

2η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Επ. Καθ. Αικατερίνη Χλίχλια

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΦΙΚΟΛΗ

Μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος μπορούν να απομονωθούν από ολικό αίμα με φυγοκέντρηση στο υλικό Ficoll-Hyraque.

Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται απομόνωση λεμφοκυττάρων πολύ εύκολα από το περιφερικό αίμα με την εφαρμογή φυγοκεντρήσεως πυκνότητας σε κλίση φικόλης (Ficoll) και μετριζιμίδης (Hyraque). Ο διαχωρισμός βασίζεται στο ότι τα λεμφοκύτταρα έχουν μικρότερη πυκνότητα από τα ερυθροκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα.

Το αίμα που λαμβάνεται, τοποθετείται αμέσως σε φιαλίδιο με αντιπηκτικό. Το αίμα αυτό αραιώνεται με υλικό ιστοκαλλιέργειας και επιστοιβάζεται προσεκτικά στην επιφάνεια του υγρού στρώματος φικόλης (Ficoll-Hyraque), η οποία βρίσκεται μέσα στο δοκιμαστικό σωλήνα. Η φικόλη έχει μεγαλύτερη πυκνότητα από εκείνη των λεμφοκυττάρων, αλλά μικρότερη από αυτή των ερυθροκυττάρων και κοκκιοκυττάρων (π.χ. ουδετεροφίλων).

Μετά από φυγοκέντρηση, τα ερυθροκύτταρα και τα πολυμορφοπύρηννα ουδετερόφιλα διέρχονται διαμέσου της φικόλης για να σχηματίσουν ίζημα στον πυθμένα του σωληναρίου, ενώ τα λεμφοκύτταρα και ελάχιστα μονοπύρηννα παραμένουν πάνω από το στρώμα της φικόλης, στη μεσοστοιβάδα. Έτσι, μπορούν να παραληφθούν από το στρώμα διαχωρισμού. Αυτά τα κύτταρα ονομάζονται μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC).

Το παρασκεύασμα των λεμφοκυττάρων μπορεί να απαλλαγεί περαιτέρω από τα μακροφάγα (μονοπύρηννα) με την προσθήκη ρινισμάτων σιδήρου. Τα ρινίσματα προσλαμβάνονται από τα φαγοκύτταρα, τα οποία μπορούν να απομακρυνθούν με έναν ισχυρό μαγνήτη.

Εναλλακτικά, τα μονοπύρηννα (μακροφάγα) μπορούν να απομακρυνθούν εάν αφήσουμε το εναιώρημα των κυττάρων να καθιζήσει σε πλαστικό τριβλίο. Τα μακροφάγα προσκολλώνται στο πλαστικό, ενώ τα λεμφοκύτταρα μπορούν να απομακρυνθούν με πλύσιμο.

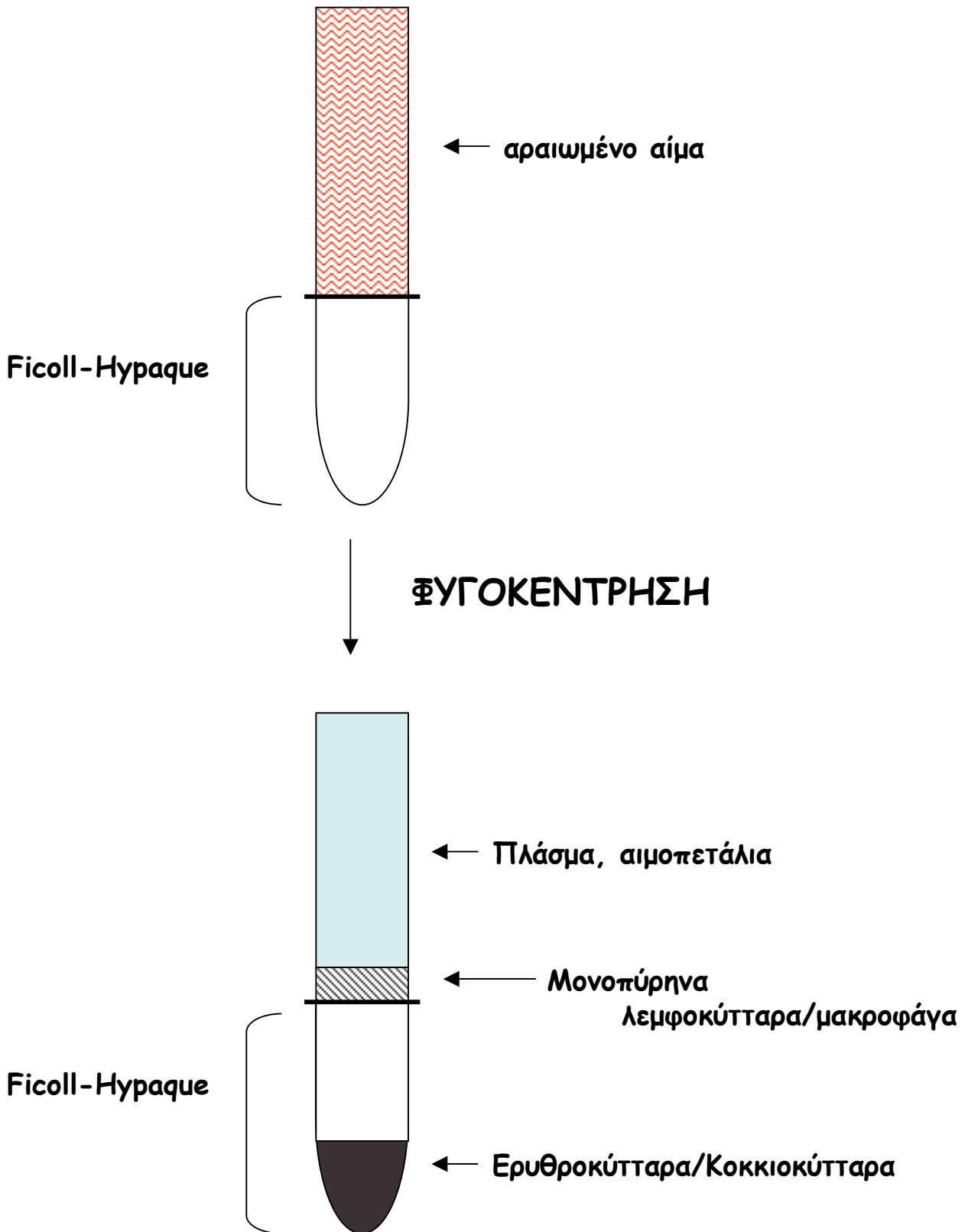
Υλικά και όργανα

διάλυμα Ficoll-Isopaque (ή Ficoll-Ηγραque, Lymphoprep, Histopaque)
 αίμα με αντιπηκτικό (ηπαρίνη ή EDTA)
 σωλήνες φυγοκέντρου 15 ml (πλαστικοί, κωνικοί), φυγόκεντρος
 Hanks' balanced salt solution (HBSS), θρεπτικό μέσο RPMI
 πιπέττες Pasteur, πιπέττες Gilson και tips
 αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer) και καλυπτρίδες
 φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας
 διάλυμα Tuerk (95 ml dH₂O, 3 ml οξικό οξύ, 4-5 σταγόνες Giemsa)
 χρωστική Trypan blue (άλας νατρίου 0.4% (w/v) σε φυσιολογικό ορό)

Μέθοδος

1. Αραιώνουμε το αίμα σε ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων (π.χ. Hanks' balanced salt solution, HBSS) ή σε θρεπτικό μέσο 1:1.
2. Προσθέτουμε 5 ml Ficoll-Isopaque (ή άλλο παρόμοιο υλικό) σε κωνικό σωλήνα φυγοκέντρου (ειδικό βάρος φικόλης = 1.078).
3. Προσεκτικά επιστοιβάζουμε το αραιωμένο αίμα (περίπου 10 ml) επάνω στο στρώμα της Ficoll-Isopaque.
4. Φυγοκέντρηση (400 xg, 25 min, 20°C).
5. Παρατηρούμε το διαχωρισμό των κυττάρων σε ζώνες. Με πιπέττα Pasteur απομακρύνουμε το επάνω στρώμα χωρίς να πειράζουμε το στρώμα των λεμφοκυττάρων. Το πάνω στρώμα περιέχει τα αιμοπετάλια και το πλάσμα.
6. Με άλλη πιπέττα Pasteur μεταφέρουμε το στρώμα των λεμφοκυττάρων σε σωλήνα φυγοκέντρου. (Το στρώμα της φικόλης περιέχει τα κοκκιοκύτταρα και στον πυθμένα βρίσκονται τα ερυθρά και νεκρά κύτταρα).
7. Προσθέτουμε στο στρώμα των λεμφοκυττάρων 15 ml Hanks' balanced salt solution (HBSS) (ή θρεπτικό μέσο που περιέχει 5-10% ορό μοσχარიού) και ανακατεύουμε με πιπέττα.
8. Φυγοκέντρηση (300 xg, 10 min, 20°C).
9. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο με πιπέττα.
10. Προσθέτουμε πάλι 10 ml HBSS (ή θρεπτικό μέσο) και ανακατεύουμε προσεκτικά.
11. Φυγοκέντρηση (300 xg, 10 min, 20°C).
12. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και αιωρούμε τα λεμφοκύτταρα σε 1 ml θρεπτικό μέσο.
13. Παρατήρηση και μέτρηση κυττάρων στο μικροσκόπιο.

Διαχωριστική φυγοκέντρηση για απομόνωση λεμφοκυττάρων



Μέτρηση κυττάρων

1. Για την παρατήρηση και μέτρηση των μονοπύρηνων κυττάρων που συλλέξαμε στο θρεπτικό μέσο, αραιώνουμε τα κύτταρα ως εξής:
 - A. 20 μl αιώρημα κυττάρων και 380 μl διάλυμα Tuerk (παρατήρηση κυττάρων)
 - B. 200 μl αιώρημα κυττάρων, 300 μl HBSS και 500 μl διάλυμα Trypan blue (αραίωση 1:5) (το Trypan blue χρωματίζει μπλε τα νεκρά κύτταρα)
2. Ανακατεύουμε προσεκτικά και περιμένουμε 5-10 min.
3. Τοποθετούμε 1 σταγόνα στο αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, στην ειδική εσοχή κάτω από την καλυπτρίδα. Περιμένουμε λίγο μέχρι να κατακαθίσουν τα κύτταρα.
4. Μετράμε τα κύτταρα που βρίσκονται στα πολύ μικρά τετράγωνα (80) στο κέντρο του σταυρού όπως δείχνει η παρακάτω εικόνα. Το αιμοκυτταρόμετρο διαιρείται σε 9 μεγάλα τετράγωνα (π.χ. 6, 7, 8 και 9) με πλευρά 1 mm το καθένα. Το κεντρικό μεγάλο τετράγωνο υποδιαιρείται σε άλλα 25 τετράγωνα (όπως 1, 2, 3, 4 και 5) μετρίου μεγέθους και το καθένα από αυτά υποδιαιρείται σε άλλα 16 μικρά τετράγωνα. Μετράμε τα κύτταρα στο κεντρικό μεγάλο τετράγωνο του σταυρού και σε ένα ακόμα μεγάλο τετράγωνο (π.χ. 6, 7, 8 ή 9).
5. Πολλαπλασιάζουμε το μέσο όρο του αριθμού κυττάρων στα δύο μεγάλα τετράγωνα επί 10.000. Αυτός ο αριθμός δίνει τον αριθμό κυττάρων ανά ml θρεπτικού μέσου, αφού πρώτα λάβουμε υπόψη μας την αρχική αραιώση των κυττάρων στα αντίστοιχα διαλύματα. (Κάθε τετράγωνο Neubauer με την καλυπτρίδα του αντιπροσωπεύει έναν όγκο των 0.1 mm^3 ή 10^{-4} cm^3 ($1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ ml}$)).

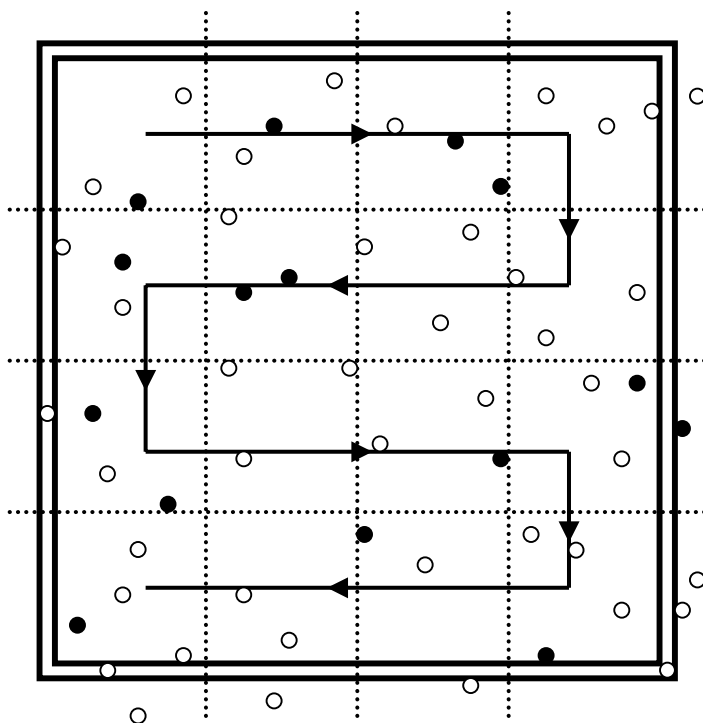
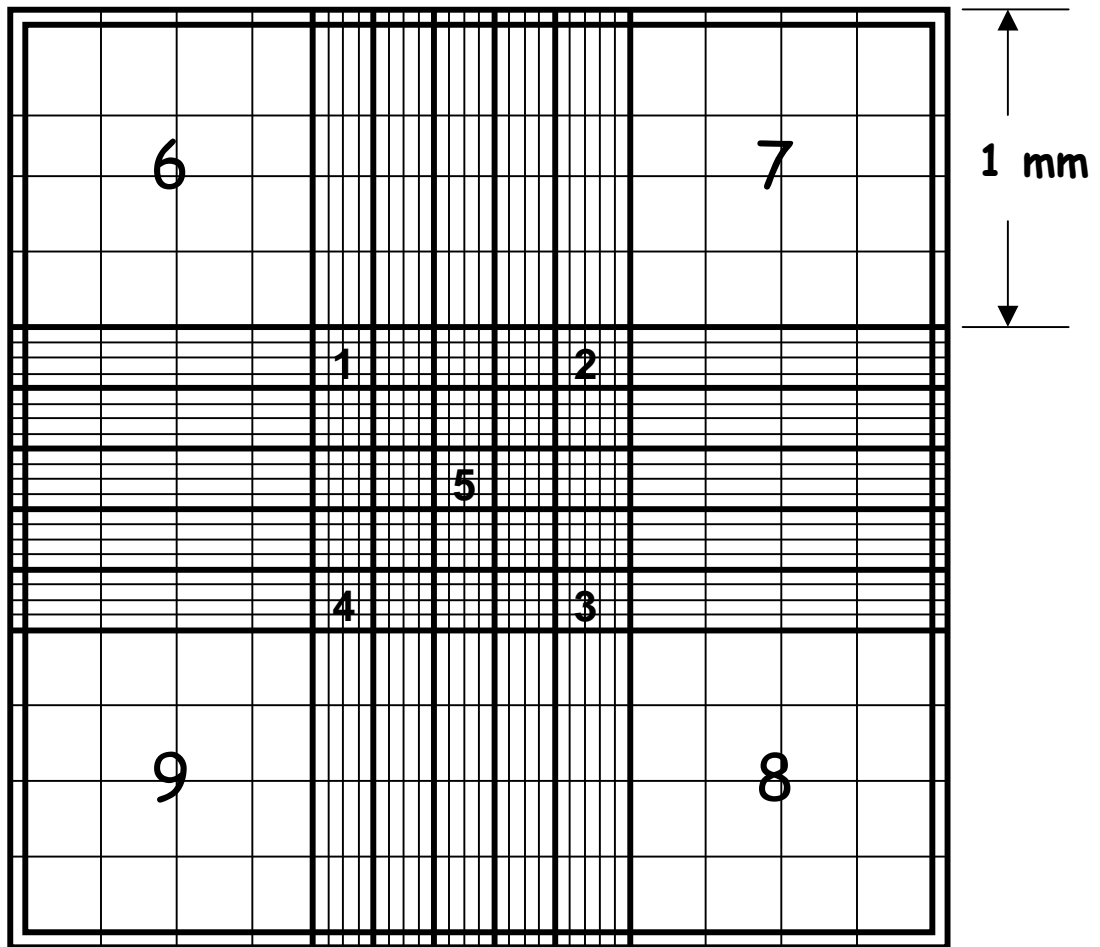
Παράδειγμα: Μετρήσαμε 55 κύτταρα στο μεσαίο μεγάλο τετράγωνο και 65 κύτταρα στο τετράγωνο 7. Ο μέσος όρος κυττάρων ανά μεγάλο τετράγωνο είναι 60. Για το διάλυμα χρωστικής Trypan blue χρησιμοποιήσαμε αραιώση 1:5 (200 μl αιώρημα κυττάρων σε 1 ml τελικό όγκο). Ο μέσος όρος κυττάρων πολλαπλασιάζεται επί την αραιώση, δηλ. $60 \times 5 = 300$. Ο συνολικός αριθμός κυττάρων ανά ml θρεπτικού μέσου θα είναι $300 \times 10.000 = 3.000.000$ ($= 3 \times 10^6$ κύτταρα).

*Μετράμε ξεχωριστά τα ζωντανά και τα νεκρά κύτταρα (μπλε) και υπολογίζουμε τη βιωσιμότητα των κυττάρων.

<p>αριθμός κυττάρων σε μεγάλο τετράγωνο</p>	<p>\times αραιώση $\times 10^4 =$ αριθμός κυττάρων / ml</p>
--	--

βιωσιμότητα κυττάρων (%) = [(αριθμός ζωντανών) ÷ (συνολικός αριθμός κυττάρων)] \times 100

Αιμακυτταρόμετρο Neubauer



Μεγέθυνση τετραγώνου 1 ή 6

○ ζωντανά κύτταρα

● νεκρά κύτταρα

* Μετράμε τα κύτταρα που έρχονται σε επαφή με τη περιμετρική πάνω οριζόντια γραμμή και τα κύτταρα που βρίσκονται επάνω στην αριστερή κάθετη γραμμή. Δεν μετράμε αυτά που ακουμπούν πάνω στην κάτω και δεξιά γραμμή!

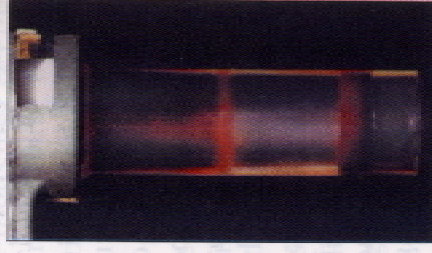
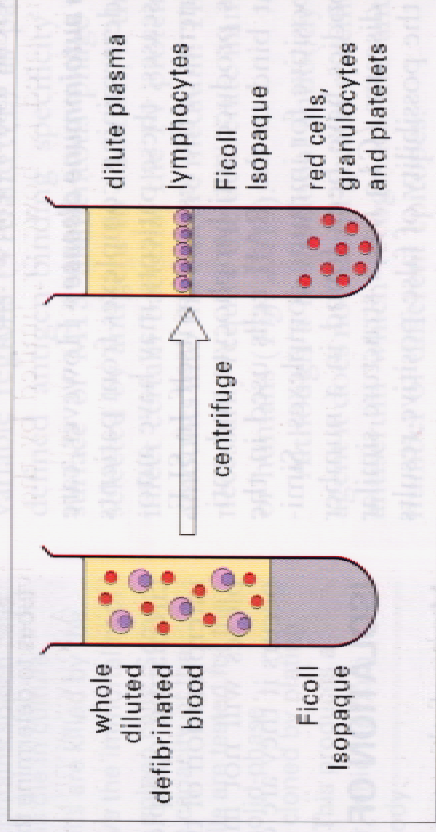
Σημειώσεις

- * Ο σχηματισμός θρόμβου εμποδίζεται αν το αίμα αναμιχθεί με αντιπηκτικές ουσίες, όπως κιτρικό νάτριο, οξαλλικό κάλλιο, EDTA και ηπαρίνη. Τα τρία πρώτα αντιπηκτικά εμποδίζουν το σχηματισμό θρόμβου γιατί αντιδρούν με τα ιόντα Ca^{2+} . Η ηπαρίνη είναι θεϊκός πολυσακχαρίτης και εμποδίζει το σχηματισμό θρομβίνης.
- * Τα ερυθροκύτταρα είναι μικρά κύτταρα και διαφανή. Τα λεμφοκύτταρα είναι ίδιου ή λίγο μεγαλύτερου μεγέθους από τα ερυθρά, αλλά φαίνονται αδιαφανή. Τα πολυμορφοπύρηνα είναι μεγαλύτερα και αδιαφανή. Τα αιμοπετάλια φαίνονται σαν μικρές μαύρες κουκίδες.
- * Η φικόλη είναι συνθετική ουσία υψηλού μοριακού βάρους. Είναι πολυμερές της σακχαρόζης και της επιχλωρουδρίνης. Η λειτουργία της μετριζιμίδης είναι να δημιουργεί πυκνότητα και ώσμωση τέτοια ώστε να απομακρύνονται από τα λεμφοκύτταρα τα άλλα κύτταρα. Οι διάφοροι τύποι κυττάρων λόγω διαφορετικής πυκνότητας της μάζας τους καθιζάνουν με διαφορετική ταχύτητα στα παρασκευάσματα της Ficoll-raque.
- * Το μείγμα Ficoll-Hyraque μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για αιώρημα κυττάρων από διάφορα όργανα (όπως π.χ. αιώρημα κυττάρων από σπλήνα ποντικού)
- * Η πλασματική μεμβράνη ενός ζωντανού κυττάρου δεν επιτρέπει την είσοδο μη-ηλεκτρολυτών χρωστικών, ενώ των νεκρών επιτρέπει. Οι χρωστικές που ηλεκτρολύονται εισέρχονται μόνο στα ζωντανά κύτταρα. Για το σκοπό αυτό, για τον προσδιορισμό και τη μέτρηση νεκρών κυττάρων, χρησιμοποιούνται χρωστικές που δεν ηλεκτρολύονται, π.χ. Trypan blue. Αυτή η χρωστική βάφει μπλε τα νεκρά κύτταρα και είναι μία από τις πολύ εύχρηστες χρωστικές αποκλεισμού (από τα ζωντανά κύτταρα).
- * Αν τα κύτταρα είναι πάρα πολλά και δεν είναι δυνατόν να τα μετρήσουμε κάνουμε μεγαλύτερη αραιώση των κυττάρων.
- * Η απομόνωση κυττάρων (από πειραματόζωα) που θα χρησιμοποιηθούν για πειράματα πρέπει να γίνεται σχετικά γρήγορα. Τα κύτταρα πρέπει να εισέρθουν σε κυτταροκαλλιέργεια *in vitro* ή θα πρέπει να μεταφερθούν σε άλλο ζώο *in vivo*, όσο πιο γρήγορα γίνεται. Η μέγιστη επιβίωση *in vitro* επιτυγχάνεται συνήθως αν τα κύτταρα παραμείνουν στους 4°C κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας. Το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων δε θα επιβιώσει αν αυτά μείνουν για μεγάλο διάστημα στο ψυγείο.
- * Τα μονοπύρηνα κύτταρα (μακροφάγα) μπορούν να απομακρυνθούν από τα λεμφοκύτταρα, εάν αφήσουμε το αιώρημα κυττάρων να καθιζήσει σε πλαστικό τριβλίο για 1-2 ώρες. Τα μακροφάγα προσκολλώνται στο πλαστικό, ενώ τα λεμφοκύτταρα απομακρύνονται με το υπερκείμενο.

Διαχωρισμός λεμφοκυττάρων σε φικόλη

Fig. 27.23 Lymphocytes can be separated from whole blood using a density gradient. Whole blood is defibrinated by shaking with glass beads and the resulting clot removed. The blood is then diluted in tissue culture medium and layered on top of a tube half full of Ficoll. Ficoll has a density greater than that of lymphocytes but less than that of red cells and granulocytes (e.g. neutrophils). After centrifugation the red cells and polymorphonuclear neutrophils (PMNs) pass down through the Ficoll to form a pellet at the bottom of the tube while lymphocytes settle at the interface of the medium and Ficoll. The lymphocyte preparation can be further depleted of macrophages and residual

Density-gradient separation of lymphocytes on Ficoll Isopaque



PMNs by the addition of iron filings; these are taken up by phagocytes which can then be drawn away with a strong magnet. Macrophages can also be

removed by leaving the cell suspension to settle on a plastic dish. Macrophages adhere to plastic, whereas the lymphocytes can be washed off.