

SEPARACE LYMFOCYTŮ PERIFERNÍ KRVE

Separace lymfocytů na základě jejich vznášivé hustoty

Provedení:

1. Pro dvojici: dva odběry 2,7 ml heparinizované/EDTA krve.
2. Krev přelít do kontejnerku s 5 ml RPMI-1640.
3. Vrstvení pro izolaci lymfocytů probíhá do zkumavky s připravenými 3,5 ml Lymphoprepu (separační médium o hustotě 1,077g/ml).
4. Na toto separační médium opatrně navrstvit pasterkou asi 5 ml ředěné krve (krev + RPMI) – VRSTVY SE NESMÍ PROMÍCHAT!!! (1 kontejner=2 studenti)
5. Centrifugace 2500 ot./30 min.
6. Po ukončení centrifugace odstraníme do odpadu pasterkou horní vrstvu (krevní plazma).
7. Poté odebereme opatrně pasterkou prstenec lymfocytů (rozhraní mezi krevní plazmou a separační tekutinou).
8. Do zkumavky přidáme 2-3ml RPMI (pasterka) a promícháme pasterkou, aby se směs dobře promíchala.
9. Centrifugujeme 1800 ot./10 min.
10. Zkontrolujeme prstenec lymfocytů na dně zkumavky a slijeme.
11. Do zkumavky napipetujeme 1 ml RPMI, dobře rozmícháme pipetou a přeneseme do čisté zkumavky.
12. Změříme na přístroji k počítání leukocytů – naměřená hodnota na displeji udává počet leukocytů $\cdot 10^6$ v 1 ml.

SEPARACE LYMFOCYTŮ PERIFERNÍ KRVE

Separace lymfocytů na základě jejich vznášivé hustoty

Provedení:

1. Pro dvojici: dva odběry 2,7 ml heparinizované/EDTA krve.
2. Krev přelit do kontejnerku s 5 ml RPMI-1640.
3. Vrstvení pro izolaci lymfocytů probíhá do zkumavky s připravenými 3,5 ml Lymphoprepu (separační médium o hustotě 1,077g/ml).
4. Na toto separační médium opatrně navrstvit pasterkou asi 5 ml ředěné krve (krev + RPMI) – VRSTVY SE NESMÍ PROMÍCHAT!!! (1 kontejner=2 studenti)
5. Centrifugace 2500 ot./30 min.
6. Po ukončení centrifugace odstraníme do odpadu pasterkou horní vrstvu (krevní plazma).
7. Poté odebereme opatrně pasterkou prstenec lymfocytů (rozhraní mezi krevní plazmou a separační tekutinou).
8. Do zkumavky přidáme 2-3ml RPMI (pasterka) a promícháme pasterkou, aby se směs dobře promíchala.
9. Centrifugujeme 1800 ot./10 min.
10. Zkontrolujeme prstenec lymfocytů na dně zkumavky a slijeme.
11. Do zkumavky napipetujeme 1 ml RPMI, dobře rozmícháme pipetou a přeneseme do čisté zkumavky.
12. Změříme na přístroji k počítání leukocytů – naměřená hodnota na displeji udává počet leukocytů $\cdot 10^6$ v 1 ml.