

DE OEC BMBI Szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-003	
	Érvényessége: 2013. szeptember 1-től	
Monociták izolálása és tenyésztése humán vérkészítményből (buffy coat-ból)		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum
Tartalma: 7 oldal	Az 1 oldalas melléklettel együtt	
Referenciák: Human CD14 microbeads termékismertető (Miltenyi Biotec)		

Felülvizsgálta (dátum/aláírás):	Ellenőrizte:	Jóváhagyta:

DE OEC BMBI szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-003
Monociták izolálása és tenyésztése humán vérkészítményből (buffy coat-ból)	
Készítette:	aláírás dátum
Ellenőrizte:	aláírás dátum
Jóváhagyta:	aláírás dátum

1. Tartalma

A humán monociták izolálása a Miltenyi Biotec cég által kidolgozott protokoll felhasználásán alapszik. Ez a sejt szeparáló eljárás a Miltenyi Biotec által forgalmazott kitek és technológiák adaptálásával történik. Az itt felvázolt munkautasítások lehetővé teszik a humán perifériás vérmintákból CD14 pozitív monociták biztonságos kinyerését és tisztítását.

2. Hatálya

A Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum (DE OEC) dolgozóira vonatkozik, akik engedéllyel rendelkeznek a DE OEC BMBI-BSL2 laboratórium használatára.

3. A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

3.1 Anyagok

Kiindulási biológiai minta: Véradó Állomásról származó friss vérkészítmény (buffy coat; 50-100 ml-es kiserelés)

Sejttenyésztő tápfolyadék: 10% FBS tartalmú RPMI-1640 tápfolyadék (Hyclone)

CD14 microbeads (Miltenyi; humán monociták szeparálására)

Ficoll Paque (GE Healthcare)

Fiziológiás sóoldat

A puffer: PBS (pH 7.2) + 0.5% BSA + 2 mM EDTA

3.2 Eszközök

Eppendorf centrifuga

QuadroMACS mágneses sejtszeparátor készülék (Miltenyi)

DE OEC BMBI szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-003	
Monociták izolálása és tenyésztése humán vérkészítményből (buffy coat-ból)		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum

MACS LS oszlop (Miltenyi)

50 ml-es Falcon műanyag centrifugacsövek

T25-ös sejtenyésztő flaska

Prefilter oszlop (Pre-Separation Filters; Miltenyi)

Bürkerkamra

Pipettor (5, 10 és 25 ml-es egyszer használatos steril műanyag hegyekkel)

4. A vizsgálathoz használt minták előkészítése

A Véradó állomásról kapott vérminták zárt zacskóban érkeznek, ezeket beérkezést követően azonnal fel lehet dolgozni, illetve lehetőség van néhány órán át tárolni őket a BSL2 laboratóriumban található 4 fokos hűtőszekrényben. A BSL2 laboratóriumba bekerült vérpreparátumot a feldolgozás előtt vagy közben tilos kivinni, illetve más laboratóriumban tárolni.

A monociták szeparálásához szükséges oldatokat előre el kell készíteni és a BSL2 laboratórium 4 fokos hűtőjében kell tárolni. Minden preparált oldat és tápfolyadék esetében jelezni kell, hogy ki készítette az oldatot és a lejáratidőt is fel kell tüntetni.

5. A vizsgálat lépései

5.01. A humán vérmintákat steril fülke alatt kell kinyitni és szét kell őket önteni 50 ml-es steril Falcon-centrifugacsövekben; centrifugálás 2500 rpm-mel 15 percig szobahőmérsékleten.

5.02. A vérplazmát ideiglenes műanyag tárolóba öntjük, a maradék vért (alakos elemeket) duplájára kell hígítani fiziológiás sóoldattal az eredeti Falcon centrifuga csövekben.

DE OEC BMBI szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-003
Monociták izolálása és tenyésztése humán vérkészítményből (buffy coat-ból)	
Készítette:	aláírás dátum
Ellenőrizte:	aláírás dátum
Jóváhagyta:	aláírás dátum

5.03. Vérminták rétegzése Ficoll oldatra: 10 ml Ficoll oldatra (Ficoll Paque) 20 ml vérmintát kell lassan, óvatosan rárétegezni pipettor segítségével.

5.04. Centrifugálás 2500 rpm-el 20 percig majd ezt követően az élő mononukleáris sejteket tartalmazó gyűrű átpipettázása új centrifugacsőbe.

5.05. A centrifugacsövenként összegyűjtött 30 ml folyadékhoz 20 ml fiziológiás sóoldat hozzáadását (hígítás) követően centrifugálás 1500 rpm-mel 10 percig.

5.06. A csapadékot (a lecentrifugálódott sejtüledéket) fel kell szuszpendálni 20 ml fiziológiás sóoldattal, majd lecentrifugálni 1500 rpm-mel 10 percig.

5.07. Az 5.06-os mosási lépés megismétlése.

5.08. A csapadék felszuszpendálása 10 ml fiziológiás sóoldattal, majd a sejtszám meghatározása Bürkerkamrás számolással. Opcionálisan 1 millió sejtet félre lehet tenni áramlási citometriás analízishez (a félretett sejtek tárolása: a BSL2 laboratórium 4 fokos hűtőszekrényében).

5.09. A sejtek előszűrése benedvesített prefilter oszlopon (nylon mesh), majd a sejtek centrifugálása 1500 rpm-mel 10 percig.

5.10. A sejtek felszuszpendálása 80 ul A puffer + 20 ul CD14 microbeads oldattal (10^7 sejtszám esetén). Kisebb sejtszámnál célszerű arányosan csökkenteni az A puffer és a mikro-gyöngyök mennyiségét.

5.11. A gyöngyökkel összekevert sejtuszuspenzió inkubálása jégen (4 Celsius fokon) 20 percig.

5.12. A sejtekhez nem kötődött mágneses gyöngyök kimosása 5 ml A pufferrel; centrifugálás 10 percig 1500 rpm-mel; majd a sejtek felvétele 5 ml A pufferben.

5.13. A mágneses oszlop (MACS LS) beillesztése a quadroMACS készülékbe, majd az oszlop előmosása 3 ml A pufferrel.

DE OEC BMBI szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-003	
Monociták izolálása és tenyésztése humán vérkészítményből (buffy coat-ból)		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum

5.14. Az 5 ml sejtszuszpenzió felvitele az oszlopra, az átfolyó sejtek gyűjtése centrifugacsőbe.

5.15. Az oszlop mosása 3x3 ml A pufferrel; az átfolyó sejtek egybegyűjtése centrifugacsőbe.

5.16. A pozitív sejtek szeparálása: a mágneses mezőből az oszlopot el kell távolítani; eluálás 5 ml A pufferrel történik, a pozitív sejtek gyűjtése külön tiszta centrifugacsőbe.

5.17. A sejtszám meghatározás Bürker kamrával, opcionálisan hozzávetőleg 1-1 millió sejtet félre lehet tenni áramlási citometriás és RNS vizsgálatokhoz.

5.18. A sejtek lecentrifugálása 10 percig 1500 rpm-mel, a sejtek felvétele 1 ml tápfolyadékban (RPMI-1640).

5.18. Az elszeparált sejtek (ekkor már tiszta monocita populáció) szétosztása sejttenyésztő flaskákba (1.5×10^6 sejt/ml).

5.19. Az így létrejött monocita sejtpopuláció tenyésztése 3-5 napig történhet a BSL2 laboratórium primer sejtek számára dedikált CO₂ inkubátorában (opcionálisan a monociták különféle citokinekkal kezelhetők a különféle irányú sejtátalakítás elősegítése céljából). A vérből izolált monocitákat szigorúan tilos más sejttenyésztő laboratórium inkubátorában tárolni és növesztetni.

6. Értékelés

A kísérlet eredményeként meg kell határozni, hogy hány millió monocitát sikerült kinyerni egy-egy vérkészítményből. Továbbá fontos megállapítani, hogy a szétválogatott sejtek mennyire életképesek, illetve mennyire alkotnak tiszta sejtpopulációt. Ennek vizsgálatára a leghatékonyabb módszer az áramlási citometriás elemzés. Ezzel a módszerrel lehetővé válik annak a meghatározása, hogy a sejtek hány százaléka CD14 pozitív (a CD14 a humán monociták legfontosabb sejtfelszíni markere).

7. Dokumentálás

A vizsgálat lépéseiről jegyzőkönyvet kell készíteni, mely tartalmazza mindazokat az adatokat és információkat, ami a szeparálási kísérlet reprodukálásához szükséges. Külön kiemelendő, hogy a jegyzőkönyvben a dátumot pontosan fel kell tüntetni, illetve szükséges dokumentálni a buffy

DE OEC BMBI szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-003	
Monociták izolálása és tenyésztése humán vérkészítményből (buffy coat-ból)		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum

coat kódját is. Továbbá a jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell, hogy hány ml vérmintából indult ki a vizsgálat és fel kell tüntetni, hogy hány millió monocitát sikerült izolálni (mekkora lett a hozam). Ha a monociták a BSL2 laborban továbbtenyésztésre kerülnek, akkor precízen dokumentálni kell, hogy hány tenyésztő flaskában, s milyen kondíciók mellett történik a sejtek továbbtenyésztése.

8. Munkavédelmi, higiénés rendszabályok

A BSL2 laboratórium általános szabályai ennél a munkafolyamatnál is érvényesek, s szigorúan betartandók. A steril sejtenyésztő fülkék használatát és tisztítását a BSL2-005 számú leírásban külön részletesen ismertetjük.

A 6-os pontban ismertetett lépések túlnyomó részét steril fülke alatt kell elvégezni. Ez az jelenti, hogy a vérmintát csak a steril fülke alatt szabad kibontani és szétönteni centrifugacsövekbe.

Továbbá a steril fülke alatt kell dolgozni a quadroMACS készülékkel is. A quadroMACS készüléket a fülkébe való behelyezés és kivétel során gondosan le kell mosni 70%-os etanollal. Természetesen a sejtszámolás, az áramlási citometriás analízis és a sejtek centrifugálása a fülkén kívül történik. Ezekben az esetekben viszont a sejteket zárt centrifugacsövekben kell tárolni, s ügyelni kell arra, hogy a fülkéből kikerülő csövek külseje szennyeződést ne tartalmazzon.

Az egész procedúra során keletkező szennyezett zacskót, sejtekkel szennyezett centrifugacsöveket, mágneses oszlopokat, pipetta hegyeket a fülke mellett elhelyezett zárható badellába kell kidobni. A badellákon fel van tüntetve hogy 'biohazard', ezekhez a takarító személyzet nem nyúlhat, ha megteltek légmentesen le kell zárni őket. Az eljárás során keletkeznek olyan folyadék (pl. a mágneses oszlop mosása során) melyek viszonylag tömény potenciálisan veszélyes sejtszuspenziót tartalmaznak, ezek közvetlenül nem kerülhetnek a badellákba hanem elsőként Clorox-ot tartalmazó tárolóedényekbe kerülnek.

DE OEC BMBI szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-003	
Monociták izolálása és tenyésztése humán vérkészítményből (buffy coat-ból)		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum

Az 5-ös pontban bemutatott tisztítás lépéseit figyelmesen kell végrehajtani (közben lehetőleg ne beszéljünk, telefonáljunk) különösképpen arra kell vigyázni, hogy ne szennyeződjön be a steril fülke, a sejteket vagy vért tartalmazó folyadékkal. Ha véletlenül mégis rácspeppen a biológiai anyagot tartalmazó folyadék a fülke felületére vagy oldalára, akkor azonnal fertőtlenítő szerrel (SprayIn-TEVA/Mikozid AF Liquide) le kell kezelni a szennyezett felületet, majd eltávolítani a szennyezést és többször gondosan áttisztítani a kontaminált területet. A monociták izolálása során kötelező az előírt védőfelszerelés használat: a BSL2 laboratórium használatra dedikált fehér köpenyt kell viselni, továbbá minden művelet során gumikesztyűt kell hordani. Ha a munka során a kesztyű biológiai szennyeződéssel kontaminálódik, akkor azonnal új kesztyűt kell felvenni. Az eljárás során az első a legkritikusabb lépés (amikor a vért szétöntjük centrifuga csövekbe), ennél a lépésnél célszerű két kesztyűt felvenni.