

PBMC Sort Protokoll

PANEL PBMCs

| | | Pro 100 mio |
|----------------|------|-------------|
| FITC | CD8 | 125 µl |
| PE | CD14 | 125 µl |
| PE-Cy7 | CD19 | 200 µl |
| APC | CD56 | 250 µl |
| APC-Cy7 | CD3 | 75 µl |
| BV421 | CD4 | 200 µl |

PANEL CD8

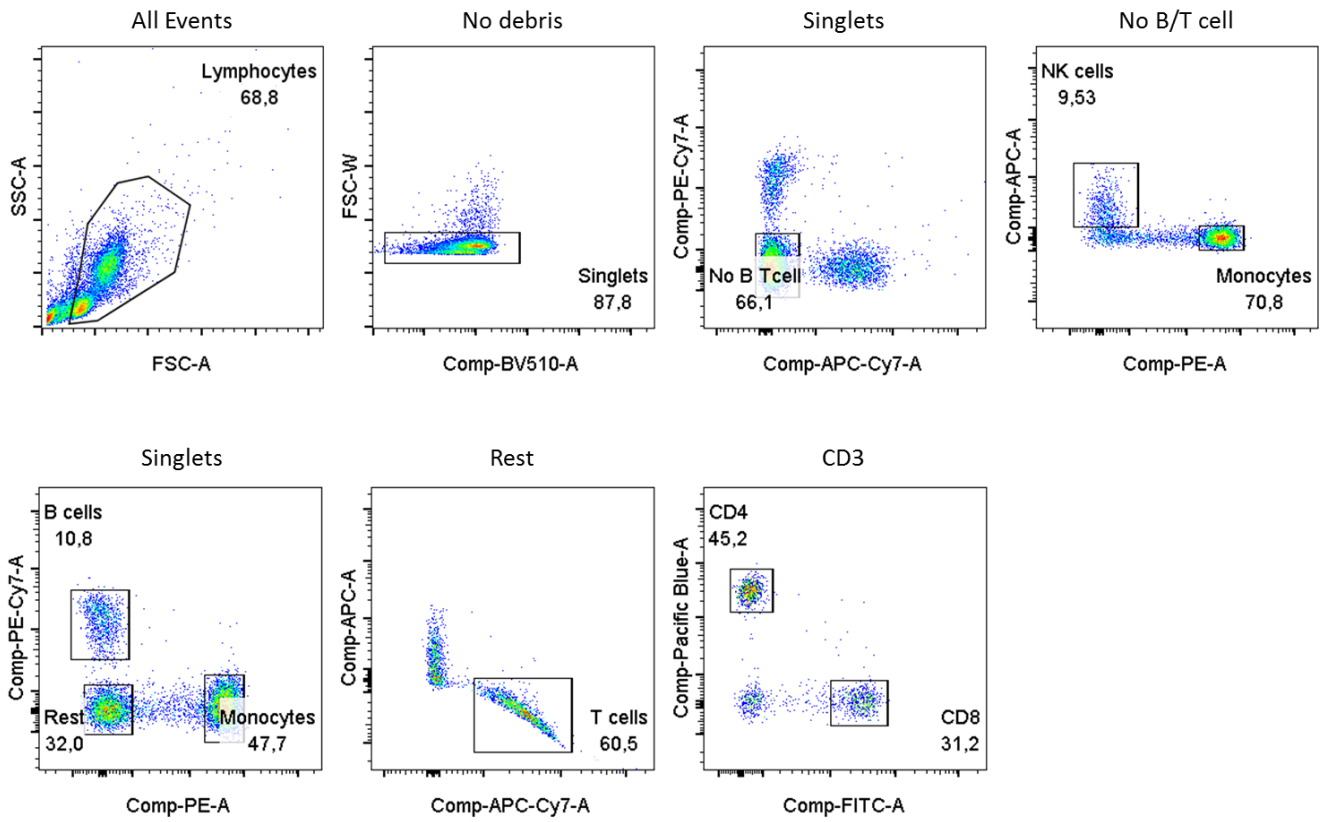
| | | Pro 100 mio |
|--------------|--------|-------------|
| PE | CD8 | 200 µl |
| APC | CD45RA | 200 µl |
| PECy7 | CD3 | 200 µl |
| BV421 | CCR7 | 300 µl |

Protokoll:

- PBMCs auftauen, bisher 3 vials
 - o Für PBMC Panel bisher ca. 100-120 mio
 - o Für CD8 Panel so viel wie möglich, bisher 150-200 mio
- Zellen mit PBS waschen
- Optional: DNase Verdau
 - o Zellen in HBSS/5 mM MgCl₂ aufnehmen, 1 ml pro 100 mio
 - o (= 0,1 g MgCl₂ in 100 ml HBSS)
 - o + 20 µl DNase
 - o Inkubation 30 min, RT
 - o 1x mit HBSS/5 mM MgCl₂ waschen, 5 ml pro 100 mio
- Zellen in MACS resuspendieren, 1 ml pro 40 mio
- Färbung (siehe oben)
- Für Sort in 500 µl MACS aufnehmen
 - o PBMCs: CD4, CD8, B-Zellen, NK-Zellen, Monos
 - o CD8: Naive, Tcm, Tem, Teff
 - o Pro Zellsorte bisher 3 mio, besser mehr (ca. 5 mio)
- Sort in 15er Falcons
- Nach Sort:
 - o Zellen fugen, Pr. 1
 - o Pellet in 1 ml PBS resuspendieren und in Eppi übertragen
 - o Zellen fugen, 2500 g, 3 min
 - o Zellen noch 2x mit 1 ml PBS waschen
 - o PBS abnehmen und Pellet schockfrostet
 - o Lagerung bei -80 °C

Sort Gating:

PBMC Panel



CD8 Panel

