

## Natrium – Messung im Fluoromax-3

file: Natrium\_Messung\_Ablauf.doc

1. Wasserbad und Heizung am Gerät anschalten
2. CoroNa green-AM (MW 657,52 g/mol) vorbereiten (50 µg ( $7,6 \times 10^{-8}$  mol) CoroNa + 50 µl DMSO - wasserfrei), Stammkonzentration:  $1,52 \times 10^{-3}$  mol/l, dunkel bei RT lagern!
3. LBS-Arbeitslösung ansetzen (100 ml LBS-Stammlösung + 0,108 g Glukose im Polycarbonat – Erlenmeyerkolben + 1 ml CaCl<sub>2</sub> Stammlösung aus CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O (130 mmol/l) → 1,3 mmol/l (physiologisch)
4. LBS-Arbeitslösung ins Wasserbad stellen
5. Zellen ernten
  - a. Medium mit Pasteur – Pipetten abnehmen und in 70% Alkohol geben
  - b. 500 µl Trypsin (mit EDTA) gleichmäßig über Zellen verteilen
  - c. bis zu 15 min bei 37 °C inkubieren
  - d. Zellen durch Aufziehen in und Ausdrücken aus der 1 ml-Pipette suspendieren und in 1,5 ml Eppi überführen
6. Zentrifugation (2 min bei 2.000 rpm) in der Eppendorf-Zentrifuge und Überstand dekantieren
7. Zellen 1 x in 750 µl LBS waschen
8. Zellen resuspendieren in 750 µl LBS und weitere 750 µl LBS hinzufügen, Ansatz teilen
9. 750 µl Zellsuspension in 2 ml Eppi mit vorlegten 3,7 µl CoroNa geben und 20 min im Dunkeln bei 37 °C inkubieren (Schüttelplattform im Gewebeinkubator), End- Konz. CoroNa-green-AM:  $1,9 \times 10^{-6}$  mol/l
10. das andere 750 µl-Aliquot der Zellsuspension im Dunkeln für weiteren Ansatz im Dunkeln bei 37 °C inkubieren (Schüttelplattform im Gewebeinkubator)
11. CoroNa-beladene Zellen zentrifugieren, in 750 µl LBS resuspendieren und für weitere 20 min inkubieren (recovery period)
12. Zellen des zweiten Aliquots mit Farbstoff beladen und 20 min inkubieren (Schritte 9-11)
13. 3 ml LBS in Methacrylatküvette + Rührfisch (Stellung 8) geben und zum Vorwärmen ins Gerät stellen
14. ersten Ansatz zentrifugieren und 2 x mit 750 µl LBS waschen
  - a. Zellen nach dem 2. Waschen in LBS aus der Küvette resuspendieren und die Suspension in die Küvette überführen
15. Messung starten
  - a. Messprotokoll abarbeiten, am Ende zur Überprüfung der Farbstoff-Beladung der Zellen Gramacidin zugeben (3 µl), End-Konz.:  $1 \times 10^{-6}$  mol/l
  - b. Fluoreszenz über 10 min aufzeichnen
16. Versuch beenden, Rührfisch säubern, Küvette wegwerfen

Lösungen:

Gramacidin : Taue 1 aliquot (10 mg/ml) auf, addiere davon 50 µl zu 200 µl wasserfreiem DMSO → Endkonzentration 1 µmol/l

LBS-Stammlösung:

Natriumchlorid	132,5 mmol / l	7,74 g / l
Kaliumchlorid	4,8 mmol / l	0,36 g / l
Magnesiumchlorid · 6 H <sub>2</sub> O	1,2 mmol / l	0,24 g / l
Kaliumdihydrogenphosphat	1,2 mmol / l	0,16 g / l
HEPES freie Säure	5,95 mmol / l	1,42 g / l
HEPES, Natriumsalz	9,05 mmol / l	2,36 g / l

→ Lagere bei 4 °C

Messung:

Erst Gerät anschalten (blaue Lampe muss leuchten)

Dann erst Computer anschalten

(beim Ausschalten anders herum)

Zunächst ist an jedem Versuchstag ein Routinecheck des Gerätes durchzuführen wie in der Datei „Na-Messung mit dem Fluoromax-3“ beschrieben.