

Anreicherung von NK-Zellen für MoFlo Sort

Benötigte Puffer und Lösungen:

- MACS Puffer (pH 7,3):
 - 1x PBS ohne Ca^{2+} Mg^{2+}
 - 2 % FCS oder 0,5 % BSA
 - 2 mM EDTA
- NK Isolation Kit Miltenyi
- LS Säulen (Miltenyi)
- Magnet
- Zellsiebe
- Blocking Buffer
 - 1x PBS
 - 10% FCS
 - 2 % Maus-Serum
- Antikörper

Durchführung

- Entnahme von 20 Milzen
- Single Cell Suspension der ersten 10 Milzen
- Kurz in EtOH waschen
- in MACS Puffer waschen
- in MACS Puffer mit Spritzenstempel durch Zellsieb drücken
- Suspension durch Zellsieb in ein 50 mL Tube überführen, auf 50 mL auffüllen mit MACS Puffer, Auszählung, zentrifugieren (500 x g, 4°C, 10 min)
- ÜS verwerfen, Pellet in 2 mL MACS Puffer resuspendieren
- Zugabe von 0,5 mL Antibody Cocktail
- 10' @ 4°C → *Parallel beginnen mit der Aufbereitung der weiteren 10 Milzen*
- Zugabe von 1,5 mL MACS Puffer
- Zugabe von 1 mL Microbeads
- 15' @ 4°C
- auf 50 mL auffüllen mit MACS Puffer, zentrifugieren (300 x g, 4°C, 10 min)
- ÜS verwerfen, Pellet in 18 mL MACS Puffer resuspendieren und durch blaues Zellsieb filtrieren
- Suspension auf 6 LS Säulen verteilen → *Inkubation der nächsten 10 Milzen mit Antikörper*
- 3x mit 3 mL MACS Puffer waschen
- NK Zellen poolen, zentr. und auszählen

Sobald die Aufreinigungen fertig sind, alle Zellen poolen, abzentr. und in 200 µL Blocking Buffer aufnehmen, gut vortexen und 10' @ 4°C inkubieren. Anschließend die Antikörper für die Färbung zugeben und für 15' @ 4°C inkubieren. Mit 10 mL PBS waschen, Pellet in 3 mL R10 aufnehmen, und über ein Zellsieb in ein 15 mL Tube überführen. Auffang-Tubes mit R20 vorbereiten und alles zum Sorter mitnehmen.