

Aufreinigung von CD19-positiven Zellen (Optimiert für Zellsortierungen)

- 3ml Verdauungslösung (37°C) in ZK-Schale (6well-Platte) **vorlegen** und 70µm cell-strainer einsetzen.
- Maus töten und Milz (und ggf. Lymphknoten) entnehmen
- Milz in 70µm cell-strainer in ZK-Schale (6well-Platte) überführen und grob zerkleinern.
- 60 Minuten Inkubation bei 37°C.
- 100µl 0,5M EDTA zugeben um Verdauung zu stoppen (5 Minuten Inkubation).
- Zellen mit planarem Stempel vorsichtig und schonend durch 70µm cell-strainer passieren.
- Einzelzellsuspension in **15ml Rundboden-MACS-Röhrchen** überführen und abzentrifugieren (1400rpm, 4°C, 10min)
- 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 (Zellen für FACS-Färbung entnehmen)
- Abzentrifugieren: (1400rpm, 4°C, 10min)

OPTIONAL: CD4/ CD8-Depletion

Pellet in 5ml R10+2ml anti-CD4+ 2ml anti-CD8 ZK-ÜS resuspendieren und 10min bei 37°C inkubieren.

Währenddessen Low-Tox Rabbit Complement mit 1ml Wasser pro tube resuspendieren (eiskalt!!!)

1ml Komplement zu Zellen geben, 45min bei 37°C

durch 70µm Filter in 15ml Rundbodentubes filtern und mit 2 ml Ficoll unterschichten, 20min, 2000rpm, 20°C **OHNE BREMSE!!!!** zentrifugieren

Lymphozyten-Ring abziehen und in 20 ml MACS-Puffer waschen,

Zellen zählen (Zellen für FACS-Färbung entnehmen)

1min pro 2ml zentrifugieren 1500rpm, 4°C

- Aufnehmen in MACS-Puffer: **90µl MACS-Puffer pro 1*10⁷ Zellen**
- Zugabe der CD19-MicroBeads: **10µl CD19-MicroBeads pro 1*10⁷ Zellen**
- Inkubation für 15min bei 4°C
- 20ml MACS-Puffer zu Zellen geben und abzentrifugieren
(1400rpm, 4°C, 10min)
- MACS-Säule (LS+/VS+ bis 10⁸ positive Zellen) mit 3 ml MACS-Puffer equilibrieren
- Pellet in 500 µl MACS-Puffer resuspendieren und mit 500µl MACS-Puffer durch **70µm-Sieb** in 15ml-Falcon spülen
- 1ml auf Säule (**im Magneten!!!**) auftragen
- Säule 3mal mit 500µl und 3mal mit 3ml MACS-Puffer spülen
(⇒ DURCHLAUF)
- Säule aus Magneten nehmen (neues Auffangröhrchen!!)
- 1mal mit 5ml MACS-Puffer unter Druck (Spritze) ausspülen
(⇒ POSITIVE ZELLEN)
- Zellen zählen (Zellen für FACS-Färbung entnehmen)

Verwendete 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

Verdauungslösung: - Hanks-Puffer + 2% FCS..... (19,6ml Hanks + 400ul FCS)
 - Kollagenase D 20mg (1mg/ml final)
 - DNase I 200µl (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)

LOW-TOX-M RABBIT COMPLEMENT Artikelnr.:CL3051
Lympholyte-M (CEDARLANE) Artikelnr.:CL5030
Ratte IgM anti Maus CD4 (Ceredig et al., 1985) Klon 174.2

Ratte IgM anti Maus CD8 (Ceredig et al., 1985)

**K
l
o
n

3
1
-
6
8**