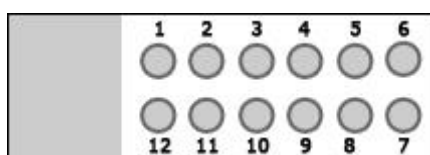




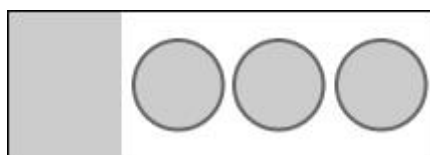
Anwendung Adhäsions-Objektträger

1) Prinzip

- a) Eine neue Technik zur Untersuchung lebender Zellen verwendet Objektträger mit präparierten Reaktionsfeldern, um die Zellen dauerhaft an der Glasoberfläche zu verankern. Diese Zellen verlieren dabei weder ihre Antigenität noch ihre Funktionalität.



- b) Der Adhäsions-Objektträger hat zwei Funktionseinheiten:
- i) 3 oder 12 Reaktionsfelder, an deren Glasoberfläche die Zellen verankert werden.
 - ii) Eine wasserabweisende Umgebung der Reaktionsfelder stößt dauerhaft und wirksam sogar hochkonzentrierte Proteinlösungen ab. Durch die wasserabweisende Beschichtung wird die Lösung sogar dann davon abgehalten, sich auf den verschiedenen Reaktionsfeldern zu vermischen, wenn der Objektträger auf einem Vortex-Mischer geschüttelt wird.



- c) Alle Arten von Zellen können untersucht werden:
- i) alle Blutzellen wie Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, Thrombozyten und Erythrozyten
 - ii) Zellen aus Knochenmark, Ergüssen, Flüssigkeit, bronchoalveolärer Lavage und Zellsuspensionen von Lymphknoten und Tumoren
- d) Die Tests können mit nur wenigen Zellen durchgeführt werden. Im Allgemeinen werden 20.000 bis 50.000 Zellen verwendet.
- e) Das Substratvolumen für die Inkubation ist gering; 5 bis 10 µl sind ausreichend, um ein Feld zu bedecken.



- f) Das Waschen der Zellen ist leicht möglich, indem das Feld mit einem entsprechenden Medium abgespült wird. Die Zeit, die sonst für das Zentrifugieren benötigt wird, kann gespart und Zellverlust vermieden werden.
- g) Lebende Zellen können verwendet und für viele Anwendungen und Studien behandelt werden. Sie können mit verschiedenen Fixiermitteln in wässrigen Lösungen fixiert oder getrocknet und danach fixiert werden.

2) Vorbereitung des Adhäsions-Objektträgers

- a) Die Felder des Adhäsions-Objektträgers werden mit einer grünen Farbschicht bedeckt, um die adhäsive Beschichtung zu schützen. Mit dieser Schutzschicht kann der Adhäsions-Objektträger über mehrere Jahre bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.
- b) Die Schutzschicht des Adhäsions-Objektträgers muss zuerst unter fließendem Wasser aufgelöst, abgespült und danach mit einem isotonischen Puffer von jeglichen Rückständen befreit werden. Ein unsichtbarer Film (adhäsive Beschichtung) bleibt auf den Reaktionsfeldern, deren positive Ladung die negativ geladenen Zellen anheftet.
- c) Um zu verhindern, dass die adhäsive Beschichtung austrocknet, wird der Vorgang in einer feuchten Kammer durchgeführt.
- d) Eine sichtbare Zellanheftung ist sichergestellt:
 - i) wenn die Zellen lebensfähig sind, d.h. unbeschädigt sind und
 - ii) wenn die gewaschenen Zellen beim Gebrauch eines proteinfreien physiologischen Puffers zur Anwendung kommen.
- e) Nicht zufriedenstellende Anheftung und Zellverlust können durch folgende Faktoren verursacht werden:
 - i) Die grüne Schutzschicht wurde nicht vollständig entfernt. Spülen Sie den Objektträger komplett mit Wasser und anschließend mit isotonischem Puffer. Sorgen Sie dafür, dass die adhäsive Beschichtung nicht austrocknet.
 - ii) Mechanische Beschädigung der adhäsiven Beschichtung – Beschädigungen durch Pipettenspitzen oder durch Abwischen sind zu vermeiden.
 - iii) Die Zell-Lösung muss gänzlich frei von Protein sein. Lösliche Proteine neutralisieren die adhäsive Beschichtung. Die Zellen müssen vor der Anwendung gründlich und sorgfältig in einem isotonischen, proteinfreien Puffer gewaschen werden. Die Zellen sollen sofort nach der Isolierung und der Wäsche verwendet werden.
 - iv) Die Zellen sind beschädigt. Zellschädigung kann durch lange Lagerung, Anwendung von nicht-physiologischem Puffer oder einem Temperaturschock verursacht werden. Beschädigte oder tote Zellen heften sich schlecht an. Zerstörte Zellen können Substanzen abgeben, welche die Anheftung anderer Zellen verhindern. Tote Zellen müssen entfernt werden.



Die elektrostatische Anheftung der Zellen auf dem Objektträger ist so beständig, dass die Reaktionsfelder in der Küvette oder mit einer Spritze ohne Risiko von Zellverlust gewaschen werden können.

3) Anwendung des Adhäsions-Objektträgers

- a) Immunperoxidase-PAP-Test oder vergleichbare Enzymtests
- b) Immunfluoreszenz-Methoden oder andere vergleichbare Methoden
- c) Färben der Zellen unter Verwendung der Pappenheim-Methode (Morphologie)
- d) Intrazelluläre Antigennachweise
- e) Molekularbiologische Tests, z.B. FISH

4) Ausgewählte Bibliographie

Bross KJ, et. al.

Demonstration of cell surface antigens and their antibodies by the peroxidase-antiperoxidase method

Transplantation: 25: 331-334 (1978)

Andreesen R, et. al.

A Hodgkin cell-specific antigen is expressed on a subset of auto- and alloactivated T (helper) Lymphoblasts

Blood: 63: 1299-1302 (1984)

Schneider H, et. al.

Identification of proliferating lymphocyte subpopulations in microcultures by surface marker and autoradiography

Immunological Communications
13: 553-561 (1984)

Frickhofen N, et. al.

Modified immunocytochemical slide technique for demonstrating surface antigens on viable cells

J of Clinical Pathology
38: 671-676 (1985)

Guzman J, et. al.

Tuberculous pleural effusions lymphocyte phenotypes in comparison with other lymphocyte-rich effusions

Diagnostic Cytopathology
5: 139-144 (1989)