

Isolierung aus Colon nach Miltenyi Biotec

Lösungen:

EDTA, 0,5 mol/L

MilliQ-H ₂ O	100	mL	
EDTA	18,6	g	0,5

Mit NaOH Plätzchen auf pH = 8 einstellen.

HEPES, 1 mol/L

MilliQ-H ₂ O	100	mL	
Hepes	37,2	g	

HBSS w/o

HBSS	500	mL	
Hepes (1 mol/L)	5	mL	10 mmol/L

HBSS w

HBSS w/o	500	mL	
CaCl ₂	92,5	mg	
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	98,5	mg	

Vorverdau-Puffer (je Probe 2x 20 mL)

HBSS w/o	40	mL	
EDTA, 0,5 M	0,4	mL	5 mmol/L
FCS	2	mL	5 % (v/v)

Kleine Menge des Vorverdau-Puffers abfüllen und DTT darin lösen. DTT-Lösung erst kurz vor Pufferverwendung zugeben

DTT	6,17	mg → 40µl	1 mmol/L
-----	------	-----------	----------

PB-Puffer

PBS (pH = 7,2)	500	mL	
BSA	2,5	g	0,5 % (w/v)

Verdaupuffer (je Probe 2,5 mL)

HBSS w	2,35	mL	
FCS	117,5	µL	5 % (v/v)

Puffer auf 37°C Vorwärmen

Enzym D	100	µL	
Enzym R	50	µL	
Enzym A	12,5	µL	

FACS-Puffer

PBS (pH = 7,2)	500	mL	
FCS	10	mL	2 % (v/v)

Durchführung:

a) Lamina Propria Dissoziation:

Nach: Miltenyi Biotec – Lamina Propria Dissociation Kit mouse/ s.a. Martina

- **Zentrifuge und Schüttler reservieren und schau das Zentrifuge RT hat!!!**
- **Maximal 2 Mäuse poolen ab Verdauschritt**

1. Vorverdaupuffer herstellen
2. Präparation des Kolons
 - Kolon aus Maus in Petrischale mit HBSS w/o legen
 - Kolon mit HBSS w/o in hohem Gefäß mit 10 ml Spritze spülen (Darminhalt entfernen)
 - Zum Entfernen von Fett, Blutgefäßen, Peyer'sche Plaques Darm auf HBSS w/o getränkten Whatman-Papier rollen und überflüssiges Gewebe abschneiden, Achtung Gewebe nicht trocken fallen lassen
 - Kolon lateral aufschneiden und in Petrischale mit Pinzette hin und her schütteln um Mucus zu entfernen, wdh in frischen HBSS w/o und gewaschenes Kolon in 0,5 cm große Stücke in Falcon mit 20 ml Vorverdaupuffer in 50ml Falcon zerschneiden
 - Alternativ: Kolon 2x in ca. 10 mL HBSS w/o zur Entfernung des Mucus durch vortexen (20 s) spülen (50 mL Falcon)
Pufferwechsel: Kolon in Petrischale zwischenlagern; Leeres Falcon auf Zellstoff ausklopfen; frischen Puffer einfüllen
3. **1. Vorverdau:**
Inkubation: 20 min, 37°C, Schüttler (Brutschrank)
Kolon 10 s vortexen
4. Vorverdau-Puffer mittels autoklavierten, 100 µm Falcon-Filter (gelbe) (mit 5 mL HBSS w/o anfeuchten) in ein leeres 50 mL Falcon abnehmen
Kolon-Stücke verbleiben im Filter
Durchlauf enthält intra-epitheliale Lymphozyten (IEL); ggf. auf Eis stellen für weitere Analysen, ansonsten verwerfen
5. **2. Vorverdau:** Kolon-Stücke in frischen 20 mL Vorverdau-Puffer (50 mL Falcon) überführen
Inkubation: 20 min, 37°C, Schüttler (Brutschrank)
Kolon 10 s vortexen
6. Während Inkubation Verdaupuffer ansetzen und **ohne Enzyme** in Brutschrank erwärmen
7. Vorverdau-Puffer mittels autoklavierten, 100 µm Falcon-Filter (mit 5 mL HBSS w/o anfeuchten) in ein 50 mL Falcon abnehmen
Lamina propria Stücke verbleiben im Filter
Durchlauf enthält IEL, für weitere Analysen mit IEL-Fraktion aus 3. poolen, ansonsten verwerfen
8. **Waschschritt:** Lamina propria Stücke in 20 mL HBSS w/o (50 mL Falcon) überführen
Inkubation: 20 min, 37°C, Schüttler (Brutschrank)
Lamina propria 10 s vortexen
Verdaupuffer mit Enzymen versetzen und mischen
Percoll aus Kühlschrank holen

9. HBSS w/o mittels autoklavierten 100 µm Falcon-Filter (mit 5 mL HBSS w/o anfeuchten) in ein 50 mL Falcon abnehmen.
Lamina propria Stücke verbleiben im Filter
10. **Verdau:** Lamina propria Stücke in 2,5 mL fertigen Verdaupuffer in gentleMACS C Tubes überführen
Inkubation: 30 min, 37°C, Schüttler (Brutschrank)
Während Verdau Milz für Einzelfärbung für die Kompensation isolieren
11. C Tube fest schließen und Kopf über auf den gentleMACS Dissociator stellen (Probe muss sich am Rotor/Stator befinden)
Programm: m_intestine_01; 3 Mal wiederholen
schaun ob es gelöst ist
12. 10 mL PB-Puffer zur Probe geben.
Probe mittels FRISCHEN 100 µm Falcon-Filter (mit 5 mL PB-Puffer anfeuchten) in ein 50 mL Falcon filtrieren.
C Tube mit weiteren 10 mL PB-Puffer spülen und über den Filter geben.
Filter mit 5 mL PB-Puffer spülen.
Zentrifugation: 20 min, 400 g, 4°C
Überstand mit **Pipette abnehmen** und verwerfen.
Hier in 15 ml Falcon 5 ml 80% Percoll vorlegen
13. Zellen in 1 mL 40 % Percoll resuspendieren und im Anschluss auf 10 mL 40 % Percoll auffüllen
Zellen überschichten (Pipette langsam, Flüssigkeitsbrücke, Falcon schräg halten)
Zentrifugation: 20 min, 2600 rpm, RT, OHNE Bremse (dauert ca. 45 min)
14. 40% Percoll mit 5 ml Pipette abnehmen bis 1 cm über Zellring und verwerfen.
Ring mit 10 ml Pipette abnehmen, ca. 3 mL verbleiben im Röhrchen (Sediment (= „Dreck“) NICHT mit aufnehmen!!) und in neues 50 mL Falcon geben
15. Zellen mit 20 mL FACS-Puffer oder PB-Puffer spülen.
Zentrifugation: 10 min, 400 g, 4°C
16. Für Zellzahlbestimmung Zellen in gewünschtem Volumen FACS-Puffer aufnehmen (ca. 2ml).

Zellen zählen.