:
KUT-AJK-LIP-117-01-002 a 2017.10.19-én érkezett MEF-145 sejtekről

Lépések (névvel,szignóval):
Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor

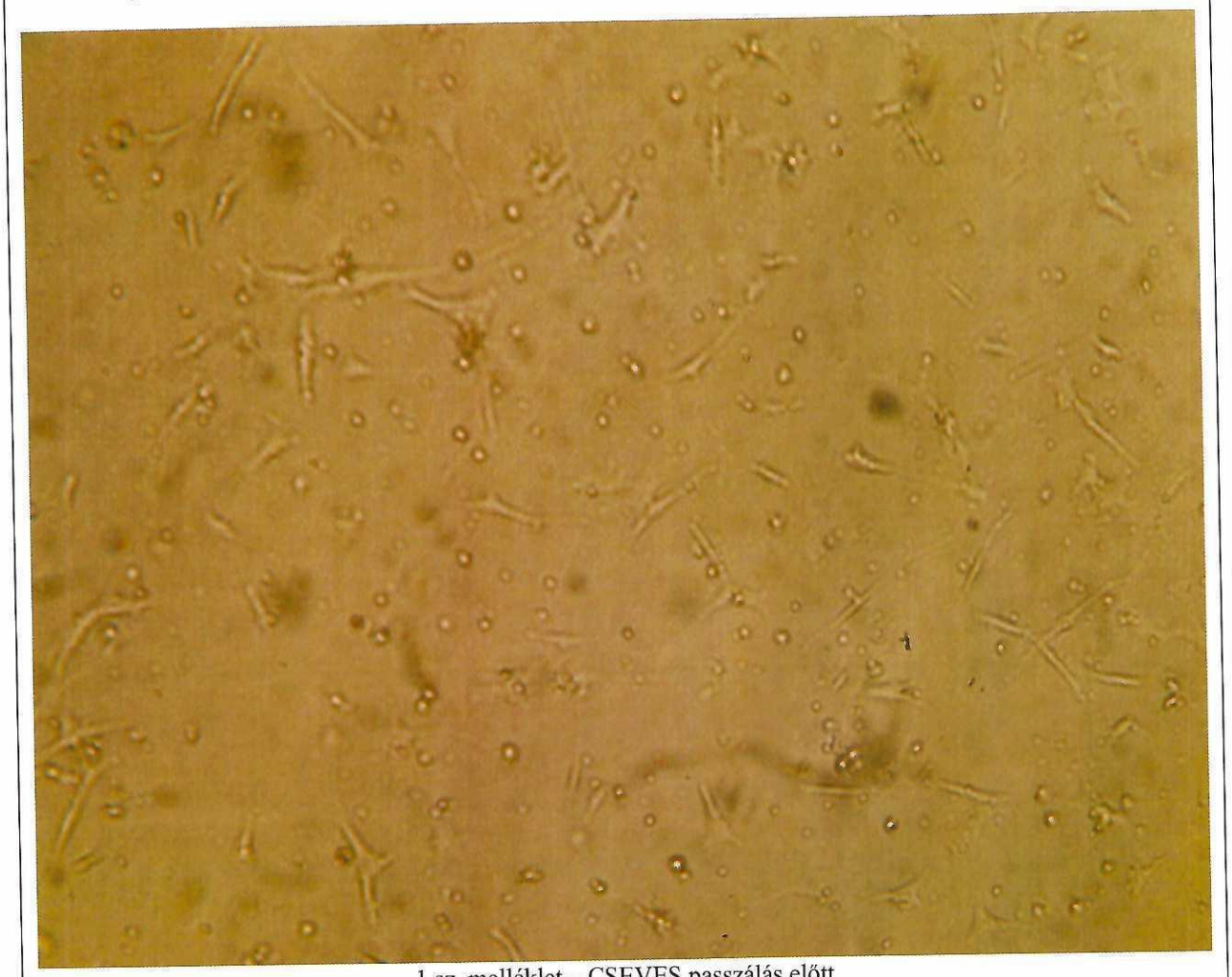
1) A MEF-145 sejtekről (2 db T-25-ös flaska, passzázs száma: 13) eltávolítjuk az elhasznált tenyésztő tápoldatot
2) a sejteket 5-5 mL steril PBS-sel mossuk
3) a MEF-145 sejtekre 2 mL Trypsin-EDTA oldatot mérek, majd 2 percre 37°C-os CO_2 inkubátorba helyezzük őket
4) a 2 perc inkubációs idő letelte után vízlégszivattyú vákuumához csatlakoztatott Pasteur pipettával óvatosan leszívjuk a Trypsin-EDTA oldatot
5) üvegpipettával alaposan felszuszpendáljuk a sejteket, 10 mL friss CSEV (MEM with Hank's balanced salt + 10% FBS + 1 x-es Penicillin-Streptomycin + 5µg/mL Puromycin) tápoldattal
6) ebből a szuszpenzióból osztunk, új steril 10 cm-es csészékbe 1:2 arányban. Az A MEF-145 sejtek így elérték a 14. passzázst.

Összefoglalása, eredménye:

A MEF-145 sejteket a 2 db. T-25-ös flaskából 4 db. 10-cm-es sejttenyésztő Petri csészébe osztottam. A sejtek passzázs száma így elérte a 14-et.

Csatolmányok felsorolása:
1.sz. melléklet – CSEVES passzálás előtt

Csatolmányok



1.sz. melléklet – CSEVES passzálás előtt

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 6/6 Üzleti titok
Tárgy: . Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése	
Alcím: CSEVES csirke vesehám sejtvonal fenntartása, passzálása	
Dátuma: 2017.10.27.	*Azonosító:KUT-JKV-LIP-117-01-011*

Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor	***Kiadásért felel: Dr. Hunya Ákos Gábor***

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

DEBRECENI EGYETEM

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 1/6 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* CSEVES csirke vesehám sejtvonal fagyasztása	
Dátuma: 2017.11.03.	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-01-012*

A művelet végzésének helye

A LipidArt Kft. kutatólaboratóriuma, 6726 Szeged, Temesvári krt. 62.

A műveletet végző személyek

	Beosztás K/T	**Aláírás**
Dr. Horváth Ibolya, vezető kutató	Vezető kutató	Horváth
Dr. Hunya Ákos Gábor	Tudományos munkatárs	
Dr. Pilbat Ana Maria	Tudományos munkatárs	Pilbat Ana Maria
Bogdán Istvánné	Laborasszisztens	Bogdán Istvánné

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 2/6 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* CSEVES csirke vesehám sejtvonal fagyasztása	
Dátuma: 2017.11.03.	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-01-012*

Célja és rövid leírása:

Cél: A CSEVES immortalizált csirke vesehám sejtek kriopreszerválása.

Leírás: A Debreceni Egyetemtől kapott CSEVES sejtvonal fagyasztása, fenntartó tenyésztése (passzálása) és kísérleti előkészítése.

Felhasznált anyagok

Anyag neve	Gyártó	Gyártási szám v. azonosító	Steril-e? x	Lejárati idő
EMEM	Sigma	M4642-50L	x	2020.02.
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco	1027-106	x	2019.12.
L-Glutamine	Sigma	G5792-1KG	x	2020.03.
Penicillin-Streptomycin solution	Sigma	P4333-100ML	x	2021.01
10 cm-es műanyag Petri csésze	VWR	734-2321	x	2020.06.03.
10 mL-es üveg szerológiai pipetta	N/A	N/A	x	N/A
5 mL-es üveg szerológiai pipetta	N/A	N/A	x	N/A
Üveg Pasteur pipetta (2 mL)	N/A	N/A	x	N/A
1.5 ml-es Eppendorf cső	Greiner Bio-One	616201	x	2020.06
Trypsin-EDTA solution	Lonza	BE17-161E	x	2020.05
PBS	N/A	N/A	x	N/A
15 mL-es centrifugacső	Deltalab	22,429920	x	2020.02.
Dimethyl-sulfoxide	Molar	02610-203-340	-	2019.10.
Csavaros tetejű fagyasztócső (CRYO.S)	Greiner Bio-One	121263	x	2020.03.

Felhasznált gépek, berendezések, mérőeszközök

Berendezés neve	Azonosító	Ellenőrzés Kvalifikált/kalibrált-e: x, kvalifikálási azonosító
Steril fülke	ADS Laminaire BIO II. 12	x, 025/MTA:20-1801-3034
37°C-os CO_2 inkubátor	Jouan IG-150	N/A
Pipettor	Drummond PipettAid XL	N/A
OLYMPUS fázis kontraszt fénymikroszkóp	OLYMPUS CK30	N/A
Vízlégszivattyú	N/A	N/A
Izopropil-alkoholos fagyasztódoboz	Nalgene Cryo 1C	N/A
100-1000 µL-es manuális pipetta	Biohit ProLine	N/A
Sejtcentrifuga	Janetzki T32C	N/A
-80°C-os mélyfagyasztó hűtőszekrény		N/A

GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban

SZÉCHENYI 2020
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 4/6 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése	
Alcím: CSEVES csirke vesehám sejtvonal fagyasztása	
Dátuma: 2017.11.03.	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-01-012*

Előzmények:
KUT-JKV-LIP-01-011 passzálási jegyzőkönyv

Lépések (névvel,szignóval):
Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor

1) A CSEVES (2 db. 10 cm-es Petri csésze) sejtekről eltávolítjuk az elhasznált médiumot
2) A csirke vesehám sejteket 5-5 mL 37°C-os 1x PBS-sel mossuk
3) A sejtekre ezután egyenként 2-2 mL Tripszin-EDTA oldatot pipettázunk, majd 2 percre 37°C-os sejttenyésztő inkubátorba helyezzük őket
4) 2 perc inkubációs idő letelte után 5 csészéből 10 mL 37°C-ra előmelegített CSEV (EMEM + 10% FBS + 1 x-es Penicillin-Streptomycin) tápoldattal üvegpipetta segítségével alaposan felszuszpendáljuk, majd egy 15 mL-es centrifugacsőbe pipettázzuk át a sejteket.
5) az így összegyűjtött sejteket 1200 rpm-el 5 percig centrifugáljuk sejtcentrifuga segítségével
6) centrifugálás után a leülepített sejttömegről eltávolítjuk a felülúszót
7) a sejtpelletet ezután 2 mL sejtfagyasztó tápoldatban (CSEV tápoldat + 10% FBS + 10% DMSO) újraszuszpendáljuk
8) a 2 mL sejtszuszpenziót végül 2 db fagyasztócsőbe (minden 10 cm-es Petri csésze sejtből 1 fagyasztócsőnyi sejtet készítünk, ez kb. 5 x 10^6 sejt / cső sejtkoncentrációt jelent) pipettázzuk (mindegyikbe 1-1 mL-t).
9) a fagyasztócsöveket izopropil-alkoholos fagyasztódobozba helyezzük (ez biztosítja a lassú, kb. 1°C / perces hűtést) és -80°C-os mélyfagyasztó hűtőszekrénybe tesszük

Összefoglalása, eredménye:
A Debreceni Egyetemről 2017.10.19-én érkezett CSEVES sejteket 2 db 10 cm-es Petri csészében felszaporítottuk (KUT-JKV-LIP-01-011 passzálási jegyzőkönyv), majd mind a 2 db csészében található sejteket lefagyasztottuk 2 db fagyasztócsőbe.

Csatolmányok felsorolása:
-

SZÉCHENYI 2020
GINOP-2.3.4-15-2016-00002
A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban
MAGYARORSZÁG KORMÁNYA
Európai Unió
Európai Regionális Fejlesztési Alap
BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 5/6 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* CSEVES csirke vesehám sejtvonal fagyasztása	
Dátuma: 2017.11.03.	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-01-012*

Csatolmányok

-

KUTATÁSI JEGYZŐKÖNYV	Oldal: 6/6 Üzleti titok
Tárgy: 1. Feladat: Sejtvonalak növekedésének és stabilitásának fokozása fermentorban történő növesztéshez 1.1. Részfeladat: A dajkafehérjék expressziójának és működésének a megbízó által rendelkezésre bocsátott madár/emlős sejtvonalon történő jellemzése *Alcím:* CSEVES csirke vesehám sejtvonal fagyasztása	
Dátuma: 2017.11.03.	*Azonosító: KUT-JKV-LIP-117-01-012*

Készítette: Dr. Hunya Ákos Gábor	***Kiadásért felel: Dr. Hunya Ákos Gábor***