

# spezielle Sortierfagen

<http://www.cell-sorter.de>

## Unterschiede zwischen unserem MoFlo und dem FACSaria II:

### MoFlo

Das MoFlo ist modular und flexibel. Deshalb können wir das MoFlo durch physikalischen Umbau den biologischen Problemen anpassen.

Für die Benutzer ist die optische Justierung des MoFos zu kompliziert.

Zum Sortieren ist eine Bedienperson notwendig.

Das MoFlo hat eine geringere Fluoreszenzauflösung als der FACSaria entsprechend der "stream in air" Messung.

In der Praxis ist es möglich, mit dem MoFlo um 50 % schnellere Zellsortierungen durchzuführen als mit dem FACSaria.

An unserem MoFlo haben wir eine starke (100 mW) echte (355 nm) UV-Anregung.

Das MoFlo ist gut geeignet, große und fragile Zellen zu sortieren.

Das Flußsystem des MoFos ist einfach steril zu halten.

### FACSaria II

Der FACSaria II hat einen festen Aufbau. Deswegen kann die Anregungswellenlänge und Intensität der Laser nicht verändert werden.

Der FACSaria II ist einfach zu benutzen. Es ist nicht aufwändig, die Düse zu wechseln.

Der FACSaria II kann von angelegten Benutzern bedient werden.

Für kleine Zellen und sichtbare Lichtanregung hat der FACSaria II ausgezeichnete Fluoreszenzaufösungen.

Zellsortierungen mit dem FACSaria II sind langsamer als mit dem MoFlo. Der FACSaria II hat einen hohen Zellverlust.

Der FACSaria II hat nur eine UV-nahe (375 nm) und sehr schwache (7 mW) Lichtanregung. Speziell für große Zellen ist die Auflösung schlecht. Die Side Population (SP) kleiner, nichtadhärenter, kompakter Zellen kann mit dem FACSaria gemessen werden (siehe Beispiele).

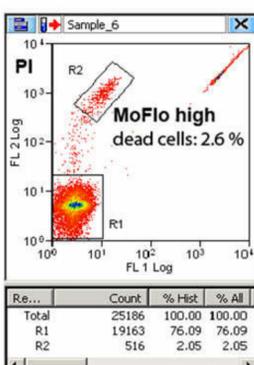
Große adhärenente Zellen werden geschädigt oder getötet bei der Sortierung mit dem FACSaria II. Bei großen abtrypsinierten Zellen hat der FACSaria II eine sehr schlechte Scatter-Auflösung.

Es ist unkompliziert, den FACSaria II steril zu halten.

## Vergleich der Vitalität sortierter K562-Zellen:

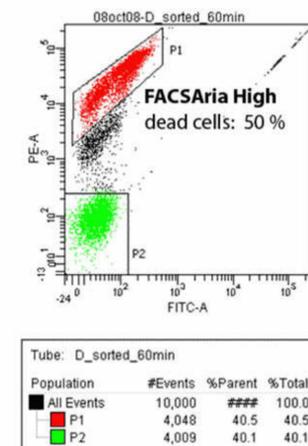
Die K562-Linie besteht aus nicht-adhärenenten runden Zellen mit einem Durchmesser von ca. 15 µm. Vor dem Sortieren waren 3 % der Zellen tot. Nach Propidium Jodid (PI) - Färbung, wurden die vitalen K562-Zellen mit dem MoFlo und dem FACSaria herausortiert. Die sortierten Zellen wurden wieder mit PI gefärbt und reanalysiert, um die Vitalität der mit dem MoFlo bzw. dem FACSaria sortierten Zellen zu vergleichen.

Reanalyse der am **MoFlo** im "high speed mode" sortierten K562-Zellen :



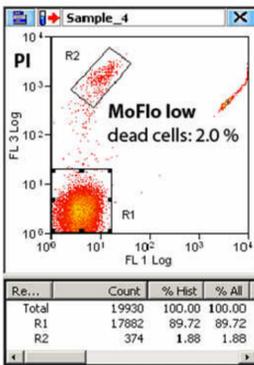
**MoFlo:** Düse: 70 µm, Druck: 60 psi, Hüllstrom: Hanks BSS, cell counting beads

Reanalyse der am **FACSaria** im "high speed mode" sortierten K562-Zellen :



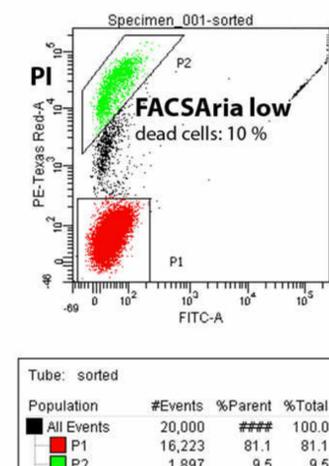
**FACSaria:** Düse: 70 µm, Druck: 70 psi, Hüllstrom: Hanks BSS, cell counting beads

Reanalyse der am **MoFlo** im "low speed mode" sortierten K562-Zellen :



**MoFlo:** Düse: 100 µm, Druck: 20 psi, Hüllstrom: Hanks BSS, cell counting beads

Reanalyse der am **FACSaria** im "low speed mode" sortierten K562-Zellen :



**FACSaria:** Düse: 100 µm, Druck: 20 psi, Hüllstrom: Hanks BSS, cell counting beads

**Ergebnis:** Am MoFlo werden die K562-Zellen weniger geschädigt als am FACSaria. Kulturzellen wie die K562-Linie sollten mit dem MoFlo und nicht mit dem FACSaria sortiert werden!

## Wann sollte der Fluoreszenz-aktivierte Zellsorter Massenreicherungsmethoden wie Panning, Elutriation oder einer Separation mit magnetischen oder paramagnetischen Beads vorgezogen werden ?

- Wenn eine sehr große Reinheit (98%-100%) der Zielpopulation erforderlich ist.
- Wenn Populationen getrennt werden müssen, die eine sehr geringe Rezeptordichte auf ihrer Oberfläche haben.
- Bei Trennungen von Populationen aufgrund der Rezeptordichte.
- Bei Sortierungen nach vielen Farben.
- Bei Separationen auf der Basis von zellinternen Färbungen wie DNA, interne Antigene oder aufgrund exprimierter fluoreszenter Proteine.
- Wenn Einzelsortierungen gefragt sind, z.B. bei Klonierungen oder bei der Einzelzell-PCR.
- Wenn alle anderen Anreicherungsverfahren versagen.

## Nach welchen biologischen Parametern können die Zellen angereichert werden ?

Nach Zelleigenschaften, die mit Fluoreszenzfarbstoffen dargestellt werden können wie z.B.

- Protein Expression,
- DNA Gehalt,
- Zellfunktion
- oder anderen anfärbaren Zelleigenschaften.
- Aber auch Steuerelemente
- und Kombinationen aus den einzelnen Parametern.

## Welches sind die meist verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe für das Sortieren ?

- Bei der Immunophänotypisierung mit bis zu 9 Farben z.B. FITC, PE, CY5, Cascade Blue, Amca, APC, TR und die Tandemfarbstoffe mit PE und APC.
- Bei der Expression fluoreszenter Proteine z.B. e-BFP, e-CFP, e-GFP, e-YFP oder DS-Red.
- Bei der Zellteilung z.B. BUdR/Hoechst, CFSE oder PKH26
- Zellzyklus und Ploidie z.B. PI, Hoechst-Farbstoffen oder DAPI.
- Bei der Kalzium-Mobilisierung z.B. Indo-1
- Apoptose: Sortierung des Sub-diploiden Peaks oder Annexin V-Markierung

An unserem MoFlo können fast alle üblicherweise benutzten Farbstoffe zum Sortieren verwendet werden.

## Was kann mit sortierten Zellen gemacht werden ?

- Z.B. Zellkultur, stabile Zelllinien,
- DNA-Analysen, PCR,
- RNA-Analysen, FISH, Micro-Array-Analysen,
- morphologische Untersuchungen mit dem Mikroskop,
- Protein Extraktion, Western Blots,
- DNA Analysen, PCR,
- Zellklonierung,
- oder Zellanreicherungen für funktionelle Tests.

## Werden die Zellen durch den Sortiervorgang geschädigt ?

Im allgemeinen werden die Zellen durch den Sortiervorgang nicht geschädigt, wenn die Temperatur und der PH-Wert stimmen und das Medium für die Zellen geeignet ist. Meist sind mehr als 95% der Zellen nach dem Sortieren intakt. Schon vorgeschädigte Zellen sind bei der Sortierung anfälliger für Schädigungen als vollkommen intakte Zellen. Was aus dem Sorter herauskommt, ist mit dem sehr ähnlich, was in den Sorter hineingegeben wurde!

## Geschätzte Sortierzeiten:

Die Einstellzeit des MoFos beträgt 90 Minuten, das Herunterfahren des Gerätes nach der Sortierung dauert weitere 15 Minuten. Deswegen versuchen wir so viel Sortierungen wie möglich direkt nacheinander durchzuführen.

Die Dauer des reinen Zellseparationsprozesses hängt von der Ausgangszellzahl ab und nicht von der Anzahl der benötigten sortierten Zellen. Durchschnittliche Sortiergeschwindigkeiten:  
adhärenente Zelllinien: ~30 Millionen Ausgangszellen/h  
Blutzellen/Thymozyten: ~100 Millionen Ausgangszellen/h.

Das Sortieren von 10 Millionen Zellen dauert mit Ein- und Ausstellen des Sorters ungefähr 2h, von 100 Millionen Zellen etwa 3-5 Stunden.

Die aktuelle Sortierzeit ist sehr abhängig von der Zellschicht, weil nur ein bestimmtes Probenvolumen pro Zeiteinheit durch den Sortierlaufgang kann, wenn die Strömung laminar bleibt soll. Da tote Zellen und Zellschrott auch als Ereignisse gewertet werden, verlängern ihre Ausselektion den Sortiervorgang unnötig.

## Wonach kann eine Sortierung optimiert werden ?

- Reinheit
- Recovery
- genaue Zellzahl

## Reinheit der sortierten Zellen:

Die maximale Reinheit der sortierten Zellen beträgt 99% bis 100%. Sie kann in einem Sortierschritt erreicht werden, wenn die Zielpopulation grösser als 10% ist. Die Sortierreinheit übersteigt im allgemeinen 95% wenn die Zielpopulation größer als 1% ist. Die Reinheit der sortierten Fraktion hängt von der Qualität der Probe und den Sortierparametern ab. Allgemein ist die Reinheit um so kleiner, je grösser die Ausbeute sein soll. Weiter hängt die Reinheit stark von der Stabilität der Flußzytometers ab. Die Stabilität des Sorters ist wesentlich von der Nichtanwesenheit von Schlamm aus zerfallenden Zellen abhängig.

## Zellausbeute:

50% Recovery ist ein vernünftig angenommener Mittelwert, aber der aktuelle Prozentsatz der Zellen, die wiedergefunden werden hängt von vielen Faktoren ab:  
• dem Zelltod, der vor, während und nach dem Sortieren stattfindet,  
• dem Verlust durch Adhärenz der Zellen an den Röhrenwänden (wir benutzen deswegen Polypropylen anstatt Polystyrene Röhren),  
• dem Anteil des Zellschlammes aus abgestorbenen Zellen,  
• der präzisen Einstellung und der Stabilität des Flußzytometers  
• und davon, ob es sich um eine Anreicherungs- oder eine Reinsortierung handelt.

## Kann man eine Population von weniger als 1% herausortieren oder müssen die Zellen vorher angereichert werden?

Ja, seltene Ereignisse unter 1% Zielzellen können sortiert werden, aber darunter leidet die Reinheit und die Ausbeute. Deswegen sollte die Konzentration der Zielzellen, wenn möglich, vorher durch Massenreicherungsmethoden oder durch eine vorausgehende Anreicherungs-sortierung erhöht werden.

## In welche Gefäße kann sortiert werden ?

Das Volumen eines sortierten Tropfens beträgt ca. 1,4 nl. Einzelne Tropfen trocknen in Sekunden aus. Deswegen sollte, vor allem bei wenig zu erwartenden Zellen, 1-2 ml Serum oder etwas, worin sich die Zellen wohlfühlen, in die Sortiergefäße vorgelegt werden.  
• Eppendorf Röhrenchen bei bis zu einer Million erwarteter Zellen  
• 5 ml bis 50 ml Falcon - Röhrenchen,  
• Multiwell-Platten mit 6 bis 384 wells,  
• bis zu 4 kleine Röhrenchen gleichzeitig,  
• Objektträger oder Filter oder Nitrozellulose Membranen.

>> zum Seitenanfang