



# Immunzell-Medium

## Datenblatt

|                                 |                |
|---------------------------------|----------------|
| <b>Artikel Nr. BS.34.0100IZ</b> | <b>100 ml</b>  |
| <b>Artikel Nr. BS.34.0500IZ</b> | <b>500 ml</b>  |
| <b>Artikel Nr. BS.34.1000IZ</b> | <b>1000 ml</b> |

(Nur für die Forschung)

---

Chargen-Nr.:

Mindestens haltbar bis:

Aussehen:

Farbe:

---

|   |  |  |
|---|--|--|
| <b>Bio&amp;SELL</b><br>Lohweg 27<br>90537 Feucht bei Nürnberg | E-Mail: <a href="mailto:info@bio-sell.de">info@bio-sell.de</a><br>Internet: <a href="http://www.bio-sell.de">www.bio-sell.de</a> | Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32<br>Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33 |
|---|--|--|



# Immunzell-Medium

## Beschreibung

Das Immunzell- (IZ) Medium ist ein ready-to-use Medium zur erfolgreichen Kultivierung von T-Zellen, CIK-Zellen (Zytokin-induzierte Killerzelle), LAK-Zellen (Lymphokin aktivierte Killerzelle), NK-Zellen (natürliche Killerzellen) in Suspensionskulturen ohne die Zugabe von Serum (Kälber oder humanes Serum).

Die Grundlage für das serumfreie IZ-Medium von Bio&SELL bildet das RPMI 1640 und das DMEM-F12 Medium. Durch den Zusatz spezieller Salze, Spurenelemente, Albumin, Cholesterin, Lipiden und Vitaminen wurden diese für die Kultivierung und die Proliferationen von Immunzellen optimiert.

## Besonderheiten:

Das IZ-Medium enthält bewusst keine Wachstumsfaktoren (wie z.B. rekombinante Zytokine) für die Zelldifferenzierung oder die Anreicherung von T-Zellen aus Vollblutproben. Diese können somit abgestimmt auf die individuellen Anforderungen zugegeben werden.

## Anwendungsgebiete:

Das IZ-Medium ist optimiert für:

- Anreicherung **von T-Zellen** aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)/ Vollblut nach Stimulation (z.B. mit PHA-L oder anti-CD3)
- Anreicherung von **NK-, LAK- und CIK-Zellen** nach Stimulation
- Langzeitkultivierung von **immortalisierten T-Zellen**

|  |  |  |
|--|--|--|
| Bio&SELL<br>Lohweg 27<br>90537 Feucht bei Nürnberg | E-Mail: <a href="mailto:info@bio-sell.de">info@bio-sell.de</a><br>Internet: <a href="http://www.bio-sell.de">www.bio-sell.de</a> | Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32<br>Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33 |
|--|--|--|

## Anwendungshinweise

### Isolierung von PBMCs / Lymphozyten aus Vollblut durch Dichte- gradientenzentrifugation

- Das heparinisierte Vollblut wird 1-3-fach mit DPBS oder RPMI-Medium verdünnt und zu einem, mit einer Lymphozyten-Trennlösung gefüllten, Zentrifugenröhrchen gegeben. Pipettieren Sie das Blut sorgfältig auf die Trennlösung, um ein Mischen der verschiedenen Phasen zu vermeiden.
- Zentrifugieren Sie bei 800 g für 20 Minuten bei Raumtemperatur (Abschalten der Bremse an der Zentrifuge!)

Nach der Zentrifugation entstehen 4 Phasen:

1. Top-Phase: Plasma

**2. Phase: erscheint als undurchsichtiges weißliches Band der sog. „Buffy-Coat“ (Leukozytenschicht) dieser enthält die Lymphozyten**

3. Phase: Trennmedium

4. Phase: Pellets mit Erythrozyten und Granulozyten

- Die oberste Phase (Das Plasma) mit einer Pipette vorsichtig entfernen
- Die Lymphozyten (Buffy-Coat) mit einer neuen Pipette in ein neues Zentrifugalrohr überführen
- Waschen der Lymphozyten/ PMBCs mit 10 ml einer gepufferten Salzlösung, z.B. 1x DPBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  /  $\text{Mg}^{2+}$ )
- Anschließend 10 Minuten bei 300 g zentrifugieren
- Verwerfen Sie den Überstand und waschen das Lymphozytenpellet erneut mit 1x DPBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  /  $\text{Mg}^{2+}$ )
- Insgesamt sind 2-3 Waschschrte erforderlich

|   |  |  |
|---|--|--|
| <p><b>Bio&amp;SELL</b><br/><br/>Lohweg 27<br/>90537 Feucht bei Nürnberg</p> | <p>E-Mail: <a href="mailto:info@bio-sell.de">info@bio-sell.de</a><br/>Internet: <a href="http://www.bio-sell.de">www.bio-sell.de</a></p> | <p>Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32<br/>Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33</p> |
|---|--|--|

## Immunzell-Medium

### Wichtig:

- Verwenden Sie die Trennlösung bei Raumtemperatur
- Je verdünnter die Blutprobe, desto besser die Reinheit der mononukleären Zellen
- Das periphere Blut oder Buffy-Coat sollte nicht älter als 6 Stunden und mit Antikoagulanzen (z.B. Heparin) versetzt sein
- Pipettieren Sie das Blut sehr sorgfältig auf die Trennlösung, um das Mischen der Phasen zu vermeiden
- Bremse der Zentrifuge ausschalten
- Schnelles Bremsen verursacht eine Mischung der Phasen

### Zellkultur von Immunzellen

Das IZ-Medium wurde für die serumfreie Kultivierung von Lymphozyten aus Vollblut entwickelt. Zellen des peripheren Blutes sind in der G<sub>0</sub> Phase arretiert und müssen zwingend mit Mitogenen (wie pflanzlichen Lektinen, z.B. Phytohemagglutinin PHA; oder Antikörper wie z.B. anti-CD3) stimuliert werden um einige Zeit in der Zellkultur kultiviert werden zu können.

### Tipps zur Stimulation von T-Zellen:

- T-Zelldichte von  $1 \times 10^5$ /ml
- Zugabe von PHA nach Herstellerangabe (1-5 µg/ml)
- Inkubationszeit variiert zwischen 48-72 Std. (abhängig von Art und Herkunft der Lymphozyten und dem Verwendungszweck)
- Zugabe von frischem IZ-Medium und die weitere Stimulierung der T-Zellen ist nötig um die Kultur fortzuführen

### Bitte beachten:

Die Proliferationsrate von primären Lymphozyten aus Vollblut ist begrenzt.

|  |  |  |
|--|--|--|
| <p><b>Bio&amp;SELL</b><br/>Lohweg 27<br/>90537 Feucht bei Nürnberg</p> | <p>E-Mail: <a href="mailto:info@bio-sell.de">info@bio-sell.de</a><br/>Internet: <a href="http://www.bio-sell.de">www.bio-sell.de</a></p> | <p>Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32<br/>Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33</p> |
|--|--|--|



## Immunzell-Medium

### Tipps zur Stimulation/ Kultivierung von CIK

CIKs werden durch Zugabe von IFN- $\gamma$ , mAb anti-CD3 (OKT3) und IL-2 zu isolierten PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) angereichert. Nach 2-3 Wochen *in vitro* Kultur ist ihre Konzentration bis zu 1000-fach erhöht.

Die Isolierung von PBMCs ist in der Regel der erste Schritt um Zellen des Immunsystems zu erhalten. Aufgrund der unterschiedlichen Dichten von Granulozyten, PBMCs und roten Blutzellen (RBCs), ist die Trennung über einen Dichtegradienten einfach möglich.

Zunächst werden, wie oben beschrieben, Lymphozyten durch eine Dichtegradientenzentrifugation isoliert.

Der Buffy-Coat (mit den enthaltenen Lymphozyten) wird isoliert und das Zellpellet 2-3 mal in 1x DPBS (ohne Ca<sup>2+</sup> / Mg<sup>2+</sup>) gewaschen.

### Kultivierung von CIKs:

Zur Isolierung von CIKs aus Vollblut benötigen Sie:

- Lymphozytenmedium: Bio&SELL IZ-Medium
- PBMCs
- Anti-CD3
- IL-2; 1000 IU/ml
- IFN $\gamma$ ; 2000 IU/ml
- Bei Bedarf 5% autologes Serum

|   |  |  |
|---|--|--|
| <b>Bio&amp;SELL</b><br>Lohweg 27<br>90537 Feucht bei Nürnberg | E-Mail: <a href="mailto:info@bio-sell.de">info@bio-sell.de</a><br>Internet: <a href="http://www.bio-sell.de">www.bio-sell.de</a> | Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32<br>Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33 |
|---|--|--|

# Immunzell-Medium

## Protokoll

Verwenden Sie anti-CD3 nach Empfehlung des Herstellers.

- Tag 0: (optional) Beschichtung (coating)
  - Anti-CD3 (OKT3) mit sterilem DPBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  /  $\text{Mg}^{2+}$ ) auf 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  verdünnen
  - 10 bis 15 ml sind für einen T175  $\text{cm}^2$ -Kolben erforderlich
  - Inkubation bei 4 °C über Nacht (maximal für 3 Tage)
  - Waschen mit sterilem DPBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  /  $\text{Mg}^{2+}$ ) und anschließend mit Bio&SELL IZ-Medium vor dem Gebrauch
  
- Tag 1:
  - Zellen auf eine Zelldichte von  $1,5\text{-}2 \times 10^6$  Zellen/ml in 25-30ml IZ-Medium einstellen
  - Supplementieren Sie mit:
    - 2000 IU/ml  $\text{IFN}\gamma$
    - 1000 IU/ml IL-2
  - Bringen Sie die vorbereiteten Zellen in einem T175-Kolben (OKT3-beschichtet, optional) aus
  - Addieren Sie 100 ng /ml anti CD3 (OKT3), wenn der Kolben nicht beschichtet wird.
  
- Kultivierung bei 37 °C mit 5%  $\text{CO}_2$ .

|   |  |  |
|---|--|--|
| <p><b>Bio&amp;SELL</b></p> <p>Lohweg 27<br/>90537 Feucht bei Nürnberg</p> | <p>E-Mail: <a href="mailto:info@bio-sell.de">info@bio-sell.de</a><br/>Internet: <a href="http://www.bio-sell.de">www.bio-sell.de</a></p> | <p>Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32<br/>Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33</p> |
|---|--|--|

## Immunzell-Medium

- Tag 3:
  - Entnehmen Sie eine 100 µl Probe zum Auszählen der Zellen
  - Geben Sie 25-30ml frisches IZ-Medium supplementiert mit:
    - 1000 IU/ml IL-2
    - 2000 IU/ml IFN $\gamma$
    - 100 ng/ml CD3 (OKT3) (Nicht erforderlich, wenn der Kolben beschichtet ist)
 zu den Zellen dazu.
    - Das Gesamtvolumen beträgt nun 50-60 ml
  
- Tag 5/6:
  - Entnehmen Sie eine 100 µl Probe zum Auszählen der Zellen
  - Fügen Sie 60 ml frisches IZ-Medium mit 1000 IU/ml IL-2 (Gesamtvolumen 120 ml) hinzu
  
- Tag 7 bis Tag 14:
  - Geben Sie frisches IZ-Medium supplementiert mit 1000 IU/ml IL-2 entsprechend der Zellkonzentration und dem pH-Wert zu den Zellen (oder fügen Sie frisches Medium alle 2 oder 3 Tage hinzu).

### Anwendungshinweise:

**Lagerung:** bei 2-8 °C im Dunklen

**Haltbarkeit:** 10 Monate ab Produktionsdatum

IZ-Medium welches mit Supplementen / Wachstumsfaktoren angereichert ist ebenfalls bei 2-8°C im Dunklen lagern und häufiges Auftauen und Einfrieren vermeiden, vor Licht schützen. Unter diesen Bedingungen ist es sicher 3 Monate haltbar.

|   |  |  |
|---|--|--|
| <p><b>Bio&amp;SELL</b><br/><br/>Lohweg 27<br/>90537 Feucht bei Nürnberg</p> | <p>E-Mail: <a href="mailto:info@bio-sell.de">info@bio-sell.de</a><br/>Internet: <a href="http://www.bio-sell.de">www.bio-sell.de</a></p> | <p>Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32<br/>Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33</p> |
|---|--|--|

## Immune-Zell-Medium

**Klassische Medien in der Standardformulierung sind für Ihre spezifischen Anwendungen nicht geeignet?**

### Modifikationen von klassischen Medien

- Medien speziell nach Ihren Anforderungen.  
(z.B. defiziente Medien, alternative Medien, zusätzliche Supplementierung)

### Kundenformulierungen

- Anfertigung von Medien speziell nach Ihren Wünschen; exklusiv nach Ihrer Spezifikation.

**Sie suchen effiziente Transfektionsreagenzien?**

**Trans o-fect** und **Trans m-fect** von Bio&SELL ist gängigen Transfektions-Methoden überlegen:

- effektiv
- geringste Toxizität
- sehr einfache Handhabung
- **Kompatibel mit den unterschiedlichsten:** Zellen, Seren, Differenzierungsfaktoren & Antibiotika

**Bio&SELL Produkte sind günstig, innovativ und verlässlich.**



Besuchen Sie uns auf:  
**[www.bio-sell.de](http://www.bio-sell.de)**

oder treten Sie mit uns in Kontakt:

**[info@bio-sell.de](mailto:info@bio-sell.de)**  
**Tel +49 (0) 9128 724 32 32**

Wir sind die Guten.

|  |  |  |
|--|--|--|
| <p><b>Bio&amp;SELL</b><br/>Lohweg 27<br/>90537 Feucht bei Nürnberg</p> | <p>E-Mail: <a href="mailto:info@bio-sell.de">info@bio-sell.de</a><br/>Internet: <a href="http://www.bio-sell.de">www.bio-sell.de</a></p> | <p>Fon : +49 (0) 9128 – 724 32 32<br/>Fax : +49 (0) 9128 – 724 32 33</p> |
|--|--|--|