

Izolace PBMC

Teorie

Pro některá imunologická vyšetření je třeba získat koncentrovanou suspenzi určitého typu buněk, zejména lymfocytů. K izolaci lymfocytů společně s monocyty (PBMC = peripheral blood mononuclear cells) se využívá gradientové centrifugace krve se separačním médiem (např. Ficoll, Lymphoprep).

Materiál a pomůcky

Plná krev v EDTA, separační médium, PBS, 10 ml zkumavky, mikrozkušavky 1,5 ml ("eppendorfky"), kontejnerky 30ml, Pasteurovy pipety ("pasterky"), pipety, špičky, vortex, počítač leukocytů Mythic, centrifuga.

Postup

1. Nachystáme si 30ml kontjnerky a 10ml zkumavky.
2. Krev opatrně promícháme otáčením zkumavky v ruce.
3. 10 ml krve smíchat s 10 ml PBS v kontejnerku, zavřít víčkem, promíchat (vystačí pro 4 separace).
4. Do 10 ml zkumavky napipetovat 3 ml separačního média.
5. Přidání krve k separačnímu médiu musí proběhnout opatrně, aby se vrstvy nepromísily! zkumavku se separačním médiem vezměte do ruky, nakloňte, abyste měli větší plochu hladiny, neberte pasterkou naředěnou krev, přiložte konec pasterky na stěnu zkumavky a opatrně nechte stékat krev po stěně, krev vytvoří vrstvu nad separačním médiem. Přidejte o něco více krve než je separačního média (cca 5ml).
6. Centrifugace 30 min, 2000 ot./min. Oddělí se jednotlivé vrstvy – nahoře je plazma, mezi plazmou a médiem je vrstva PBMC, na dno klesnou erytrocyty a granulocyty.
7. Pasterkou odstraňte do koše vrchní vrstvu krevní plazmy (nenaberte bílý prstenec na rozhraní plazmy a média!)
8. Připravte si novou 10 ml zkumavku a dejte do ní 5 ml PBS.
9. Krouživými pohyby opatrně naberte pasterkou bílý prstenec PBMC na rozhraní plazmy a média a přeneste ho do nové zkumavky s 5 ml PBS, promíchejte pasterkou.
10. Centrifugace 10 min., 1500 ot./min.
11. Zkontrolujte jestli je na dně zkumavky vrstva PBMC.
12. Opatrně odlejte supernatant do výlevky, k peletu přidejte 1 ml PBS a rozsuspendujte pipetou.
13. Změřte počet leukocytů na analyzátoru Mythic (v rádech miliony leukocytů / ml).

Vyhodnocení

Zapište naměřený počet vyizolovaných leukocytů / ml.

Vypočítejte potřebné ředění, abyste dostali 1 milion leukocytů / ml.