

Universität Heidelberg- IBF/ Biotechnologie Labor

Frank Zimmermann, INF 347, D-69120 Heidelberg, Phone: +49-6221-546883, Fax: +49-6221-545705,
E-Mail: frank.zimmermann@urz.uni-hd.de

ES-Zell- (R1) Präparation für die Blastozysteninjektion (Kurzversion)

3.5-3 Tage vor Injektion	- 1 Vial (4x10 ⁶) Mito C-Feeder auf 3x6 cm plattieren
2.5 Tage vor Injektion	- 1 Vial (5x10 ⁶) ES-Zellen auf 1x6 cm Feederplatte plattieren
1.5 Tage vor Injektion	- Splitten der subkonfluenten 6 cm ES-Zellplatte auf 2x6 cm Feederplatte im Verhältnis 1/3 und 2/3
Injektionstag	- Auswahl der passenden Platte - Sind die Kolonien zu dicht gewachsen, leidet die Qualität der Zellen - Sind zu wenig Zellen auf der Platte, ergibt sich ein ungünstiges ES-Zell-Feeder Verhältnis (erschwert die ES-Zell-Anreicherung)
06:30Uhr	
08:30Uhr	- Mediumwechsel 1-2 h vor der Ernte - Kulturplatte 2x mit PBS waschen - Trypsinisieren mit 1 ml Trypsin (Reaktion am Mikroskop verfolgen!) - Nach 3-8 min ES-Zellen mit polierter Pasteurpipette vereinzeln (auf/abpipettieren) - Abstoppen der Reaktion mit 1-2 ml Medium /auf/abpipettieren mit polierter Pasteurpipette - ES-Zellen mit 8 ml Medium resuspendieren - Für 5 min bei 1000 Rpm zentrifugieren - ES_zellen in 1 ml ES-Medium mit polierter Pasteurpipette resuspendieren - ES-Zellen in 5 ml ES-Medium auf gelatinisierter 6 cm Platte präplattieren - Nach 20-30 min Inkubation unter dem Mikroskop überprüfen
08:30	- Platte mit dem Überstand spülen und auf frische gelatinisierte 6 cm Platte plattieren - Nach 20-30 min Inkubation unter dem Mikroskop überprüfen
10:00Uhr	- Wenn noch deutlich zu viele Feeder-Zellen vorhanden sind, ein 3. Mal präplattieren - Platte mit dem Überstand spülen und Überstand abnehmen - Für 5 min bei 1000 Rpm zentrifugieren - ES-Zellen in 1 ml ES-Medium mit polierter Pasteurpipette resuspendieren

Universität Heidelberg- IBF/ Biotechnologie Labor

Frank Zimmermann, INF 347, D-69120 Heidelberg, Phone: +49-6221-546883, Fax: +49-6221-545705,
E-Mail: frank.zimmermann@urz.uni-hd.de

	<ul style="list-style-type: none">- 20 µl/ml ES-Medium 1M Hepes (Endkonzentration = - - 20 mM) + Pen/Strep- Abgabe der Zellen im BTL/IBF (Raum 1.60)- Transport und Übergabe der Zellen im klaren 1,5 ml Falcon tube (einwandfreie, lesbare Beschriftung!) auf Flockeneiswasser- Ebenfalls abgeben: vollständig ausgefülltes Formblatt
--	--