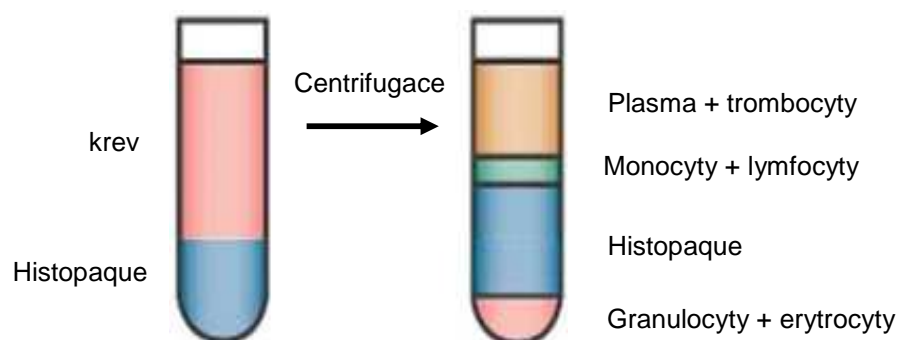


4 Metody separace buněk

Pro izolace krevních elementů z plné krve se používají různé metody, přičemž důležitým faktorem je čistota získané buněčné populace. Zpravidla platí, že čím vyšší je čistota výsledné suspenze, tím vyšší její cena a náročnost separační metody.

Gradientová centrifugace

Metoda je založena na rozdílné hustotě separovaných buněk. Erytrocyty a granulocyty mají vyšší hustotu než monocyty a lymfocyty. Separace je velmi jednoduchá: spočívá v navrstvení heparinizované krve na separační gradient (např. Histopaque) s následnou centrifugací. Poté dojde k typickému rozdělení buněk viz obrázek.



Vrstva lymfocyty / monocyty / plasma / trombocyty se musí znovu promývat a centrifugovat, aby se odmyly trombocyty.

Celá příprava trvá asi hodinu a z 1 ml periferní krve lze získat $1 - 2 \times 10^6$ agranulocytů. Tyto buňky lze dále použít k řadě funkčních testů (proliferační testy, testy cytotoxicity, průtoková cytometrie apod.). Je-li vyžadována frakce čistých lymfocytů, musí se monocyty oddělit pomocí adherence na plastový povrch.

Výhody a nevýhody: cena, jednoduchost, buňky po centrifugaci zůstávají plně funkční. Technicky obtížné je sesbírání prstence agranulocytů. Nejlepších výsledků je dosahováno při teplotě 18 – 20 °C. Pokud mají být buňky v další fázi použity pro kultivaci musí se pracovat za sterilních podmínek. V některých případech (při separaci pupečnickové krve, u malých dětí a nebo také za patologických stavů) se v krvi vyskytuje zvýšené množství prekurzorů erytrocytů, které obsahují jádra a po separaci zůstávají v horní vrstvě.

Izolace lymfocytů pomocí rozet

Metoda využívá povrchových receptorů lymfocytů. CD2 na povrchu T-lymfocytů funguje jako receptor pro povrchové antigeny ovčích erytrocytů a vytváří s nimi tzv. Rozety (označované jako T-rozety). Podobně B-lymfocyt reaguje s myšími erytrocyty.

Tato metoda byla používána před objevem monoklonálních protilátek a průtokové cytometrie. Hodnocení spočívalo ve zjišťování počtu rozet ve světelném mikroskopu. Dnes se tato metoda využívá ve spojení s gradientovou centrifugací. Erytrocyty se oddělují osmotickou lýzou.

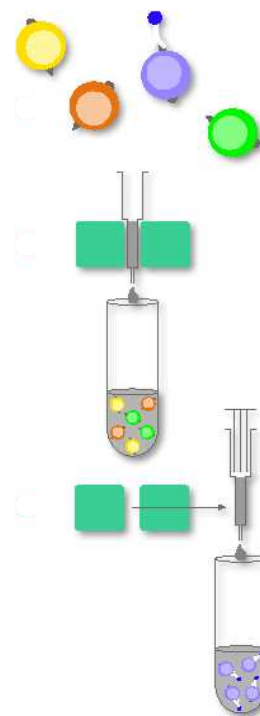
Výhody a nevýhody: metoda využívá vazbu na receptor buněk, tudíž dochází k aktivaci buněk.

Imuno-magnetická separace

Široce používaná metoda separace na základě povrchových markerů buněk.

Používá se v pozitivním nebo negativním uspořádání. Pozitivní separace spočívá ve výběru buněk podle přítomnosti určitého znaku (povrchové molekuly). Negativní pak spočívá v odstranění všech, které specifický znak nenesou. Používají se tzv. selekční protilátky, které jsou pevně navázané na magnetické částice.

Nejprve se buňky naváží na povrch magnetických kuliček, které jsou potaženy specifickou selekční protilátkou. Poté suspenze buněk prochází separační kolonou, která je umístěna v magnetickém poli. Magnetické kuličky s navázanými buňkami zůstávají v magnetickém poli, zatímco zbytek buněk projde kolonou. Jde-li nám o frakci buněk, která zůstává zachycena v magnetickém poli pomocí specifických protilátek, hovoříme o tzv. pozitivní selekci. Naopak chceme-li frakci buněk, která kolonou prochází aniž by se vážala na specifické protilátky navázané na povrchu magnetických kuliček, hovoříme o negativní selekci. Nevýhoda pozitivní selekce je aktivace buněk prostřednictvím vazby na povrchový marker. Tudíž se častěji využívá negativní selekce, při které ze suspenze vychytáváme všechny typy buněk, které chceme odstranit. Je tedy jasné, že negativní selekce je dražší, neboť při ní potřebujeme více druhů specifických protilátek. Často se používá pro izolaci buněk CD34 a subpopulaci lymfocytů.



Obr. Znárodnění průběhu magnetické separace. Popis viz text.

Výhody a nevýhody: existuje široká škála komerčně dostupných separátorů a kitů specifických pro určité buněčné populace. Jednoduchost, rychlost.

Selekce pomocí průtokové cytometrie

Jedná se o tzv. třídění nebo-li sortování buněk, což je jedna z funkcí průtokového cytometru. Buňka se označí fluorescenční protilátkou a je přístrojem detekována na základě svých optických vlastností a elektrickým výbojem je vychýlena ze své dráhy a nasměrována do sběrné zkumavky.

Výhody a nevýhody: Vysoký stupeň čistoty (až 99 %). Vysoká náročnost na přístrojové a materiálové vybavení a vysoká pořizovací cena flow cytometru.

ÚLOHA 3: Izolace agranulocytů z myší krve

Tato metoda se běžně používá v biochemických či výzkumných laboratořích jako mezistupeň k dalšímu stanovení imunitních vlastností a aktivit lymfocytů jako je např. proliferace buněk nebo aktivita buněčných enzymů. Izolované lymfocyty slouží také jako zdroj DNA pro genetické analýzy. V nádorové terapii se používá izolovaných lymfocytů k určení proliferační odpovědnosti lymfocytů po vystavení nádorovým buňkám i extraktům, pro stanovení cytotoxické aktivity výkonných buněk proti nádorům.

Princip

Krev se rozdělí centrifugací na hustotním gradientu. Během centrifugace se erythrocyty a granulocyty shlukují a sedimentují. Lymfocyty a monocyty zůstávají ve vrstvě plazma – Histopaque viz obrázek na předchozí straně. Získaná frakce agranulocytárních buněk se následně promyje. Ve cvičení pracujeme s malými objemy krve, což ztěžuje průběh separace. Výťažnost metody je proto velice nízká v porovnání s výtěžností dosahovanou v klinických laboratořích.

Chemikálie a roztoky

1. Histopaque 1083
Komerčně dodávaná suspenze o hustotě 1,083 g/ml (Sigma Aldrich, CZ)
2. Tůrkův roztok pro barvení leukocytů
Lyzuje erythrocyty (obsahuje kys. octovou) a barví jádra leukocytů fialově.
3. Leukodif pro barvení krevních nátěrů.
Postup najdete v sekci Obecné laboratorní postupy na začátku těchto skript.

Vzorek: Heparinizovaná myší krev

S přídatkem heparinu v koncentraci 50 U/ml, což odpovídá 10 µl zásobního roztoku heparinu na 1 ml plné myší krve.

Pomůcky a přístroje

Centrifuga, Bürkerova komůrka na počítání buněk, polystyrénové zkumavky pro separaci.

Postup

1. Připravíme si polystyrenovou zkumavku s 300 µl Histopaque
2. Heparinizovanou krev opatrně pipetou navrstvíme na vytemperovaný roztok Histopaque
1 díl krve na 1 díl Histopaque tedy 300 µl krve + 300 µl Histopaque
3. Centrifugujeme 30 minut při 1500 rpm.
4. Mezitím spočítáme počet leukocytů a krevní diferenciál v krvi před separací:
 - a. *Počet leukocytů určíme v Bürkerově komůrce po obarvení Tůrkovým roztokem (1 : 20).*
 - b. *Krevní diferenciál z krevního nátěru po obarvení Leukodifem - viz obecné postupy.*
5. Po centrifugaci pipetou opatrně sesbíráme světlou **střední** vrstvu obsahující mononukleární buňky (1 – 2 mm). Můžeme sesbírat i celou vrchní vrstvu (plasma + trombocyty + mononukleární buňky). Resuspendujte. Pomocí automatických pipet změříme co nejpřesněji objem získané suspenze.
6. Z této suspenze odebereme malé množství a naplníme Bürkerovu komůrku. Spočítáme agranulocyty v 50 čtvercích. Suspenze obsahuje poměrně vysoké množství zbytkových erythrocytů, které jsou menší, ploché a bezjaderné na rozdíl od větších kulatých lymfocytů. Ze zjištěného počtu buněk, objemu 50 čtverců a celkového objemu získané suspenze určíme kolik buněk jsme při izolaci fakticky získali.

Pozn.

7. Takto získaná suspenze lymfocytů se musí dále promýt aby se odstranila plasma, Histopaque a zbytkové erythrocyty. Postup je uveden níže, objemy Hanksova roztoku a 0,87% NH_4Cl záměrně nejsou uvedeny, protože se volí podle objemu separované krve. Ve cvičení ale toto promývání už neděláme, protože v malých objemech je těžko proveditelné.

Suspenzi centrifugujeme 10 min při 1500 rpm.

Sediment resuspendujeme v NH_4Cl , tím se zlyžují zbytkové erythrocyty

Centrifugujeme 10 min. při 1500 rpm.

Sediment resuspendujeme v Hanksova roztoku.

Centrifugujeme 10 min při 1500 rpm.

Sediment resuspendujeme ve zvoleném množství Hanksova roztoku Množství se zpravidla vypočítá podle toho, jakou potřebujeme výslednou hustotu suspenze.

Výstup

1. Uvedeme počty leukocytů a hodnoty krevního diferenciálu v původní krvi **před separací**. Z těchto hodnot vypočteme, kolik agranulocytů vstupovalo do separace v původních 300 μl krve viz kapitola Počítání buněk v obecné části skript (vycházejte ze zjištěné koncentrace buněk, objemu krve pro separaci a výsledků krevního diferenciálu).

2. Uvedeme počet agranulocytů **po separaci** v 50ti čtvercích a celkový počet získaných buněk (vycházejte ze zjištěné koncentrace buněk a objemu získané suspenze).

3. Z hodnot v bodě 1. a 2. určíme výtěžnost naší separace v %.