

## Protokoll Durchflusszytometrie

# Puffer für die Durchflusszytometrie

Gelistet sind gängige Puffer, die für Standard-Anwendungen der Durchflusszytometrie verwendet werden. Diese müssen entsprechend des Zelltypes und der Art der anschließenden Prozessierung angepasst werden.

Es ist zu empfehlen, für spezifische Verwendungszwecke die Puffer der Hersteller zu verwenden, da diese bei der jeweiligen Applikation getestet wurden. Generell werden Puffer steril filtriert und bei 4° C gelagert.

## Allgemeiner Färbepuffer

### Verwendung

- Oberflächenfärbung von Zellen
- Verdünnungen von Antikörpern und Zellsuspensionen
- Wasch-Schritte während der Zellpräparation

### Hinweise

- Natriumazid oder Pen/Strep als Konservierungsstoff (bei funktionellen Assays mit Bakterien weglassen!)
- FKS/BSA Konzentration so gering wie möglich halten, um ein Aggregieren der Zellen zu vermeiden. FKS/BSA sollte Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-frei dialysiert sein.
- EDTA dient als Anti-Koagulanz und sollte, wenn möglich, immer enthalten sein.

### Rezept

1x PBS (-Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>)  
 2-5 % (w/v) FKS od. BSA (Hitze-inaktiviert)  
 2-5 mM EDTA  
 2 mM NaN<sub>3</sub> oder 1 % Pen/Strep

## Permeabilisierungspuffer

### Verwendung

- Intrazelluläre Färbung von Zellen nach Fixierung
- Verdünnungen von Antikörpern und Zellsuspensionen bei permeabilisierten Zellen
- Wasch-Schritte während der Färbung von intrazellulären Markern

### Hinweise

- Saponin-vermittelte Desintegration der Zellmembran ist reversibel, daher bei allen Schritten der Präparation diesen Puffer verwenden.
- Natriumazid oder Pen/Strep wirkt präservativ (bei funktionellen Assays mit Bakterien weglassen!)
- FKS/BSA Konzentration so gering wie möglich halten, um ein Aggregieren der Zellen zu vermeiden.
- EDTA dient als Anti-Koagulanz und sollte, wenn möglich, immer enthalten sein.

### Rezept

1x PBS (-Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>)  
 0,1 % (w/v) Saponin  
 2-5 % (w/v) FKS oder BSA (Hitze-inaktiviert)

2 mM EDTA  
2 mM NaN<sub>3</sub> oder 1 % Pen/Strep

## Fixierungspuffer

### Verwendung

- Intrazelluläre Färbung von Zellen vor Permeabilisierung
- Fixierung der Eigenschaften (light scatter/ fluorescence intensity) für anschließende durchflusszytometrische Analysen

### Hinweise

- PFA reduziert die FSC Eigenschaften der Zellen

### Rezept

1x PBS  
4 % (v/v) Paraformaldehyd (PFA)

## Erythrozyten-Lyse-Puffer 10x

### Verwendung

- Schnelle Lyse der Erythrozyten aus Vollblut, Gewebe und aus Gewebe gewonnenen Zellen unter isotonischen Bedingungen

### Hinweise

- 1:10 Verdünnung in AquaDest herstellen (= Arbeitslösung)
- Verdünnung immer frisch ansetzen
- Puffer nicht autoklavieren

Alternativ funktioniert reines Wasser, welches die Erythrozyten platzen lässt. Aber dann müssen die verbliebenen PBMCs unverzüglich in isotonische Bedingungen zurücküberführt werden.

### Rezept (1 L)

1,5 M NH<sub>4</sub>Cl  
100 mM NaHCO<sub>3</sub> oder KHCO<sub>3</sub>  
10 mM EDTA  
pH 7,4  
Auf 1 L auffüllen mit AquaDest

## AnnexinV Bindepuffer

### Verwendung

- Apoptose-Nachweis über AnnexinV-Färbung

### Hinweise

- CaCl<sub>2</sub> ist essentiell für die Bindung von AnnexinV an PS
- Puffer bei 4° C lagern, auf RT erwärmen, Inkubation bei RT im Dunkeln

### Rezept

10 mM HEPES, pH 7,4  
140 mM NaCl  
2,5 mM CaCl<sub>2</sub>

## Färbepuffer für Zellzyklus

### Verwendung

- Zellzyklus Analyse mittels PI

### Hinweise

- 30 min bei RT im Dunkeln inkubieren ODER ü.N. bei 4°C im Dunkeln

### Rezept

1 x PBS  
0,1 % (w/v) Triton-X  
10 µg/mL RNase  
20 µg/mL PI