

Core Unit Cell Sorting and Immunomonitoring Erlangen

Hinweise zur Puffer-Wahl für Sortierungen

Zellkultur-Medien sind als Basis nur bedingt geeignet, da die pH-Pufferung nicht für normale atmosphärische Bedingungen ausgelegt ist und das Medium so sehr schnell basisch wird.

Calcium und Magnesiumfreies PBS oder HBSS ist daher die bessere Basis.

Für die Sortierung sollten Puffer verwendet werden, in denen die Zellen auch über einen längeren Zeitraum hinweg nicht verklumpen oder an den Gefäßwänden adhären. Die meisten Adhäsionsmoleküle benötigen Calcium oder Magnesium für ihre Funktion. Durch die Zugabe von EDTA kann dementsprechend Adhäsion verhindert werden.

Die meisten Zellen verkraften die Zugabe von 0,5mM bis zu 10mM EDTA relativ gut. Im Vorfeld sollte allerdings geprüft werden, inwiefern die Antigen-Antikörper-Bindung EDTA-Resistent ist

Sollte die auftretende Verklumpung nicht durch Adhäsion, sondern durch DNA aus toten Zellen auftreten (oft bei vorher kryokonservierten Proben oder NAF), dann ist die Zugabe von DNase sinnvoll.

Als Protein-Komponente empfiehlt sich bis zu 1% Serum (FCS oder HS), welches bei sehr klebrigen Zellen ggf. gegen $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ freies PBS dialysiert werden sollte. Alternativ kann auch BSA (0,5 – 1 %) verwendet werden.

Die Zellkonzentration sollte (je nach Zellmenge, Größe und verwendeter Nozzle) zwischen 5 und 15 Mio pro ml liegen. Zur einfachen Anpassung der Zellkonzentration ist es ratsam ein Röhrchen des Sort-Puffers mit zur Sortierung zu bringen.

Beim Auffangen der sortierten Zellen für weitere Kultivierung steht weniger das Verhindern von Verklumpungen, sondern eher die Förderung der Zellvitalität im Vordergrund. Es ist allerdings zu bedenken, dass das Auffangmedium durch das die Zelle umgebende Sheath-Fluid (PBS) verdünnt wird.

Bei kleinen Zellmengen ist Zellkultur-Medium ausreichend, bei längeren Sorts sollte allerdings zur besseren Pufferung HEPES zugesetzt werden.

Größere Zellmengen oder empfindliche Zellen können auch in Medium mit höherer Serumkonzentration bzw. reines Serum sortiert werden.