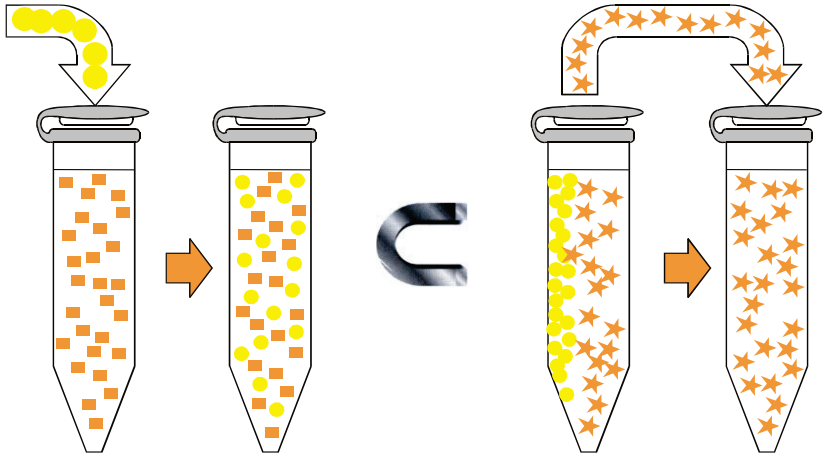
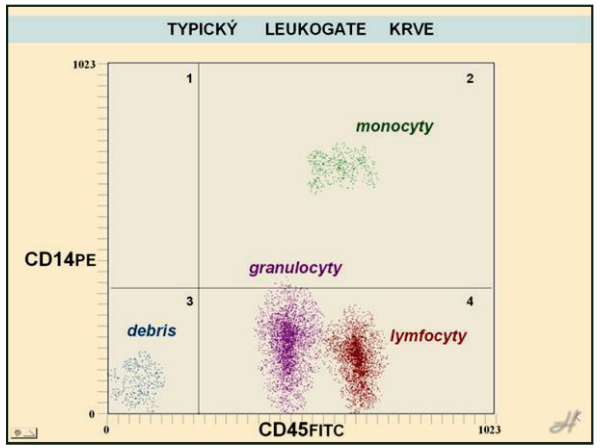
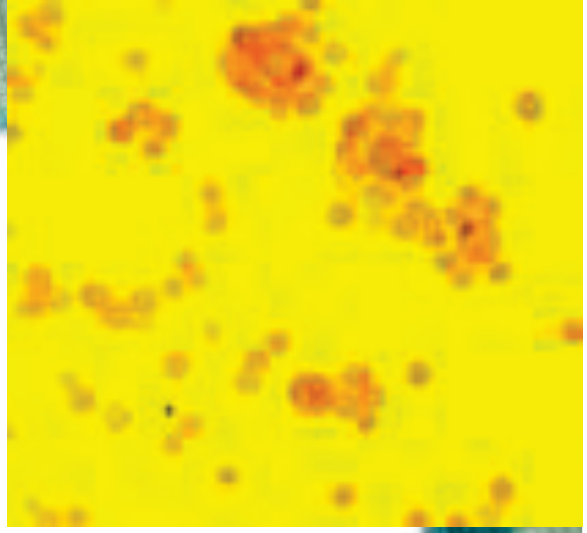
Techniky separace buněk





EVROPSKÁ UNIE
esf
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
Univerzita Pardubice
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Techniky separace buněk



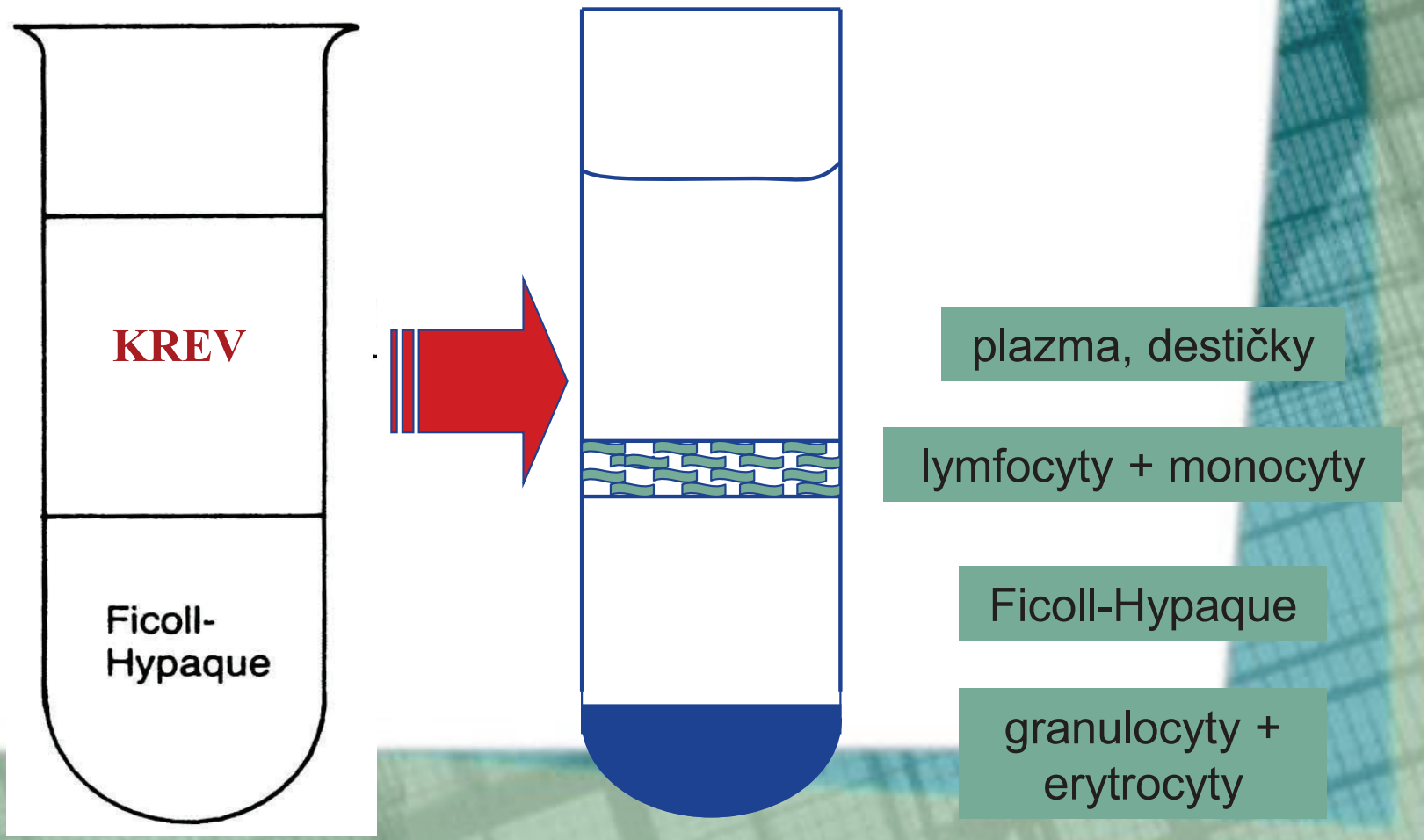
- (izolace T lymfocytů pomocí rozet)
  - CD2+ bb, beraní erytrocyty
- gradientová centrifugace
  - pomocí chlazené centrifugy
- imunomagnetická selekce
- selekce pomocí průtokové cytometrie

Gradientová centrifugace

- gradientová separace na vrstvě Ficoll-Hypaque, Lymphoprep
- založená na oddělení buněk podle rozdílů v jejich hustotě

Podmínky

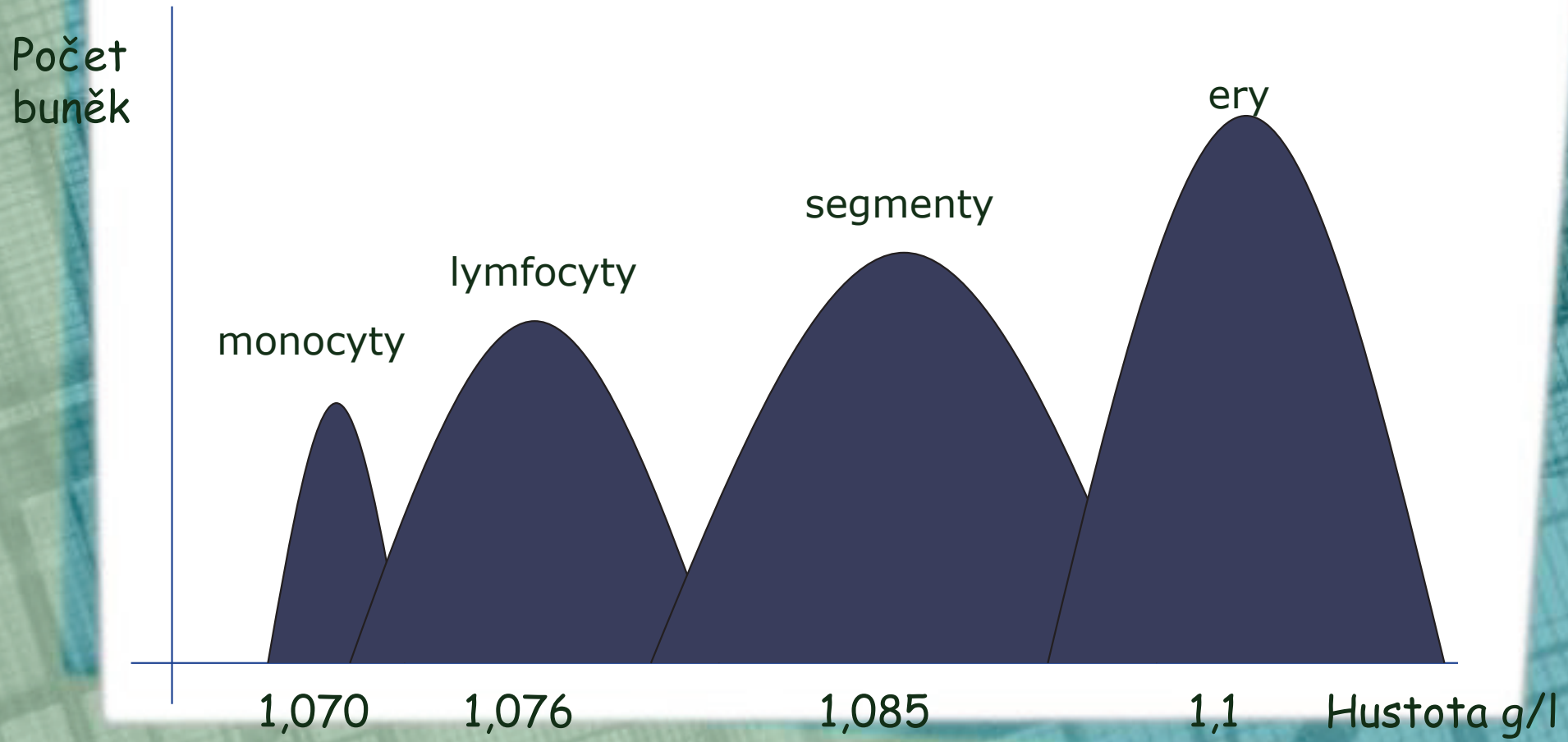
- 30 minut při 1500 rpm
- +2 hod pro monocyty
- optimální T 18-20°C



Před inkubací

Po inkubaci.

Hustotní gradient buněk



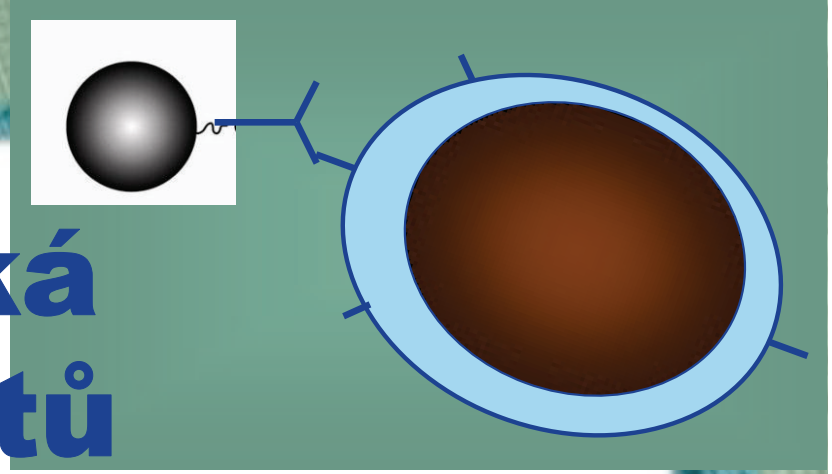
Další izolace populací z gradientu

- Destičky kontaminují mononukleární bb
  - oddělí se dalšími centrifugacemi
- monocyty a makrofágy 30%
  - adherují na plastový povrch
  - fagocytují železné piliny
- Granulocyty
  - jsou velmi fragilní; velmi infekční (laminární box)
  - ke směsi ery + granulocyty se přidá dextran, který vytváří shluky s ery

Další izolace populací z gradientu

- odstranění nežádoucích buněčných populací
  - použití bivalentních Ab
  - proti erytrocytům (glykoforin A)
  - příslušné populaci: anti-CD3 (pro T bb), anti-CD19 (B bb)

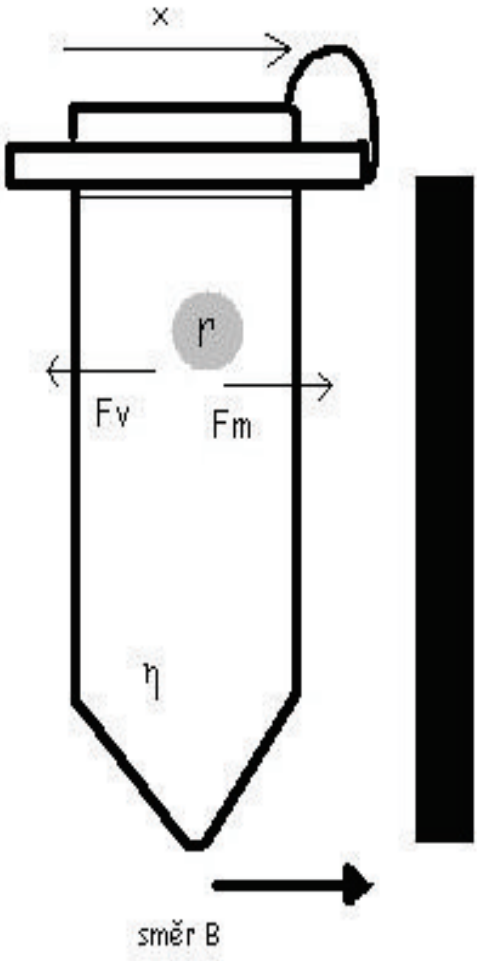
Imunomagnetická selekce leukocytů

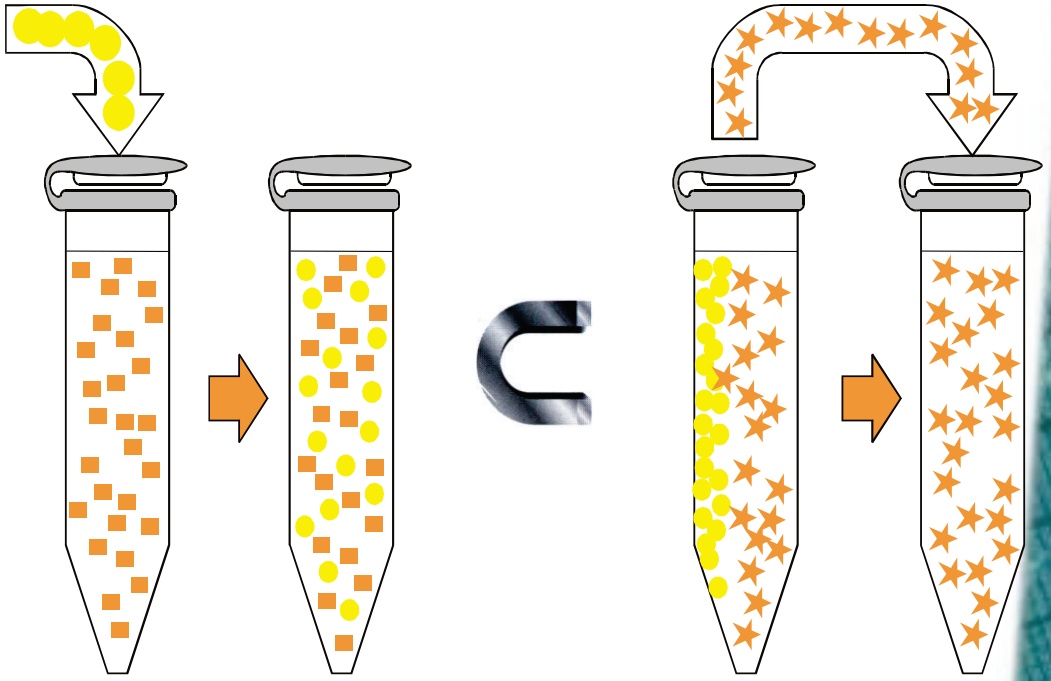


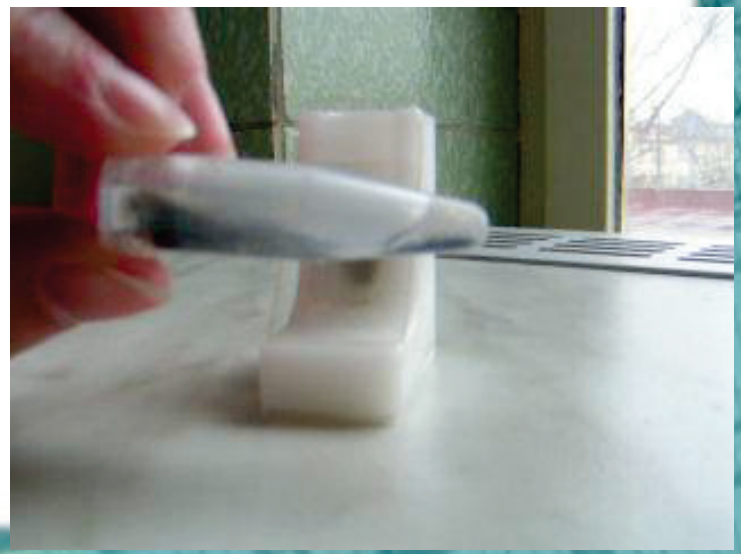
- separace je založená na expresi povrchových Ag
- použití magnetických částic s navázanou specifickou protilátkou
- pozitivní selekce: jsou vybírány buňky s určitým Ag
- negativní selekce: nežádoucí populace je vybrána a odstraněna

- trvání selekce 2 h
- čistota frakcí přes 90%
- 4°C zajistí specifickou vazbu protilátky

Princip magnetické separace







PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

- slouží k identifikaci buněčných populací průkazem membránových molekul (CD) - FC (flow cytometry)
- slouží k separaci buněčných linií – FACS – cell sorter (třídič)

- částice jsou v laminárním proudění usměrněny do řady
- cytometrie určuje:
  - počet (N)
  - velikost (FS)
  - „morfologii“ buněk (SS)
  - přítomnost fluorescenčního signálu (FL)

- údaje získané pro jednotlivé buňky jsou vyhodnoceny počítačem

PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

MATERIÁL:

- **plná krev, punktáty kostní dřeně**
- **separované buněčné populace**
- **jiné tělní tekutiny *(likvor, ascites, exsudáty)***
- **buněčné suspenze získané dezintegrací tkáně**
  - **buněčné suspenze jsou značeny imunofluorescencí**
  - **používají se monoklonální protilátky proti:**
  - **membránovým molekulám**
  - **cytoplazmatickým molekulám**
  - **jaderným molekulám**

Základní CD znaky leukocytů využívané v průt. cytometrii

- T bb:
  (CD2), CD3, CD4, CD8, HLA-DR, CD25
  Normální hladina CD4:CD8 2:1
  CD4+, adhezivní molekuly CD11/CD18
- B bb: CD19,20,21
- NK bb: CD16+ CD56+
- monocyty CD14
- granulocyty CD15

Průtoková cytometrie plné krve

- ✓ odpadá separace buněk
- ✓ přímá imunofluorescence
- ✓ inkubace heparinizované krve se značenou monoklonální protilátkou
- ✓ hypotonická lýza erytrocytů
- ✓ odstranění nenavázané protilátky
- ✓ měření

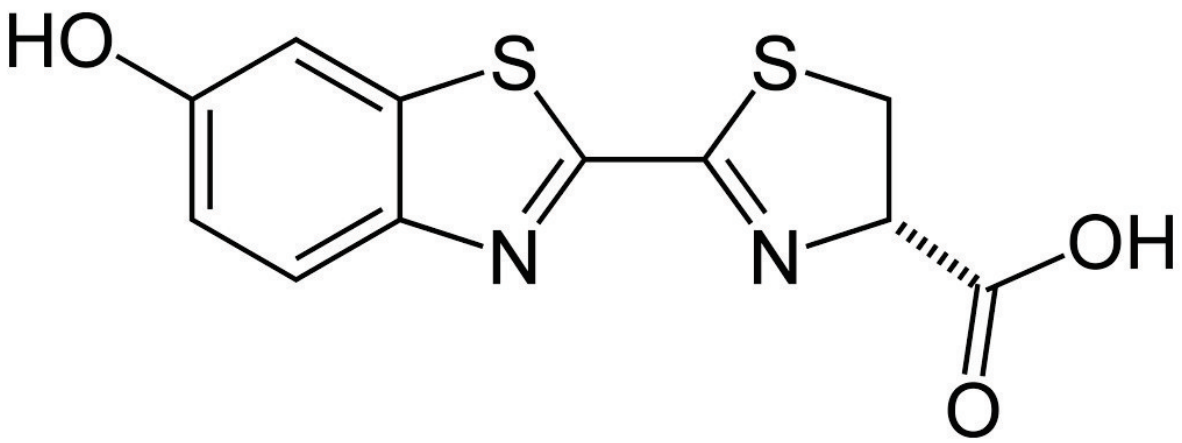
- Při použití různých monoklonálních protilátek označených rozdílnými fluorochromy lze provést současný průkaz dvou až tří znaků (výzkumné FC až 9 - 12 znaků)

MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY JSOU OZNAČENY FLUOROCHROMY

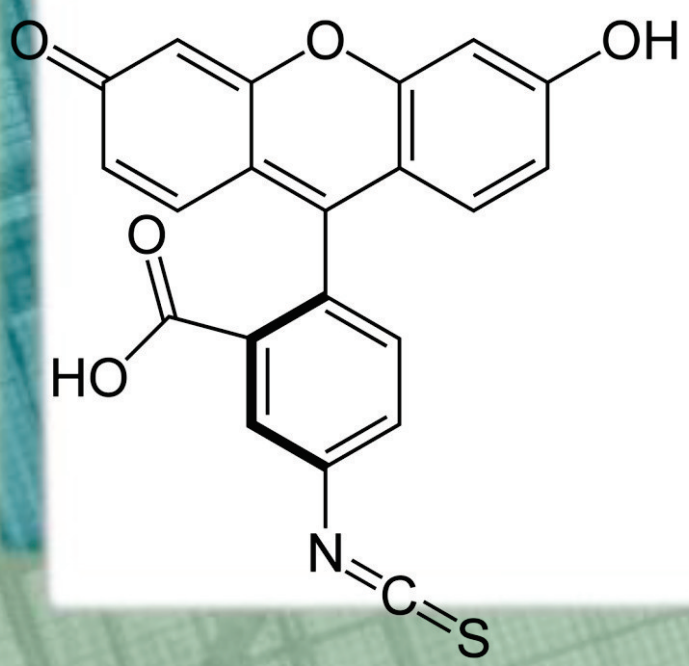
energie potřebná k excitaci fluorochromů je získávána z UV světla nebo laserového paprsku

je vyzařováno světlo, jehož barva závisí na vlnové délce emise

flurochrom	absorbce *(nm)*	emise
FITC	470 - 510	510 - 540
PHYCOERYTHRIN *(PE)*	490 - 580	570 - 590
ALOPHYKOCYANIN *(APC)*	630 - 635	660 - 680



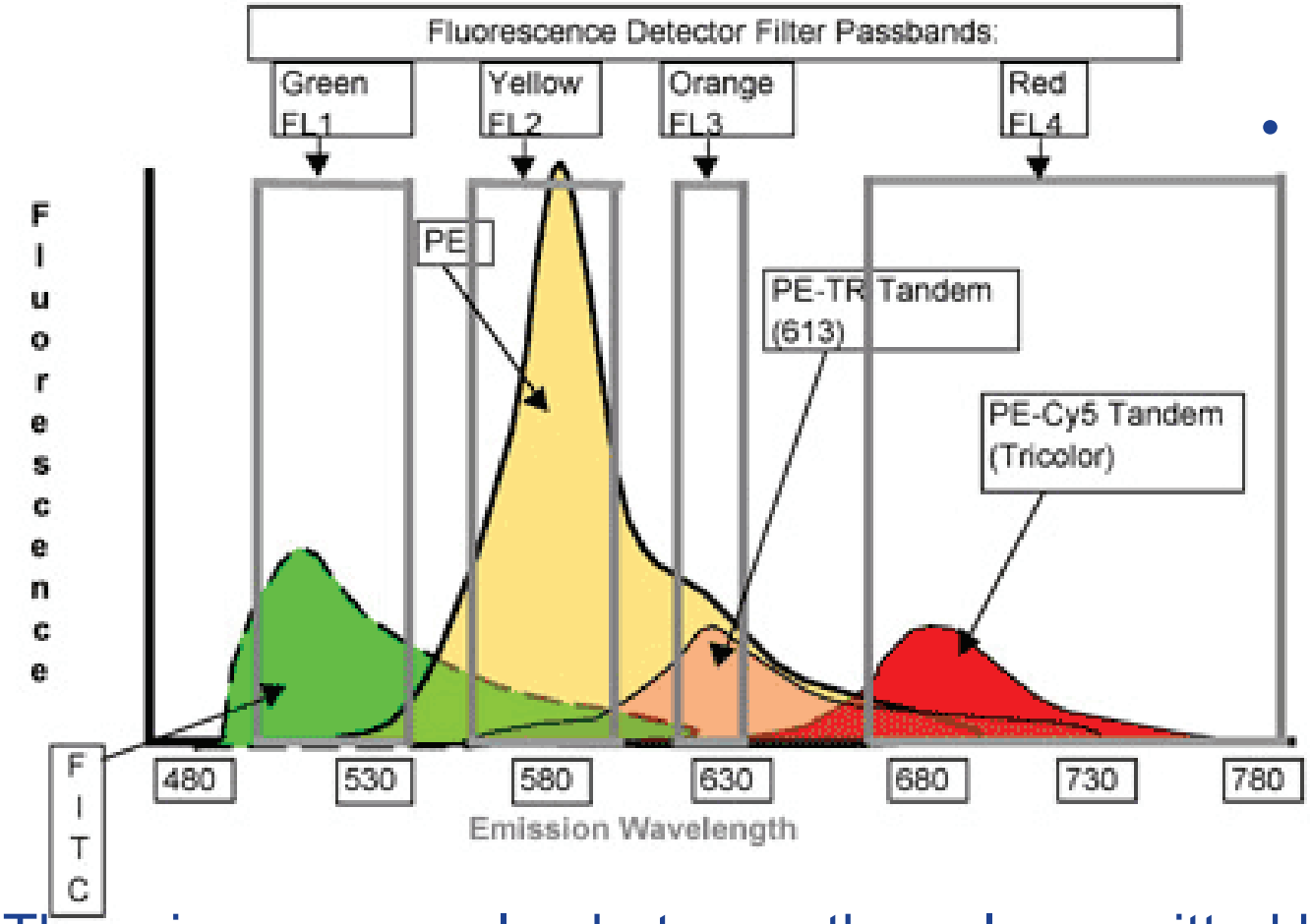
Luciferin



Fluorescein Isothiocyanate
(FITC)

http://en.wikipedia.org/

Compensation

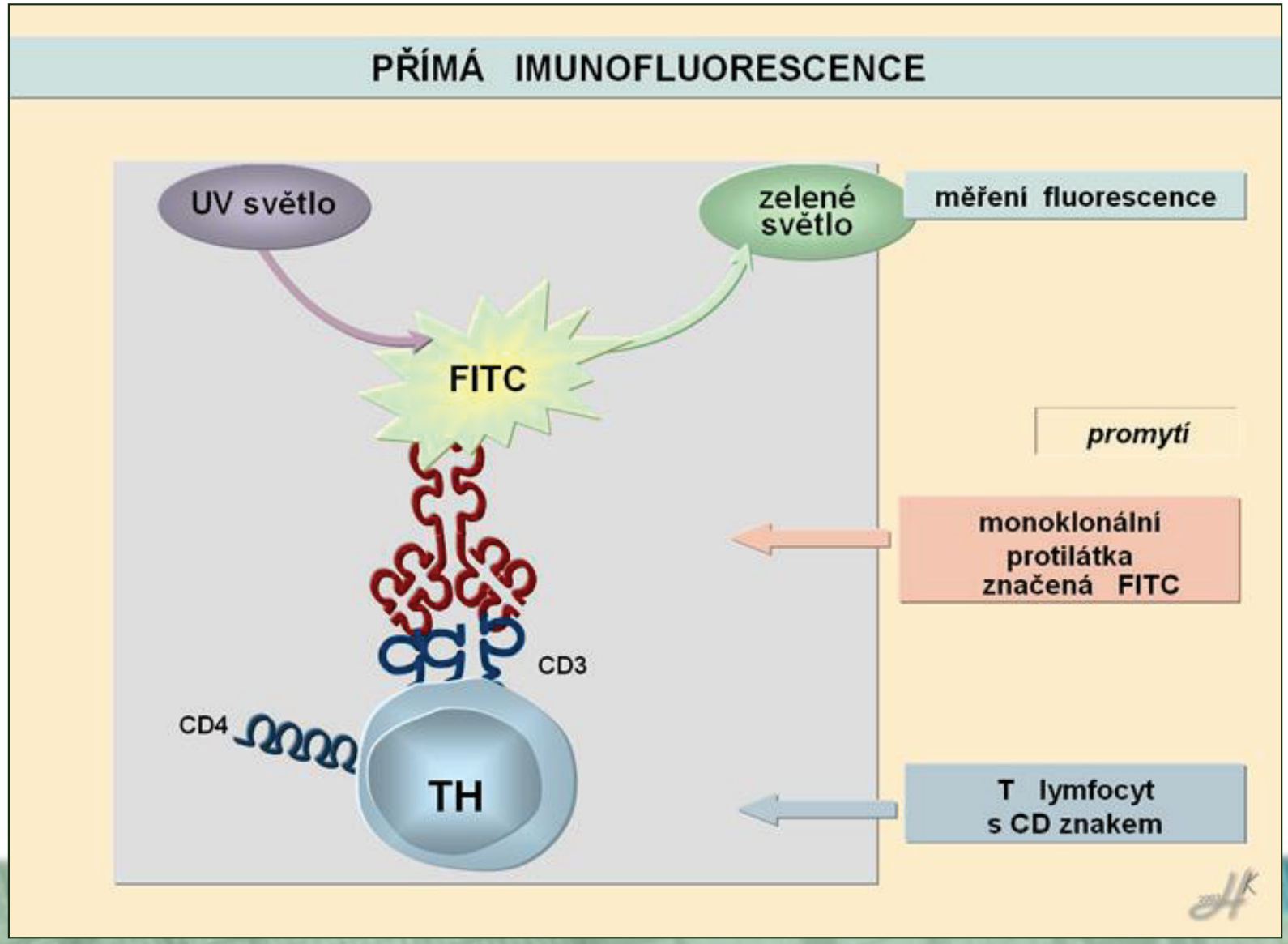


- A very important function of the electronics system is to perform compensation

- There is some overlap between the colors emitted by different fluorescent markers, therefore mathematical compensation is used to reduce overlapping results

fluorochrom je konjugován s primární protilátkou

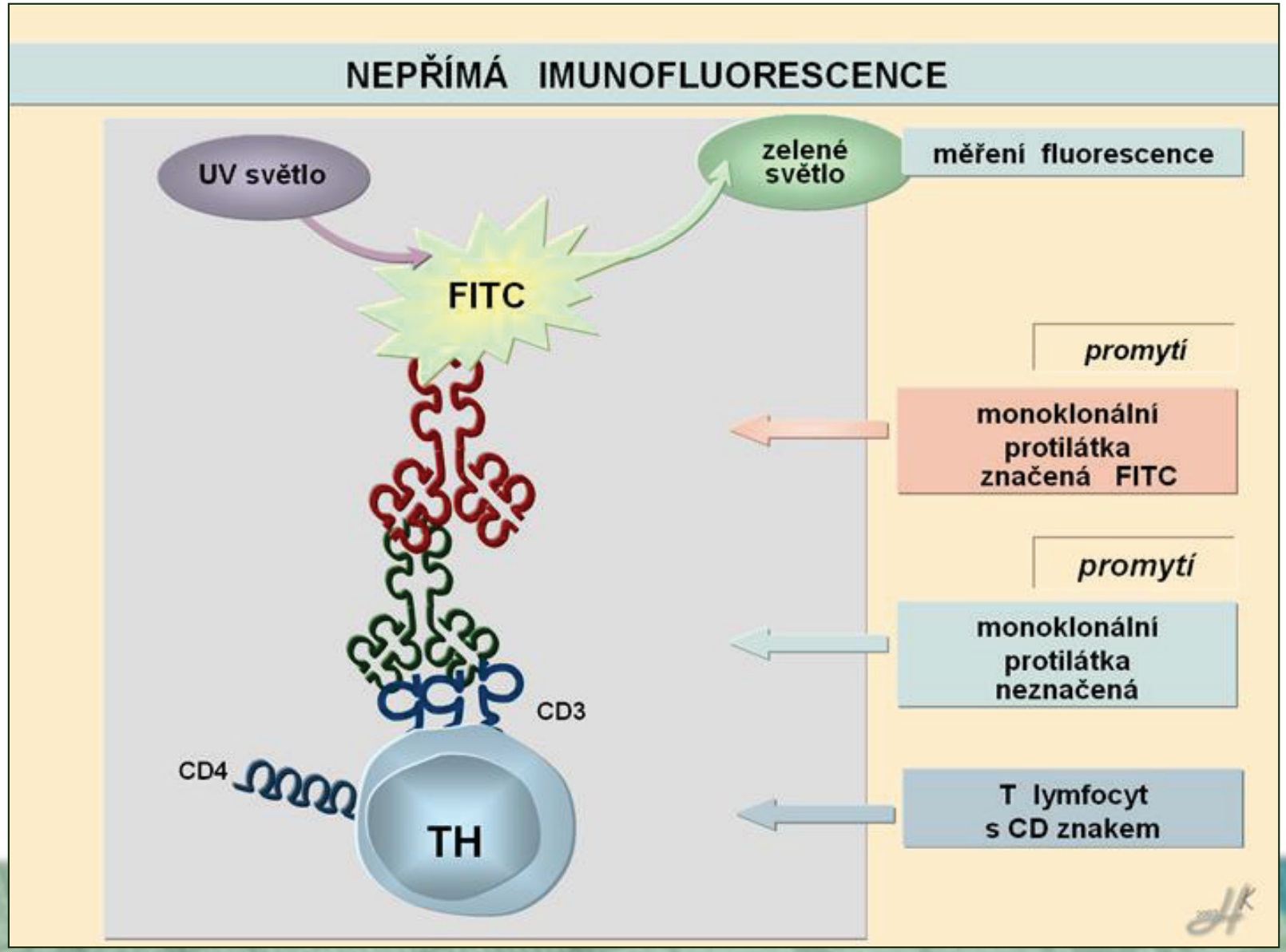
- analýza plné krve
- průtoková cytometrie

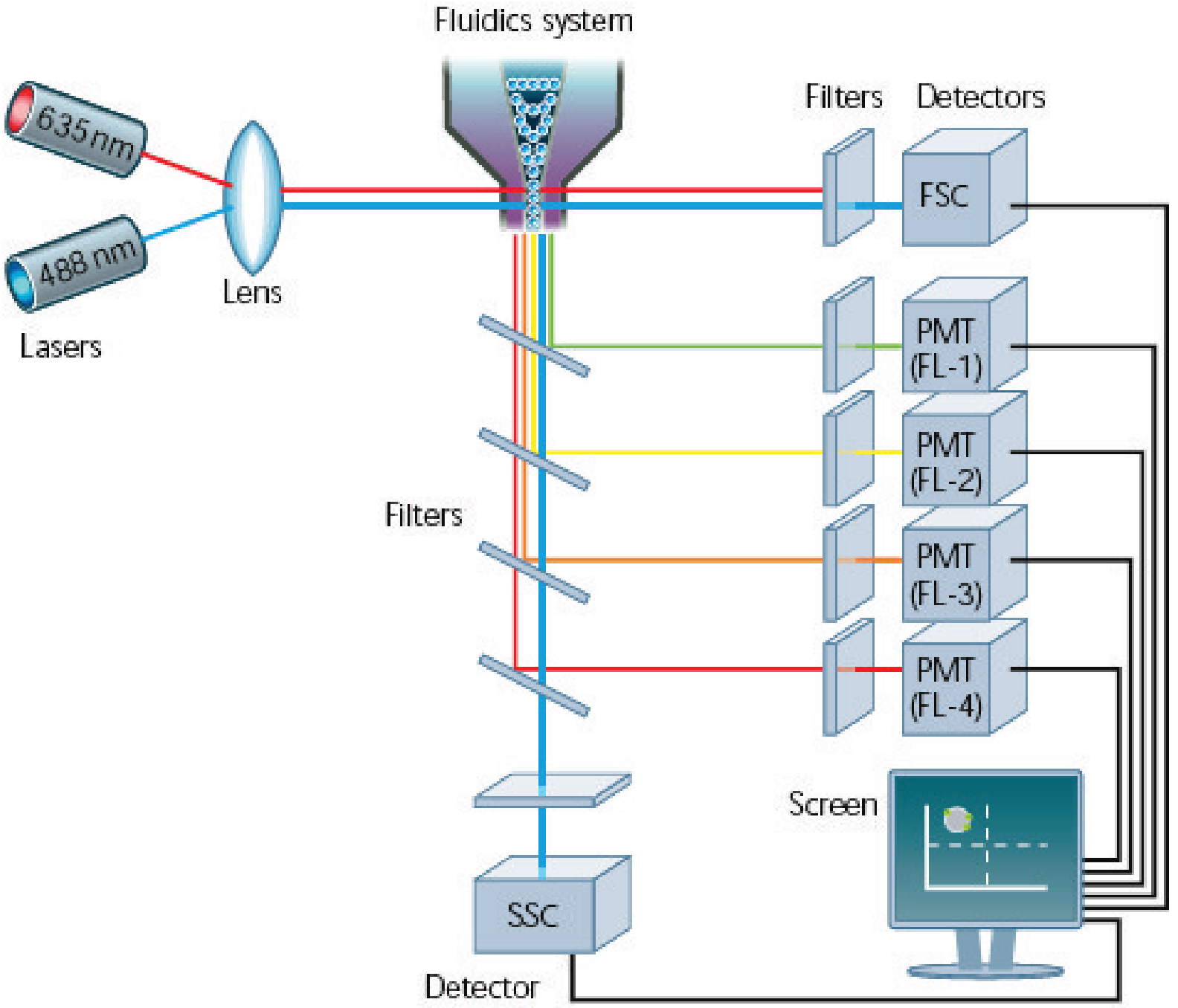


primární protilátka je neznačená

⇒- označena je sekundární protilátka

- izolované buňky, **imunohistochemie**
- UV mikroskopie

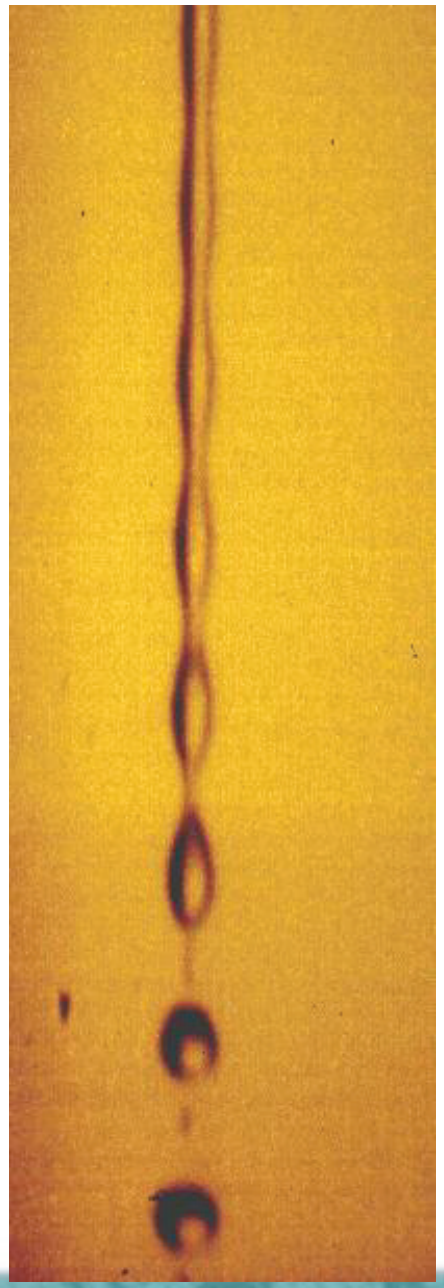




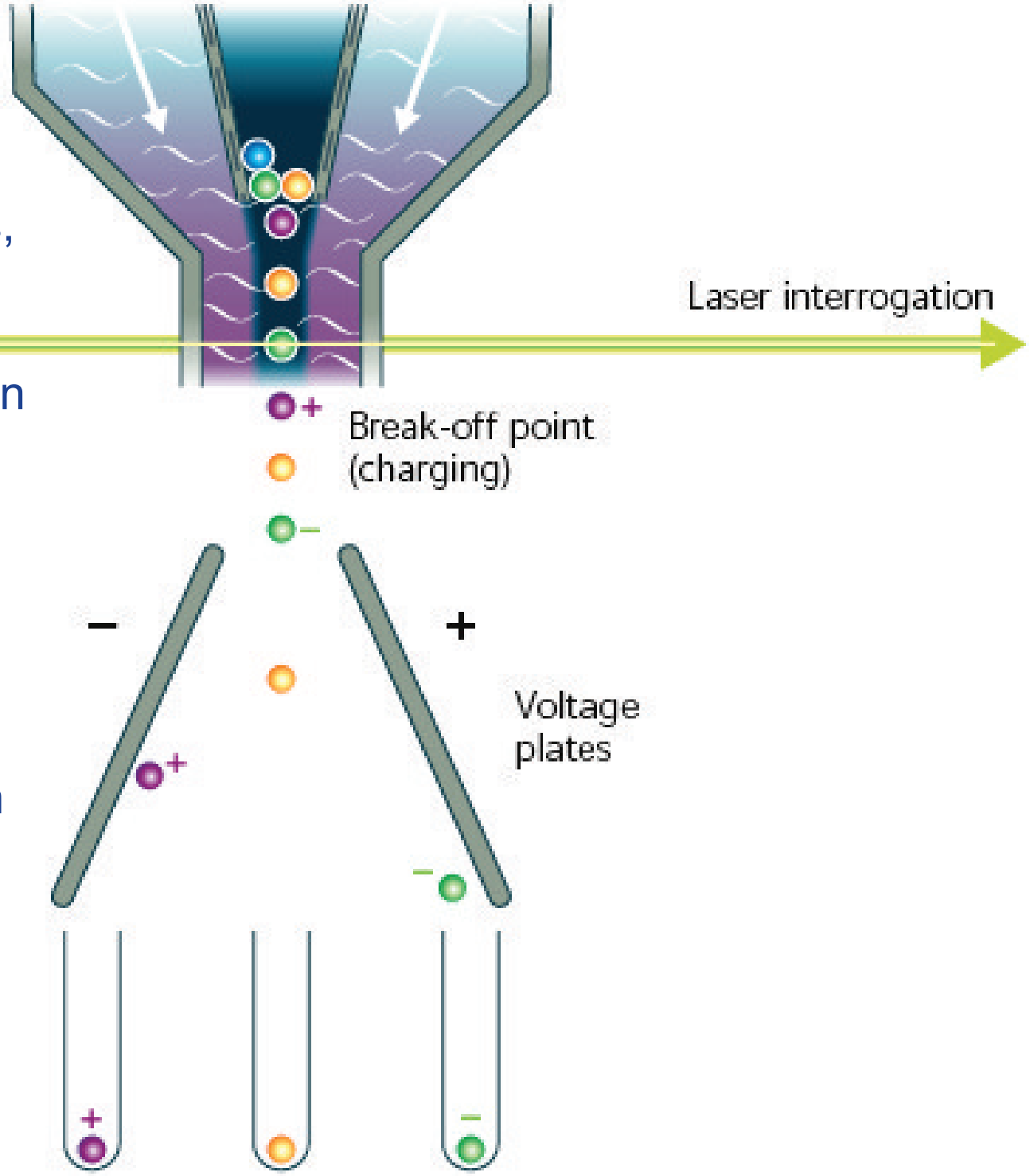
Abdcerotec.com

Electrostatic Flow Sorting

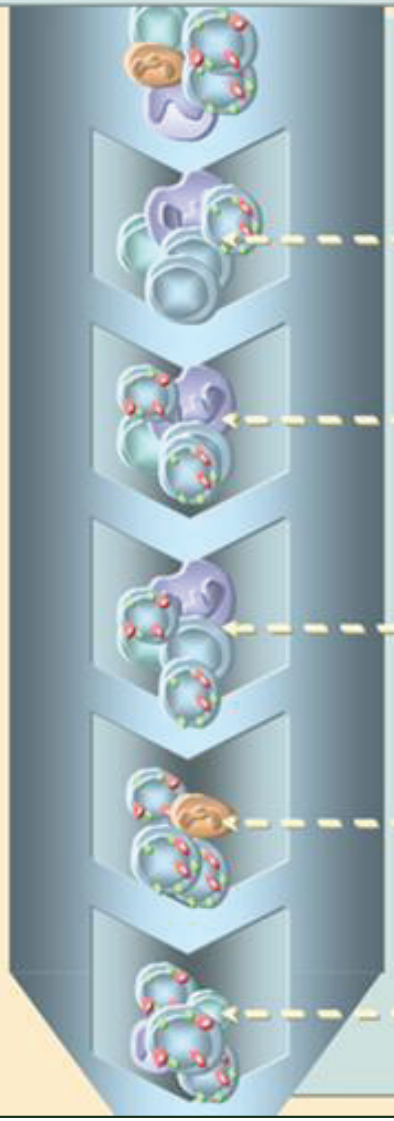
- After the cells are interrogated by the laser, vibrations separate the sample stream into droplets containing either one or zero cells, called the “break-off point”



- At the point at which the stream breaks into droplets, it passes through an electrically charged ring which charge cells based on the results detected by the cytometer's laser and detector system
- The cells then pass by charged plates which sort the cells based on the charge that they have been given



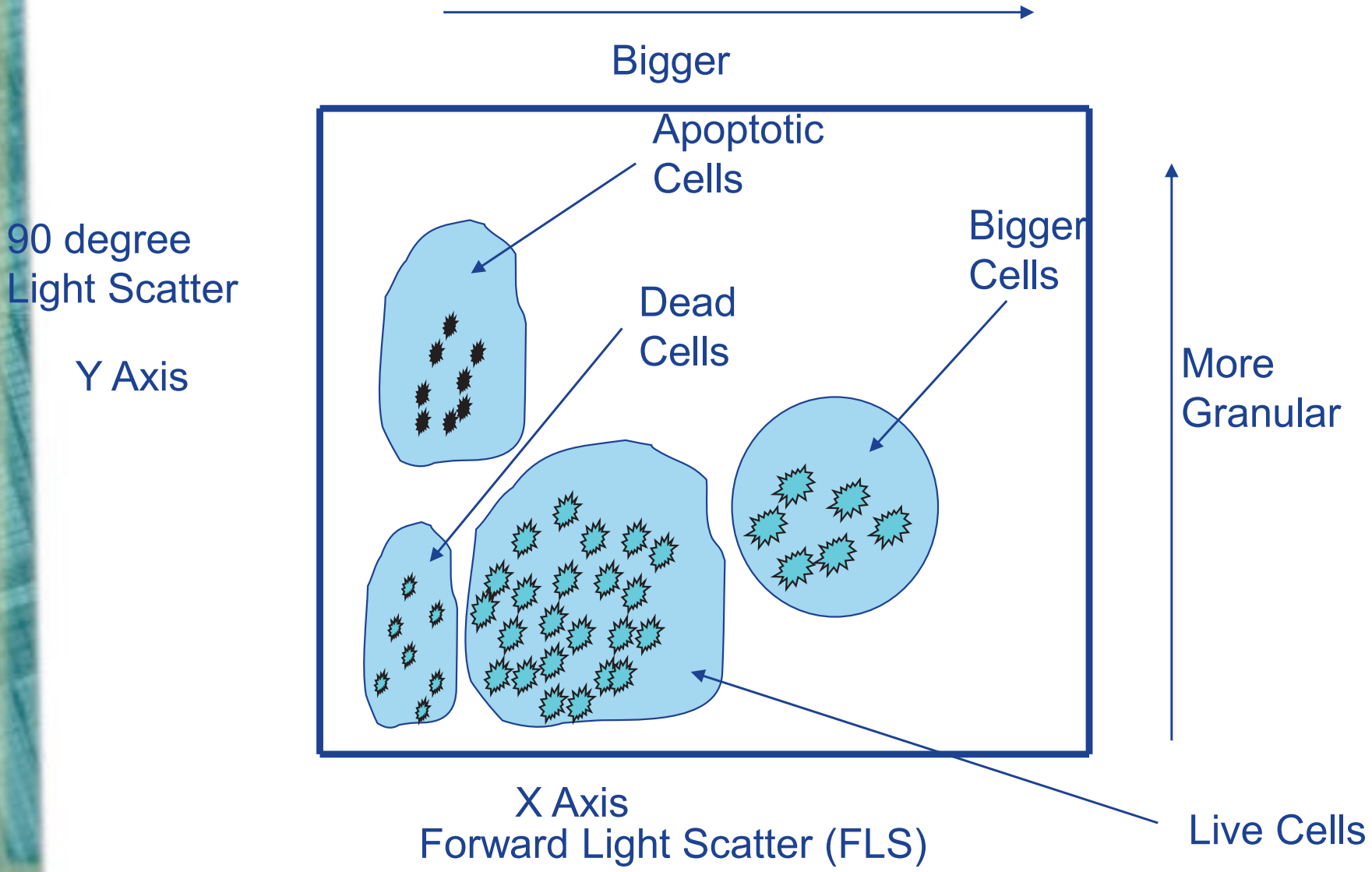
PRINCIP PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE

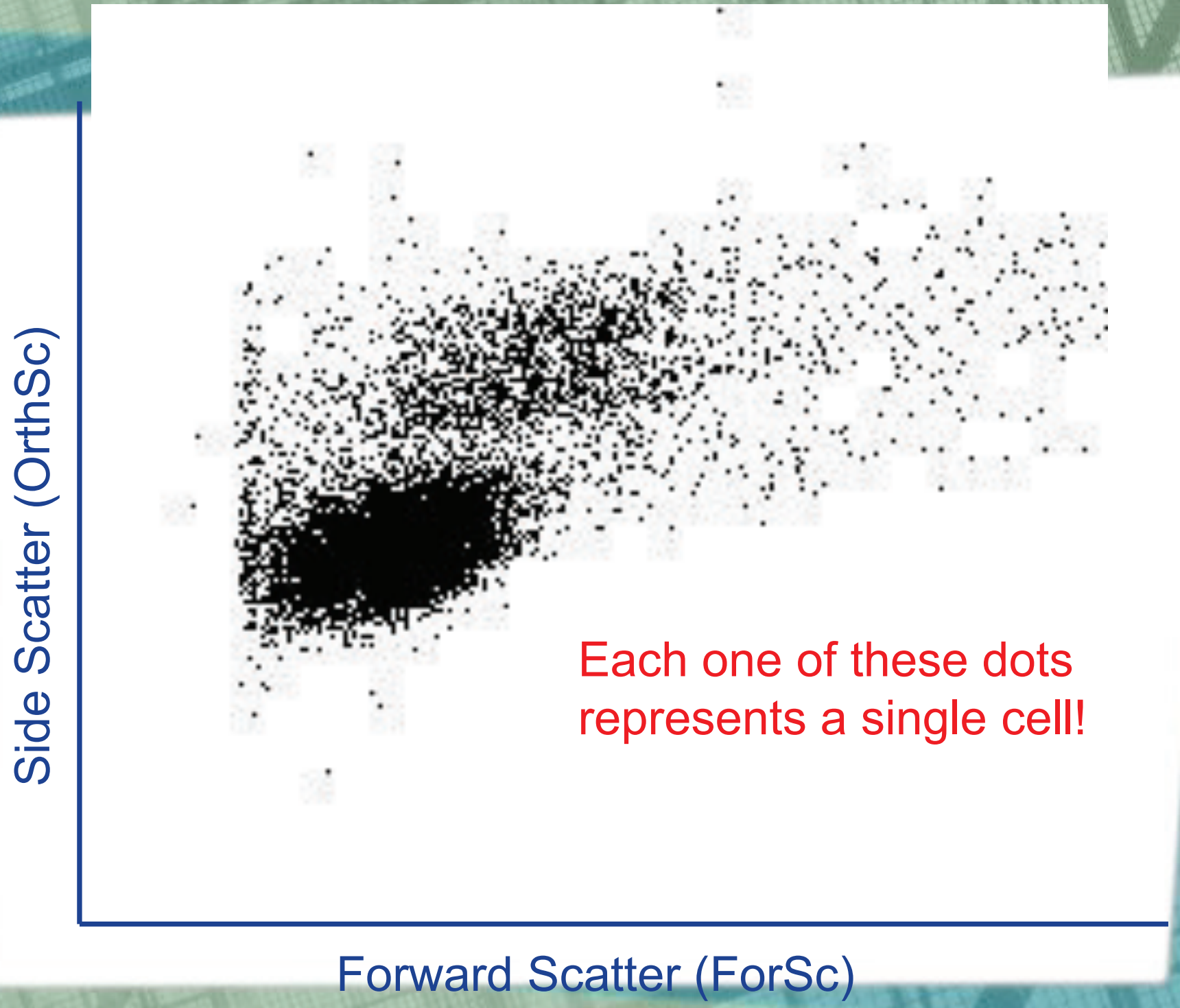


SENZORY DETEKUJÍCÍ:

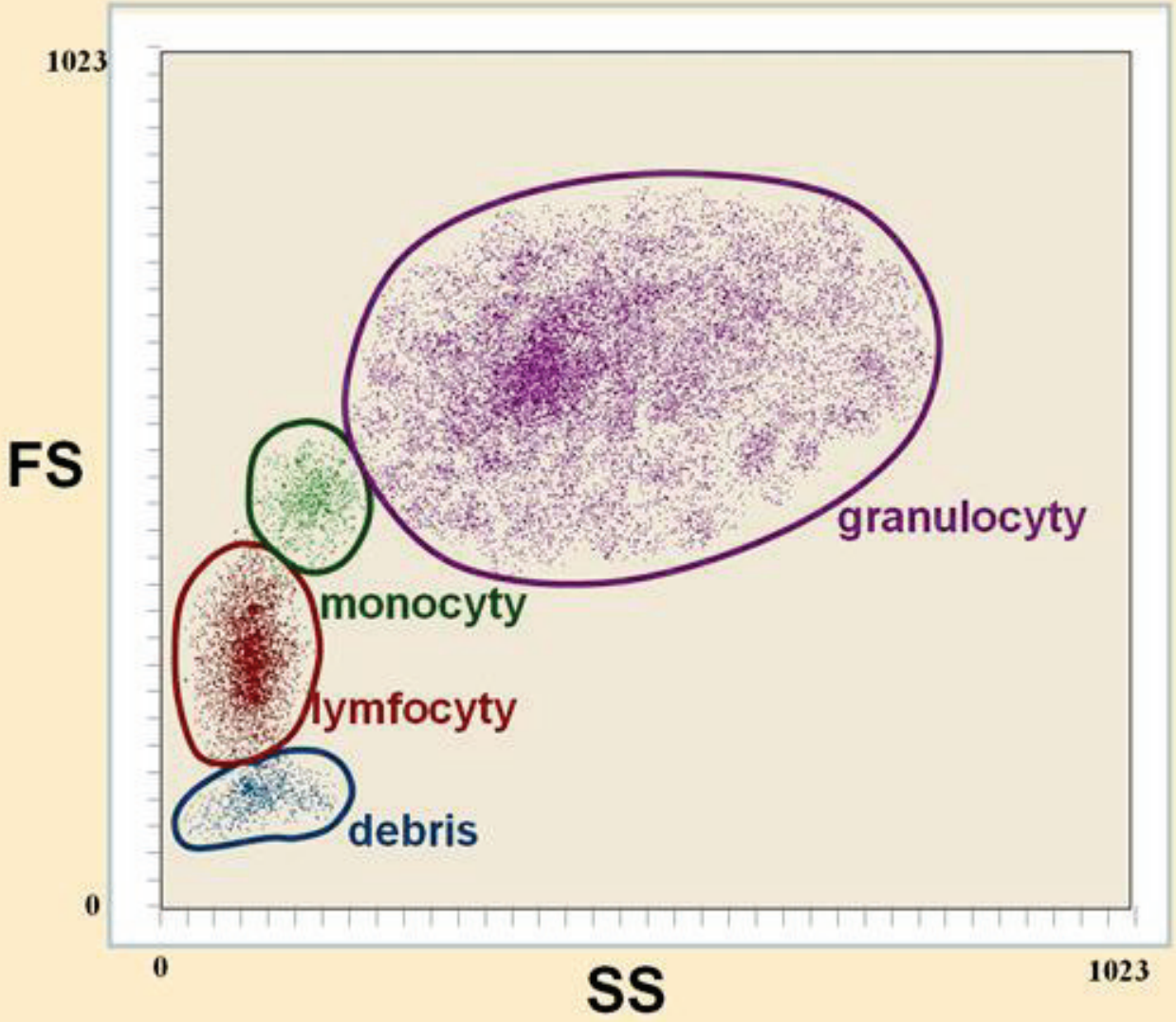
- POČET BUNĚK
- VELIKOST BUNĚK *(FS)*
- MORFOLOGII BUNĚK *(SS)*
- FL1 – ZELENOU EMISI *(FITC)*
- FL2 – ČERVENOU EMISI *(PE)*

Light Scattering, 2 Parameter Histogram




Side Scatter (OrthSc)
Each one of these dots represents a single cell!
Forward Scatter (ForSc)

TYPICKÝ SCATTERGRAM KRVE

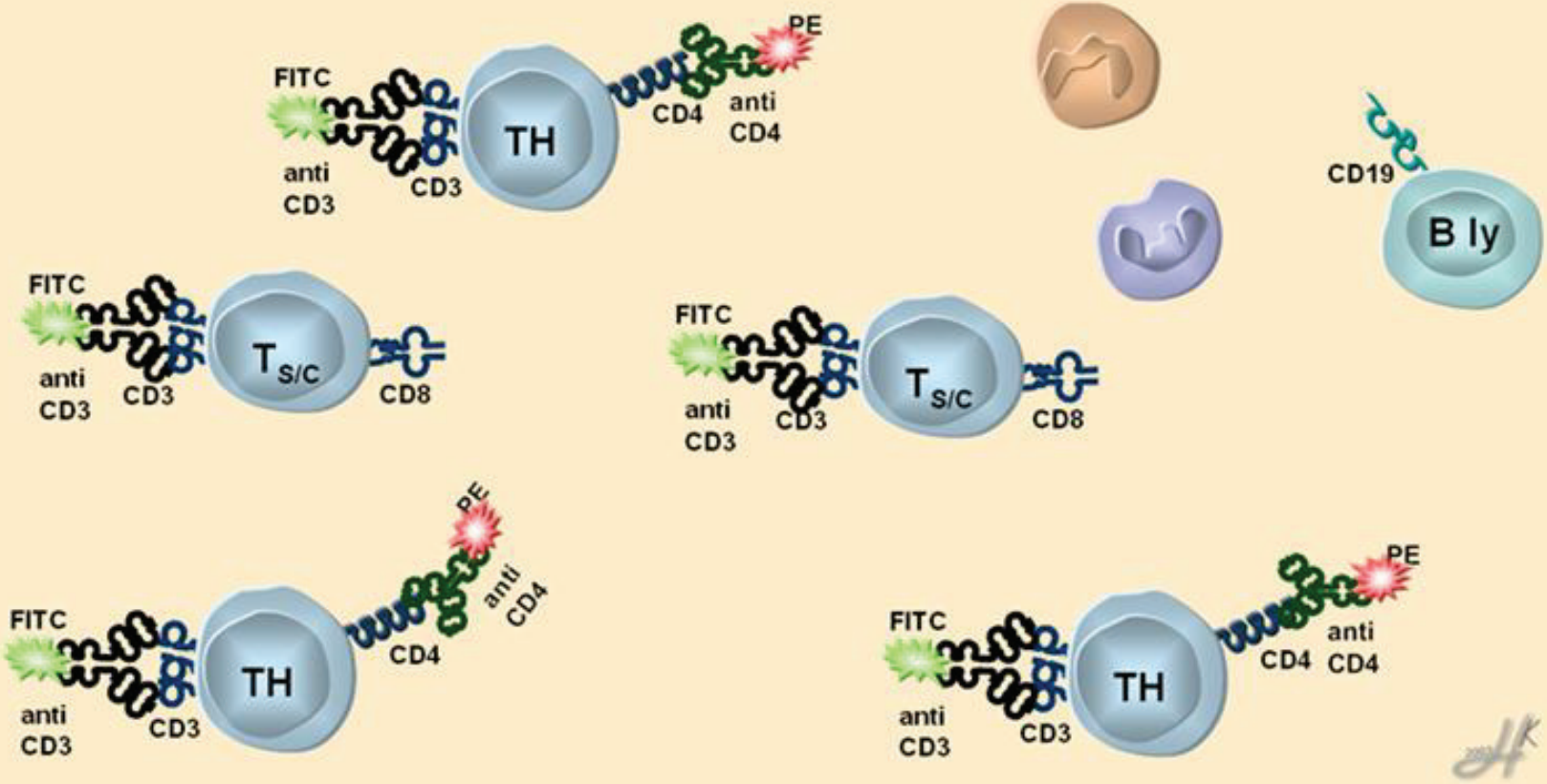


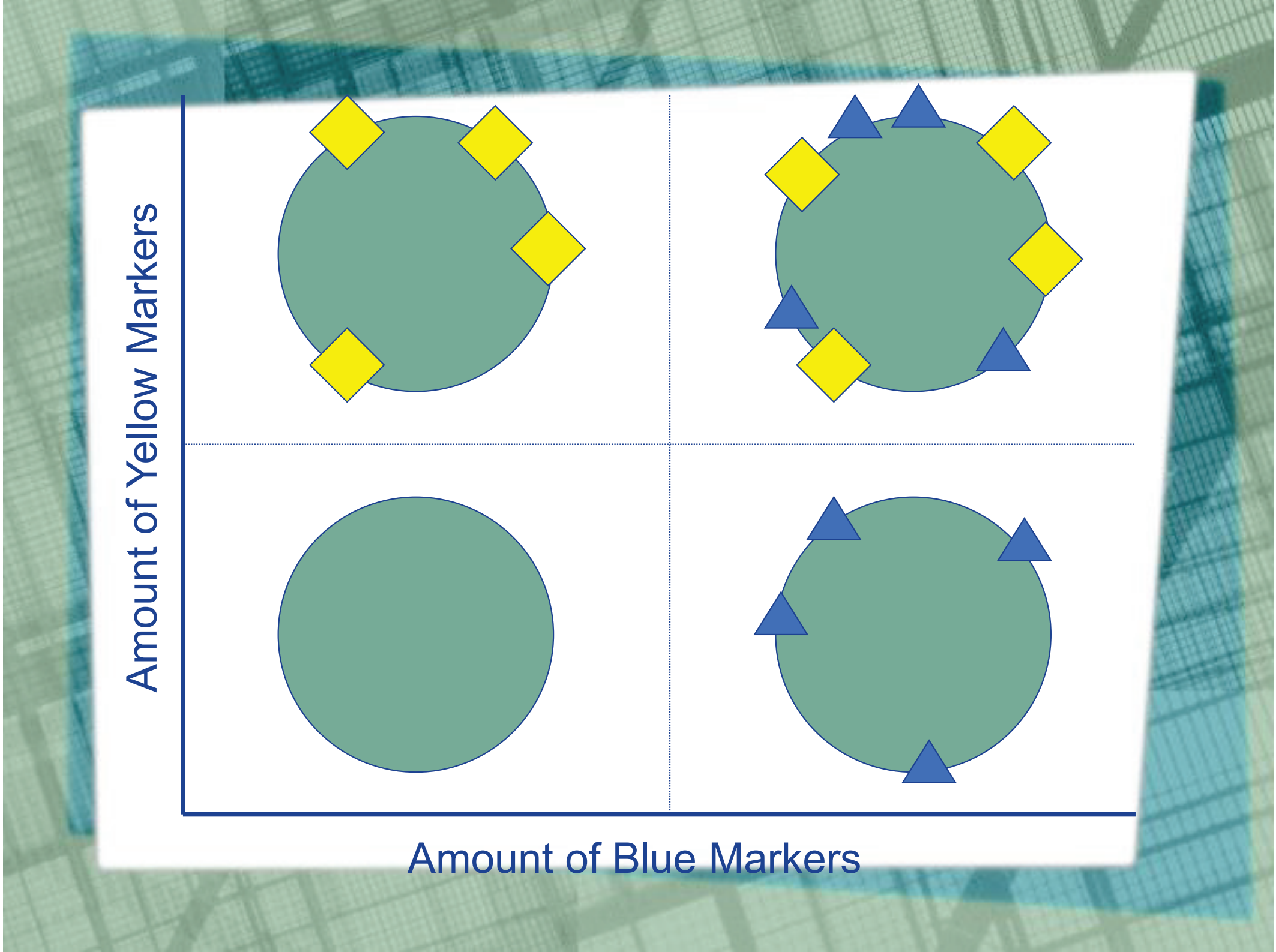
PŘÍMÁ DVOJITÁ IMUNOFLUORESCENCE V PLNÉ KRVI

1. + monoklonální protilátky anti CD3 FITC

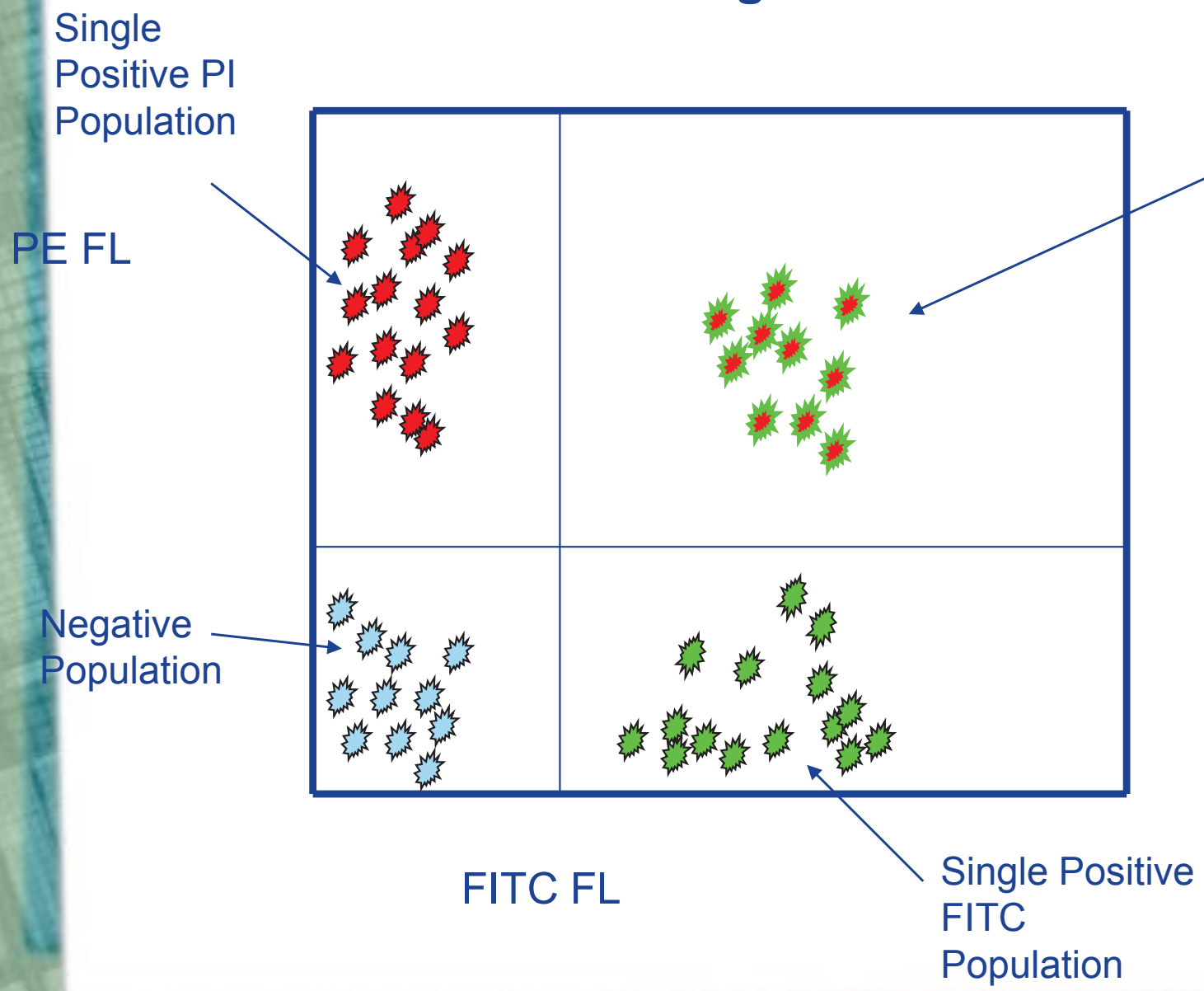
2. + monoklonální protilátky anti CD4 PE

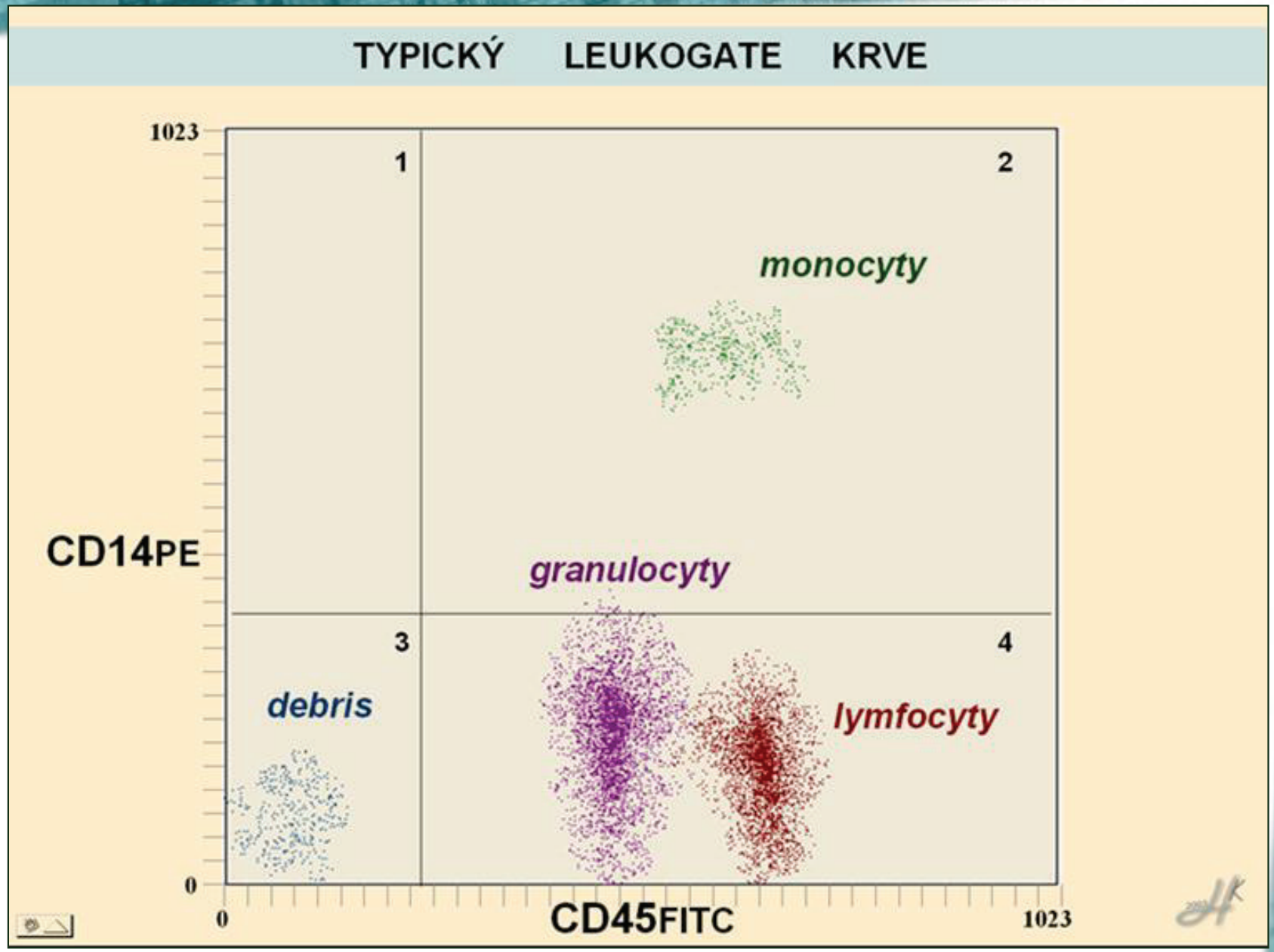
3. + lyzační roztok - hemolýza erytrocytů




Amount of Yellow Markers
Amount of Blue Markers

2 Parameter Histogram




TYPICKÝ LEUKOGATE KRVE
1023
1
2
monocyty
CD14PE
granulocyty
3
4
debris
lymfocyty
0
0
CD45FITC
1023

APLIKACE PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE

- **Určení různých populací leukocytů *(jiných buněk) a jejich separace***

- **Imunofenotypizační průkaz buněk krevních malignit**

- **Měření proliferační aktivity buněk:**
  - **měří se obsah DNA**
  - **DNA je označena látkami, které fluoreskují**
  - **Měření O2 závislých mechanismů zabíjení**

- **FAGOCYTUJÍCÍCH BUNĚK:**
  - **granulocyty *(plná krev)* jsou inkubovány s látkou, která je působením nitrobuněčných mechanismů převedena na látku fluoreskující**

další APLIKACE PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE

- stanovení buněčné ploidie (počtu sad chromozómů)
- stanovení nitrobuněčných biologicky aktivních molekul:
  - cytokinů (TH1, TH2 subsety)
  - molekul regulujících buněčný cyklus
  - molekul regulujících apoptózu
  - produktů onkogenů a antionkogenů

- mikrobiologie
- hematologie
- transfúzní lékařství
- transplantační imunologie