



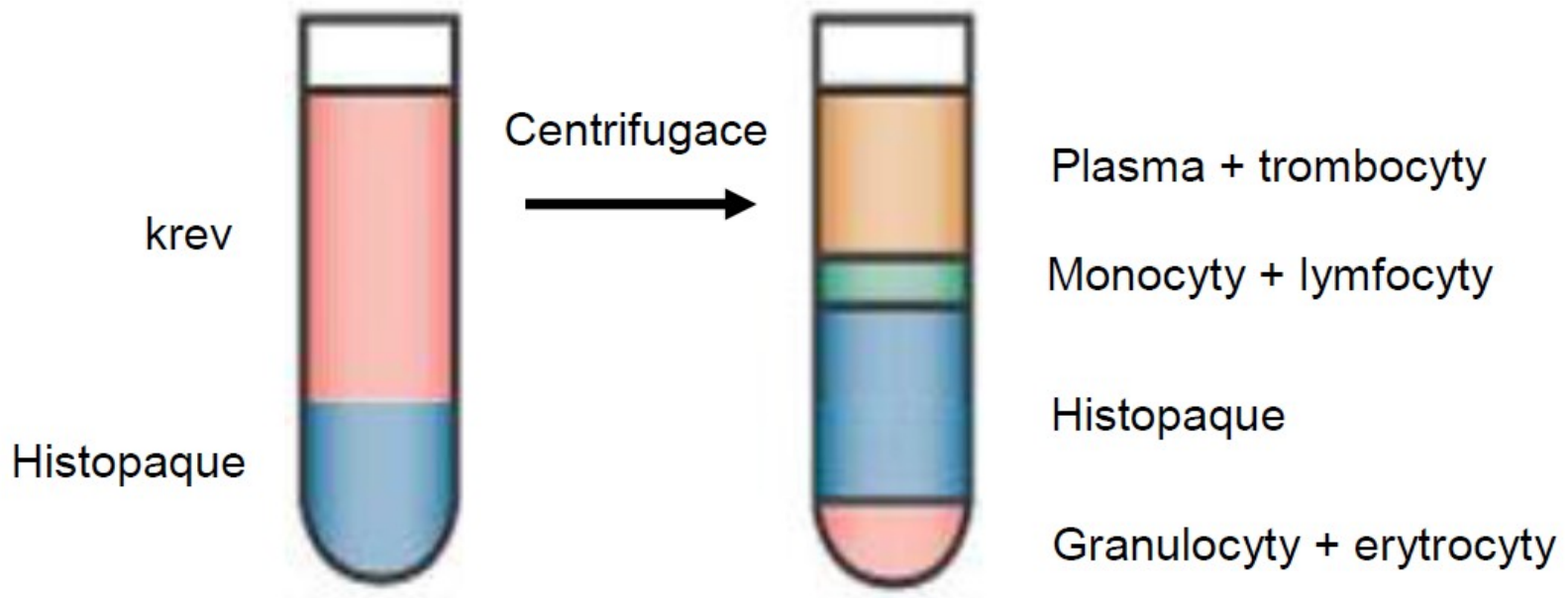
Metody separace buněk

Bi5220c Imunologie - cvičení 2021

Gradientová separace

- Založena na rozdílné hustotě separovaných buněk
 - erytrocyty, granulocyty > lymfocyty, monocyty
- Spočívá v navrstvení nesrážlivé krve na separační gradient (např. dextran, Ficoll, Histopaque)

Separace buněk gradientovou centrifugací s využitím Histopaque



Gradientová separace

1 ml periferní krve → 1–2x 10⁶ agranulocytů

Výhody

- Cena
- Jednoduchost
- Buňky po centrifugaci zůstávají plně funkční

Nevýhody

- Čistota / výtěžek
- V některých případech prekurzory erytrocytů v horní vrstvě s agranulocyty

Izolace lymfocytů pomocí rozet

- Využívá povrchových receptorů lymfocytů

T-lymfocyty

- CD2 reaguje s povrchovými antigeny ovčích erytrocytů za tvorby rozet

B-lymfocyty

- Reaguje s antigeny myších erytrocytů

Hodnocení

- Počítání rozet pomocí světelného mikroskopu

Izolace lymfocytů pomocí rozet

- Před objevem monoklonálních protilátek a průtokové cytometrie
- Dnes ve spojení s gradientovou centrifugací

Výhody

- Cena
- Jednoduchost

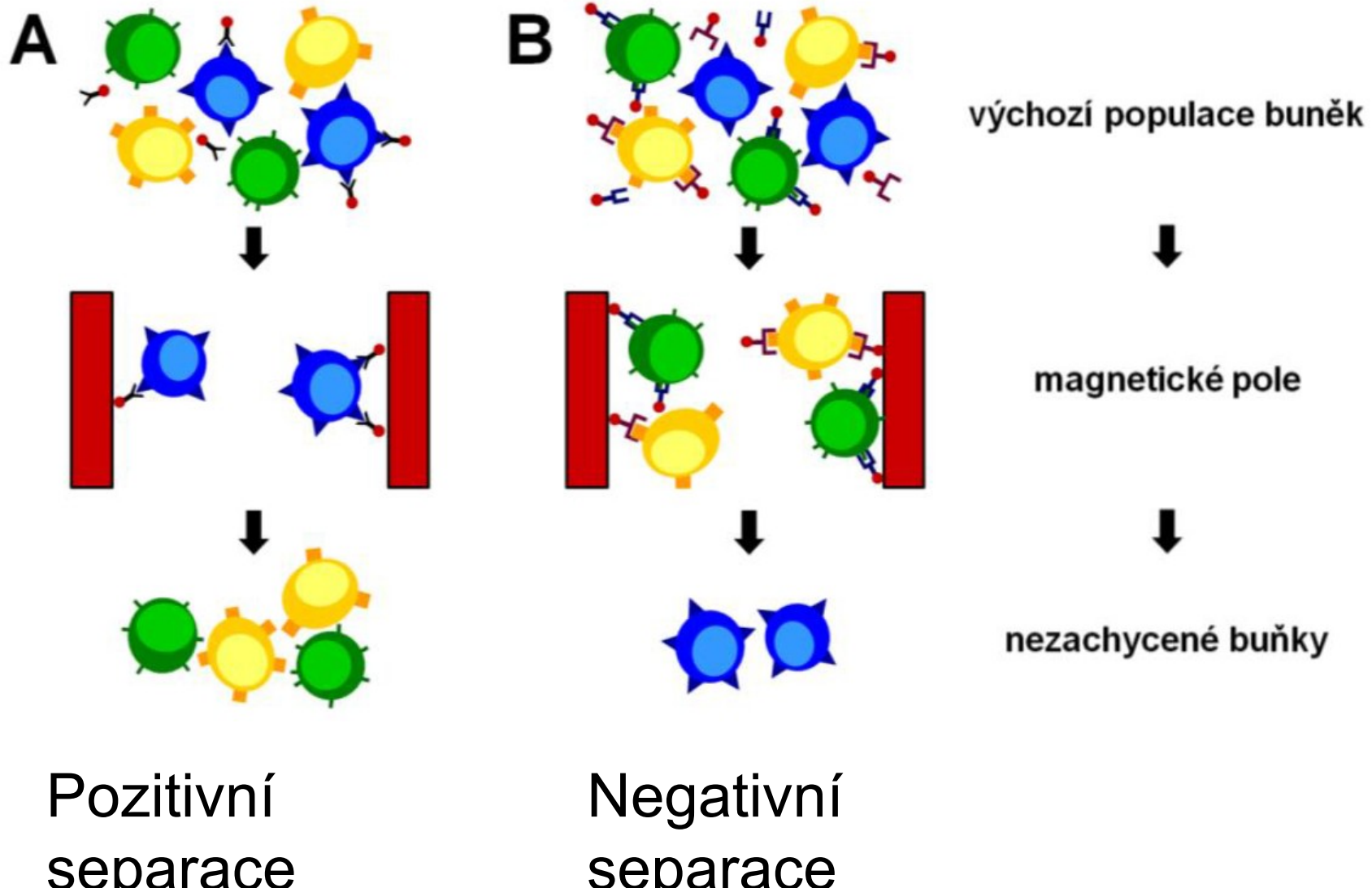
Nevýhody

- Aktivace buněk

Imunomagnetická separace

- Využívá povrchových markerů buněk
- Selekční protilátky navázané na magnetické částice
- 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

Imunomagnetická separace



Imunomagnetická separace

Výhody

- Jednoduchost
- Rychlost

Nevýhody

- Cena (především negativní separace)
- Aktivace buněk v případě pozitivní separace

Selekce pomocí průtokové cytometrie

tzv. třídění neboli sortování buněk

- Sledované buňky se označí fluorescenční protilátkou
- Při průchodu přístrojem jsou pak tyto buňky detekovány na základě svých optických vlastností
- Elektrickým výbojem jsou vychýleny ze své dráhy a nasměrovány do sběrné zkumavky
- Ostatní neoznačené buňky cytometrem projdou nevychýleny a jsou zachyceny odděleně od požadované buněčné populace

Selekce pomocí průtokové cytometrie

Výhody

- Vysoký stupeň čistoty (až 99 %)

Nevýhody

- Cena - vysoká náročnost na přístrojové a materiálové vybavení



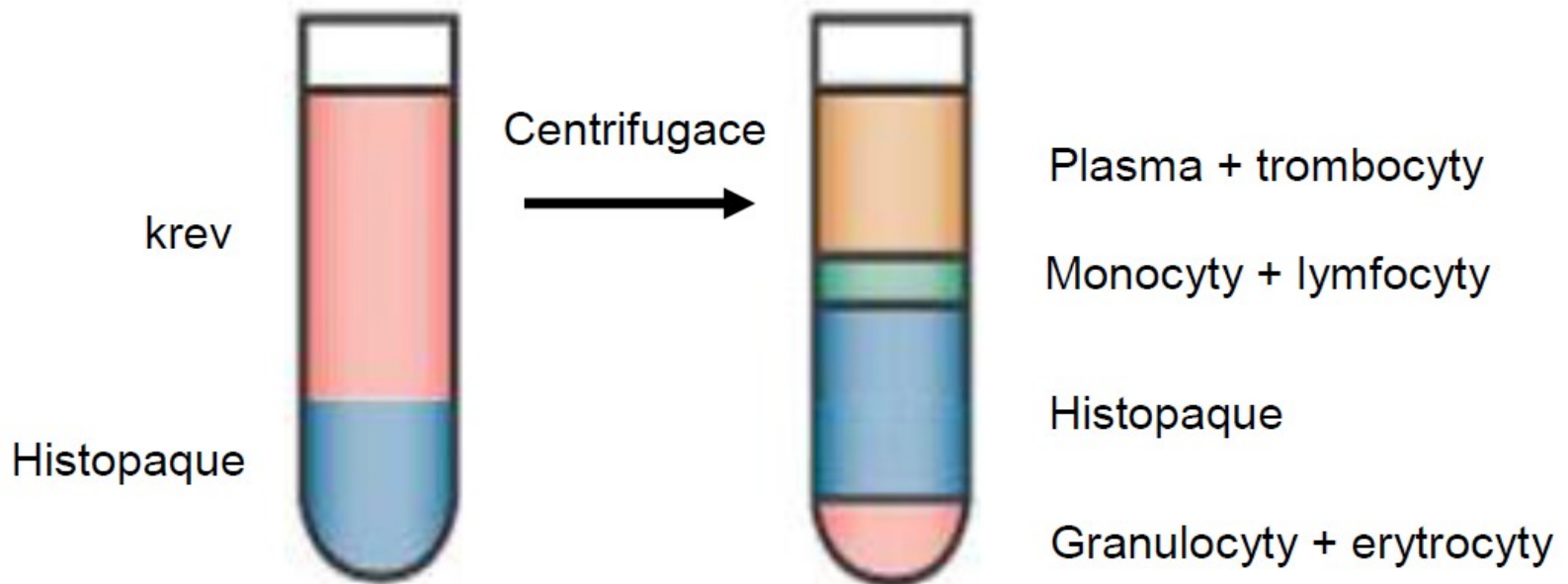
IV. Úloha – Izolace agranulocytů z myší krve

Izolace agranulocytů

- Mezistupeň před následným stanovením imunitních vlastností lymfocytů
 - proliferace buněk
 - aktivita buněčných enzymů
- Zdroj DNA pro genetické analýzy
- V nádorové terapii se používá izolovaných lymfocytů k určení proliferační aktivity lymfocytů po vystavení nádorovým buňkám či extraktům a pro stanovení cytotoxické aktivity výkonných buněk proti nádorům

Princip

- Separace buněk gradientovou centrifugací s využitím Histopaque



Postup

1. Připravíme si polystyrenovou zkumavku s 300 μ l vytemperovaného roztoku Histopaque.
2. Na Histopaque opatrně pipetou navrstvíme 300 μ l heparinizované myší krve.
3. Centrifugujeme 15 – 30 minut při 500 g.
4. Během centrifugace si spočítáme pomocí Bürkerovy komůrky počet leukocytů v myší krvi před separací. Pro počítání buněk použijeme směs krve s Türkovým roztokem (ředění 1 : 20; 10 μ l krve + 190 μ l Türkova roztoku).

Postup

5. Po centrifugaci pipetou opatrně sesbíráme světlou **střední** vrstvu obsahující mononukleární buňky (cca 1 – 2 mm). Můžeme sesbírat i celou vrchní vrstvu (plasma + trombocyty + mononukleární buňky). Pomocí automatických pipet **změříme co nejpřesněji objem** získané suspenze!
6. V odebrané suspenzi spočítáme pomocí Bürkerovy komůrky počet buněk – agranulocytů získaných po separaci. Buňky počítáme v 50 velkých čtvercích mřížky.
7. Ze zjištěného počtu agranulocytů, známého objemu 50 čtverců a celkového objemu odebrané suspenze určíme, kolik buněk jsme při izolaci fakticky získali. Pokud byla suspenze před počítáním ředěna, je nutno při výpočtu počtu získaných buněk toto ředění také zohlednit!

Hodnocení a výstup

- Uvedte **počet leukocytů v původní krvi před separací**. Z těchto hodnot vypočtete, kolik agranulocytů vstupovalo do separace v původních 300 μ l krve. Vycházejte z koncentrace buněk zjištěné v kroku 4 postupu, objemu krve použité pro separaci a toho, že podle fyziologických hodnot tvoří lymfocyty a monocyty 80 % všech leukocytů myši.
- Uvedte **počet agranulocytů po separaci** v 50 čtvercích a celkový počet získaných buněk. Vycházejte z koncentrace buněk zjištěné v kroku 6 postupu a objemu získané suspenze.
- Z vypočítaných hodnot určujících počet agranulocytů před a po separaci, určete **výtěžnost vlastní separace v %**.