

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 Ca²⁺/Mg²⁺-frei dialysiert sein.
- EDTA dient als Anti-Koagulanzen und sollte, wenn möglich, immer enthalten sein.

Rezept

1x PBS (-Ca²⁺/Mg²⁺)
 2-5 % (w/v) FKS od. BSA (Hitze-inaktiviert)
 2-5 mM EDTA
 2 mM NaN₃ 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-Koagulanzen und sollte, wenn möglich, immer enthalten sein.

Rezept

1x PBS (-Ca²⁺/Mg²⁺)
 0,1 % (w/v) Saponin
 2-5 % (w/v) FKS oder BSA (Hitze-inaktiviert)

2 mM EDTA
2 mM NaN₃ 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 NH₄Cl
100 mM NaHCO₃ oder KHCO₃
10 mM EDTA
pH 7,4
Auf 1 L auffüllen mit AquaDest

AnnexinV Bindepuffer

Verwendung

- Apoptose-Nachweis über AnnexinV-Färbung

Hinweise

- CaCl₂ 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 CaCl₂

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