

Versuch	ANW-20180913: NEOCYST_ Isolation RTE Zellen aus Urin (UREC)																																
Durchführung	<p>Verwendete Medien:</p> <p>HEPES Medium Sigma (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F12,#51445): 50ml</p> <table> <tr> <td>Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F12,#51445, Sigma</td> <td>43,6 ml</td> </tr> <tr> <td>FCS (Endkonz.: 10%)</td> <td>5 ml</td> </tr> <tr> <td>Pen/Strep (140U/ml & 140µg/ml) (Biochrom,#A2213)</td> <td>700 µl</td> </tr> <tr> <td>Amphotericin B (3,5µg/ml) (Sigma Aldrich, #A2942)</td> <td>700 µl</td> </tr> <tr> <td>REGM SingleQuot kit supplement and growthfactors, (Lonza, #CC-4127,)</td> <td></td> </tr> <tr> <td> rhEGF</td> <td>50 µl</td> </tr> <tr> <td> Insulin</td> <td>50 µl</td> </tr> <tr> <td> Hydrocortison</td> <td>50 µl</td> </tr> <tr> <td> GA-1000</td> <td>50 µl</td> </tr> <tr> <td> FBS</td> <td>250 µl</td> </tr> <tr> <td> Epinephrine</td> <td>50 µl</td> </tr> <tr> <td> T3</td> <td>50 µl</td> </tr> <tr> <td> Transferrin</td> <td>50 µl</td> </tr> </table> <p>Waschmedium: 50ml</p> <table> <tr> <td>1x PBS ohne Ca/Mg (Apotheke MHH)</td> <td>ad. 50 ml</td> </tr> <tr> <td>Pen/Strep (140U/ml & 140µg/ml) (Biochrom,#A2213)</td> <td>700 µl</td> </tr> <tr> <td>Amphotericin B (1µg/ml) (Sigma Aldrich, #A2942)</td> <td>200 µl</td> </tr> </table> <hr/> <p>Vor Versuchsstart: Medien für 30 Minuten auf 37°C im Inkubator/Wärmeschrank vorwärmen</p> <hr/> <p>Probennahme: Nicht den Morgenurin verwenden!</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Vor Probenentnahme, Waschen von <i>Genitalregion</i> und Händen mit Wasser und Seife, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren. (ggf. "feuchte Tücher" verwenden) ✓ Sammelcontainer nur außen anfassen, möglichst nicht den Rand oder die Innenseite berühren. ✓ Der Container soll die <i>Genitalien</i> nicht berühren. Männer sollten die Vorhaut zurückziehen. ✓ Bevorzugt Mittelstahl-Urin sammeln; so viel Urin wie möglich ✓ Sammelcontainer dicht verschließen und beschriften: Patienten-Identifikation (Menge, Datum und Uhrzeit!) ✓ Auf Eis (bzw. bei 4 °C) können die Urin-Proben bis zu 4 Std. gelagert werden. <p>Aufarbeitung: (Alle nachfolgenden Schritte unter der Sterilbank durchführen.)</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Urin je Proband in ein oder mehrere 50ml-Röhrchen überführen (1-2, je 50ml). ✓ Zentrifugieren mit 400g für 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT). ✓ Überstand bis auf 1ml Rest abnehmen und werfen. Dabei darauf achten, dass das Pellet nicht gestört wird! ✓ Pellet in verbliebendem Überstand resuspendieren. (Bei mehreren Röhrchen bitte hier vereinigen.) ✓ Nach Zugabe von 10ml Waschmedium durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischen. ✓ Zentrifugieren mit 200g für 10 Minuten bei RT. ✓ Überstand bis auf kleinen Rest (200 bis 500µl) werfen. Darauf achten, dass das Pellet nicht gestört wird! ✓ Je Probe →in 2ml HEPES Medium resuspendieren (s.o.), 	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>in ein Cryoröhrchen überführen</p> <p>✓ Probenkennzeichnung, Datum und Uhrzeit vermerken und an folgende Adresse verschicken:</p> <p>z.Hd.: Margit Überheide Pädiatrische Nieren- Leber- und Stoffwechselerkrankungen Gebäude J10, Ebene 01, Raum 7260 Carl-Neuberg-Strasse 1 30625 Hannover</p> <p>Tel: 0511 / 532-7814 e-mail: ueberheide.margit@mh-hannover.de</p>
Material	Sterile Urinsammelröhrchen , 50ml Röhrchen (steril), Tischzentrifuge, Sterilbank, Pipetten, Cryoröhrchen
Reagenzien	Waschlösung, HEPES Vollmedium