

Software-gesteuerte Beschleunigungs- und Bremsrampe zur optimierten Isolierung von mononukleären Zellen

Holger Heine, Forschungszentrum Borstel, 23845 Borstel
Thomas Uschkureit, Eppendorf AG, Hamburg

Einführung

Viele Anwendungen in klinischen und zellbiologischen Laboratorien erfordern eine möglichst schnelle Bearbeitung der zu untersuchenden Proben. Die für solche Anwendungen notwendigen Zentrifugen sollten deshalb möglichst schnell beschleunigen und entsprechend schnell abbremsen können, damit z.B. temperatursensitive Proben wie Kulturzellen ohne lange Verweilzeit in der Zentrifuge für weitere Schritte der entsprechenden Applikation verwendet werden können. Mit der Entwicklung der Centrifugen 5702, 5702 R und 5702 RH stellt Eppendorf moderne Laborzentrifugen für solche Applikationen zur Verfügung, die extrem kurze Beschleunigungs- und Bremszeiten aufweisen (< 25 sec). Neben der Geschwindigkeit ist die sogenannte Rückmischrate ein entscheidendes Kriterium für die Güte einer Zentrifuge im Routinelabor. Besonderes Augenmerk wurde deshalb auf die Entwicklung einer zweiten, schonenden und zugleich schnellen Beschleunigungs- und Bremsrampe gelegt. Diese sogenannte Soft-Funktion ermöglicht es dem Anwender sensitive Anwendungen wie z.B. Dichtegradientenzentrifugationen zur Isolierung von Blutzellen schnell und reproduzierbar durchzuführen. Die Isolierung von humanen mononukleären Zellen (MNC) aus Vollblut ist eine dieser Standardmethoden zellbiologischer Labore. Diese Zellpopulation, die T- und B-Lymphozyten und Monozyten enthält,

kann anschließend direkt für Versuche benutzt werden, oder dient als Ausgangspopulation für eine weitere Isolierung der einzelnen Zelltypen. Für die Isolierung von MNC durch Dichtegradientenzentrifugation wird hauptsächlich eine Methode verwendet, die auf den Dichteigenschaften von Ficoll beruht (1). Rote Blutkörperchen (Erythrozyten) passieren aufgrund der höheren Dichte die Ficoll-Phase (Dichte: 1,077 g/ml) und sedimentieren. Als hochpolymerer Zucker bewirkt Ficoll zudem eine Agglutination (Verklumpung) der Erythrozyten und somit eine Sedimentationsbeschleunigung. Lymphozyten, Thrombozyten und Monozyten sammeln sich an der Plasma-Gradientenphase (spezifisches Gewicht kleiner 1,077 g/ml) und können so angereichert werden. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Software-Optimierung zur Entwicklung einer optimalen Soft-Funktion zusammengefasst.

Material und Methoden

1. 10 ml Raumtemperatur-warme Biocoll-Separating-Solution (enthält Ficoll® 400, Biochrom AG) werden in ein konisches 50 ml Gefäß (Falcon®-Gefäße, BD Biosciences) pipettiert.
2. Humanes Vollblut wird 1:2 mit HBSS (Hanks balanced salt solution, Invitrogen) verdünnt.
3. Die Ficoll-Phase wird mit 35 ml verdünntem Blut überschichtet. Dabei ist eine Verwirbelung von Blut und Biocoll unbedingt zu vermeiden!
4. Es erfolgt die Zentrifugation für 30 min bei 1600 U/min (440 x g) und ein- bzw. ausgeschalteter Soft-Funktion (Centrifuge 5702, Rotor A-4-38, Adapter 5702 734.004 für konische Zentrifugen-Gefäße).
5. Optische Analyse des ausgebildeten Gradienten mit einer Digitalkamera.
6. Anschließend wird der HBSS/Thrombozyten/Blutplasma-Überstand bis ca. 1 cm oberhalb des MNC-Ringes vorsichtig abgesaugt.
7. Der MNC-Ring wird mit einer 10 ml Pipette vorsichtig in ein neues 50 ml Gefäß überführt. Alle Schritte werden auf Eis durchgeführt und es werden nicht mehr als 20 ml pro Gefäß verarbeitet.
8. Mit HBSS wird auf 50 ml aufgefüllt, durch vorsichtiges Schütteln gut gemischt und mit eingeschalteter Bremse zentrifugiert (10 min, 1600 U/min, 440 x g).
9. Nachdem der Überstand abgesaugt worden ist, wird das Pellet in 1 ml HBSS resuspendiert und Schritt 7 (Zentrifugation) wird wiederholt.
10. Abschließend wird der Überstand abgesaugt und die Zellen werden in 5 ml Kulturmedium aufgenommen. Es erfolgt die Bestimmung der Zellzahl (Neubauer-Zählkammer) und -größe. Hierzu werde 50 µl der Zellsuspension mit 10 ml Zählflüssigkeit (Isoton II, Beckmann Coulter, Krefeld) versetzt und in einem Coulter Channelyzer 256 (Beckmann Coulter, Krefeld) analysiert.

Ergebnisse und Diskussion

Die in dieser Untersuchung erhaltenen Ergebnisse wurden zunächst qualitativ durch die optische Beurteilung des ausgebildeten Gradienten (vgl. Schritt 4, Material und Methoden) dokumentiert und am Ende des Experiments durch die Bestimmung der Zellzahl quantitativ verifiziert. Dabei wurde darauf geachtet, dass das verwendete Blut jeweils eines Spenders für die Ausbildung von mindestens vier Gradienten verwendet werden konnte; zwei in der zu untersuchenden Centrifuge 5702 und zwei in einer Vergleichszentrifuge. Als Vergleichsmodell stand in dieser Studie die Centrifuge 5810

zusammen mit dem Ausschwingrotor A-4-44 und den entsprechenden Adaptern für konische 50 ml Gefäße (5804 758.005) zur Verfügung. Die Centrifuge 5810 verfügt über 9 Brems- und 9 Beschleunigungsrampen und von der hier gewählten Rampe 0 (niedrigste Beschleunigung bzw. Bremse) sind sehr gute Ergebnisse für diese Applikation bekannt. Zunächst wurde die verwendete Centrifuge 5702 bei allen erforderlichen Zentrifugationsschritten mit eingeschalteter Bremse betrieben. Abb. 1a zeigt deutlich, dass bei dieser Zentrifugation, neben dem vorsichtigem Aufschichten des Vollblut/Mediumgemisches auf das Ficoll

(vgl. Material und Methoden), die Bremseneinstellung der Zentrifuge von großer Bedeutung ist. Bei eingeschalteter Bremse ist eine Isolierung der mononukleären Zellen nicht möglich, da kein MNC-Ring zu erkennen ist.

Im nächsten Schritt wurde eine Soft-Funktion implementiert, die eine nur leicht verlängerte Beschleunigung sowie einen ungebremsten Auslauf des Rotors ermöglicht (Abb. 1b). Der Vergleich mit der Centrifuge 5810 (Abb. 1c) belegt, dass bei beiden Versuchen ein zu erkennender Gradient ausgebildet wird, dieser in der Vergleichszentrifuge jedoch wesentlich deutlicher ausgeprägt ist.

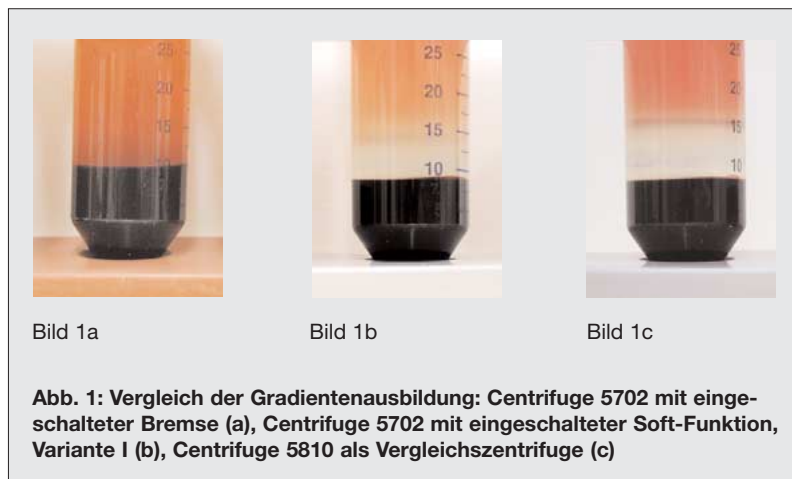


Bild 1a

Bild 1b

Bild 1c

Abb. 1: Vergleich der Gradientenausbildung: Centrifuge 5702 mit eingeschalteter Bremse (a), Centrifuge 5702 mit eingeschalteter Soft-Funktion, Variante I (b), Centrifuge 5810 als Vergleichszentrifuge (c)

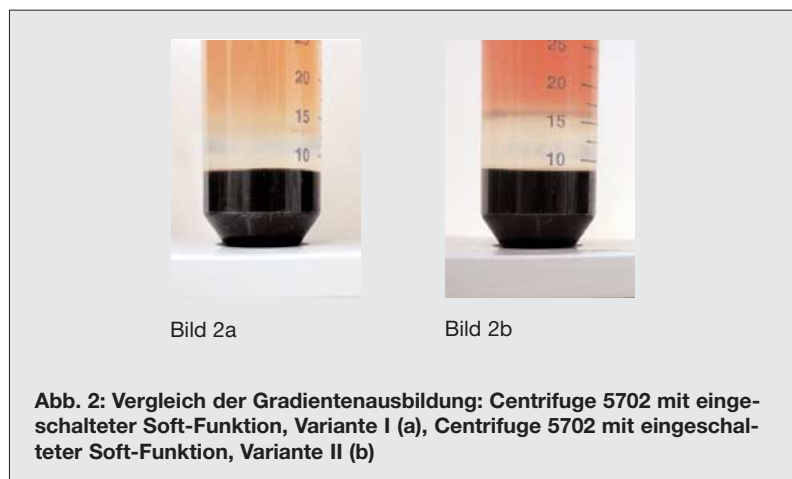


Bild 2a

Bild 2b

Abb. 2: Vergleich der Gradientenausbildung: Centrifuge 5702 mit eingeschalteter Soft-Funktion, Variante I (a), Centrifuge 5702 mit eingeschalteter Soft-Funktion, Variante II (b)

Dieser optische Eindruck wird durch die in Tabelle 1 zusammengefassten Zellausbeuten bestätigt.

Eine deutliche Verbesserung der Zentrifugationsergebnisse wurde durch die Verwendung einer Zentrifuge mit einer neuen Software (Variante II) erreicht. Diese Variante ermöglicht sowohl eine gleichmäßig langsame Beschleunigung als auch ein elektronisch gesteuertes gleichmäßiges Abbremsen. Der in Abb. 2 dargestellte Vergleich zeigt eindeutig, daß der Ring mononukleärer Zellen in der Centrifuge 5702 mit dieser Software-Variante (Abb. 2b) wesentlich leichter zu lokalisieren ist als in dem Gerät mit der ersten Software-Variante (Abb. 2a). Dies führt sowohl zu einer höheren Zellausbeute (vgl. Tabelle 1) als auch zu einer Reduktion unerwünschter Zellen (z.B. Thrombozyten), wie mit Hilfe einer Streulichtanalyse (vgl. Material und Methoden) gezeigt werden konnte (Ergebnisse nicht dargestellt).

Das für die bisher beschriebenen Versuche verwendete Blut stammte von einem Spender, so dass die Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet ist.

Table 1: Versuchsbeschreibung sowie Ergebnisse zur Ermittlung der optimalen Soft-Funktion

Zentrifuge	Centrifuge 5702 Software I	Centrifuge 5702 Software I	Centrifuge 5702 Software II	Centrifuge 5810 (Vergleichsmodell)
Programm für Ficoll-Gradienten				
RPM; RCF	1600 1/min; 440 x g	1600 1/min; 440 x g	1600 1/min; 440 x g	1700 1/min; 440 x g
Zeit (gesamt)	30 min	30 min	30 min	30 min
Bremse, Beschleunigung	max.	<i>Soft-Funktion</i>	<i>Soft-Funktion</i>	min. (Rampe 0/0)
Wasch-Programm				
RPM; RCF	30 min	1600 1/min; 440 x g	1600 1/min; 440 x g	1600 1/min; 440 x g
Zeit (gesamt)	max.	30 min	30 min	30 min
Bremse, Beschleunigung	n.d.	max.	max.	Rampe 9/9
Menge MNC	n.d.	152 Mio	168 Mio	172 Mio

n.d.: nicht detektierbar



Bild 3a



Bild 3b

Abb. 3: Vergleich der Gradientenausbildung: Centrifuge 5702 mit eingeschalteter Soft-Funktion, Variante II (a); Centrifuge 5702 mit eingeschalteter Soft-Funktion, Variante III (b)

In einem dritten Schritt wurde die Software auf eine möglichst geringe Laufzeit optimiert. Abb. 3 zeigt einen Vergleich der Software-Varianten II und III. Die Ausbildung des Ficoll-Gradienten ist in beiden Fällen als vergleichbar gut zu beurteilen, wobei die Variante III deutlich kürzere Bremszeiten ermöglicht (ca. 60 sec im Vergleich zu ca. 180 sec bei Variante II). Sowohl für die Beschleunigung als auch für das Abbremsen konnte auf diese Weise eine Soft-Funktion entwickelt werden, die es ermöglicht, schnell und mit reproduzierbar guten Ergebnissen mononukleäre Zellen über einen Ficoll-Gradienten aufzureinigen.

Zusammenfassung

In dieser Applikation wurde durch die Zusammenarbeit von akademischer Forschung und industrieller Entwicklung die Software einer Zentrifuge für das klinische Routinelabor optimiert. Verschiedene Versionen der Centrifuge 5702 wurden im Hinblick auf die Isolierung von humanen mononukleären Zellen

(MNC) aus Vollblut durch eine Dichtegradientenzentrifugation untersucht. Es zeigte sich, dass obwohl schon die erste vorgesehene Software für die Methode geeignet ist, das Ergebnis durch die Optimierung der Steuersoftware nochmals verbessert werden konnte. Somit steht mit der Centrifuge 5702 ein Laborgerät zur Verfügung, das im klinischen Routinelabor für nahezu alle Anwendungen einsetzbar ist.

Die optimierte Software-Variante ist selbstverständlich auch in den anderen Geräten dieser Centrifugen-Familie implementiert, wie der gekühlten Variante, der Centrifuge 5702 R, und der neuesten Zentrifuge dieser Familie, der temperierbaren Centrifuge 5702 RH, die sowohl heizen als auch kühlen kann und damit sehr genaue Temperatureinstellungen ermöglicht (+/- 0,5 °C bei 4 °C und 37 °C).

Referenzen

- [1] Böyum, A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood *Scand.J.Lab.Clin.Invest* 21:77-89.



Bestellinformationen

Bezeichnung	Bestell-Nr.
Centrifuge 5702, ohne Rotor	5702 000.019
Centrifuge 5702 R, ohne Rotor	5703 000.012
Centrifuge 5702 RH, ohne Rotor	5704 000.016
Ausschwingrotor A-4-38, inkl. 4 Rundbecher à 85 ml	5702 720.003
Adapter für 50 ml Falcon-Gefäße, Satz à 2 Stück	5702 734.004
Centrifuge 5810, ohne Rotor	5810 000.017
Ausschwingrotor A-4-44, inkl. 4 Rechteckbecher à 100 ml	5804 709.004
Adapter für 50 ml Falcon-Gefäße, Satz à 2 Stück	5804 758.005

eppendorf
In touch with life

Your local distributor: www.eppendorf.com/worldwide

Application Hotline: +49 40-3 66 67 89

Eppendorf AG · Germany · Phone: +49 40-538 01 0 · Brinkmann Instruments, Inc. · USA · Internet: www.brinkmann.com