

Grupa.....

Wrocław,

Imiona i nazwiska studentów:

Imię i nazwisko prowadzącego:

.....

.....

.....

.....

Ćwiczenie 1

Izolacja limfocytów z krwi obwodowej, liczenie na siatce analitycznej.

Ćwiczenie obejmuje dwie części:

- (1) Prawidłowe techniki pipetowania przy użyciu pipet automatycznych;
- (2) Separację jednojądrzastych komórek krwi obwodowej oraz ocena ich żywotności

Zagadnienia: zasady funkcjonowania laboratorium, przepisy BHP, komórki immunologicznie czynne, komórki pomocnicze, metody izolacji komórek, testy czynnościowe, reakcje nadwrażliwości, metody oceny funkcji limfocytów

Zadanie 1. Przygotowanie seryjnych (geometrycznych) rozcieńczeń roztworu wzorcowego.

1. Przygotuj 6 próbek o pojemności 1,5 ml i ponumeruj od 1 do 6.
2. Do każdej dodaj 600 μ l wody destylowanej.
3. Do pierwszej próbki dodaj 400 μ l roztworu wzorcowego. Dokładnie wymieszaj. Zwiruj w wirówce tak, aby ciecz nie pozostawała na ściankach próbki.
4. Pobierz 400 μ l roztworu z próbki 1 i przenieś do próbki nr 2.
5. Analogicznie przygotuj kolejne rozcieńczenia.

Przygotowanie rozcieńczeń prostych roztworu wzorcowego.

1. Przygotuj 4 próbki o pojemności 1,5 ml i ponumeruj od 1 do 4.
2. Przygotuj roztwory zgodnie z informacjami zamieszczonymi w tabeli poniżej.

	Objętość wody [μ l]	Objętość roztworu wzorcowego [μ l]	Zakres użytej pipety
Probówka 1	500	500	
Probówka 2	900	100	
Probówka 3	990	10	
Probówka 4	999	1	

3. Zaznacz w tabeli zakres pipety użytej do przygotowania każdego z roztworów

Zadanie 2. Izolacja komórek z krwi i oznaczanie żywotności komórek.

- metoda izolacji w gradientach gęstości

Wykorzystuje różnice w wielkości i ciężarze właściwym poszczególnych komórek. Stosuje się mieszaniny rozdzielające: Ficoll (Percoll) – Isopaque (Uropolina) – [metoda Boyum’a], **Gradisol** (mieszanina Uropoliny i dekstranu) o różnej gęstości. Krew pobraną na antykoagulant i wymieszaną z PBS nawarstwia się na odpowiedni gradient i wiruje. Po wirowaniu komórki zbiera się powstałej interfazy.

- ocena żywotności izolowanych komórek

W celu oceny żywotności komórek wykorzystuje się np. roztwór błękitu trypanu (BT). Dodanie tego barwnika pozwala ocenić przepuszczalność błony komórkowej. W teście z BT martwe komórki barwią się na niebiesko. Oceniane komórki liczy się na siatce do liczenia pod mikroskopem świetlnym.

Przygotowanie:

I. Izolacja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej

1. Sprzęt i odczynniki:

- probówki plastikowe 15 ml i 50 ml
- zestaw regulowanych mikropipet 10 – 1000 μ l
- Gradisol L (FICOLL o $d = 1,077 \text{ g/cm}^3$)
- Bufor PBS

2. Materiał badany:

- krew obwodowa pobrana do probówki z antykoagulantem heparyną (min. ilość **500 μ l**)

3. Zasada metody:

Na określoną objętość gradientu gęstości nawarstwia się rozcieńczoną PBS krew obwodową. Po odwirowaniu zbiera się interfazę bogatą w komórki limfoidalne. Na dnie probówki zbierają się erytrocyty i granulocyty, które przedostały się przez warstwę Gradisolu.

4. Wykonanie:

- Pobraną na heparynę krew rozcieńczyć w probówce 50 ml roztworem PBS w stosunku 1:3.
- Do probówki 15 ml wprowadzić Gradisol L i krew zawieszoną w PBS w stosunku 1:1 (3:1) tak aby zachować granicę faz.
- Wirować probówki w ciągu **20 min**, w temperaturze **20°C**, przy **2000 obr./min**.
- Zebrać z interfazy pierścień komórek jednojądrzastych.
- Płukać dwa razy w PBS. Wirować w temperaturze **4°C** przy **200 g** (prowadzący zbierze **probówki do wirowania od całej grupy**).
- zebrać supernatant znad osadu komórkowego i zawiesić w 0,5 ml PBS.

5. Ocena i interpretacja wyników:

Ocenę izolacji limfocytów przeprowadza się pod mikroskopem świetlnym.

II. Liczenie komórek na hemacytometrze oraz określenie żywotności komórek przy pomocy błękitu trypanu.

1. Sprzęt i odczynniki:

- hemacytometr (kamera do liczenia komórek, np. Burkera lub KOVA)
- zestaw regulowanych mikropipet 10 – 1000 μ l
- probówki plastikowe 0.5ml
- mikroskop świetlny
- błękit trypanu 0,05 %

2. Materiał badany: komórki krwi obwodowej izolowane w gradiencie gęstości (z części I)

3. Zasada metody:

W wyniku barwienia błękitem trypanu komórki martwe wybarwiają się na niebiesko, do wnętrza komórek żywych barwnik nie wnika.

4. Wykonanie

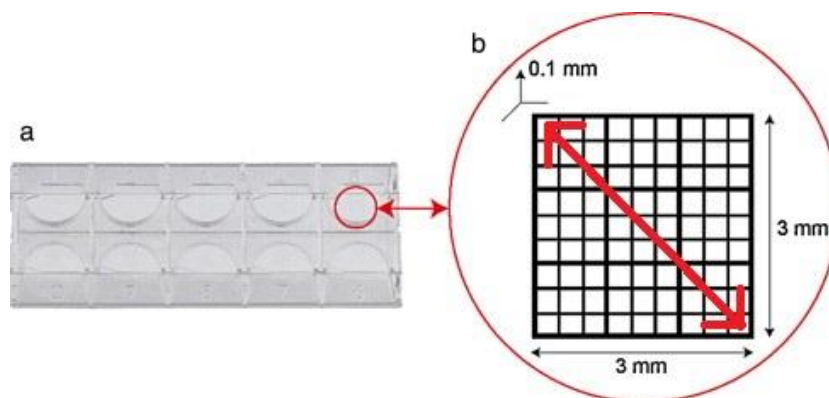
- Zmieszać 10 µl zawiesiny komórek z 10 µl 0,05 % błękitu trypanu (stosunek 1 : 1).
- Nałożyć 10 µl mieszaniny komórek i błękitu trypanu na komorę KOVA.
- Umieścić kamerę do liczenia komórek pod mikroskopem świetlnym.
- Obliczyć ilość żywych (niewybarwionych) i martwych (niebieskich) komórek zawartych na powierzchni 1 mm². Powtórzyć liczenie dla 3 – 4 różnych pól i obliczyć średnią liczbę komórek na 1 mm².

5. Ocena i interpretacja wyników:

- Przeliczyć całkowitą liczbę żywych komórek wg opisu:

Pod mikroskopem świetlnym odwróconym liczymy ilość komórek po przekątnej komory Kova (KOVA® Glasstic Slide 10 with Grid Chamber, HYCOR) w 3 dużych kwadratach (najlepiej po przekątnej), składających się z 9 mniejszych kwadratów (Rysunek 1). Uzyskane wyniki z liczenia komórek na poszczególnych kwadratach zsumowano i pomnożono przez współczynnik Kova wg wzoru poniżej. Uzyskany wynik z obliczeń to liczba komórek zawieszonych w zadanej objętości roztworu.

$$\text{Suma komórek z 3 kwadratów} \times 1,1 \times 3 \times \text{objętość zawiesiny w jakiej są komórki (N)} = \text{ilość komórek w N ml zawiesiny}$$



Rysunek 1. Płytki KOVA do liczenia komórek pod mikroskopem: a) wygląd płytki; b) schemat komory Kova.

Opracowanie wyników i zadanie

- (1) Podaj liczbę limfocytów w badanej próbce na 1ml
.....
- (2) Podaj liczbę limfocytów żywych i martwych policzonych w badanej próbce
.....
- (3) Suma komórek z 3ch dużych kwadratów to 168. Ile mam wszystkich komórek jeśli w probówce z której pobrano komórki do liczenia było 4 ml zawiesiny komórek.
.....