

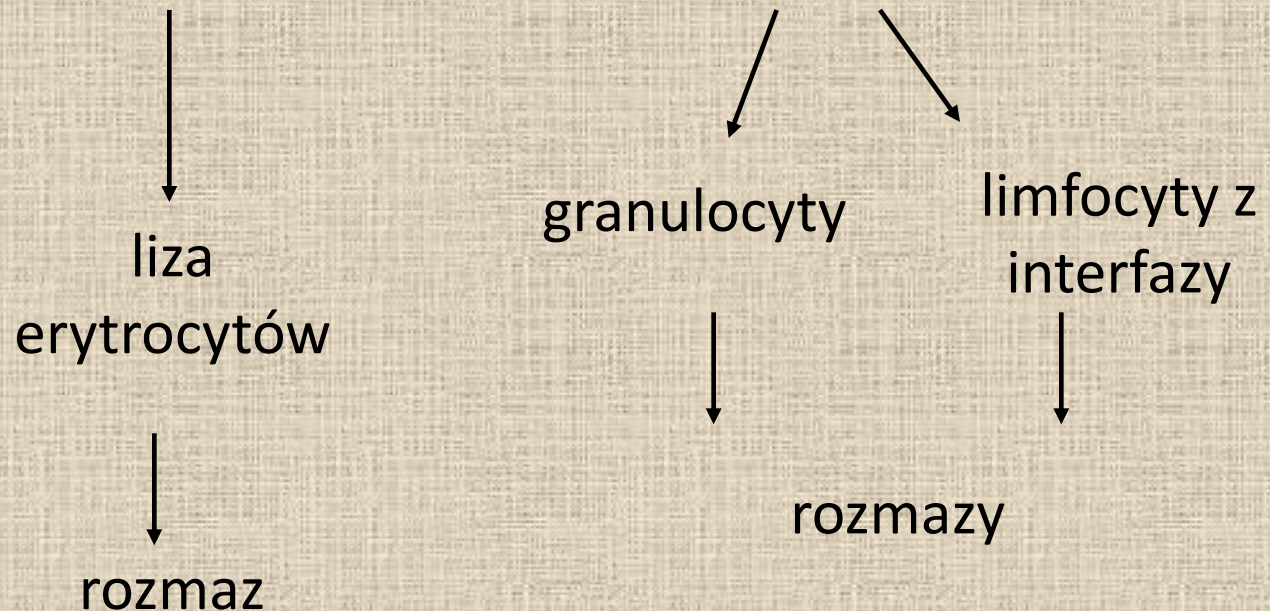
Ćwiczenie 3

Metody izolowania różnych form
morfotycznych leukocytów

Wykonywanie preparatów
z krwi, grasicy, śledziony i węzłów
chłonnych

Plan ćwiczeń:

1. Rozmaz z krwi obwodowej
2. Węzły limfatyczne i grasica: homogenizacja → rozmaz
3. Śledziona: homogenizacja → wirowanie na gradisolu



4. Utrwalanie wyschniętych rozmazów metanolem

1. Przygotowanie rozmazów krwi obwodowej

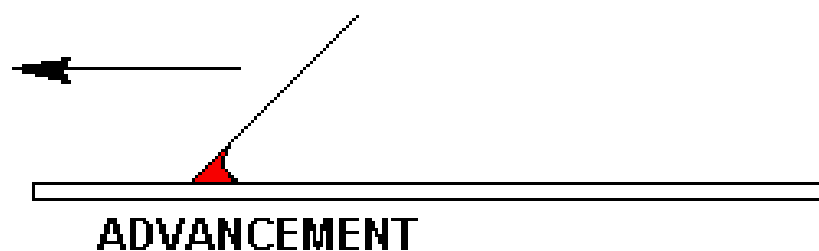
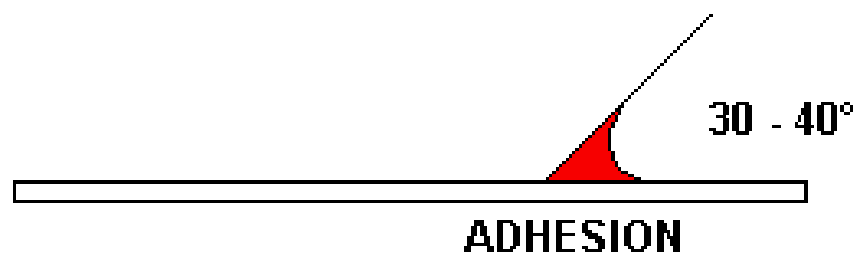
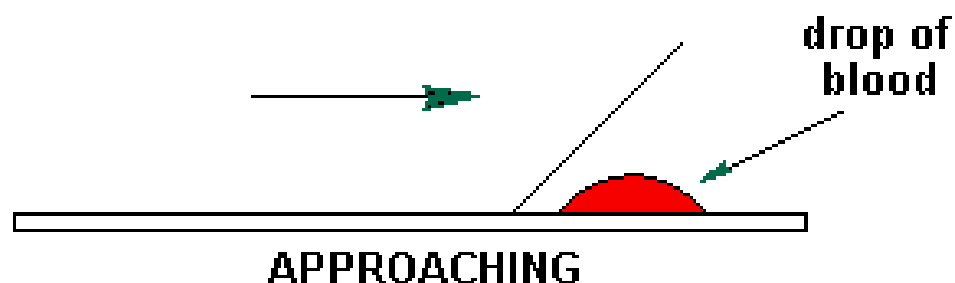
Rozmazy należy przygotować wg instrukcji osoby prowadzącej.
Po wyschnięciu rozmaz utrwalić metanolem. (preparat KO)

Uwaga: Wszystkie preparaty należy podpisywać ołówkiem

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

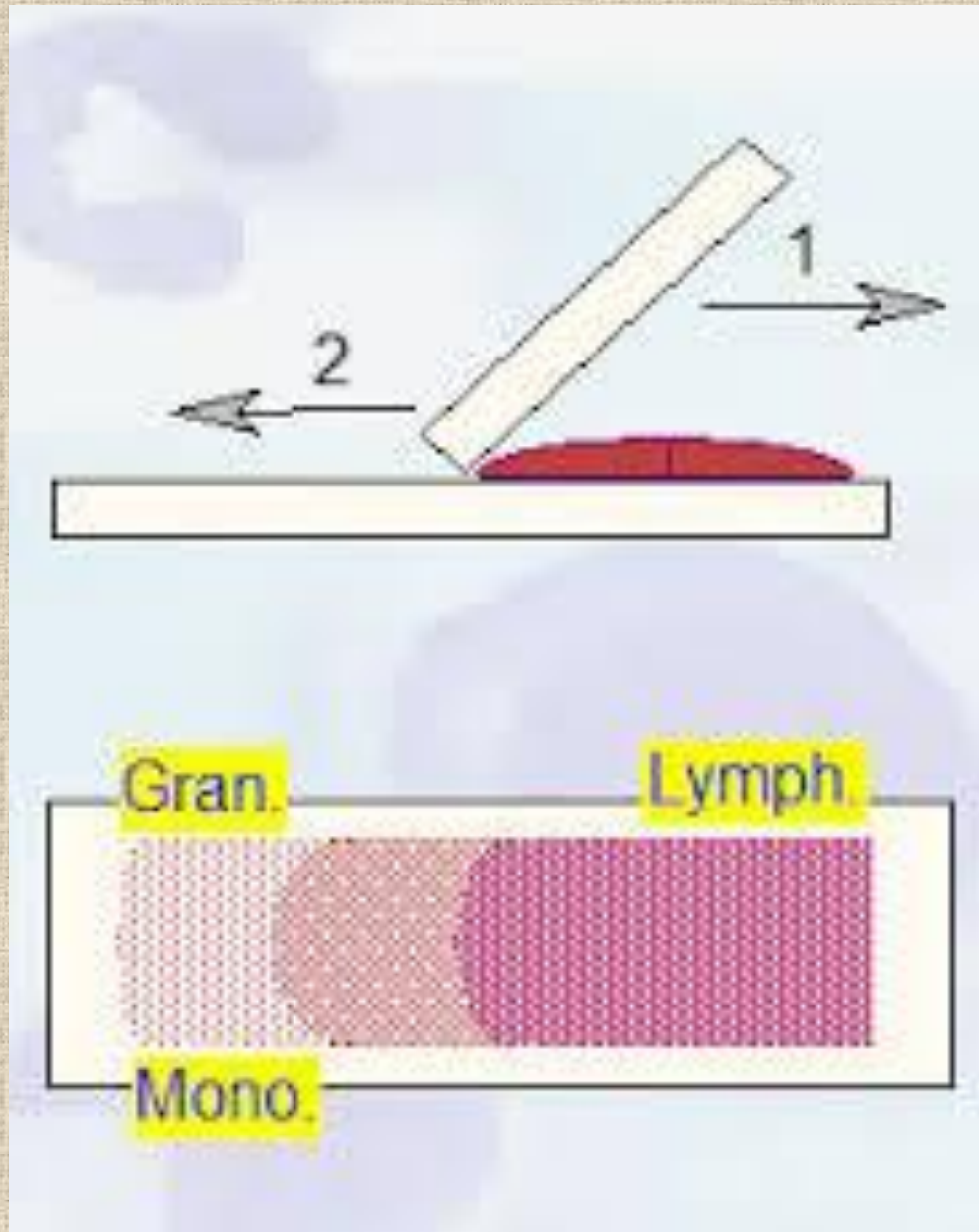
Wykonywanie rozmazów



Schemat pokazuje sposób wykonania rozmazu z krwi

Podobnie należy wykonać inne rozmazy z zawiesin komórek uzyskanych z węzłów chłonnych, grasicy i śledziony

Wykonywanie rozmazów



rozmaz z krwi

Sekcja myszy - izolowanie węzłów limfatycznych, grasicy i śledziony



2. Węzły limfatyczne i grasica: homogenizacja → rozmazy



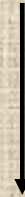
- homogenizować w 3 ml podłoża, przesączyć przez sitko (100mm)
- zwirować 8 minut, 1500 rpm, temp. 4°C,
- zlać supernatant,
- komórki zawiesić w ostatniej kropli
- dodać 1 kroplę surowicy, wymieszać
- zrobić rozmazy (podpisać preparaty - W i G)
- po wysuszeniu utrwalić metanolem

3. Śledziona: homogenizacja - wirowanie na gradisolu - liza erytrocytów

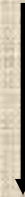


-homogenizować w 3 ml
podłoża, przesączyć przez sitko
(100mm)

- dopełnić podłożem do 6 ml

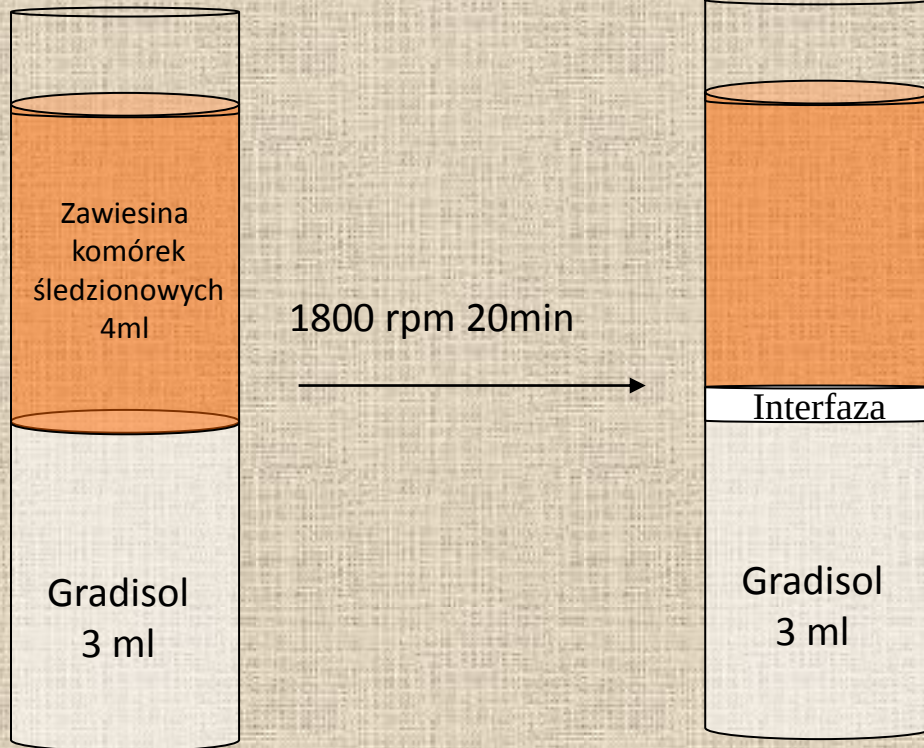


4ml do
wirowania
na gradisolu



2ml do lizy
erytrocytów

Izolowanie limfocytów poprzez wirowanie na gradisolu (homogenat ze śledziony)



- 4ml zawiesiny komórek podwarstwić 3 ml gradisolu ($d=1.077 \text{ g/cm}^3$) za pomocą pipety pasteurowskiej.

- wirować 20 minut, 1800 rpm,

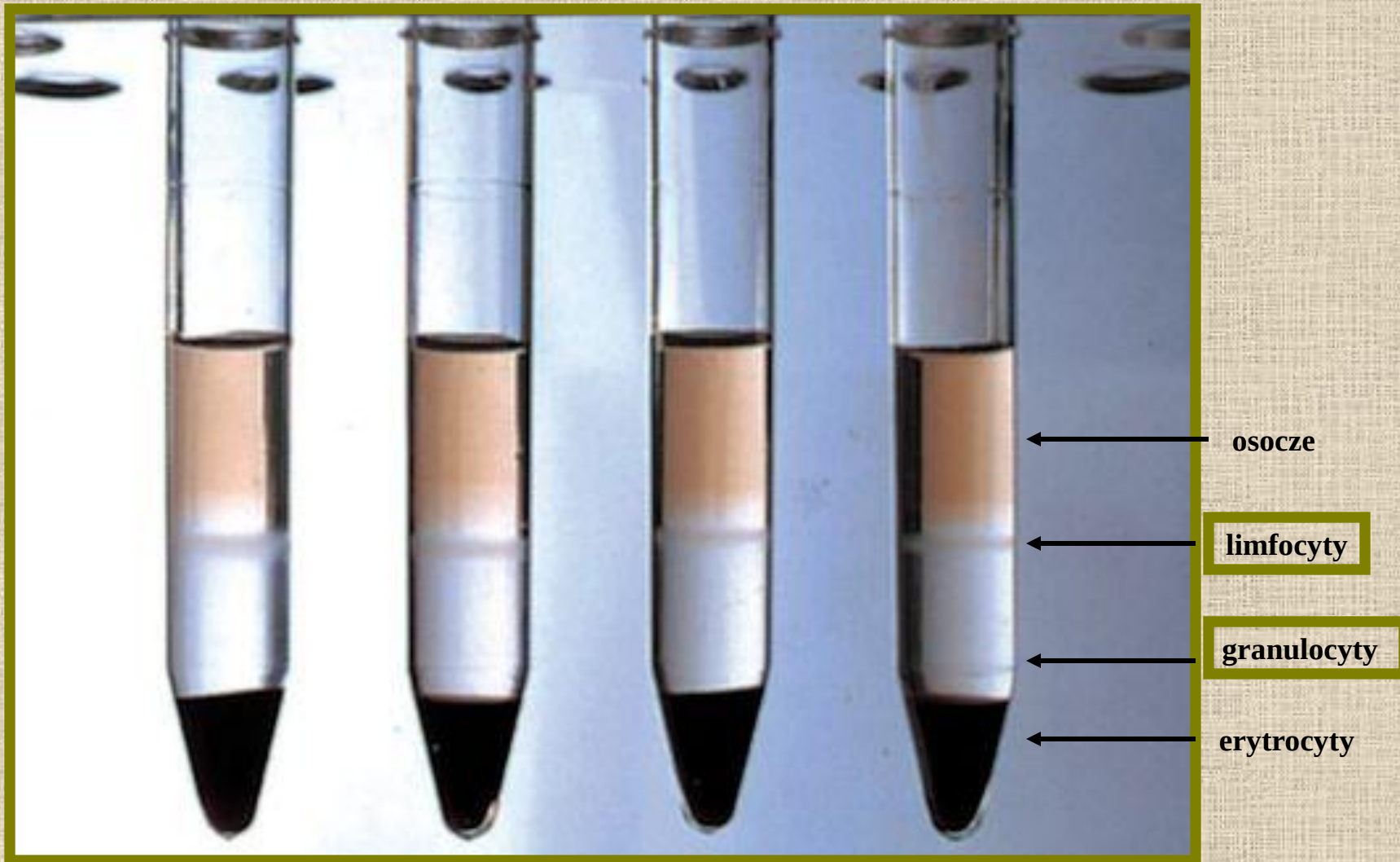
- przy pomocy pipety zebrać komórki z interfazy (mleczna warstwa nad gradisolem)

- z zebranych komórek przygotować rozmaz (preparat L)

- wykonać rozmaz także z komórek osadzonych na dnie probówki (preparat O)

- po wyschnięciu utrwalić metanolem

Izolowanie komórek poprzez wirowanie na gradisolu



Homogenat ze śledziony - liza erytrocytów

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