

Präparation von Zellkernen aus humanem Gehirn

Stammlösungen:

0,5 M NaEDTA pH 8.0	1 M KCl
10% Triton X-100	1M MgAcetat
1 M DTT	1 M Tris-HCl pH 7,2
1M CaCl ₂	1 M Tris pH 8.0
1M MgCl ₂	

Arbeitslösungen:

Lysispuffer:

0,32 M Saccharose

5 mM CaCl₂

3 mM MgAcetat

0,1 mM NaEDTA

10 mM Tris pH 8.0

0,1 % Triton X-100

1 mM DTT

DTT und Triton X-100 werden immer frisch, d.h. unmittelbar vor der Präparation hinzugefügt.

Saccharoselösung

1,7 M Saccharose

3mM Mg Acetat

10 M Tris pH 8.0

1 mM DTT (*frisch d.h. unmittelbar vor der Präparation zugeben*)

NBS-Lösung

15% Saccharose

70 mM KCl

2 mM MgCl₂

10 mM Tris pH 7,2

1% BSA in PBS

Präparation: 1 Ansatz ≈ 1g Gewebe

(Proben und Lösungen werden auf Eis gelagert)

- Ultrazentrifugenröhrchen (Füllmenge 37 ml) werden mit 1% BSA (in PBS) beschichtet und anschließend mit 9,3 ml Saccharoselösung befüllt.
- Die Gewebeprobe wird auf Eis aufgetaut, mit einem Skalpell zerkleinert und in einem Dounce-Homogenisator zusammen mit 9,3 ml Lysepuffer homogenisiert (erst LOOSE dann TIGHT).
- Das Homogenat wird in ein mit 18,5 ml Saccharoselösung befülltes Falcon gegeben, durch Schwenken vorsichtig gemischt und dann auf die im Zentrifugenröhrchen vorgelegten 9,3 ml Saccharoselsg gegossen. Es entstehen 2 Phasen.
- Zentrifugation 26.500 g, 4 °C, 2:25 h, Ausschwingrotor, langsames Abbremsen
- Nach der Zentrifugation wird der Überstand abgekippt. Die Zentrifugenröhrchen werden mit einem Papiertuch von innen gründlich ausgewischt.
- Das Pellet wird in 1 ml NBS-Lösung vorsichtig resuspendiert und anschließend über ein 40 µm Zellsieb geben.
- Für die Färbung wird ein mit Alexa 647 gekoppelter NeuN-Antikörper (MAB377 Merck millipore/Invitrogen Alexa Fluor 647 monoclonal AB labeling kit) in einer Endkonzentration von 1: 1000 eingesetzt. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4°C.
- Vor der FACS-Analyse werden die benötigten Auffangröhrchen mit 1% BSA beschichtet.
- Die Zellkernsuspension wird bei 500 g, 10 min 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in ca. 1 ml PBS aufgenommen. Unmittelbar vor dem FACS wird 5 mM EDTA zu den Zellkernen gegeben. Die Probe wird nochmals gefiltert zuerst mit einem 100 µm und anschließend mit einem 30µm Zellsieb.
- Nach der FACS-Analyse werden die Zellkerne bei 1500 g, 4°C, 15 min pelletiert und bei -20°C gelagert.