

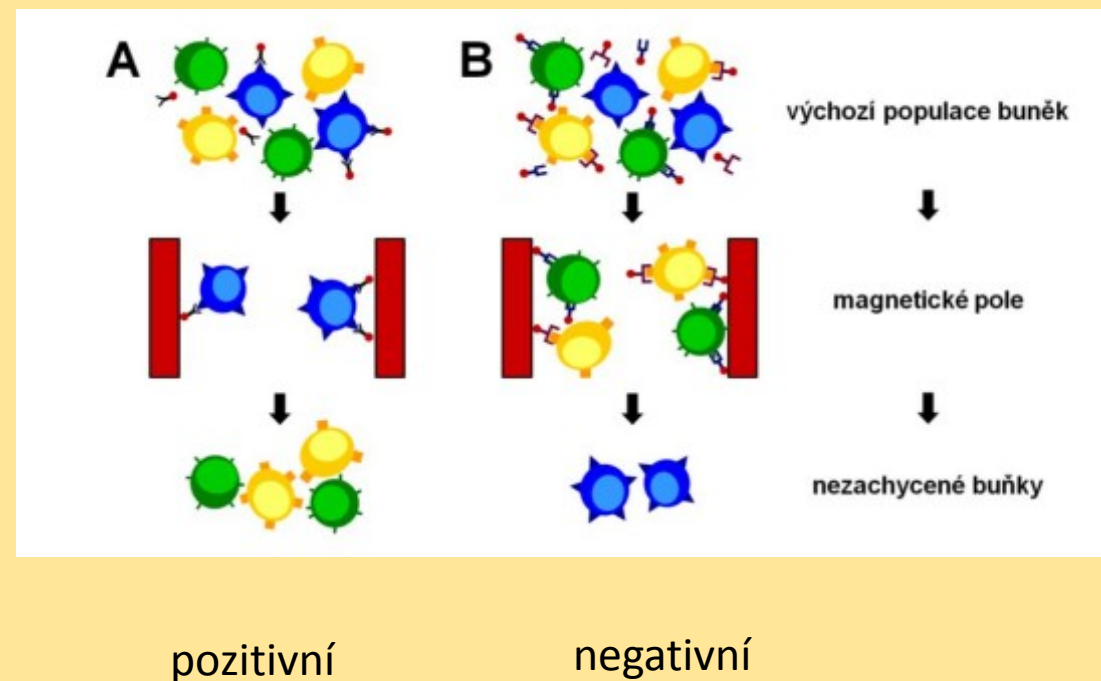
Metody separace buněk

Metody separace buněk

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)

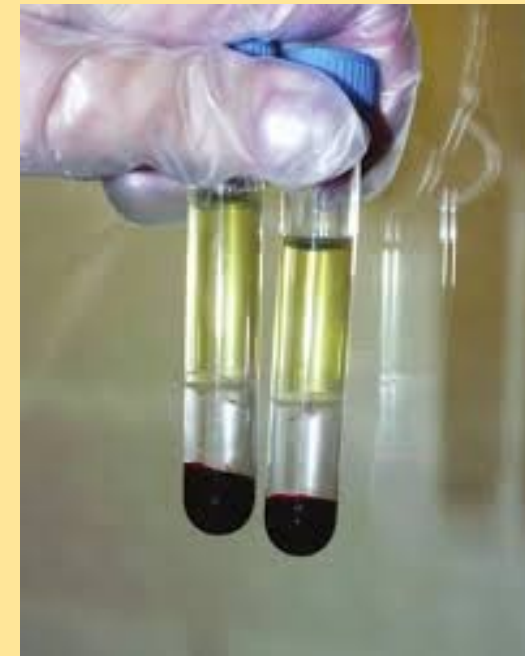
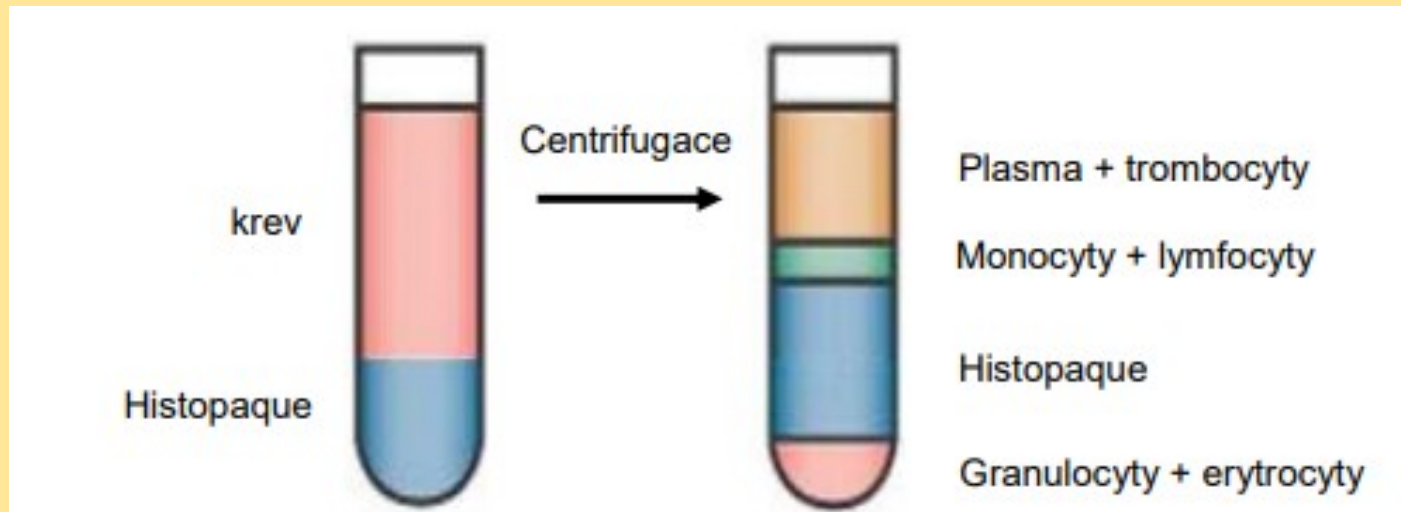
Negativní spočívá v odstranění všech, které specifický znak nenesou.



Gradientová separace

Metoda založená na rozdílné hustotě buněk.

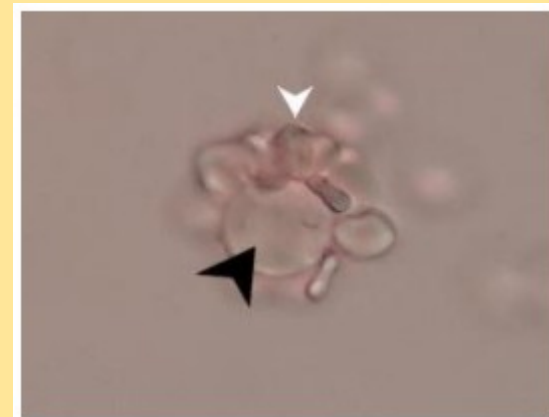
Navrstvení heparinované krve na separační gradient (např. dextran, Ficoll, Histopaque). Po následné centrifugaci dojde k typickému rozdělení buněk



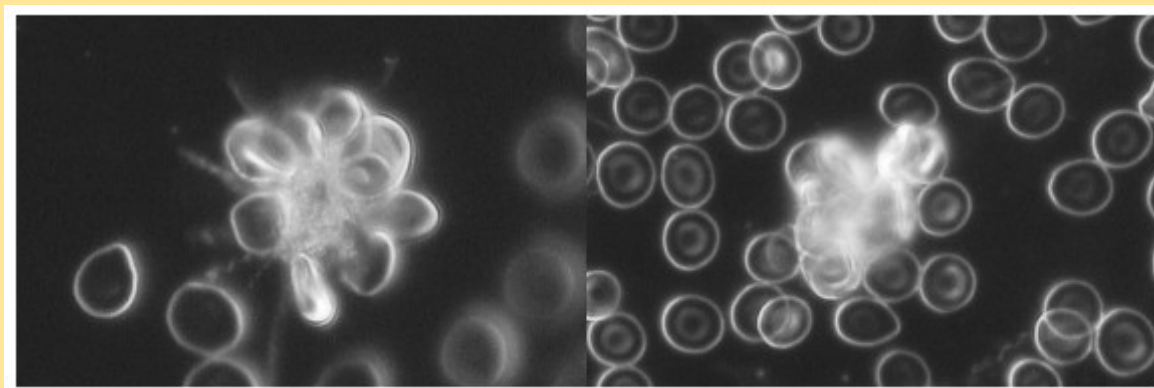
Plasma plus tromb.
Hledaná vrstva mono
plus lymfocyty
histopaque
ery plus granulocyty

E-rozetový test

E-rozetový test – test k průkazu počtu T mfocytů. Spočívá v schopnosti interakce CD2 molekuly na povrchu T buněk s beranými erythrocyty majícími na povrchu molekulu odpovídající LFA-3, tj. CD58. E-rozeta je mikroskopicky pozorovatelný beraní erythrocyt obklopený T buňkami

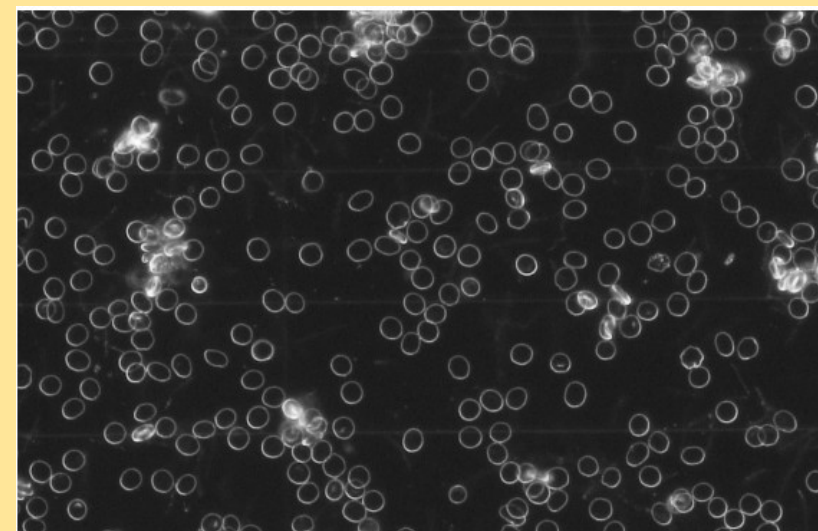


Ery – bílá šipka, rozetují kolem centrální buňky – černá šipka
Lefnerová DP MU



Detily rozet ery

Podobně B-lymfocyt reaguje s myšími erythrocyty.



X166 kultura borelií obklopená ery

Pro stanovení koncentrace částic v 1 ml suspenze se používá výpočet:

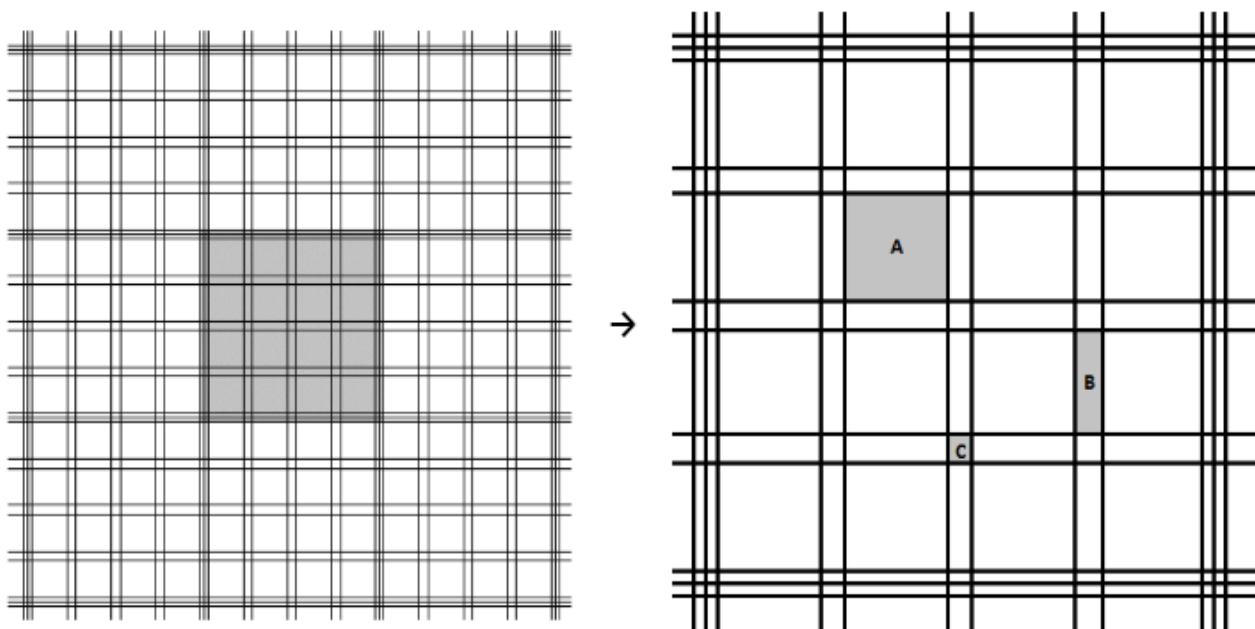
$$X = \frac{a \cdot 1000}{n \cdot V}$$

X... koncentrace buněk v 1 ml suspenze

a... stanovený počet buněk

n... počet opakování (počet spočítaných čtverců)

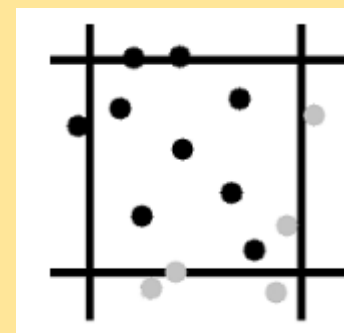
V... objem počítaného útvaru



Počítací síť Bürkerovy komůrky

	Rozměry	Plocha	Hloubka	Objem
Velký čtverec	1 x 1 mm	1 mm ²	0,1 mm	0,1 mm ³
Čtverec A	0,2 x 0,2 mm	0,04 mm ²	0,1 mm	0,004 mm ³
Obdélník B	0,05 x 0,2 mm	0,01 mm ²	0,1 mm	0,001 mm ³
Čtverec C	0,05 x 0,05 mm	0,0025 mm ²	0,1 mm	0,00025 mm ³

Velikost útvarů v počítací síti



Pravidlo pro počítání částic v počítací komůrce. Do celkového počtu částic se započítávají pouze ty, které leží nebo se dotýkají dvou zvolených stran, v tomto případě horní a levá (označeny černě). Částice dotýkající se pravé a spodní strany nezapočítáváme (označeny šedě).

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

Uveďte počet leukocytů v původní krvi před separací. Z těchto hodnot vypočtete, kolik agranulocytů vstupovalo do separace v původních 600 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.

Úkol: Z vypočítaných hodnot určujících počet agranulocytů před a po separaci, určete výtěžnost vlastní separace v %.

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 po separaci: počet lymfocytů/mikrolitr
3. Přepočítat na použité objemy (mn. plné krve na počátku separace a mn. sesbírané vrstvy po separaci)
4. Trojčlenkou určit výtěžnost reakce:

celkový počet buněk vstupujících do reakce100 %

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