

Protokoll Durchflusszytometrie

Färbung Oberflächenmarker

Das nachfolgende Protokoll ist eine allgemeine, vereinfachte Darstellung. Bitte ZWINGEND die Angaben und Protokolle der AK-Hersteller beachten!

Protokoll

1. Zellen gewinnen.
2. Waschen: Bei 350 g für 5 min zentrifugieren, Überstand abnehmen, Pellet in FACS Puffer resuspendieren.
3. Bei 350 g für 5 min zentrifugieren, Überstand abnehmen, in FACS Puffer aufnehmen und zählen.
4. Aliquots von $5-10 \times 10^5$ Zellen in 100 μ L FACS Puffer vorbereiten.
5. Blockierung Fc-Rezeptoren: Nach Herstellerangaben mit dem Fc-Block inkubieren ODER 30 min bei 4° C in Blockierungs-Puffer auf einem Schüttler inkubieren.
6. Inkubation mit primärem AK für 15-20 min im Dunkeln auf Eis.
7. Zellen 2x waschen.
8. Optional: Entsprechende Menge an Sekundär- AK zu den Zellen geben und für 15-20 min auf Eis im Dunkeln inkubieren und anschließend 2x waschen.
9. Zellen in 0,5 mL FACS Puffer aufnehmen.
10. Optional: Bei stark klumpenden Zellen bitte in Filter Cap FACS Tubes filtrieren.
11. Messen.

FACS Puffer	1x PBS (-Ca ²⁺ /Mg ²⁺) 2 -5 % (w/v) FKS o. BSA (Hitze-inaktiviert) 2-5 mM EDTA 1 % P/S o. 2 mM NaN ₃
Blockierungspuffer	1x PBS (-Ca ²⁺ /Mg ²⁺) 10 % (w/v) FKS o. BSA (Hitze-inaktiviert) 2-5 mM EDTA 1 % P/S o. 2 mM NaN ₃

Hinweise

- Natriumazid oder Pen/Strep diesen als Konservierungsstoff (bei funktionellen Assays mit Bakterien weglassen!) und sind optional.
- 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-Koagulanz und sollte, wenn möglich, immer enthalten sein. Die Konzentration ist abhängig von der Koagulierungsseigenschaft der Zellen.
- Puffer IMMER steril filtrieren (0,2 μ M Filter) und bei 4° C lagern.
- AK nicht vortexen, stattdessen kurz runterzentrifugieren.
- Bei Mehrfarben-Panels für das Set-up unbedingt Einzelfärbungen mitbringen.
- Die Färbung kann in allen Formaten erfolgen: Multiwell, Falcon Tubes, Eppendorf Tubes, FACS Tubes.