

Yleiset soluviljely-toimintaohjeet

- käytä soluviljelyssä erillistä työtakkia sekä sisäkenkiä/kenkäsuoja
- varaa laminaari Outlook- kalenterista johon saat pääsyn salla.kangas@oulu.fi

Muista aseptinen työskentely:

- työskenneltäessä pidetään hanskat kädessä ja ne desinfioidaan viinalla ennen työskentelyn aloittamista
- pyyhi mikroskooppi sekä pöytäpinnat ennen solujen tarkastelua
- laminaarikaapit pidetään pääsääntöisesti tyhjillään
- älä sammuta laminaarien ilmanvaihtoa, pidetään se aina päällä
- UV-lamput ovat päällä 1 h:n ajan klo 5-6 välisenä aikana
- laminaarikaapin pinnat pyyhitään 70 - 80 % etanolilla ennen työskentelyn aloittamista ja sen päätyttyä sekä välittömästi roiskeiden jälkeen
- kaikki kaappiin vietävät välineet ja liuospullot käsitellään 70 - 80 % etanolilla ja avataan vasta laminaarin sisällä
- pipettorit sekä mikropipetit ovat pääsääntöisesti laminaarikohtaisia
- soluviljelyssä käytetään vain ja ainoastaan filtterikärkiä
- kiinteä biologinen jäte (esim. käytetyn pipetinkärjet, soluviljelymaljat jne.) kerätään autoklavoitaviin pusseihin. Huom! ei nesteitä pussiin!!
- biologinen, nestemäinen jäte käsitellään ensin 2% klorillilla/virkonilla yön yli. Tämän jälkeen, seuraavana päivänä, neste voidaan kaataa viemäriin runsaan veden kera
- käytetyt lasipipetit (pasteur) kerätään omaan, terävälle jätteelle (ml. neulat ja muut terävät) varattuun kanisteriin/säiliöön
- jokainen huolehtii omien lasitavaroiden sekä muovien autoklavoinnista ja käytettyjen lasitavaroiden viemisestä pois soluviljelytiloista
- ime työskentelyn päätyttyä imupussiin/-pulloon 2% klorillia/virkonia sekä etanolia
- laita pipettori tarvittaessa lataukseen

Jätteiden lajittelu

- soluihin kosketuksissa olleet muovit kerätään autoklavoitaviin jätteisiin
- soluviljelmät sekä muu biologinen jäte poistetaan lisäämällä niihin 2% klorillia/virkonia, annetaan vaikuttaa seuraavaan päivään jonka jälkeen kaadetaan runsaan veden kera viemäriin
- viiltävä jäte kerätään omaan kanisteriin
- imusäiliön täyttyessä pussiin lisätään 2% klorillia/virkonia, annetaan vaikuttaa seuraavaan päivään jonka jälkeen kaadetaan viemäriin runsaan veden kera

Kontaminaatioiden sattuessa, viljelmä poistetaan heti soluviljelytiloista ja otetaan yhteys soluviljelyvastaavaan: Reetta Hinttala

puh. 050 428 6095

reetta.hinttala@oulu.fi:

1. Poista kontaminoitunut viljelmä heti soluviljelystä, ota yhteys soluviljelyvastaavaan (Reetta Hinttala puh. 050 428 6095, reetta.hinttala@oulu.fi)
2. Kontaminaation dokumentointi mahdollisuuksien mukaan, (esim. kuvaa malja/pullo). Käsittele sen jälkeen klorillilla/virkonilla.
3. Heitä pois käytössä olleet kasvatusmediumit, PBS jne. kontaminaation uusimisen välttämiseksi.
4. Samassa inkubaattorissa olleita muita soluviljelmiä tarkkaillaan ja jos ongelmia ei ilmene, kokeet suoritetaan loppuun. Heti kun mahdollista, kaappi pestään. Kaapista ei siirretä soluja toisiin inkubaattoreihin!

HUOLEHDITAA YLEISESTÄ SIISTEYDESTÄ

- Laminaarien UV-valot ovat automaattisesti päällä klo 5-6
- Varmista sentrifuugin siisteys jokaisen fuugauksen jälkeen, erityisesti veriroiskeet on pyyhittävä heti pois vedellä sekä viinalla
- Mykoplasmatästä pari kertaa vuodessa (Anja Heikkinen) tai tarvittaessa vastaavan tutkijan toimesta
- Biosidalin käyttö oman harkinnan ja tarpeen mukaan laminaareissa
- Potilaiden kudospotilaalasta lähtöisin olevat primäärikasvustot keskitetään 342B ja 357B laboratorioihin. Kaupallisten solulinjojen kasvatus keskittyy 341B:n oikean puoleiseen inkubaattoriin, vasemman puoleisessa viljellään myös potilaiden primäärisoluja
- Säännöllinen siivous:
 - 2 viikon välein:
 - vesihautteet
 - inkubaattoreiden vesihaude
 - sentrifuugit
 - labratakan vaihto tarvittaessa
 - 4 viikon välein:
 - labrattakien vaihto
 - laminaarien perusteellinen pyyhkiminen, myös alapohja
 - 6 kk välein:
 - inkubaattorin sterilointiohjelma

Näytteen keräys mykoplasmatestiin

- Ota 1 ml mediumia talteen eppariin, säilytä -20°C:ssa testi-PCR:ään saakka
- Anja Heikkinen (377B) suorittaa testauksen pari kertaa vuodessa, muissa tapauksissa analysoitavista näytteistä vastaava tutkija
- Parhain tulos saadaan kun näyte kerätään 24h (tai vähintään yön yli) mediumin vaihdon jälkeen. Jos näyte kerätään 48-72h mediumin vaihdon jälkeen, kuolleet solut ja fragmentoitunut DNA saattavat häiritä PCR-reaktiota

Sample collection for mycoplasma test

- Collect 1 ml of media to Eppendorf tube and store in -20°C until the test-PCR
- Anja Heikkinen (377B) takes care of two routine checks per year, otherwise, if needed, the researcher takes care of checking his/her own samples
- Ideally the supernatant should be collected 24 hours after changing the medium. If impossible, at least overnight. If the samples are collected after 48-72 hours of culture (without medium changes) you might get results that look like a "smear", because of DNA fragments from dead cells and debris.

Tärkeitä yhteystietoja soluviljelyssä/Important contact information:

Hiilidioksidisäiliöt/Carbondioxide tanks:

Yliopisto/University: teknisetpalvelut.ltk@oulu.fi

Laminaarit ja UV-valot/Hoods and UV-lights:

Pyynnöt Help service desk:in kautta (Notio)/Require through Help service desk (in Notio)

<https://notio.oulu.fi/fi/tilat-ja-palvelut>

Mykoplasmatestaus/Mycoplasma test:

Anja Heikkinen tai vastaava tutkija tarvittaessa/Anja Heikkinen or corresponding researcher

Mikroskoopit/Microscopes:

Yliopisto/University: teknisetpalvelut.ltk@oulu.fi

OYS (tarvittaessa erikoisosaamista/if special expertise is needed):

Pekka Suutari-Jääskö, 08-3156377

Mikko Teppola, 08-3155342

Inkubaattorit/Incubators:

Yliopisto/University: teknisetpalvelut.ltk@oulu.fi

Välinehuolto/Autoclaving:

Virpi Glumoff, p. 040- 016 5981 (virpi.glumoff@oulu.fi)

Soluviljelyiden yhteyshenkilöt/Contact persons in each cell culture:

341B: Pirjo Keränen, 376B, pirjo.keranen@oulu.fi

342B: Heta Merikallio, 348B, heta.merikallio@oulu.fi

357B: Miia Vierimaa, miia.vierimaa@oulu.fi

Instructions for working in cell culture

A dedicated lab coat must be used at any time when working in cell culture. Outside footwear should not be worn in the cell culture laboratory. Use shoes for only indoor use or shoe covers. Make a reservation for the hood beforehand. Reservation calendar works both in Outlook and O365 web calendar. Please contact Salla Kangas (salla.kangas@oulu.fi) to get access to the cell culture reservation calendar. If you are having problems with making reservations or access to the calendar, you can contact Salla.

Work aseptically:

- Gloves and a dedicated lab coat must be used at any time. Disinfect the gloves with ethanol prior to working.
- Wipe the microscope and other surfaces that are in contact with your cell culture dishes with ethanol before and after observing the cells.
- Laminar flow hoods are for sterile work. Keep them as empty as possible and do not overload them during working to ensure correct airflow to maintain sterility.
- Do not switch off the hood air flow.
- UV-lamps in the hoods are on for 1 hour between 5-6 AM.
- For routine cleaning of the hood, wipe the work surface with 70% ethanol before and after work, and during work especially after any spillage.
- Wipe the outside of the containers, flasks, plates, and dishes with 70% ethanol before placing them in the cell culture hood. To keep plastic ware and reagents sterile, they should be opened only inside the hood.
- Each hood has dedicated pipette controller and possibly micropipettes. Do not take pipettes out from their dedicated hood or cell culture room.
- Use only sterile filter tips in cell culture.
- Solid biological waste, (e.g. used pipette tips, cell culture dishes etc.), is collected into autoclavable bags. NOTE: Waste bin is not for liquids!
- Biological liquid waste is deactivated with 2% chlorine or virkon overnight. On the following day, pour the inactivated liquid waste down a sink and rinse with excess water.
- Glass pasteur pipettes have their own waste container. Also needles and other sharp waste has to be disposed in a specific container.
- Everyone is responsible of autoclaving their own glass and plastic ware. Everyone takes their own dishes out from cell culture.
- After using the vacuum aspirator, aspirate 2% chlorine/virkon and ethanol.
- Recharge the pipette controller when needed.

Cell culture waste:

- Solid biological waste, (e.g. used pipette tips, cell culture dishes etc.), is collected into autoclavable bags. NOTE: Waste bin is not for liquids!

- Biological liquid waste is deactivated with 2% chlorine or virkon overnight. On the following day, pour the inactivated liquid waste down a sink and rinse with excess water.
- Glass pasteur pipettes have their own waste container. Also needles and other sharp waste has to be disposed in their own specific container.
- After using the vacuum aspirator, aspirate 2% chlorine/virkon and ethanol. When the bag is full, replace it with new bag. Add chlorine/virkon into the used bag and on the following day, pour the inactivated liquid waste down a sink and rinse with excess water.

If you observe a contamination in your cell culture, dispose the contaminated culture and contact immediately cell culture responsible person Reetta Hinttala, phone: 050 428 6095, reetta.hinttala@oulu.fi

1. Dispose the contaminated culture and contact immediately cell culture responsible person Reetta Hinttala, phone: 050 428 6095, reetta.hinttala@oulu.fi
2. Document the contamination, if possible (e.g. take a picture of the dish/flask). After that, treat the dish with 2% chlorine/virkon.
3. Discard the potential sources of the contamination, such as culture media, PBS, etc. to avoid new contaminations.
4. Cell cultures that have been kept in same incubator as the contaminated dish are under constant observation. If no contamination is observed, the experiments can be finished as planned. Do not put new cultures in the incubator during that period. As soon as possible, the incubator is cleaned. DO NOT transfer the cells from this incubator to other incubators to avoid the risk to spread the contamination!

KEEPING THE CELL CULTURE LABS CLEAN

- UV-lamps in the hoods are on for 1 hour between 5-6 AM.
- When you use centrifuges, take care to leave it clean for the next user. Especially blood and other spills should be wiped away first wiping with water and then with ethanol.
- Testing for mycoplasma is done generally couple of times per year by Anja Heikkinen or by responsible researcher whenever needed.
- Biocidal usage according to own evaluation and needs in laminar flow hoods (please inform all other possible hood users).
- Patient-derived primary tissue cultures are concentrated in cell culture rooms 342B and 357B.
- Commercial and well characterized, clean cell lines are concentrated in an incubator on right side in room 341B, primary patient cells can be cultured in the incubator on the left hand side.
- Regular cleaning:
 - every 2 weeks
 - water baths
 - water baths inside the incubators
 - centrifuges
 - clean lab coat
 - every 4 weeks
 - clean lab coat

- wiping the laminars, also the lower bottom part

every 6 months

- incubators are sterilized