

DE OEC BMBI Szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-004	
	Érvényessége: 2013. szeptember 1-től	
HUVEC preparálás (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) köldökzsinórból		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum
Tartalma: 6 oldal	1 darab melléklettel együtt	
Referenciák: Debreceni Egyetem 2-es Belklinika által kidolgozott protokoll		

Felülvizsgálta (dátum/aláírás):	Ellenőrizte (szakmai vezető):	Jóváhagyta (szakmai vezető):

DE OEC BMBI szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-004
HUVEC preparálás (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) köldökzsinórból	
Készítette:	aláírás dátum
Ellenőrizte:	aláírás dátum
Jóváhagyta:	aláírás dátum

1. Tartalma

A humán endothél sejtek izolálása a Debreceni Egyetem 2-es Belklinika által kidolgozott protokoll felhasználásán alapszik. Az itt felvázolt munkautasítások lehetővé teszik a humán köldökzsinór mintákból endothél sejtek biztonságos kinyerését.

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: friss humán köldökzsinór

Medium 199 (Sigma, M 2154)

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

Hanks's Balanced solution, Sigma (H 9394) (-Ca, -Mg, HCO₃)

Collagenase, Sigma (C 9407); 100 mg steril, szűrt (0,22 µm) 100 ml Medium 199-ben;

tárolás -20°C-on

70%-os etanol

Sejttenyésztő tápfolyadék összetétele:

- Medium 199 (Sigma)
- 10% Bovine serum (Csertex)
- 2% Hepes buffer (1 M, H 0887)
- 1% Penicillin (Sigma) & Streptomycin (P 4333)

DE OEC BMBI szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-004	
HUVEC preparálás (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) köldökzinórból		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum

- 1% L-glutamine (G 7513)
- 1% Amphotericin (A 2942)

3.2 Eszközök

kanülök

steril olló

steril csipesz

steril papírvatta

steril sebészfonal

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

15–20 ml-es Falcon műanyag centrifugacsövek

Eppendorf centrifuga

T25-ös sejttenyésztő flaska

37 °C-os termosztát

4. A vizsgálathoz használt minták előkészítése

A Heim Pál Gyermekkorházából, illetve a Debreceni Egyetem Szülészeti Klinikájáról érkezett köldökzinór minták steril PBS-ben érkeznek, melyeket beérkezést követően azonnal fel kell dolgozni, illetve lehetőség van néhány órán át szobahőmérsékleten tárolni őket. A BSL2 laboratóriumba bekerült mintákat a feldolgozás közben tilos kivinni, illetve más laboratóriumban tárolni.

DE OEC BMBI szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-004	
HUVEC preparálás (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) köldökzsinórból		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum

Az endothél sejtek izolálásához szükséges tápfolyadékokat BSL2 laboratórium 4 fokos hűtőjében kell tárolni, az oldatokat előre el kell készíteni. 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 friss humán köldökzsinór mintákat PBS-ben tartjuk izolálásig, a munkát steril fülkében kell végezni.

5.02. Megtisztogatjuk a zsinór külső részeit 70%-os etanollal. A vénába kanült vezetünk, majd a behelyezett kanül vastagított része fölött steril fonállal kötjük el.

5.03. Ezt követően átmoszuk a vénát 20-40 ml steril PBS-sel, majd levegőt is átfújhatunk rajta, hogy az összes PBS-t kimossuk a vénából. Ezután behelyezünk egy kanült a zsinór másik végébe is.

5.04. A következő lépésben ismét átmoszuk a vénát, 20-40 ml Hanks' oldattal, majd szintén átfújunk rajta levegőt is, hogy az összes Hanks' oldatot eltávolítsuk a vénából.

5.05. A megtisztított köldökzsinór vénába 4-7 ml Collagenase-t töltünk, majd a kanülhöz tartozó kupakkal lezárjuk a köldökzsinór két végét, és 12 percre 37°C-os CO₂-inkubátorba helyezzük.

5.06. A 12 perc leteltét követően a vénát 20 ml Medium 199-cel átmoszuk, és steril Falcon centrifugacsőbe gyűjtjük a köldökzsinór faláról leemészett sejteket tartalmazó folyadékot.

5.07. Az így összegyűjtött sejteket centrifugáljuk 20 percig, 1000 rpm-mel, 25°C-on.

5.08. Centrifugálást követően az összegyűjtött sejtekről leszívjuk a felülúszót, a pelletet 5 ml tápfolyadékban felszuszpendáljuk és egy T25-ös sejtenyésztő flakába szélesztjük.

5.09. Az így izolált endothél sejtvonalak tenyésztése a BSL2 laboratórium primer sejtek számára dedikált CO₂ inkubátorában történik. A humán köldökzsinórból izolált sejteket szigorúan tilos más sejtenyésztő laboratórium inkubátorában tárolni és növeszteni.

DE OEC BMBI szabványműveleti előírás	Szám: BSL2-004	
HUVEC preparálás (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) köldökzinórból		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum

6. Értékelés

A továbbiakban immunhisztokémiás festéssel (pl. Von Willebrand faktor), illetve áramlási citometriás elemzéssel különböző endothél sejtekre jellemző sejtfelszíni markerek segítségével bizonyítjuk be, hogy az általunk izolált sejtek, valóban endothél sejtek. Ezt követően a sejteket a BSL2 sejtlaborban elhelyezett inkubátorban tenyésztjük és használjuk fel különböző kísérletekben.

7. Dokumentálás

A vizsgálat lépéseiről jegyzőkönyvet kell készíteni, mely tartalmazza mindazokat az adatokat és információkat, ami az izolálás reprodukálásához szükséges. Külön kiemelő, hogy a jegyzőkönyvben a dátumot pontosan fel kell tüntetni. Az endothél sejtek a BSL2 laborban továbbtenyésztésre kerülnek, így precízen dokumentálni kell, hogy hány tenyésztő flakóban, 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 sejttenyésztő fülkék használatát és tisztítását a BSL2-005 számú leírásban külön részletesen ismertetjük.

Az izolálási folyamat összes ismertetett lépését steril fülke alatt kell elvégezni. Az izoláláshoz használt eszközöket a fülkébe való behelyezés és kivétel során gondosan le kell mosni 70%-os etanollal. Természetesen 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 sejtekkel szennyezett centrifugacsöveket, pipetta hegyeket a fülke mellett elhelyezett zárható badellába kell kidobni. A badellákon fel van tüntetve, hogy

DE OEC BMBI szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-004	
HUVEC preparálás (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) köldökzsínorból		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum

'biohazard', ezekhez a takarító személyzet nem nyúlhat, ha megteltek légmentesen le kell zárni őket.

Különösképpen arra kell vigyázni, hogy ne szennyeződjön be a steril fülke a sejteket vagy vért tartalmazó folyadékkal. Ha véletlen mégis rácsseppen 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. Az endothél sejtek izolálása során kötelező az előírt védőfelszerelés használata: 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 vértől megtisztítjuk a köldökzsínort), ennél a lépésnél célszerű két kesztyűt felvenni.