

VOORSCHRIFTEN:

Laboratorium voor

**EXPERIMENTELE
IMMUNO-BIOLOGIE**

1. = Preparation of a lymphocyte suspension for lymphocyte cytotoxicity, or frozen storage
2. = Lymphocyten bereiding rat
3. = Mitomycin C treatment of lymphocytes for one-way stimulation in lymphocyte cultures
4. = Oog plexus punctie rat 2 pag.
5. = Selectieve erythrocyten agglutinatie
6. = Preservation of lymphocytes at cryogenic temperatures 2 pag.
7. = Instant tissue culture powder medium
8. = Invriezen tumor celsuspensie
9. = Trypsinatie cellen in suspensie (Lymphocyten of fibroblasten)
10. = Micro cytotoxie ratte lymphocyten
11. = Thymocyten bereiding ratten
12. = Mixed haemadsorptie 2 pag.
13. = Treatment of the cells for DNA-synthesis determination
14. = Lymphocyte culture for determination of ALS activity
15. = Preparation of the lymphocyte suspension for lymphocyte cultures

PREPARATION OF A LYMPHOCYTE SUSPENSION FOR LYMPHOCYTE CYTOTOXICITY,
OR FROZEN STORAGE

- =====
- 1) Venous heparinized blood - heparin without preservative
 "Thromboliquine" (Organon, Oss, Holland)
 8 ml 1:20 in saline
 per 500 ml of blood

 - 2) Removal of the granulocytes by filtration through nylon wool
 either "Leucopak" (Fenwall Laboratory
 Morton Grove, Ill. USA)
 or "Filtralon" (ARA, Amsterdam, Holland)

 - 3) Sedimentation of the red cells at $37^{\circ}\text{C} + 45-60$ min.
 either spontaneously
 or after addition of $\frac{1}{4}$ vol. 5% Dextran
 (MW 180.000 Poviet, Amsterdam)

 - 4) Centrifugation of the lymphocyte rich plasma 10 min 400 G

 - 5) Two washings in Earle's BSS with 10% human AB serum 2 x 10 min
 260 G

 - 6) Resuspension in the media to be used afterwards

 - 7) Cell counting (for quantitative lymphocyte culture experiments
 electronic counting is required)

 - 8) Resuspension to the finally required concentration

LYMPHOCYTEN BEREIDING RAT
=====

b.v. voor cytotoxie

Afnemen in zeer grote overmaat heparine 1:20

b.v. + 1 dl heparine 1:20/5 dln bloed.

Filtreren door voorgespoelde Fenwal kolom, opvangen in zout (Earle's) met heparine 1:20.

Totaal volume bloed moet aldus zeker 2-3 x verdund worden anders zakt dit zeer slecht uit met dextran.

Gelijk volume dextran (5%) toevoegen. (+ 1 dl verdund bloed/1 dl dextran).

Uitzakken 30', 37°C.

Afdraaien 1600 rpm, 10' (ratte-lymphocyten zijn kleiner dan humane).

Verder wassen analoog aan humane lymphocyten.

MITOMYCIN C TREATMENT OF LYMPHOCYTES FOR ONE-WAY STIMULATION
IN LYMPHOCYTE CULTURES

=====

The lymphocytes are resuspended in Earle's B.S.S. with mitomycin C (Christiaens, SA, Brussels). Final cell concentration 10×10^6 /ml

Final mitomycin C concentration

12.5 μ g/ml.

Incubation for 30 min. at 37°C.

The cells are spun down, washed once in Earle's B.S.S. (260 x G 10 min), and resuspended in tissue culture medium to a final concentration of 750,000/ml.

In our experiments we culture $1,5 \times 10^6$ mitomycin treated cells together with $1,5 \times 10^6$ non-treated cells from the other donor per tube.

OOG PLEXUS PUNCTIE RAT

NODIG :

1. Etherpot + ether
2. narcosekapje
3. dikke pasteurse pipetten, afgezaagd tot 1 à 2 cm van de verdikking en ietwat ruw gelaten
4. pasteurse pipet spoelen met heparine onverdund en in het puntje iets heparine laten zitten
of
onverdunde heparine erin en daarna in laten drogen in broedstoof
5. Kleenex tissues

Rat narcotiseren en onder narcose houden met narcosekapje

N.B. (Chloralhydraat narcose is vaak net niet diep genoeg ———
hevige reactie bij punctie)

Met afgezaagde pipet in mediale ooghoek langs oogbol naar binnen dringen terwijl een pipet steeds gedraaid wordt.

Met linkerhand hals van rat stevig op de tafel duwen waardoor gestuwd wordt ——— ogen puilen uit.

Pipet doorduwen totdat zacht krassen gevoeld wordt. Door te blijven stuwen vult de pipet zich vanzelf.

(Pipet niet terugtrekken tijdens vullen want dan loopt het bloed er langs)

Bij beëindigen eerst ontstuwen, met linkerhand tissue pakken en direct op het oog drukken wanneer de pipet verwijderd wordt, waarbij met de rechter wijsvinger het uiteinde van de pipet dichtgehouden wordt om leeglopen te voorkomen.

Met enige handigheid is het mogelijk zo 2 à 3 pipetten geheel te vullen uit één oog-plexus (totale opbrengst dan + 6 à 10 ml).

Methode ook geschikt voor bepalen Hb, Hc, Hp, erythrocyten, leucocyten etc. Wanneer al deze bepalingen gedaan moeten worden, beginnen met vullen van afgezaagd capillair (enkele stuks voor Hc, na afdraaien bruikbaar voor serum).

Hb, erythrocyten, leucocyten worden afgezogen met droog gehepariniseerde Sahli volume-pipetten (disposable), gebruik makend van zuigslangetje. Iedere pipet direct na opzuigen met tissue op volume brengen en direct uitblazen in desbetreffende vloeistoffen.

Telkens na iedere pipet weer ontstuwen, bij stuwen gaat bloed direct weer vloeien voor de volgende afname.

De reproduceerbaarheid van de bepalingen is zeer redelijk mits ter plaatse direct in suspensie-vloeistoffen gebracht daar stolling in Sahli capillairen toch snel optreedt.

SELECTIEVE ERYTHROCYTEN AGGLUTINATIE
=====Kip anti-Ratte erythrocyten serum

Kip i.v. 3 x een immunisatie met 1 ml 25-30% packed ratte erythrocyten (goed gewassen) met tussenperiodes van 1 week.

- 7 - 10 dagen na laatste booster verbloed en serum geïnactiveerd
- Verdunning bepaald waarbij totale agglutinatie nog niet optreedt.
- Kip anti-rat serum met enige zekerheidsmarge verdund en uitgevuld in kleine volumina geschikt voor 1 x agglutineren (b.v. 1-2 ml)

N.B. Bij bepaalde verdunning 1/40 wordt b.v. uitgevuld 1/25 i.v.m. iets verdere verdunning door celsediment.

Methode

Ratte lymphocyten (gecontamineerd met erythrocyten) suspensie afdraaien, supernatant weg.

1 ml kip anti-rat erop pipetteren: mengen 20', 37°C incuberen, daarna 5' centrifugeren 1600 rpm, geagglutineerd sediment met grote pasteurse pipet opbrokkelen en filtreren via klein voorgespoeld (kip anti-rat) viswatten kolommetje (pasteurse pipet met + 1 cm viswatten gevuld) Naspoelen met kip anti-ratte serum, nogmaals centrifugeren 10', 1600 rpm. Moet nu erythrocyten-vrij zijn. Indien niet weer opbrokkelen en direct opnieuw filtreren en afdraaien (2e incubatie onnodig).

PRESERVATION OF LYMPHOCYTES AT CRYOGENIC TEMPERATURES
=====

1. Equipment

A Linde BF3-2 freezer, a Linde LS-160-B pressure vessel, a Siemens controller (Lichtelektrischer Zeitpl angeber 192 x 288 mit Zehnganggetriebe M122, Siemens & Halske A.G. - Karlsruhe), a Union Carbide Refrigerator LNR-250.

2. Preparation of the lymphocyte suspension

Venous heparinized blood is used (heparin without preservative e.g. "Thromboliquine" Organon, Oss, Holland) 8 ml 1:20 in saline solution per 500 ml blood. The removal of the granulocytes is accomplished by filtration through "Leukopak" filters (Fenwal Laboratories, Morton Grove, Illinois, USA) at 37°C.

Sedimentation of the red cells is performed at 37°C for 30 - 45 minutes, after addition of 1/4 vol. 5% Dextran (molecular weight 180,000 N.V. Poviet, Amsterdam); then centrifugation of the lymphocyte-rich plasma for 10 minutes at 400 g. followed by two washings in Hanks Balanced Salt Solution for 10 minutes at 400 g. Resuspend the cells in Hanks BSS with 10% normal AB serum and 10% DMSO. The concentration of the cells seems not to be critical. The cell suspension is handled at temperatures of melting ice until the cooling process has started.

The cell suspension is put either in glass sealed 2 ml ampules or in straws holding 1.1 ml. The ampules of these straws are put in racks in the BF3-2 freezer and special care should be taken that enough environmental space is present to guarantee a good heat exchange.

The lymphocytes are cooled at 1°C per minute till -25°C , next 5-7 degrees per minute till -80°C and then the cells are transferred into the liquid nitrogen. In our system, the input of liquid nitrogen is controlled by the Siemens controller and the thermal probe is only used to record that particular cooling rate in the ampule. There is no feed-back from this probe.

The program of our controller is chosen in such a way that a complete or nearly complete compensation of the heat exchange is achieved and that the cooling rates mentioned earlier are maintained. The thawing of the cells is done by immersion in a waterbath at 37°C .

Once the icenucleus has disappeared the suspension is transferred to a tube or a small Erlenmeyer flask and diluted slowly (which is very important) with Hanks BSS with 10% AB serum. After dilution 1:10 with the final concentration of DMO 1%, the cells are spun down and resuspended in either fresh complement or another appropriate vehicle.

INSTANT TISSUE CULTURE POWDER MEDIUM
=====

To prepare IX Liquid Medium

- 1) Measure out 5% less water (triple distilled) than desired total volume of medium. Using a mixing container that is as close to the final volume as possible.
- 2) Add powder medium to 15-20C. (room temperature) water with gentle stirring (do not heat water)
- 3) Rinse out inside of package to remove all traces of powder medium.
- 4) Add 2,2 gms. of NaHCO_3 per liter of medium.
- 5) Dilute to desired volume with water. Stir until dissolved. (do not over-mix)
- 6) Adjust pH of medium to 0.2-0.3 below desired final working pH*; use of 1N NaOH or CO_2 gas is recommended. (add slowly with stirring). After pH has been adjusted, keep container closed until medium is filtered.
- 7) Sterilize immediately by membrane filtration (air pressure system recommended).

* pH units will usually rise 0.1-0.3 upon filtration

If TRIS-HCl buffer is preferred instead of bicarbonate:

Take 15 grams TRIS, add 9.2 cc HCl 36% and dilute with saline to 100 ml. Add 20 ml of this solution to 1000 ml of MEM.
Adjust to final pH with NaOH.

INVRIEZEN TUMOR CELSUSPENSIE
=====Methode I

- a) Voeg aan sediment gelijk volume zout toe
- b) Voeg aan dit mengsel een gelijk volume vriesmedium toe
- c) Vul ampullen en vries in

Methode II

- a) Verdun celsediment ongeveer 4 x met zout. Resuspendeer.
Neem een monster (2 à 3 druppels) voor microhematocriet bepaling.
- b) Centrifugeer
- c) Breng aan de hand van de microhematocriet-waarde de celconcentratie op ongeveer 25% (in compleet vriesmedium)
- d) Vul ampullen en vries in.

Methode III

- a) Bepaal microhematocriet
- b) Neem van het sediment 0,5 cc p. cells (vries de rest in als methode II)
- c) Resuspendeer 0,5 cc p. cells in 15 ml zout (fysiologisch)
- d) Voeg hieraan 20 ml 0,1% konijn γ -globuline oplossing toe
- e) Voeg 5 ml bisdiazobenzidine 1 op 16 in zout toe aan het cellen- γ -globuline mengsel
- f) Incubeer 10 min. K.T.
- g) Centrifugeer (10' 1200 rpm)
Was 2 x met fysiologisch zout
- h) Resuspendeer in 20 ml vriesmedium
- i) Neem hiervan een monster à 0,1 ml voor steriliteits-controle
- k) Vul ampullen en vries in.

TRYP SINATIE CELLEN IN SUSPENSIE (LYMPHOCYTEN OF FIBROBLASTEN)
=====

- cel-concentratie 50×10^6 /ml
- Trypsine 0.5% + EDTA 0.25%

Mengen 1 dl Trypsine/EDTA
+ 4 dln celsuspensie

Uiteindelijke concentratie wordt
 40×10^6 cellen/ml
0.1% Trypsine + 0.05% EDTA

Mengsel 20', 37°C na goed schudden incuberen.

Tijdens incubatie af en toe schudden.

Na incubatie + 1 dl serum toevoegen en direct goed schudden.

(Er ontstaat een slijm-klont)

Filtreren over zeer los gestopte Fenwal (viswatten) filter waarbij de gel-klont als laatste er op gedaan wordt (verstopt zeer snel het filter!)

Naspoelen met Earle's, Betel of gebufferd zout.

Afdraaien etc.

N.B. vooral gel-klont niet door filter persen omdat bij verder wassen en afdraaien dan weer gel-vorming optreedt.

Opbrengst : + 50 - 70% van de uitgangssuspensie.

MICRO CYTOTOXIE RATTE LYMPHOCYTEN

Techniek gelijk aan humane techniek.

C' bron gelijke delen : Ratte C'
Konijne C'

(MC' geeft aspecifieke cytotoxie)

THYMOCYTEN BEREIDING RATTEN

=====

- Grootste opbrengst uit ratten van + 2 à 3 maanden oud.
- Schoonmaken onder operatie-microscoop
- Filtreren via 4 nylongaasjes uit infuussysteem in een trechttertje, doorwrijven met glazen staafje en spoelen met Krebs-Ringer volgens Betel (zie onder) *
- Nogmaals filtreren via z.g. "fliebervanger" gevuld met viswatten.

Geen Earle's of zout maar Betel gebruiken in alle fasen van de bereiding, anders gel-vorming.

*

0.009 M Tris
.130 M NaCl
.0044 M K Cl
.003 M CaCl ₂
.0011 M MgSO ₄
pH 7.4

MIXED HAEMADSORPTIE

=====

Toegepast voor het aantonen van antistoffen in konijn serum, gericht tegen fibroblasten van W.A.G. ratten.

I. Bereiding van indicator cellen

a. Erythrocyten

Schape erythrocyten worden 4x gewassen in een overmaat fosfaat gebufferd zout, waarna geresuspendeerd tot een 2% suspensie in fosfaat gebufferd zout.

b. Het coaten van de schape erythrocyten met de amboceptor.

Als amboceptor wordt gebruikt een product van de Difco Laboratories "Bacto antisheep haemolysin glycerinated". De agglutinatie titer van de amboceptor wordt bepaald in een 2% suspensie van gewassen schape erythrocyten en men gebruikt de amboceptor in die concentratie die nog juist een agglutinatie geeft (1:800).

Een mengsel van gelijke hoeveelheden van een 2% suspensie van schape erythrocyten en amboceptor 1:800 wordt 1 uur bij kamertemperatuur geplaatst. De erythrocyten worden vervolgens gesedimenteerd met behulp van centrifugeren (1600 toeren gedurende 5') waarna 3 x gewassen in een overmaat fosfaat gebufferd zout en geresuspendeerd tot een 2% suspensie in fosfaat gebufferd zout.

c. Het coaten van de sub b bereide schape erythrocyten met anti-konijn- γ -globuline.

Gebruikt wordt het anti-konijn IgG, bereid op de afdeling Immunochemie van het CLB. Om de vereiste concentratie te bereiken, titreert men het antiglobuline serum tegen 2% suspensie van met amboceptor gecoate schape erythrocyten, en gebruikt het in die concentratie waar men nog een maximale agglutinatie aantreft (1:20).

Een mengsel van gelijke hoeveelheden van een 2% suspensie van sub c bereide schape erythrocyten en anti-konijn IgG wordt 2 uur bij kamertemperatuur geplaatst. Na centrifugeren worden de cellen 1 x gewassen in een overmaat fosfaat gebufferd zout en daarna geresuspendeerd tot een 0,5% suspensie.

II. Bewerking van de fibroblastenkweek

Een monolayer met fibroblasten wordt getrypsineerd om de hechting aan de wand van de monolayer te verbreken. (trypsine 0,5%, EDTA 0,02%)
Na centrifugeren worden de fibroblasten in een paar cc kweekmedium geresuspendeerd en in speciale kweekkamertjes gepipetteerd. Deze plaatst men ongeveer 24 uur bij 37°C zodat de fibroblasten zich aan de wand hechten en zich niet gaan strekken.

III. Uitvoering van de mixed haemadsorptie

Het kweekkamertje wordt 2 x gewassen in fosfaat gebufferd zout. Vervolgens wordt het antiserum in een bepaalde verdunningsreeks in de kleine kweekruimte gepipetteerd en het kamertje 1 uur bij kamer-temperatuur geplaatst. Dan dompelt men het kamertje 3 x in fosfaat gebufferd zout en druppelt de indicatorcellen in een 0,5% suspensie in de kleine kweekruimte.
Na $\frac{1}{2}$ tot 1 uur dompelt men het kamertje 2 x in fosfaat gebufferd zout en leest het resultaat microscopisch af.

Samenvatting

- I. b. 1 deel 2% gewassen schape erythrocyten + 1 deel amboceptor(1:800)
1 uur bij K.T.
3 x gewassen in fosfaat gebufferd zout en weer geresuspendeerd in 1 deel fosfaat gebufferd zout.
- c. 1 deel met amboceptor gecoate schape erythrocyten + 1 deel anti-konijne IgG (1:20)
2 uur bij K.T.
1 x gewassen in fosfaat gebufferd zout en geresuspendeerd tot 0,5% suspensie.
- III. fibroblastenkweek:
2 x gewassen in fosfaat gebufferd zout.
toevoegen van geïnactiveerd antiserum
1 uur bij K.T.
3 x gewassen in fosfaat gebufferd zout
toevoegen van 0,5% indicator cellen ($\frac{1}{2}$ - 1 uur)
2 x gewassen in fosfaat gebufferd zout
microscopisch aflezen.

TREATMENT OF THE CELLS FOR DNA-SYNTHESIS DETERMINATION
=====

24 hours before harvesting - addition of 0.06 μ c thymidine-2-C₁₄
spec. act. 1.2 5 mC/mM per 4 ml culture

- harvesting - one washing in 2% acetic acid
- one washing in saline with 0.5% human AB serum
 - precipitation with 6 ml 10% TCA
 - centrifugation 10' on 3000 rpm
 - removal of the supernatant
 - to 0.6 ml of the sediment 0.3 ml 10% NaOH is added,
whereafter 3 ml cellosolve with 4% formic acid is added
 - this is transferred to a counting vial and the tube is
rinsed with another 3 ml cellosolve formic acid mixture
 - finally 40 ml of scintillation counting fluid is added to
the vial whereafter counting can be performed.

LYMPHOCYTE CULTURE FOR DETERMINATION OF ALS ACTIVITY
=====

Incubation of 0.4 ml cell suspension (containing 3×10^6 lymphocytes) with 0.4 ml of the ALS dilution for 2 hours at 37°C.

Either the cells are washed in excess Earle's BSS whereafter 4 ml of culture medium is added or the cell-serum mixture is diluted without washing with 3.5 ml of culture medium.

PREPARATION OF THE LYMPHOCYTE SUSPENSION FOR LYMPHOCYTE CULTURES
=====

Venous heparinized blood - Heparin without preservative, e.g.
"Thromboliquine" (Organon, OSS, Holland)
16 ml 1:20 in saline solution per 500 ml blood

Removal of the granulocytes by filtration through "Leucopak" filter
(Fenwall Lab., Morton Grove, Ill. USA) at 37°C

Sedimentation of the red cells at 37°C + 45 - 60 min.
either spontaneously
or after addition of 1/4 vol. 5% Dextran
(M.W. 180.000, N.V. Poviet, Amsterdam)

Centrifugation of lymphocyte-rich plasma 10 min. 400 g

Two washings in Hanks B.S.S. 2 x 10 min. 260 g

Resuspension: Minimum Essential Medium (Eagle) for suspension cultures
without L-glutamine (Grand Isl. Biol. Co. N.Y., USA)
+ 20% heat inactivated human AB
+ L-glutamine 0.1 mM/ml
+ penicillin 100 U/ml
+ streptomycin 100 ug/ml

Careful cell counting

Further resuspension in the abovementioned mixture to a final
concentration of 750.000 lymphocytes/ml