

Immunologia ćwiczenie nr 3

Przygotowanie rozmazów krwi obwodowej

rozmazy należy przygotować wg instrukcji osoby prowadzącej.
po wyschnięciu rozmaz utrwalić metanolem. (preparat KO)

Utrwalanie metanolem

nakropić 2-3 krople metanolu na wysuszony rozmaz (tak aby metanol pokrył całą powierzchnię). Po 2 minutach zlać ewentualny nadmiar metanolu zostawić preparat do wysuszenia

Izolowanie komórek z węzłów limfatycznych oraz grasicy

1. Pobrany narząd homogenizować w szklanym homogenizatorze w 3 ml podłoża, zawiesinę komórek przesączyć przez sitko ($100\mu\text{m}$) do probówki wirowniczej
2. zwirować 8 minut, 1500 rpm, temp. 4°C
3. zlać supernatant, komórki zwiesić w "ostatniej kropli" dodać 1 krople surowicy, wymieszać
4. przygotować rozmaz i po wyschnięciu rozmaz utrwalić metanolem

Izolowanie limfocytów ze śledziony myszy

1. wyizolować śledzionę, następnie homogenizować w szklanym homogenizatorze w 3 ml podłoża, zawiesinę komórek przesączyć przez gazę i dopełnić podłożem do objętości 6 ml
2. do probówki wirowniczej o pojemności 15 ml wlać 4ml zawiesiny komórek (pozostałe 2 ml wykorzystać do "lizy erytrocytów") i podwarstwić 3 ml gradisolu ($d=1.077\text{ g/cm}^3$). Do podwarstwienia użyć pipety pasteurowskiej.
3. wirować 20 minut, 1800 rpm, temp. pokojowa
4. po wirowaniu przy pomocy pipety zebrać komórki z interfazy (mleczna warstwa nad gradisolem) z zebranych komórek przygotować rozmaz i po wyschnięciu rozmaz utrwalić metanolem (preparat ŚI)
5. wykonać rozmaz także z komórek osadzonych na dnie probówki, po wyschnięciu rozmaz utrwalić metanolem (preparat ŚO)

Liza erytrocytów

1. 2 ml zawiesiny komórek śledziony wirować 8 minut, 1500 rpm, temp. 4°C
2. osad zawiesić w 5 ml płynu do lizy erytrocytów, inkubować 10 min w tem. pokojowej
3. zwirować 8 minut, 1500 rpm, temp. 4°C ,
4. zlać supernatant, komórki zwiesić w "ostatniej kropli" dodać 1 krople surowicy, wymieszać przygotować rozmaz i po wyschnięciu rozmaz utrwalić metanolem (preparat ŚL)