

Core Unit Cell Sorting and Immunomonitoring Erlangen

Protokoll zur Gewinnung von Einzelzellen aus Milz oder Lymphknoten (Maus)

Benötigte Puffer und Lösungen:

Hanks-Puffer (für 10L Puffer; pH 7,3) (Hanks and Wallace, 1949):

Molarität	Substanz	Molekulargewicht	Einwaage (10l)
5,4 mM	KCL	74,56	4g
0,3 mM	Na ₂ HPO ₄	141,96	1,2g
0,4 mM	KH ₂ PO ₄	136,09	0,54g
4,2 mM	NaHCO ₃	84,01	3,52g
1,3 mM	CaCl ₂	110,99	1,44g
0,5 mM	MgCl ₂	203,3	1,02g
0,6 mM	MgSO ₄	246,5	1,48g
137 mM	NaCl	58,44	80g
5,6 mM	D-Glukose	180,16	10,1g

Verdaulösung:

Hanks-Puffer + 2% FCS(19,6ml Hanks + 400ul FCS)

Kollagenase D20mg (1mg/ml final)

DNase I200µl (10mg/ml Stock)

MACS-Puffer (pH 7,3):

1xPBS(100ml 10xPBS/L)

2%FCS(20ml/L)

2mM EDTA.....(20ml 100mM Stock/L)

ERY-LYSE-Puffer:

0,15M NH₄Cl(8,02g/L)

0,02M HEPES(4,77g/L)

0,1mM EDTA.....(1ml 100mM Stock/L)

Durchführung:

- 3ml Verdaulösung (37°C) in 6well-Platte **vorlegen** und **70µm cell-strainer** einsetzen.
- Maus töten und Milz (und ggf. Lymphknoten) entnehmen
- Milz in **70µm cell-strainer** in 6well-Platte überführen und grob zerkleinern.
- 60 Minuten Inkubation bei 37°C.
- 100µl 0,5M EDTA zugeben um Verdau zu stoppen (5 Minuten Inkubation).
- Zellen mit planarem Stempel vorsichtig und schonend durch 70µm cell-strainer passieren.



Core Unit Cell Sorting and Immunomonitoring Erlangen

- Einzelzellsuspension in **15ml Rundboden-MACS-Röhrchen** überführen und abzentrifugieren (1500rpm, 4°C, 1min pro 2ml)
- Überstand verwerfen, Pellet in 500µl MACS-Puffer resuspendieren;
- 5ml **Ery-Lyse-Puffer zugeben**; Inkubation: 5min bei RT,
- Abstoppen durch Zugabe von 5 ml MACS-Puffer
- Zellsuspension erneut durch **70µm cell-strainer** in 50ml Falcon filtern und mit MACS-Puffer auffüllen
- Zellen zählen
- Abzentrifugieren: (1500rpm, 4°C, 1min pro 2ml)
- weiter mit FACS-Färbung