

# Zellseparation

- 2.1 Trennung nach Zellgröße und Zelldichte – Zentrifugationstechniken – 52**
  - 2.1.1 Differenzialzentrifugation – 52
  - 2.1.2 Dichtegradienten-Zentrifugation – 53
  - 2.1.3 Separationsmedien – 55
  - 2.1.4 Gegenstromzentrifugation – 63
- 2.2 Trennung nach zellspezifischen Oberflächenmolekülen – 64**
  - 2.2.1 Adhäsion an Kunststoffoberflächen – 65
  - 2.2.2 Adhäsion an Nylonwatte – 66
  - 2.2.3 Erythrocyten-Rosettierung – 67
  - 2.2.4 Immunmagnetische Separation – 68
  - 2.2.5 Lysierende Antikörper – 70
- Weiterführende Literatur – 71**

Ein Ansatz, immunologische Fragestellungen experimentell zu bearbeiten, ist die Betrachtung einzelner, möglichst reiner und funktionstüchtiger Zellpopulationen. Der Organismus stellt jedoch ein Potpourri aus unterschiedlichsten Zellen dar und selbst wenn man aus definiertem Gewebe eine Probe entnimmt, besteht diese niemals aus nur einer einzigen Zellpopulation. Um die verschiedenen Ingredienzien eines solchen »Zelleintopfes« studieren zu können, ist oftmals die Separation der verschiedenen Bestandteile erforderlich. Zu diesem Zweck bieten sich die im Folgenden beschriebenen Methoden an. Sie nutzen allesamt die unterschiedlichen Eigenschaften verschiedener Zellpopulationen. Solche Eigenschaften können physikalisch-chemischer Natur sein, wie z. B. Dichte, Größe und Oberflächenladung, oder biochemisch-biologischer Natur, beispielsweise zellspezifische Antigenexpression, Adhärenzverhalten und Phagocytoseverhalten. Bei der Auswahl des Verfahrens muss bedacht werden, dass unterschiedliche Zellpopulationen mit den gleichen Eigenschaften ausgestattet sein können. Durch Kombination verschiedener Methoden bietet sich die Möglichkeit, fast jeden beliebigen Zelltyp – mehr oder weniger rein – zu isolieren. Obwohl sich in den letzten Jahren auf den Gebieten der Isolierung, Anreicherung, Separation und Reinigung von Zellen einige wenige Methoden durchgesetzt haben, sollen hier auch weniger etablierte Methoden beschrieben werden, um Ihnen als Experimentator ein möglichst breites Methodenspektrum anbieten zu können. Das am Ende stehende Zellisolat kann anhand verschiedener Parameter (Ausbeute, Reinheit und Viabilität der Zellen) bewertet werden, wobei das Ergebnis meist einen Kompromiss darstellt; so ist z. B. eine hohe Reinheit des Zellisolates oftmals mit einer niedrigen Ausbeute verbunden – oder eben andersherum.

## 2.1 Trennung nach Zellgröße und Zelldichte – Zentrifugationstechniken

Die Tatsache, dass die Zentrifugation nach wie vor ein wesentlicher Bestandteil der Zellseparation ist, berechtigt zu einem begrenzten Ausflug in die un-

endlichen Weiten der Zentrifugationstechniken. Ohne tiefer in die damit verbundenen physikalischen Sphären eindringen zu wollen, sollen hier einige Techniken erwähnt werden, über die man bei der Auseinandersetzung mit diesem Thema fast zwangsweise stolpert – oder besser – elegant hinüber springt, indem man sie geschickt für die Bearbeitung seiner Fragestellung ausnutzt.

Sämtliche Zentrifugationstechniken basieren auf der Tatsache, dass Partikel in dem Kraftfeld eines rotierenden Zentrifugenrotors sedimentieren, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind: Die Dichte der Partikel muss größer als die Dichte des umgebenden Mediums sein und die einwirkende Zentrifugalkraft muss die Kraft ungeordneter Partikelbewegungen übersteigen. Bei der Zentrifugation von Zellen ist aufgrund deren Empfindlichkeit Folgendes zu beachten: Gelöste Moleküle, auch Makromoleküle, sind homogen vom Medium umgeben. Folglich wirkt an jedem Punkt ihrer Oberfläche der gleiche hydrostatische Druck. Anders verhält es sich bei lebenden Zellen. Hier handelt es sich bekanntlich um geschlossene Systeme (natürlich nicht wirklich geschlossen!), die einem eingeschränkten Gas- und Flüssigkeitsaustausch mit ihrer Umgebung unterliegen. Dieser Umstand führt zu einer gewissen morphologischen Unflexibilität des Zellkörpers. Bei Einwirkung der auftretenden Zentrifugalkräfte kann sich die Zelle infolgedessen als mechanisch instabil erweisen und platzen bzw. zerquetscht werden.

### ➤ Wichtig!

**Um der Zellviabilität willen sollten Zellen immer so schonend wie möglich zentrifugiert werden, d. h. mit der minimalen Zentrifugalkraft, die gerade noch notwendig ist, um eine effiziente Trennung zu erreichen. Für simple Waschvorgänge von Zellsuspensionen beispielsweise reichen 200 g zur Sedimentation gewöhnlich vollkommen aus.**

### 2.1.1 Differenzialzentrifugation

Die Differenzialzentrifugation nutzt unterschiedliche Sedimentationsgeschwindigkeiten einzelner

$$v = \frac{d^2((\rho)_p - (\rho)_m)g}{18\eta}$$

■ **Abb. 2.1** Svedberg-Gleichung.  $v$  Sedimentationsgeschwindigkeit;  $d$  Durchmesser des Partikels;  $g$  relative Zentrifugalbeschleunigung;  $\eta$  Viskosität des Mediums;  $\rho_p$  Dichte des Partikels;  $\rho_m$  Dichte des Mediums

Komponenten einer Partikelmischung aus, die sich in einem homogenen Medium »gelöst« befindet (■ Abb. 2.3). Für eine erfolgreiche Trennung ist es hier essenziell, dass sich die einzelnen Partikel der Mischung in ihren Sedimentationsgeschwindigkeiten stark genug voneinander unterscheiden. Die Sedimentationsgeschwindigkeit eines Partikels ist abhängig von seinem Durchmesser (korrekterweise auch von seiner Form), der Differenz zwischen der Partikeldichte und der Dichte des ihn umgebenden Mediums sowie der Viskosität des Mediums, wobei Dichte und Viskosität temperatur-abhängig sind. Diese Beziehung wird durch die Svedberg-Gleichung beschrieben (■ Abb. 2.1).

Sind die Bedingungen des Zentrifugalfeldes klar definiert, kann man den Sedimentationskoeffizienten  $s$  eines Partikels in Svedberg-Einheiten [ $S$ ] angeben (1  $S$  entspricht  $10^{-13}$  s). Der Sedimentationskoeffizient entspricht der Sedimentationsgeschwindigkeit in eben diesem definierten Zentrifugalfeld, wobei  $S$  gewöhnlich auf das Medium Wasser bei 20°C (Dichte und Viskosität) bezogen wird (■ Abb. 2.2).

Anwendung findet die Differenzialzentrifugation z. B. bei der Trennung von Zellorganellen eines Zellhomogenates, da die einzelnen Komponenten ausreichend unterschiedliche Sedimentationskoeffizienten besitzen (■ Tab. 2.1). Zur Auftrennung eines solchen Partikelgemisches wird dieses im Festwinkelrotor stufenweise höheren Zentrifugalbeschleunigungen sowie längeren Zentrifugationszeiten ausgesetzt. Dabei werden Partikel mit relativ höheren Sedimentationskoeffizienten schneller sedimentieren, während man die langsamer sedimentierenden Partikel eher im Überstand finden wird. Verglichen mit einer Zellkernfraktion wird die ER-Fraktion aufgrund des niedrigeren Sedimentationskoeffizienten daher erst bei größerer

$$s = \frac{v}{r\omega^2}$$

■ **Abb. 2.2** Berechnung des Sedimentationskoeffizienten.  $v$  Sedimentationsgeschwindigkeit;  $r$  Rotorradius;  $\omega$  Winkelgeschwindigkeit

Zentrifugalkraft und nach längerer Zeit sedimentieren. In der Praxis werden dabei die Werte der genannten Zentrifugationsparameter von Zentrifugationslauf zu Zentrifugationslauf schrittweise erhöht. Nach einem Lauf wird jeweils das Pellet bzw. der Überstand – je nachdem, worin sich die relevante Fraktion befindet – abgenommen und nochmals zentrifugiert.

### ! Achtung

**Die Fraktionen schnell sedimentierender Partikel werden aller Wahrscheinlichkeit nach mit langsam sedimentierenden Partikeln, die sich schon zu Beginn der Zentrifugation im unteren Bereich des Röhrchens befanden, kontaminiert sein (■ Abb. 2.3). Die Kontaminationen können aber auch durch nachfolgende Waschschritte sukzessiv minimiert werden – es richtet sich daher letztendlich nach den Reinheitsansprüchen des Experimentators, wie oft man die relevanten Partikel wäscht.**

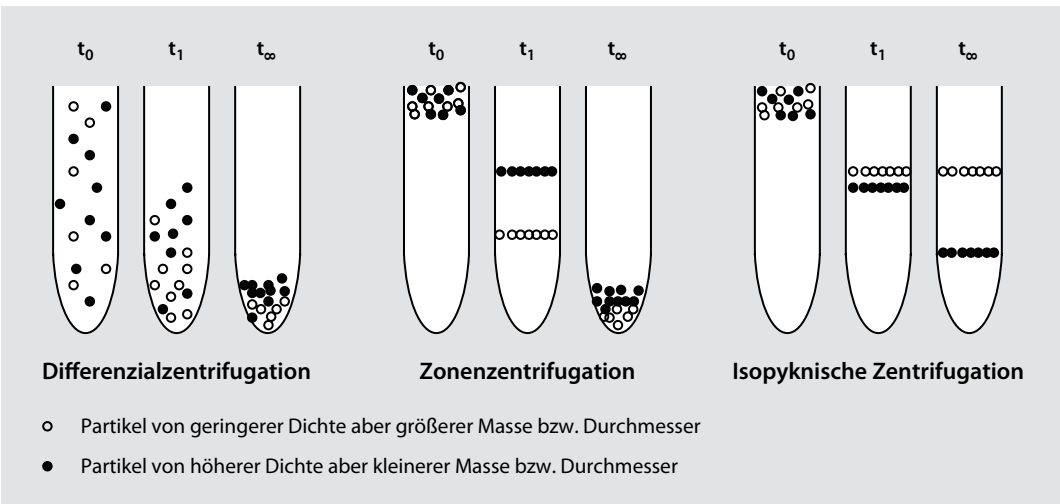
Im Gegensatz zu Zellorganellen weisen intakte Zellen Sedimentationskoeffizienten in einem engen Bereich von  $10^7$ – $10^8$   $S$  auf, weshalb die Trennung unterschiedlicher Zellpopulationen eines Zellgemisches (z. B. Blut) andere Techniken mit höherer Auflösung erfordert – womit wir bei der Dichtegradienten-Zentrifugation angelangt wären.

## 2.1.2 Dichtegradienten-Zentrifugation

Was tun, wenn sich die Sedimentationskoeffizienten der zu trennenden Partikel ungenügend unterscheiden und sich damit der Parameter

■ Tab. 2.1 Ungefähre Größen- und Dichtebereiche sowie S-Werte subzellulärer Partikel

Subzelluläre Partikel	Durchmesser [ $\mu\text{m}$ ]	Dichte [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ]	S-Wert
Zellkerne	3,0–12,0	$>1,30$	$10^6\text{--}10^7$
Mitochondrien	0,5–4,0	1,17–1,21	$10^4\text{--}5 \times 10^4$
Peroxisomen	0,5–0,8	1,19–1,40	$4 \times 10^3$
Endoplasmatisches Retikulum	0,05–0,3	1,06–1,23	$10^3$
Lysosomen	0,5–0,8	1,17–1,21	$4 \times 10^3\text{--}2 \times 10^4$



■ Abb. 2.3 Vergleich der Partikelbewegungen in Abhängigkeit ihrer Eigenschaften sowie von der angewandten Zentrifugationstechnik.  $t_0$ ,  $t_1$  und  $t_\infty$  bezeichnen die verschiedenen Zeitpunkte des Zentrifugationsvorgangs

Sedimentationsgeschwindigkeit nicht zur Trennung ausnutzen lässt? Man dreht an einem anderen Parameter. In diesem Fall variiert man die Dichte des umgebenden Mediums und erzeugt so einen Dichtegradienten. Man unterscheidet zwei Techniken der Dichtegradienten-Zentrifugation, die Zonenzentrifugation (Dichtegradienten-Differenzial-Zentrifugation) und die isopyknische Zentrifugation. Der wesentliche Unterschied liegt in der maximalen Dichte des eingesetzten Mediums in Bezug zur Dichte der zu trennenden Partikel.

Bei der **Zonenzentrifugation** unterschreitet die maximale Dichte des Mediums die minimale Dichte der Partikel – lapidar ausgedrückt: Das dichteste Medium ist hier immer noch weniger dicht als der am wenigsten dichte Partikel. Daraus folgt, dass

sämtliche Partikel in das Separationsmedium eindringen, und dort entsprechend ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit voneinander getrennt werden. Es handelt sich hierbei um eine »unvollständige« Zentrifugation, die früh genug beendet werden muss, da sonst irgendwann sämtliche Partikel am Boden des Zentrifugenbechers kleben (■ Abb. 2.3). In der Praxis wird die zu trennende Suspension auf einen kontinuierlichen, meist »flachen« Gradienten (z. B. Sucrosegradient) geschichtet und mit geeigneter g-Zahl zentrifugiert.

Anders verhält es sich bei der **isopyknischen Zentrifugation**. Hier überschreitet die maximale Dichte des Mediums die Dichte des dichtesten Partikels. Hintergrund dieser Technik ist die Tatsache, dass ein Partikel bei der Sedimentation durch einen

Dichtegradienten in einem Schwebestand verharren, wenn es Medium erreicht, dessen Dichte der Dichte des Partikels entspricht. Daher leitet sich auch die Bezeichnung isopyknisch (»gleich-dicht«) ab. Partikel gleicher Dichte schwimmen dann gewissermaßen auf einer Unterlage von Medium höherer Dichte, da sie nicht weiter sedimentieren können. Man spricht in diesem Falle von der **Buoyant-Dichte** eines Partikels. Buoyant-Dichten variieren in Abhängigkeit von dem Medium, in dem sie bestimmt werden, da verschiedene Medien die **Hydratation** der Partikel unterschiedlich beeinflussen. Bei der isopyknischen Zentrifugation wird bis zur Gleichgewichtseinstellung zentrifugiert, d. h. so lange bis sämtliche Partikel ihren spezifischen Dichtebereich erreicht haben, und nicht weiter sedimentieren können. Es besteht keine Gefahr, dass man am Ende das Partikelgemisch, mit dem man anfangs den Gradienten überschichtet hat, vollständig am Boden pelletiert wiederfindet.

Während die Differenzialzentrifugation sowie die Zonenzentrifugation zur Trennung von Partikeln geeignet sind, die sich in ihrer Größe (z. B. Zellorganellen) bzw. Masse ausreichend unterscheiden, kommt die isopyknische Zentrifugation zur Anwendung, wenn Partikel ähnlicher Größe bzw. Masse, aber unterschiedlicher Dichte (z. B. Zellen) separiert werden sollen. Bei der Zellisolierung bedient man sich Zentrifugationsmethoden, um zunächst eine grobe Fraktionierung der Ausgangszellpopulation in flüssigen bzw. verflüssigten Proben (z. B. verflüssigtes oder homogenisiertes Gewebe (Exkurs 7) zu erreichen. Mit besonderem apparativen Aufwand (► Kap. 2.1.4) respektive mit geeigneten Separationsmedien (► Kap. 2.1.3) lassen sich sogar hinreichend »feine« Gradienten zur Trennung zellulärer Subpopulationen einstellen. Im Folgenden ist schematisiert dargestellt, wie sich die Partikel einer Partikelmischung bei unterschiedlichen Zentrifugationstechniken in Abhängigkeit ihrer Eigenschaften auftrennen. Zum Zeitpunkt  $t_0$  beginnt die Zentrifugation und damit die Separation der Partikelmischung ( $t_1$ ). Angenommen, Sie würden eines Freitagnachmittags ihre Zentrifuge zur Zellseparation anstellen und gedankenverloren den Weg ins Wochenende antreten, könnten Sie des folgenden Montagmorgens mit dem Ergebnis, wie in  $t_{\infty}$  dargestellt rechnen, also entweder mit

recht festen Zellpellets oder mit im Gleichgewicht befindlichen Banden von Zellen, die allerdings ein wenig gestresst sein dürften (■ Abb. 2.3).

### 2.1.3 Separationsmedien

Abgesehen davon, dass ein Separationsmedium einen diskontinuierlichen (stufig) oder kontinuierlichen (stufenlos) Gradienten spezifischer Dichte ausbildet, sollten Separationsmedien noch einige weitere Kriterien erfüllen. Chemisch-physikalisch sollten sie von möglichst inerte Natur sein, so dass die Integrität der bearbeiteten Zellen erhalten bleibt, d. h. sie sollten möglichst geringe Cytotoxizität besitzen. Weiterhin sollten pH und Osmolarität im jeweils physiologischen Bereich liegen, um die Zellen nicht allzu sehr zu stressen. Speziell bei der Bearbeitung von Zellen bzw. subzellulärer Organellen ist es von Vorteil, Materialien zu verwenden, die einen nicht-ionischen Charakter aufweisen, da anderenfalls Interaktionen mit geladenen Teilchen auf der Zelloberfläche auftreten können, die die Zellen in unerwünschter Art und Weise beeinflussen. Einige Makromoleküle wie z. B. DNA lassen sich in ionischen Medien dagegen gut auftrennen. Letztlich sollte das Medium aus praktischen Gründen bei möglichst geringer Viskosität eine möglichst hohe Dichte aufweisen.

#### Exkurs 3: U/min oder g – wie hätten Sie's denn gern?

Zum Thema »Angabe der Zentrifugationsparameter in Arbeitsanweisungen«. Auch heute findet man leider noch viel zu häufig die unheilschwangere Einheit U/min bzw. rpm = *revolutions per minute!* zur Angabe der Zentrifugationskonditionen. Das Unheil manifestiert sich augenblicklich, wenn der Experimentator die genannte Angabe in die Tat umsetzen möchte, in der Vorschrift jedoch keinerlei Rotormaße angegeben sind. Daher sollte man beim Erstellen des Protokolls die relative Zentrifugalbeschleunigung RZB (bzw.  $rcf$  = *relative centrifugal force*) als Vielfaches der Erdbeschleunigung g angeben. Auf diese Weise kann jeder Nutzer, unabhängig von der Art der zentrifugalen

Ausstattung seines Labors, etwas mit der Vorschrift anfangen. Für die Umrechnungswilligen gilt folgende Formel (■ Abb. 2.4):

Der Zusammenhang von Rotorradius, Rotationsgeschwindigkeit und g-Wert ist in ■ Abb. 2.5 dargestellt.

#### Tip

Im Sinne der Lebenserwartung der Zentrifugenbecher sollte auch das Abhängigkeitsverhältnis Kristallisationsverhalten/Temperatur beachtet werden: Eine konzentrierte Salz- oder Zuckerlösung, die bei Raumtemperatur hergestellt wurde, kann bei deutlich niedrigerer Zentrifugationstemperatur ausfallen und so den Zentrifugenbecher »schrotten«. Diese Gefahr besteht allerdings vor allem bei Schwerefeldern, die in Ultrazentrifugen erreicht werden.

### 2.1.3.1 Ficoll-Separation

Der Klassiker unter den Zellseparationsmedien ist Ficoll-Hypaque. Das synthetische Polysaccharid Ficoll ist ein neutrales, stark verzweigtes Polymer aus Saccharosemonomeren, die über Epichlorhydrin kreuzvernetzt sind. Ficoll wird als Feststoff (Ficoll 400 bzw. Ficoll 70, wobei die Zahlen die Molekularmassen der Polymere wiedergeben) und fertige wässrige Lösung in Konzentrationen bis zu 50 % (w/w) angeboten. Für die Fraktionierung von humanen Blutzellen sind Fertiglösungen erhältlich. Diese bestehen aus 5,7 g Ficoll 400 und 9 g Natriumdiatrizoat auf 100 ml Wasser, woraus sich eine Dichte von 1,077 g/ml ergibt. Natriumdiatrizoat (amerikan.: Hypaque) – ursprünglich als Röntgenkontrastmittel entwickelt – ist ein Derivat der Triiodbenzoesäure. Es dient der Erhöhung der Dichte von Ficoll. Zusätzlich bewirkt Ficoll die Agglutination von Erythrocyten und beschleunigt so deren Sedimentation.

Wer die Herausforderung sucht, kann sich selbstverständlich aus den Einzelkomponenten seine eigene Gebrauchslösung ansetzen. Ist man auf eher ungewöhnliche Dichten der Separationsmedien angewiesen, z. B. beim Arbeiten mit Blut einer anderen Spezies, kann man sogar gezwungen sein,

$$RZB = 1,118 \cdot 10^{-5} \cdot r \cdot v^2$$

■ **Abb. 2.4** Formel zur Berechnung der relativen Zentrifugalbeschleunigung. *RZB* relative Zentrifugalbeschleunigung in g; *r* Rotorradius in cm; *v* Rotorgeschwindigkeit in U/min

sich seinen spezifischen Gradienten selbst herzustellen.

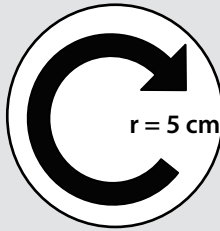
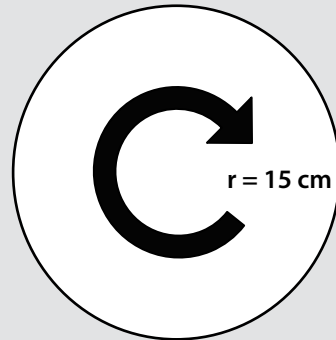
#### ! Achtung

**Der Bemerkung wert ist die ficollsche Cytotoxizität. Daher ist darauf zu achten, dass bei der Separation möglichst wenig Kontakt zwischen den relevanten Zellen und der Ficoll-Phase zustande kommt.**

#### ■ Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation in der Praxis

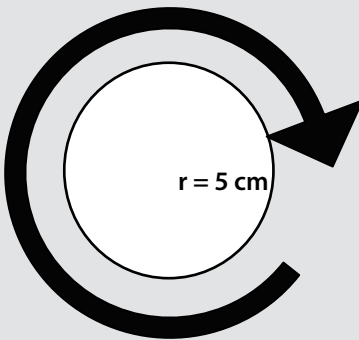
Eine der häufigsten Anwendungen dürfte die Fraktionierung von humanem Blut mittels Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation sein, weshalb sie es verdient hat, hier kurz skizziert zu werden. Die entsprechenden Prozeduren mit anderen Separationsmedien unterscheiden sich lediglich im Detail.

Zur Fraktionierung von humanem Blut gibt man in ein Tube ein bestimmtes Volumen Separationsmedium. Dieses wird vorsichtig mit einem bestimmten Volumen antikoaguliertem Blut (► Exkurs 4) überschichtet. Die Volumina sind abhängig von der Größe der Tubes bzw. davon, wie viele Zellen am Ende herauskommen sollen. Von entscheidender Bedeutung ist, dass sich die beiden Phasen während des Überschichtens nicht vermischen. Meist wird eine »ready-to-use«-Ficoll-Hypaque-Lösung mit einer Dichte von 1,077 g/ml verwendet. Dieses Medium besitzt damit eine größere Dichte als Lymphocyten, Monocyten und Thrombocyten, aber eine geringere als die von Erythrocyten und der meisten Granulocyten (■ Tab. 2.2). Die Dichten der unterschiedlichen Blutzellen überschneiden sich teilweise. Daher muss man z. B. davon ausgehen, dass die MNC-Fraktion (mononucleäre Zellen) stets mit basophilen Granulocyten und Thrombocyten kontaminiert ist.

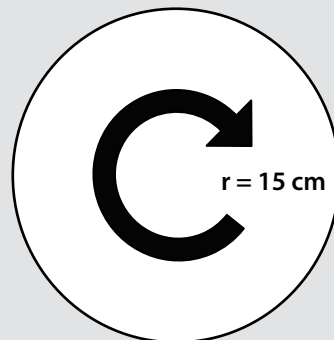
**Rotor A** $v = 3000 \text{ U/min}$ 500 g**Rotor B** $v = 3000 \text{ U/min}$ 

1500 g

Gleiche Rotationsgeschwindigkeit führt bei unterschiedlichen Rotorradien zu unterschiedlichen g-Werten!

**Rotor A** $v = \underline{5200} \text{ U/min}$ 

1500 g

**Rotor B** $v = 3000 \text{ U/min}$ 

1500 g

Um gleiche g-Werte zu erreichen, muss bei Verwendung des kleinen Rotors A eine höhere Geschwindigkeit gewählt werden!

■ **Abb. 2.5** Zusammenhang von Rotorradius, Rotationsgeschwindigkeit und dem sich daraus ergebenden g-Wert. Aus unterschiedlichen Rotorradien  $r$  ergeben sich bei gleicher Rotationsgeschwindigkeit unterschiedliche g-Werte – ebenso bei Verwendung gleicher Rotoren, aber unterschiedlicher Rotationsgeschwindigkeiten. Beispiel: Bei einer hypothetischen Rotationsgeschwindigkeit von 3.000 U/min würde unter Verwendung von Rotor A mit 500 g zentrifugiert werden – durchaus für Zellen verträglich –, während man im Rotor B bei 3.000 U/min die Zellen mit 1.500 g zentrifugieren würde, was für manch empfindsame Zelle einer Hinrichtung gleichkäme

■ Tab. 2.2 Dichtebereiche und mittlere Dichten humaner Blutkomponenten

Zellen + weitere Blutbestandteile	Dichtebereich [g/cm <sup>3</sup> ]	mittlere Dichte [g/cm <sup>3</sup> ]
Plasma/Serum	–	1,026
Thrombocyten	1,040–1,060	1,058
Monocyten	1,059–1,068	1,065
Lymphocyten	1,066–1,077	1,070
Basophile	1,075–1,081	1,079
Neutrophile	1,080–1,099	1,082
Eosinophile	1,088–1,096	1,092
Erythrocyten	1,090–1,110	1,100

#### Exkurs 4: Antikoagulanzen

Antikoagulanzen sind Substanzen, mit denen Blutproben zwecks Verhinderung der Blutgerinnung versetzt werden.

Blutentnahmen zu Analyse Zwecken erfolgen meist mittels vorgefertigter Entnahmeröhrchen, z. B. **Monovetten** oder **Vacutainer**-Röhrchen, die mit geeigneten Antikoagulanzen bestückt sind. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Röhrchen bis zur angegebenen Markierung gefüllt werden, da ansonsten das korrekte Mischungsverhältnis nicht erreicht wird. Die Röhrchen müssen sofort nach der Blutentnahme einige Male geschwenkt werden, um eine korrekte Vermischung mit dem Antikoagulanzen zu gewährleisten.

In Abhängigkeit der Untersuchungsparameter wird ungeronnenes Vollblut oder Blutserum benötigt. Für klinisch-chemische Analysen, z. B. auf Enzyme, Hormone, Metabolite usw. eignet sich am besten Blutserum, da solche Substanzen in diesem gelöst sind. Hämatologische Analysen wie z. B. Blutbilder erfordern ungeronnenes Vollblut. Als Antikoagulanzen kommen am häufigsten Ca<sup>++</sup>-bindende Salze (z. B. EDTA, Citrat, Fluorid, Oxalat, ACD) sowie Heparin zum Einsatz.

#### EDTA

Blutbilder, HLA-Typisierung, Blutgruppentest, molekularbiologische Untersuchungen (z. B.

PCR Diagnostik), die meisten serologischen Analysen.

#### Citrat

Gerinnungsanalysen

#### Ammoniumheparinat

universell einsetzbar: Serologie, Hämatologie, klinisch-chemische Analysen

#### Lithiumheparinat

Blutgase

#### Fluorid

Fluorid inhibiert glykolytische Enzyme, daher notwendig für die Bestimmung von Glucose und Lactat

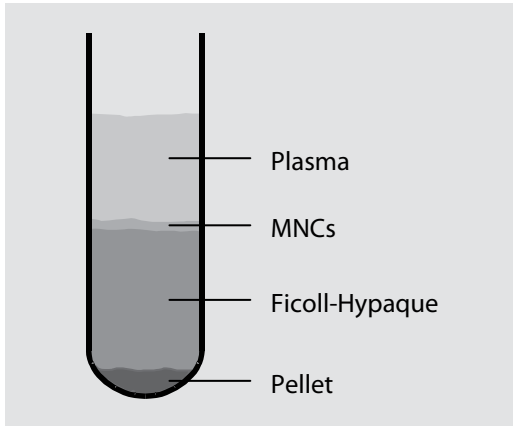
**ACD** (2,5 % Acidum citricum purum, 2,16 % Natrium citricum, 2,34 % Dextrose) Blutkonserven

Korrektes Vorgehen bei Probenentnahme und -verarbeitung ist für die Aussagekraft der Untersuchungsergebnisse unerlässlich. Dazu gehören u. a. auch die Vorbereitung des Probanden/Patienten sowie eine sachgemäße Ausführung der Blutentnahme. Die genannten Punkte werden in der sog. **Präanalytik** zusammengefasst und bearbeitet. Einige Universitätskliniken und Privatlabore bieten auf ihren entsprechenden Webseiten umfangreiche Informationen zu diesem Thema.

Hier wird deutlich, dass es sich bei Ficoll-Separation um eine modifizierte isopyknische Dichtegradienten-Zentrifugation handelt, da die maximale Dichte des Mediums die maximale Dichte einiger Zellpopulationen (Erythrocyten, Granulocyten) unterschreitet, sodass diese am Boden pelletieren.

Als vorteilhaft bezüglich der Reinheit der Zellpräparation hat sich in der Praxis weiterhin bewährt, das Blut vor dem Übersichten bis zu einem Verhältnis von 1:4 mit PBS zu verdünnen. Nach dem Übersichten zentrifugiert man ca. 30 min mit 400–800 g. Angemerkt sei hier, dass im Sinne der Schärfe des Gradienten auf die Bremse verzichtet werden sollte, da es beim Bremsvorgang zu einer Vermischung der vorher getrennten Phasen kommen kann. Während der Zentrifugation





■ **Abb. 2.6** Graphische Darstellung zur Ficoll-Hypaque-Separation. Die MNCs reichern sich nach Zentrifugation aufgrund ihrer Dichte in der Interphase zwischen Ficoll und Plasma an, während die Erythrocyten sowie die meisten Granulocyten das Ficoll durchdringen und ein Sediment bilden. Thrombocyten verbleiben aufgrund ihrer geringeren Größe und Dichte in der Plasmafraktion. Eine evtl. Thrombocytenkontamination der MNCs muss trotzdem vermutet und je nach Untersuchungsziel beachtet werden

wandern Erythrocyten und die meisten Granulocyten auf den Boden des Tubes. Die MNCs reichern sich in einer deutlich milchigen Interphase zwischen Medium und Plasma an (■ Abb. 2.6). Die Thrombocyten verbleiben – bei Anwendung der üblichen Zentrifugationszeiten – zum größten Teil im Plasma, da sie aufgrund ihres geringen Zellvolumens langsamer sedimentieren. Auftretende Thrombocyten-Kontaminationen der MNC-Schicht müssen bei entsprechender Relevanz bezüglich der nachfolgenden Untersuchungen berücksichtigt werden.

Die MNC-Schicht wird vorsichtig abpipettiert – mit »vorsichtig« ist gemeint, dass möglichst kein Ficoll überführt werden sollte, da dieses in gewissem Grade cytotoxisch wirkt. Anschließend werden die isolierten Zellen mindestens einmal mit Nähmedium oder PBS gewaschen. Eventuell störende Erythrocyten-Kontaminationen können zusätzlich durch **hypotone Lyse** minimiert werden. Dies kann mit diversen Salzlösungen erfolgen, z. B. mit 0,2%iger NaCl-Lösung. Die Extremisten unter uns greifen auch gern zu Aqua dest. Bei beiden Varianten muss darauf geachtet werden, dass nach

kurzer Zeit die physiologische Salzkonzentration wieder eingestellt wird, da sonst die MNCs ebenfalls lysieren.

### Exkurs 5: Zellzahl-Bestimmung

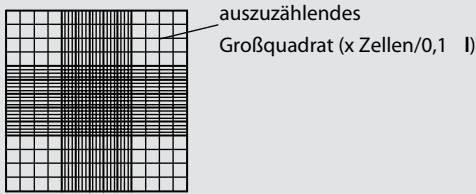
Immer wieder beliebt und quasi bei jedem Experiment, bei dem Zellen eine Rolle spielen benötigt, ist die Bestimmung der Zellzahl.

Sie wird nach wie vor standardmäßig mittels konventionellem Hämacytometer, meist Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Daneben bietet sich die luxuriöse Möglichkeit der Zählung mittels elektronischer Zählgeräte, deren Anwendung sich aus den entsprechenden Bedienungsanleitungen ergibt.

Die Neubauer-Zählkammer besteht aus vier Großquadraten, von denen jedes ein Volumen von 0,1 µl aufweist (■ Abb. 2.7). Das Volumen ergibt sich aus der Fläche von 1 mm<sup>2</sup> und einer Tiefe von 0,1 mm – vorausgesetzt das Deckglas »klebt« ordnungsgemäß auf der Zählkammer, zu erkennen an den »Newtonschen Ringen«.

Die gut durchmischte Zellsuspension wird – oft in einer 1:10 oder 1:100-Verdünnung – mittels Pipette in die Zählkammer gebracht. Unter geeigneter Vergrößerung (z. B. 100-fach) werden wenigstens vier Großquadrate ausgezählt. Meist liegen Zellen auch auf den Rändern der Quadrate – in diesem Falle sind zwei der vier Ränder mitzuzählen, die anderen beiden bleiben unberücksichtigt. Die Zellen können in PBS und/oder Medium suspendiert sein oder aber, z. B. zum Zwecke einer Differenzierung, mit diversen Färbelösungen (z. B. Trypanblau für tot/lebend-Differenzierung) angefärbt werden.

Die Zellzahl pro ml der untersuchten Zellsuspension errechnet sich, indem der Mittelwert aus den vier Großquadraten anschließend mit 10<sup>4</sup> (wegen der 0,1 µl Volumen!) multipliziert wird. Wenn die Zellsuspension verdünnt war, muss der Verdünnungsfaktor einberechnet werden: Bei einer 1:10-Verdünnung hieße das dann  $\times 10^5$ , bei 1:100  $\times 10^6$  usw. Neben der wohl geläufigsten Neubauer-Zählkammer zirkulieren auch weitere Varianten, wie Zählkammer nach Bürker, Türk, Schilling, Fuchs-Rosenthal und Thoma.



■ Abb. 2.7 Neubauer-Zählkammer

#### Mögliche Fehlerquellen:

- Zellsuspension nicht adäquat durchmischt
- Zellsuspension zu niedrig- bzw. zu hoch verdünnt
- Deckglas nicht korrekt auf die Zählkammer gebracht
- Zählkammer unter- bzw. überfüllt (nicht >10 µl einfüllen!)
- Zu wenig Großquadrate ausgezählt (mindestens 4 an der Zahl!)

### Exkurs 6: Thrombocyten-Isolation

Obwohl der Dichteunterschied von Thrombocyten und MNCs nicht gerade gigantisch ist, lassen sich die Fraktionen mittels Zentrifugation recht effizient voneinander trennen. Zum Tragen kommt in diesem Falle der beträchtliche Größenunterschied, aufgrund dessen die MNCs schneller sedimentieren.

Hier ein konventionelles Protokoll zur Anreicherung von Thrombocyten:

Antikoaguliertes Blut wird bei Raumtemperatur 15 min mit 150 g zentrifugiert. Optional kann man vorher zur Hemmung der Thrombocytenaktivierung Prostaglandin  $E_1$  ( $PGE_1$ ) in einer Endkonzentration von 2 µM dazugeben. Der mit Thrombocyten angereicherte Überstand (platelet-rich plasma; PRP) wird in ein neues Tube überführt und mit 1/10 Volumen ACD-Puffer versetzt. Die Blutplättchen werden nun durch 5 min Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 800 g pelletiert und im gewünschten Puffer resuspendiert.

### ! Anmerkung

Erythrozyten können mit unterschiedlichen Puffern lysiert werden. Neben den genannten Varianten NaCl und Aqua dest. kommen auch häufig  $NH_4Cl$ -Puffer und kommerzielle Lyse-Reagenzien (FACS™ Lysing Solution, BD Biosciences, San Jose oder CyLyse®, Partec, Münster) zum Einsatz. Es hat sich gezeigt, dass z. B. durchflusscytometrische Ergebnisse in Abhängigkeit der verwendeten Lyse-Reagenzien stark voneinander abweichen. Im Sinne der Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse sind die kostenintensiveren, kommerziellen Varianten vorzuziehen.

Mögliche **Thrombocyten-Kontaminationen** können durch nachfolgende Waschschritte minimiert werden. Ein weiterer Trick besteht in einer Ansäuerung (z. B. mit ACD) des Verdünnungsmediums (PBS) auf pH 6,5. Als Konsequenz des niedrigeren pH-Wertes runden sich die Thrombocyten ab, was zu einer verminderten »Klebrigkeit« derselben führt. Dadurch, dass die Thrombocyten dann weniger agglomerieren und auch weniger an anderen Zellen haften bleiben, verbleibt ein höherer Anteil in der Serumphase, sodass die MNC-Schicht weniger kontaminiert sein sollte.

Die erwartete Ausbeute an Lymphocyten, also exklusive Monocyten, beträgt bei durchschnittlichem Blutbild ca.  $10^6$  Zellen/ml Vollblut.

Sollte das Ergebnis ihrer MNC-Separation unbefriedigend ausfallen, könnte sich zwecks Fehlersuche ■ Tab. 2.3 für Sie als hilfreich herausstellen.

Diejenigen unter Ihnen, die Thrombocyten nicht voller Abscheu als Kontamination betrachten, sondern sich hochofreut über deren Gegenwart zeigen, mögen sich an Exkurs 6 delectieren.

### ■ Innovationen gefällig?

Eine Verfeinerung der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation stellen speziell gefertigte Tubes dar, die als innovative Komponente eine Filterscheibe enthalten, die sich direkt auf dem Trennmedium befindet. Sie soll sicherstellen, dass die Diskontinuität zwischen Trennmedium und Probe während des Beladens vollständig erhalten bleibt. Das weitere Handling unterscheidet sich lediglich in den

Der Experimentator: Immunologie

Luttmann, W.; Bratke, K.; Küpper, M.; Myrtek, D.

2014, XVIII, 299 S. 91 Abb., Softcover

ISBN: 978-3-642-41898-3