

Zentrale Forschungseinrichtung Zellsortierung – OE9411 Benutzerordnung

Leistungen

Die zentrale Forschungseinrichtung Zellsortierung (OE9411, Sorter-Labor) ist ein Servicelabor für alle Forschungsgruppen an der Medizinischen Hochschule Hannover. Sie folgt den Empfehlungen der European Science Foundation zum Betrieb von Gerätezentren „Basic Requirements for Research Infrastructures in Europe“.

Zu den Aufgaben zählen

- die durchflusszytometrische Sortierungen von Eukaryonten- und Prokaryontenzellen bis zur Risikogruppe 2 bzw. gentechnisch veränderte Organismen der Sicherheitsstufe S2.
- Unterstützung bei der Planung und Durchführung durchflusszytometrischer Experimente

Technische Ausstattung

Das Sorter-Labor verfügt über vier Hochgeschwindigkeitszellsorter (BD FACSAria Fusion, BD FACSAria Iliu, 2 x Beckman-Coulter MoFlo XDP). Die Sortiergeschwindigkeiten der Sorter sind vergleichbar und richten sich nach den Sortierbedingungen und -anforderungen. Beispielsweise ist eine Sortierung bei hoher Reinheit und guter Ausbeute bei der Verwendung von 70µm Düsen bis zu einer Rate von ca. 30.000 Zellen/sec möglich (das entspricht ca. 10⁸ Zellen/h).

Alle Sorter bieten die Option der gleichzeitigen Sortierung von bis zu 4 verschiedenen Zellpopulationen sowie die Möglichkeit der Sortierung auf Zellkulturplatten (z.B. Klonierungen) oder auf Objektträger. Für die aktuellen Spezifikationen der Geräte s. www.MHH.de/sorter-lab/technische-ausstattung.

Sortierungen sind unter aseptischen Bedingungen möglich, allerdings empfehlen wir die Zugabe von Antibiotika bei der weiteren Kultivierung von sortierten Zellen.

Buchung und Absage von Sortierterminen

Sortiertermine werden Mo - Fr zwischen 8.00 (Anfangszeit) und 18.00 (Endzeit) vergeben. Außerhalb dieser Zeiten ist eine spezielle Vereinbarung notwendig.

Buchung und Absage von Sortierterminen muss per E-Mail Formular (runterzuladen unter www.MHH.de/sorter-lab) erfolgen. Möglichst vollständiges Ausfüllen des Formulars ist Voraussetzung für eine reibungslose Buchung. Das Ausfüllen des Bereichs "Biologische Sicherheit" ist verpflichtend. Der Nutzer ist für die Richtigkeit der Angaben gegenüber dem Personal der Zentralen Forschungseinrichtung persönlich verantwortlich.

Die Termine sind frühzeitig zu buchen. Die Festlegung der voraussichtlichen Sortierzeit erfolgt durch den Nutzer oder durch Mitarbeiter des Sorter-Labors nach den Angaben der Nutzer zu dem geplanten Experiment (Zellzahl, Zellart, benötigte Reinheit).

Die Verwendung des FACSAria Fusion Zellsortierers soll präferentiell für Zellsortierungen erfolgen, bei denen entweder besondere Anforderungen an die biologische Sicherheit vorliegen (infektiöse Proben, gentechnisch veränderte Organismen der Sicherheitsstufe S2) oder bei denen die Komplexität von Färbungen die Nutzung dieses Gerätes notwendig macht (Multicolor-Anwendungen, spezielle Fluorochrom-Kombinationen). Die Mitarbeiter des Sorter-Labors behalten sich vor, Zellsortierungen ohne diese Anforderungen auch an anderen Geräten durchzuführen.

Auf dem Buchungsformular gibt es eine zusätzliche Kategorie zur Auswahl der möglichen Geräte, die vom Nutzer bei Bedarf verbindlich angekreuzt werden kann oder von den Mitarbeitern des Sorterlabors nach Rücksprache mit dem Nutzer ergänzt wird. Die alleinige Auswahl des FACSAria Fusion Sorters führt zu abweichenden Regeln für die Absage von Terminen.

Sortierungen mit einem voraussichtlichen Ende nach 18.00 Uhr sind mindestens eine Woche im Voraus zu buchen.

Sortiertermine, die nicht wahrgenommen werden können, müssen so früh wie möglich abgesagt werden. Nicht rechtzeitig abgesagte Sortiertermine werden dem Nutzer in Rechnung gestellt. Dabei gilt:

- Sortierungen bis zu 4 h Dauer müssen spätestens einen Werktag vor Sortbeginn abgesagt werden.
- Sortierungen ab 4,5 h Dauer müssen mindestens 3 Werktage im Voraus abgesagt werden.

Für Buchungen, die dezidiert für den FACSAria Fusion erfolgen, gelten abweichend davon die folgenden Regeln:

- Sortierungen bis zu 2 h Dauer müssen spätestens einen Werktag vor Sortbeginn abgesagt werden.
- Sortierungen zwischen 2,5 und 5,5 h Dauer müssen mindestens 3 Tage im Voraus abgesagt werden.
- Sortierungen ab 6 h Dauer müssen mindestens 1 Woche im Voraus abgesagt werden.

Es besteht die Möglichkeit einer unverbindlichen Reservierung. Diese muss bei einer weiteren Anfrage für den gleichen Termin entweder in eine verbindliche Reservierung umgewandelt oder abgesagt werden. Dazu ist es notwendig, dass eine Telefonnummer hinterlassen wird, unter der der Nutzer tagsüber zu erreichen ist.

Nutzergruppen und Gebühren

Die Einrichtungen stehen folgenden Gruppen in abgestufter Priorität und zu unterschiedlichen Gebühren zur Verfügung:

- (1)** Arbeitsgruppen der MHH und aus Forschungsverbänden (z.B. SFBs) mit Beteiligung der MHH
- (2)** Nutzer aus anderen akademischen (non-profit) Organisationen
- (3)** Nutzer aus kommerziellen Unternehmen

Für Nutzer der Gruppe 1 werden keine Gebühren für die wissenschaftliche Beratung und Hilfe bei der Durchführung von Sort-Experimenten erhoben. Die Entwicklung neuer Methoden kann in Kooperation mit der zentralen Einrichtung Zellsortierung erfolgen.

Gebühren werden für die reservierte Zeit bzw. für die tatsächliche Sortzeit (bei Überschreitung der reservierten Zeit) erhoben. Die Sortierzeit wird bei durch den Nutzer zu verantworteten Verspätungen ab dem vereinbarten Sortiertermin berechnet. Die Zeiten zum Umbau für außergewöhnliche Gerätekonfigurationen (z.B. Umstellung Laser auf UV o.ä.) oder besondere Dekontaminationsmaßnahmen werden ebenfalls dem Nutzer berechnet.

Die Gebühren richten sich nach der jeweils gültigen Gebührentabelle (s. Anlage 1, bzw. <https://www.mhh.de/sorter-lab/informationen-fuer-nutzer/gebuehren>)

Für Zellsortierungen von infektiösem Material (L2) und von genetisch veränderten Organismen der Sicherheitsstufe S2 wird der doppelte Stundensatz berechnet.

Materialvorbereitung

Der Nutzer ist für die adäquate Vorbereitung (incl. Färbung) der zu sortierenden Zellen sowie für die entsprechenden Kontrollfärbungen verantwortlich.

Alle Zellen müssen vor der Sortierung durch ein Nylonsieb filtriert werden (40µm für Sortierung über 70µm Nozzle, 70µm für Sortierung über 100µm Nozzle). Für Zellen, die zu Aggregatbildung neigen, kann es vorteilhaft sein, sie in einem EDTA-haltigen Puffer aufzunehmen (z.B. PBS, Ca/Mg-frei, 0,5% BSA und 1-2mM EDTA). In der Regel ist es am besten, die Zellen bis zur Sortierung auf Eis und vor Licht geschützt stehen zu lassen.

In Proben mit einem hohen Anteil toter Zellen kann freie DNA zum Verklumpen von Zellen führen. Hier empfiehlt es sich 10 U/ml DNase mit 1-5 mM MgCl zuzugeben. Achtung: DNase nicht in EDTA-haltigem Puffer verwenden!

Die Konzentration der Zellen für die Zellsortierung sollte in Abhängigkeit von Zellzahl, Zellgröße und der Tendenz der Zellen zu aggregieren zwischen 5×10^6 Zellen pro ml (z.B. große, adhärenente Zellen) und 50×10^6 Zellen pro ml (z.B. Lymphozyten) liegen. Das Ausgangsvolumen sollte allerdings 250 µl nicht unterschreiten.

Die Zellsuspension für die Sortierung kann in 1,5 ml Eppendorf-Cups, 5 ml (12x75 mm) Tubes, oder 15 ml Tubes vorliegen (für MoFlo und MoFlo XDP zusätzlich 50 ml Tubes).

Für die sortierten Zellen sollten Auffangröhrchen mit einem geeigneten Medium vorbereitet werden. Eine aussagekräftige Reanalyse der sortierten Zellen ist nur bei Verwendung von filtriertem (0,2 µm) Auffangmedium möglich (insbesondere bei Protein-haltigen Medien).

Da die Zellen durch den Sortiervorgang erheblich gestresst werden und das Medium durch die sortierten PBS-Tropfen verdünnt wird, sollte die Serum-/Proteinkonzentration bei empfindlichen Zellen höher als die bei der Kultur verwendete Standardkonzentration liegen (Verdünnung durch PBS beim Sortieren mit 70 µm Nozzle ca. 1 nl pro sortierter Zelle, bei 100 µm Nozzle ca. 3,5 nl pro sortierter Zelle).

Als Auffanggefäße können 1,5 ml Eppendorf-Cups, 5 ml (12x75 mm) Tubes und 15 ml Tubes (letztere nicht für mehr als zwei Populationen gleichzeitig!), sowie Zellkulturplatten (6 - 384 Wells) dienen.

Biologische Sicherheit

Bei der Sortierung von Zellen entstehen Aerosole. Zum Schutz der Mitarbeiter des Sorter-Labors und anderer Nutzer ist es erforderlich, dass die Nutzer alle Informationen über potentielle Risiken durch die sortierten Zellen vor der Sortierung angeben, um eventuelle Schutzmaßnahmen bzw. eine anschließende Dekontamination durchzuführen.

Da viele der Nutzer des Sorter-Labors mit Mäusen als Modellorganismen arbeiten, gelten diese Regelungen selbstverständlich auch für alle potentiellen Maus-Pathogene.

Alle Nutzer müssen vor Beginn der Zellsortierung einige Fragen zu dem zu sortierenden Material und dessen potentiellen Risiken beantworten und mit ihrer Unterschrift bestätigen (Fragebogen Biologische Sicherheit, s. Anlage 2).

Datenspeicherung

Die Nutzer können ihre Daten über einen Cloud-Ordner herunterladen. Die Daten werden als verschlüsselte Zip-Dateien gespeichert und den Nutzern wird per E-Mail ein individuelles Passwort zum Entpacken der Ordner mitgeteilt. Es liegt in der Verantwortung der Nutzer, ihre Daten herunterzuladen und zu archivieren. Die List-Mode-Files von allen Zellsortierungen und Analysen werden dauerhaft in der Zentralen Forschungseinrichtung Zellsortierung gespeichert und können in Ausnahmefällen dem Nutzer auch nachträglich zur Verfügung gestellt werden.

Geistiges Eigentum und Publikation von Ergebnissen

Die Nutzer sind die alleinigen Eigentümer (IP) der Messergebnisse. Nutzer aus dem akademischen Bereich können Informationen und geistiges Eigentum der ZF, das unter dem Begriff „foreground IP“ zusammengefasst werden kann, uneingeschränkt für Lehre und Forschung nutzen.

Die Beteiligung der Zentralen Einheit Zellsortierung an der Entstehung von Daten sollte bei deren Veröffentlichung berücksichtigt werden. Rechtfertigt der Umfang der Beteiligung eine Ko-Autorenschaft von Mitarbeitern des Sorter-Labors (z.B. Entwicklung von Methoden, Umfangreiche Auswertungen, Beteiligung an der Versuchsplanung usw.) so sind diese bei der Erstellung des Manuskriptes zu beteiligen. Jede andere Form der Beteiligung ist im Acknowledgement zu erwähnen, z.B. "We would like to acknowledge the assistance of the Cell Sorting Core Facility at the Hannover Medical School supported in part by Braukmann-Wittenberg-Herz-Stiftung and Deutsche Forschungsgemeinschaft".

Hannover, 2. Januar 2019

Dr. Matthias Ballmaier

Zentrale Forschungseinrichtung Zellsortierung
OE9411

Anlage 1: Gebührenordnung Stand 1.1.2012

Gebührenliste Sorter-Labor

Nutzergruppen

- (1) Arbeitsgruppen der MHH und aus Forschungsverbänden (z.B. SFBs) mit Beteiligung der MHH
- (2) Nutzer aus anderen akademischen (non-profit) Organisationen
- (3) Nutzer aus kommerziellen Unternehmen

Gebühren

Gruppe 1	30,- € / h
Gruppe 2	80,- € / h
Gruppe 3 (Vollkostenrechnung)	180,- € / h

Zellsortierungen von infektiösem Material (L2) und von genetisch veränderten Organismen der Sicherheitsstufe S2 werden mit dem jeweils doppelten Stundensatz berechnet.

Verbrauchsmaterialien

Falcon Röhrchen mit 35µm Nylon-Sieb (Falcon 5ml Cell Strainer Cap # 352235)	1,- € / Stück
Falcon Zellsiebe für 50ml Tubes (40µm #352340 oder 70 µm 352350)	2,- € / Stück

Anlage 2: Fragen zur Biologischen Sicherheit (Bestandteil des Buchungsformulars)

Biological Safety Questionnaire (tick appropriate fields)

Does the sample contain primary human cells?	yes/no
If yes, have donors been screened for infectious pathogens (HIV, HBV, HCV)?	n.a./yes/no
Does the sample contain any known human or murine pathogens? if yes, specify:	yes/no
Are the cells genetically engineered?	yes/no
If yes, provide safety level:	n.a./yes/no
For S2-Experiments, please provide reference-no. of approval and principal investigator:	

For sorting of infectious material or genetically engineered organisms of biosafety level S2 please ask core facility personnel.