

Imunologie cvičení 4

Metody separace buněk

MVDr. Mgr. Monika Dušková, Ph.D.

Možnosti separace buněk

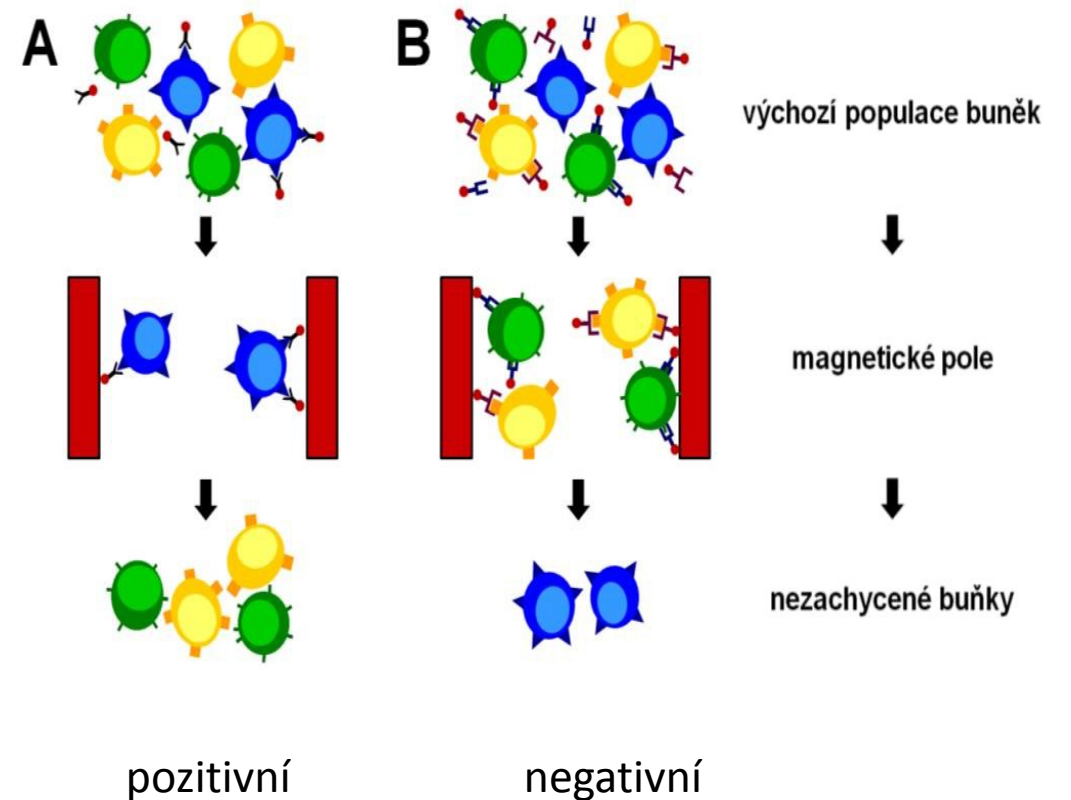
Imuno-magnetická separace

Používají se tzv. selekční protilátky, které jsou pevně navázány na magnetické částice.

Používá se v pozitivním nebo negativním uspořádání

Pozitivní separace spočívá ve výběru buněk podle přítomnosti určitého znaku (povrchové molekuly)

Negativní spočívá v odstranění všech, které specifický znak nenesou.

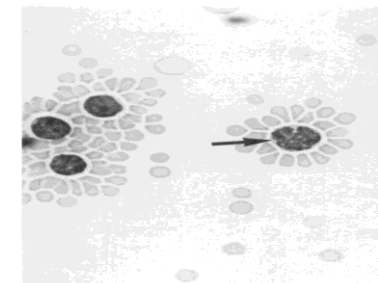
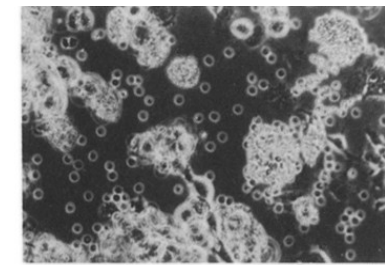


Izolace lymfocytů pomocí rozet

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.



Příklady roset z
internetových zdrojů
<https://www.researchgate.net/>

Gradientová centrifugace

Navrstvení nesrážlivé krve na separační gradient (např. Histopaque) s následnou centrifugací.

Celá příprava trvá asi hodinu a z 1 ml periferní krve lze získat $1 - 2 \times 10^6$ agranulocytů.

Separované buňky lze dále použít k řadě funkčních testů (proliferační testy, testy cytotoxicity, průtoková cytometrie apod.)

Histopaque® -1083

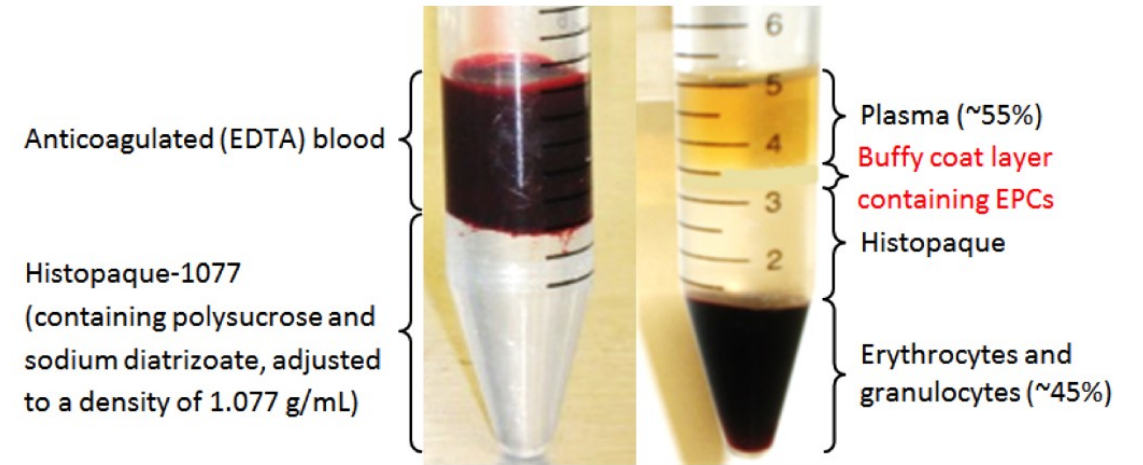
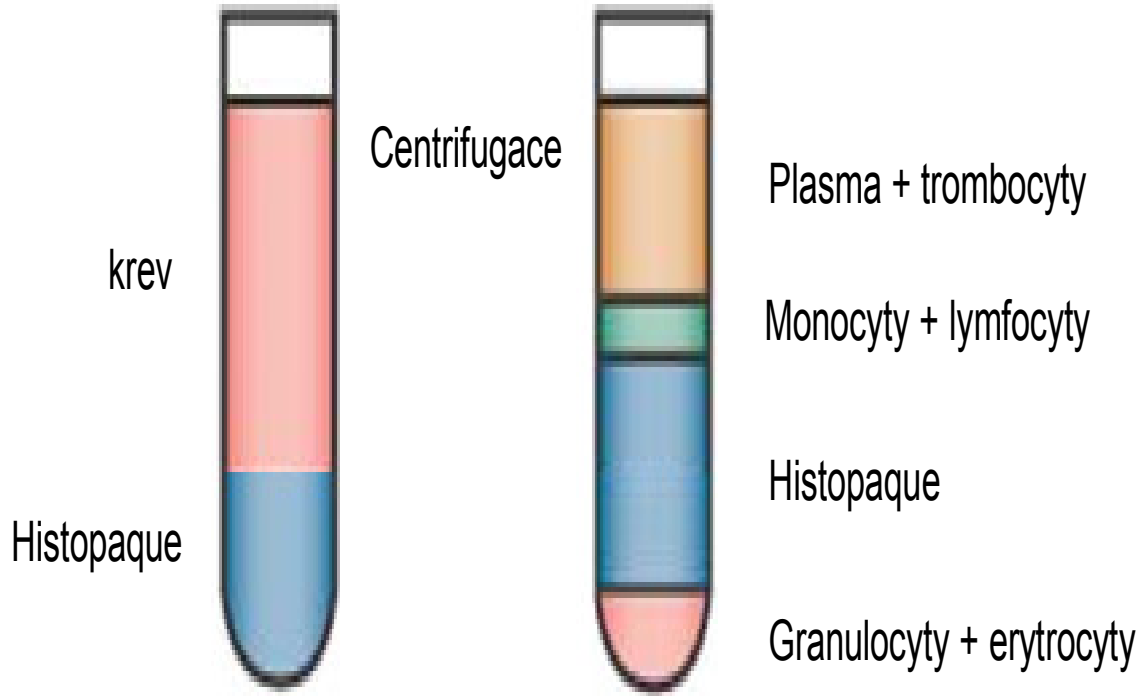
Sterile-filtered, density: 1.083 g/mL

General description

A solution containing polysucrose and sodium diatrizoate, adjusted to a density of 1.083 g/mL. Facilitates the recovery of viable mononuclear cells from rats, mice, and other small mammals.



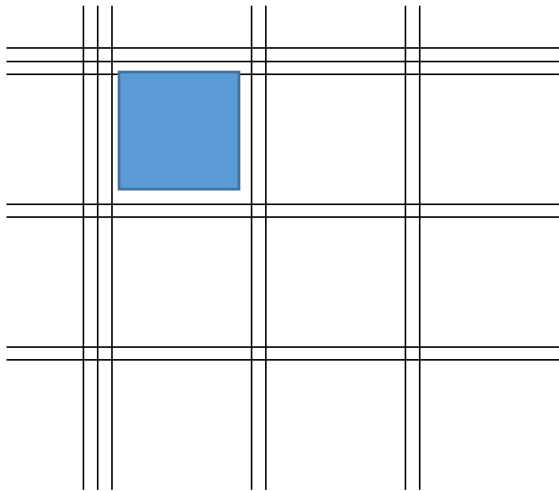
Výsledek po vrstvení a centrifugaci



doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077112.g005>

Počítání buněk v Bürkerově komůrce

Počítá se po obarvení Tůrkovým roztokem (1 : 20), v 50 velkých čtvercích



Počet buněk v 1 mm³ (μl) suspenze lze určit vzorcem:
$$b = \frac{n}{c * v * h} * z$$

b... počet buněk v 1 mm³

n... celkový počet napočítaných buněk

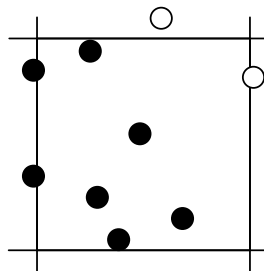
c... počet čtverců ve kterých se počítalo (nejčastěji 25 nebo 50)

v... plocha použitého čtverce (malý nebo velký)

h... hloubka komůrky

z... použité ředění suspenze (uvádí se kolikrát byla suspenze ředěna např. 20x, tedy 20)

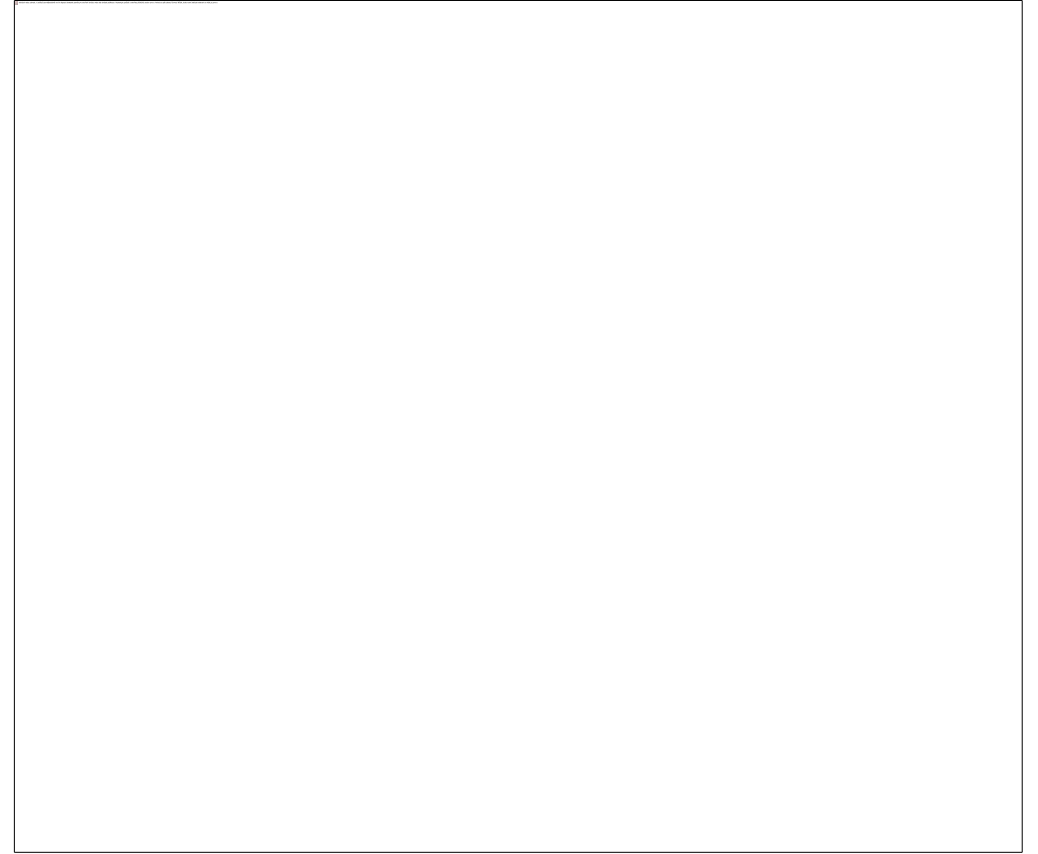
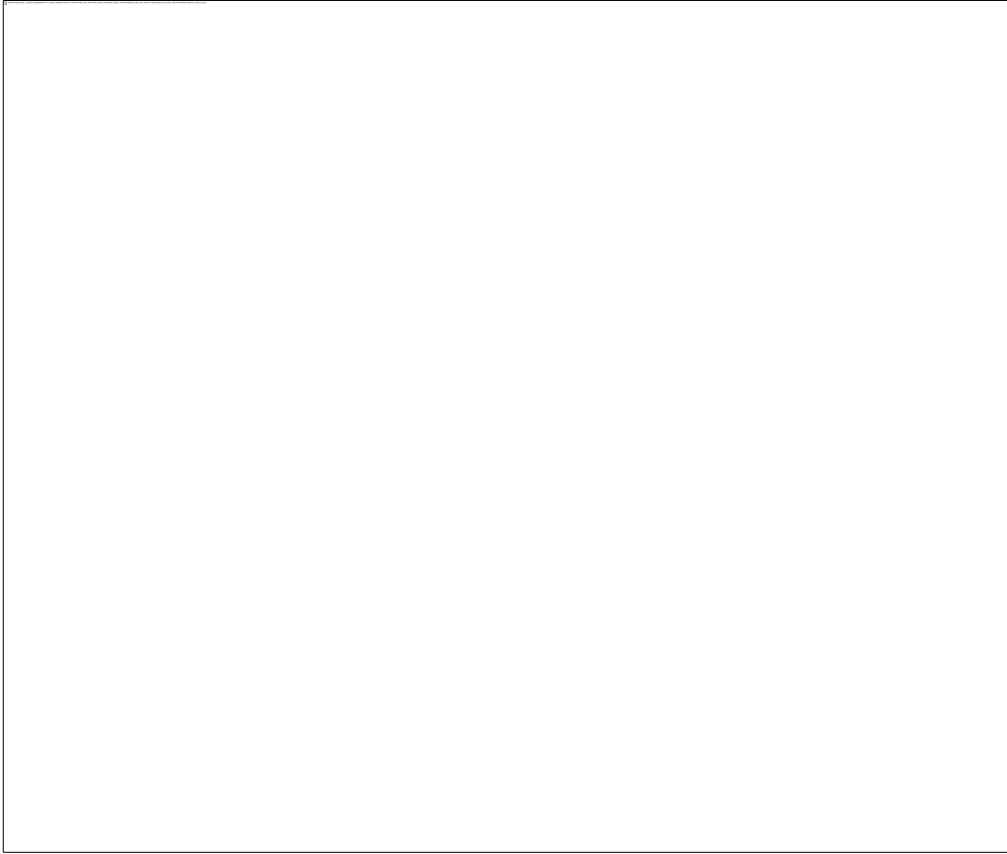
Příklad: v 50 velkých čtvercích jsme napočítali 120 buněk



$$b = \frac{120}{50 \cdot 0,04 \cdot 0,1} \cdot 20 = 12\,000$$

$$\text{Nebo ve tvaru: } b = \frac{120 \cdot 25 \cdot 10 \cdot 20}{50} = 12\,000$$

Počítání buněk v Bürkerově komůrce



Počet před separací v plné krvi – leukocyty
Zjištěná hodnota se musí ještě přepočítat pro lymfocyty
Fázový kontrast

Po separaci – už jen agranulocyty
Bez fázového kontrastu

Úvaha pro výpočet výtěžnosti

1. Spočítat množství leukocytů v původním vzorku krve: počet buněk/mikrolitr krve a vypočítat z toho počet lymfocytů (na základě diferenciálu nebo podle fyziologických hodnot)
2. Spočítat množství počet buněk - lymfocytů v sesbírané vrstvě: počet buněk/mikrolitr
3. Vzít v úvahu použité objemy (plné krve na počátku separace a sesbírané vrstvy po separaci)
4. Trojčlenkou určit výtěžnost reakce:

celkový počet buněk vstupujících do reakce100 %

celkový počet buněk po separaci.....X %
