

<b>Versuch</b>	<b>vorläufige SOP-20160216: NEOCYST_ Isolation RTE Zellen aus Urin</b>																																
<b>Durchführung</b>	<p><b>Verwendete Medien:</b></p> <p><b>HEPES Medium Sigma</b> (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F12,#51445): <b>50ml</b></p> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td>Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F12,#51445, Sigma</td> <td style="text-align: right;">43,6 ml</td> </tr> <tr> <td>FCS (Endkonz.: 10%)</td> <td style="text-align: right;">5 ml</td> </tr> <tr> <td>Pen/Strep (140U/ml &amp; 140µg/ml) (Biochrom,#A2213)</td> <td style="text-align: right;">700 µl</td> </tr> <tr> <td>Amphotericin B (3,5µg/ml) (Sigma Aldrich, #A2942)</td> <td style="text-align: right;">700 µl</td> </tr> <tr> <td>REGM SingleQuot kit supplement and growthfactors, (Lonza ,#CC-4127,)</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 40px;">rhEGF</td> <td style="text-align: right;">50 µl</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 40px;">Insulin</td> <td style="text-align: right;">50 µl</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 40px;">Hydrocortison</td> <td style="text-align: right;">50 µl</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 40px;">GA-1000</td> <td style="text-align: right;">50 µl</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 40px;">FBS</td> <td style="text-align: right;">250 µl</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 40px;">Epinephrine</td> <td style="text-align: right;">50 µl</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 40px;">T3</td> <td style="text-align: right;">50 µl</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 40px;">Transferrin</td> <td style="text-align: right;">50 µl</td> </tr> </table> <p><b>Waschmedium:</b> <b>50ml</b></p> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td>1x PBS ohne Ca/Mg (Apotheke MHH)</td> <td style="text-align: right;">ad. 50 ml</td> </tr> <tr> <td>Pen/Strep (140U/ml &amp; 140µg/ml) (Biochrom,#A2213)</td> <td style="text-align: right;">700 µl</td> </tr> <tr> <td>Amphotericin B (1µg/ml) (Sigma Aldrich, #A2942)</td> <td style="text-align: right;">200 µl</td> </tr> </table> <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> <p><b>Vor Versuchsstart:</b> Medien für 30 Minuten auf 37°C im Inkubator/Wärmeschrank vorwärmen</p> <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> <p><b>Probennahme: Nicht den Morgenurin verwenden!</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Nach Möglichkeit vor der Probenentnahme die Genitalregion mit Wasser und Seife (oder auch mit feuchten Tüchern) waschen. Das gilt auch für die Hände um ein Kontaminationsrisiko zu minimieren.</li> <li>✓ Der Sammelcontainer soll nur am äußeren Rand angefasst werden. Aufpassen, dass nicht der Rand oder die Innenseite berührt werden.</li> <li>✓ Der Probencontainer soll die Genitalien nicht berühren (Männer sollten außerdem die Vorhaut zurückziehen).</li> <li>✓ Erst einen Teil des Urins in die Toilette abgeben und erst dann in den Sammelcontainer. Dabei das Urinieren nicht unterbrechen. So viel Urin wie möglich sammeln!</li> <li>✓ Den Sammelcontainer anschließend dicht verschließen und beschriften: Patienten Identifikation</li> <li>✓ Auf Eis bzw. bei 4°C sind die Proben für maximal 4h lagerbar.</li> </ul> <p><b>Aufarbeitung:</b> (Alle nachfolgenden Schritte unter der Sterilbank durchführen.)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Urin je Proband in ein oder mehrere 50ml-Röhrchen überführen (1-2, je 50ml).</li> <li>✓ Zentrifugieren mit 400g für 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT).</li> <li>✓ Überstand bis auf 1ml Rest abnehmen und verwerfen. Dabei darauf achten, dass das Pellet nicht gestört wird!</li> <li>✓ Pellet in verbliebendem Überstand resuspendieren. (Bei mehreren Röhrchen bitte hier vereinigen.)</li> <li>✓ Nach Zugabe von 10ml Waschmedium durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischen.</li> <li>✓ Zentrifugieren mit 200g für 10 Minuten bei RT.</li> <li>✓ Überstand bis auf kleinen Rest (200 bis 500µl) verwerfen.</li> </ul>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F12,#51445, Sigma	43,6 ml	FCS (Endkonz.: 10%)	5 ml	Pen/Strep (140U/ml & 140µg/ml) (Biochrom,#A2213)	700 µl	Amphotericin B (3,5µg/ml) (Sigma Aldrich, #A2942)	700 µl	REGM SingleQuot kit supplement and growthfactors, (Lonza ,#CC-4127,)		rhEGF	50 µl	Insulin	50 µl	Hydrocortison	50 µl	GA-1000	50 µl	FBS	250 µl	Epinephrine	50 µl	T3	50 µl	Transferrin	50 µl	1x PBS ohne Ca/Mg (Apotheke MHH)	ad. 50 ml	Pen/Strep (140U/ml & 140µg/ml) (Biochrom,#A2213)	700 µl	Amphotericin B (1µg/ml) (Sigma Aldrich, #A2942)	200 µl
Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F12,#51445, Sigma	43,6 ml																																
FCS (Endkonz.: 10%)	5 ml																																
Pen/Strep (140U/ml & 140µg/ml) (Biochrom,#A2213)	700 µl																																
Amphotericin B (3,5µg/ml) (Sigma Aldrich, #A2942)	700 µl																																
REGM SingleQuot kit supplement and growthfactors, (Lonza ,#CC-4127,)																																	
rhEGF	50 µl																																
Insulin	50 µl																																
Hydrocortison	50 µl																																
GA-1000	50 µl																																
FBS	250 µl																																
Epinephrine	50 µl																																
T3	50 µl																																
Transferrin	50 µl																																
1x PBS ohne Ca/Mg (Apotheke MHH)	ad. 50 ml																																
Pen/Strep (140U/ml & 140µg/ml) (Biochrom,#A2213)	700 µl																																
Amphotericin B (1µg/ml) (Sigma Aldrich, #A2942)	200 µl																																

	<p>Darauf achten, dass das Pellet nicht gestört wird!</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Je Probe → in 2ml HEPES Medium resuspendieren (s.O.), in ein Cryoröhrchen überführen</li> <li>✓ Probenkennzeichnung, Datum und Uhrzeit vermerken und an folgende Adresse verschicken:</li> </ul> <p style="margin-left: 40px;">z.Hd.: Anja Ziolk  Pädiatrische Nieren- Leber- und Stoffwechselerkrankungen  Gebäude J10, Ebene 01, Raum 7260  Carl-Neuberg-Strasse 1  30625 Hannover</p> <p style="margin-left: 40px;">Tel: 0511 / 532-7814  e-mail: ziolk.anja@mh-hannover.de</p>
<b>Material</b>	Sterile Urinsammelröhrchen , 50ml Röhrchen (steril), Tischzentrifuge, Sterilbank, Pipetten, Cryoröhrchen
<b>Reagenzien</b>	Waschlösung, HEPES Vollmedium