

Immunologia ćwiczenie nr 4

Izolowanie makrofagów z płynu otrzewnowego myszy

A. Pobieranie płynu otrzewnowego

1. 10 ml podłoża wstrzyknąć do jamy otrzewnowej martwej myszy
2. masować powłoki brzucha przez ok. 1 min
3. pobrać płyn z otrzewnej do probówki polipropylenowej (nie jest całkiem przezroczysta)
4. zwirować 1200 obr/min, 10 min, 4°C
5. osad zawiesić w 1 ml podłoża hodowlanego
6. zmieszać 1 kroplę zawiesiny makrofagów z 1 kroplą surowicy i przygotować rozmaz, po wyschnięciu rozmaz utrwalić metanolem. (preparat O)

B. Izolowanie makrofagów z wykorzystaniem ich zdolności przylegania do powierzchni szklanych i plastikowych

1. nałożyć 0,2 ml zawiesiny komórek otrzewnowych, tak żeby zawiesina wypełniła wnętrze parafinowego kółka na szkiełku podstawowym.
2. inkubować 60 minut w 37°C, w atmosferze 5% dwutlenku węgla
3. po inkubacji odpłukać nieprzylegające komórki kilkakrotnie nakraplając i zlewając PBS
4. wysuszyć preparat, po wyschnięciu rozmaz utrwalić metanolem. (preparat MO)

C. Usuwanie makrofagów z wykorzystaniem ich właściwości żernych.

1. 0,5 ml zawiesiny komórek z płynu otrzewnowego w podłożu hodowlanym przenieść do prądownika dodać 4 mg pudru żelaza, zawartość probówki wymieszać
2. inkubować 45 minut w temp. 37°C, mieszając w czasie inkubacji zawartość probówki
3. komórki żerne wyizolować z zawiesiny przy pomocy magnesu- wg instrukcji osoby prowadzącej.

Barwienie metodą Pappenheima

Przygotowane i utrwalone na poprzednich ćwiczeniach preparaty należy zabarwić metodą Pappenheima. Po wysuszeniu ocenić morfologię komórek pod mikroskopem.

1. na suchy preparat nakropić bufor Giemzy, zlać bufor po upływie 5 min.
2. nakropić na 5 min świeżo rozcieńczony w buforze Giemzy (w stosunku 1:1) barwnik May-Grunwalda
3. odpłukać preparat kilkakrotnie nakraplając bufor Giemsy i zlewając go, osuszyć preparat opierając dłuższą krawędź szkiełka na bibule
4. nakropić barwnik Giemsy na 15 min
5. odpłukać preparat nakraplając bufor Giemsy i zlewając go
6. wysuszyć preparat przed oglądaniem pod mikroskopem

