

Znakowanie markerów powierzchniowych

Wstęp teoretyczny

1. Metody identyfikacji komórek układu odpornościowego
2. Rozróżnianie komórek metodą cytometrii przepływowej
3. Zastosowania cytometru przepływowego w badaniach laboratoryjnych i klinicznych (oznaczanie markerów powierzchniowych, apoptoza, cykl komórkowy, wskaźniki aktywacji komórek, proliferacja, sortowanie komórek, obecność białek wewnątrzkomórkowych, metody ilościowe oznaczania cytokin, przeciwciał)

I. Izolowanie leukocytów z narządów limfatycznych

Materiały:

- PBS (buforowany roztwór soli fizjologicznej, pH 7.2)
- bufor do lizowania erytrocytów
- 70% etanol
- narzędzia chirurgiczne (nożyczki, pęsety)
- wata, lignina, ręcznik papierowy
- szalki Petriego (60 x 15 mm)
- homogenizatory szklane
- probówki stożkowe (15 ml)
- pipety pasteurowskie
- komora Burkera
- płyn Turka
- roztwór błękitu trypanu (0.4% roztwór w H₂O, w/v)

Procedura

1. Mysz zabić przez przerwanie rdzenia kręgowego lub za pomocą CO₂, położyć na stoliku preparacyjnym i przemyć etanolem.
Uwaga! Preparatyka narządów i komórek powinna być wykonywana w temperaturze 4°C. Przed rozpoczęciem pracy należy przygotować łaźnię lodową.
2. Wypreparować grasicę, śledzionę i węzły chłonne i umieścić je w PBS na szalce Petriego.
3. Poszczególne narządy limfatyczne przenieść do szklanego homogenizatora i zhomogenizować w 5 ml PBS, zawiesinę komórek przesączyć przez gazę w celu usunięcia fragmentów tkanek.
4. Zawiesiny komórek przenieść do probówek stożkowych i odwirować, 1700 rpm, 8 minut, temp. 4°C.

5. Policzyc komórki w zawiesinach posługując się komorą Burkera.
6. Określić żywotność komórek w zawiesinach za pomocą barwienia błękitem trypanu.
7. Erytrocyty znajdujące się w zawiesinie komórek wyizolowanych ze śledziony usunąć poprzez dodanie do osadu komórek buforu do lizowania erytrocytów. Bufor lizujący erytrocyty dodawać podczas mieszania osadu komórek. Żywotność leukocytów po zlizowaniu erytrocytów nie powinna ulec zmianie.

II. Znakowanie markerów powierzchniowych przeciwciałami monoklonalnymi

Materiały

- bufor do znakowania markerów (0.5% roztwór BSA w PBS zawierający 0.05% NaN_3)
- przeciwciała monoklonalne sprzężone z fluorochromami
- probówki do FACSu
- płyn do utrwalania wyznakowanych komórek (1% roztwór formaliny w H_2O lub PBS)

Uwaga! Znakowanie markerów powierzchniowych wykonywać w temperaturze 4°C.

Procedura

1. Przygotować zawiesiny leukocytów w buforze do znakowania markerów. Gęstość zawiesin: $1 \times 10^6/\text{ml}$, czyli w 50 μl zawiesiny znajduje się 1 mln komórek.
2. Do probówek do FACSu dodać po 50 μl zawiesiny komórek. Do komórek dodać odpowiednie przeciwciała monoklonalne sprzężone z fluorochromami. Pamiętać o kontroli:
 - kontrola negatywna
 - kontrola izotypowa
 - znakowanie pojedyncze w przypadku znakowania kilku markerów jednocześnie.
3. Komórki inkubować z przeciwciałami w temp. 4°C, 30 minut, w ciemności.
4. Po inkubacji komórki płukać 3-krotnie buforem do znakowania (wirowanie: 1800 rpm, 8 minut, temp. 4°C)
5. Komórki zawiesić w 0.5 ml 1% roztworze formaliny (w przypadku przechowywania do 7 dni), lub PBS w przypadku natychmiastowej analizy w cytometrze przepływowym.

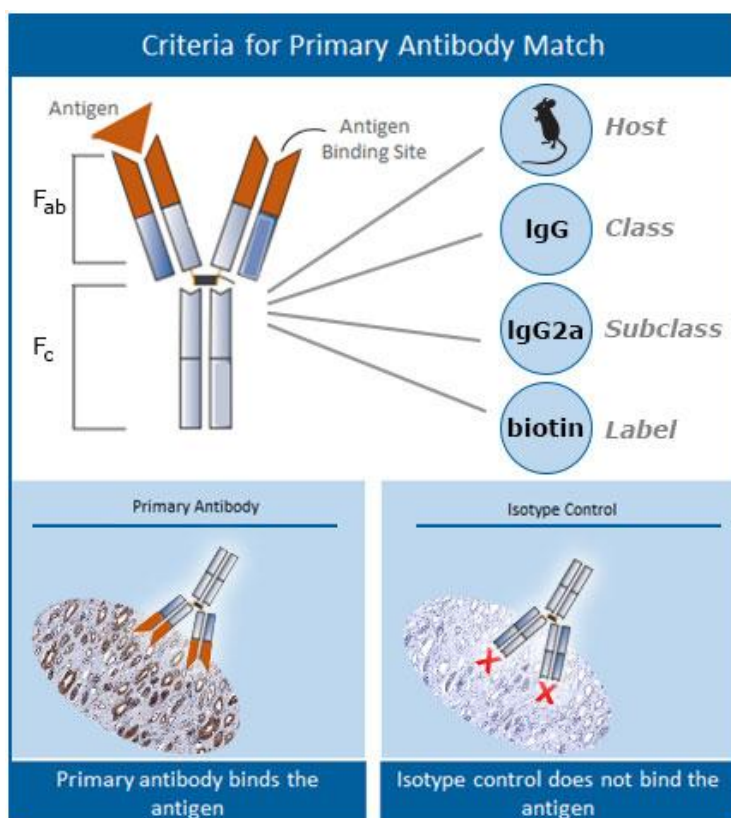
	grasica	śledziona	węzły chłonne
Kontrola negatywna			
Kontrola izotypowa *			
Kontrola pojedyncza a-CD3			
Kontrola pojedyncza a-CD4			
Kontrola pojedyncza a-CD8			
a-CD3/a-CD4/a-CD25			
a-CD3/a-CD19			
a-CD4/a-CD8/a-CD3			
a-CD4/a-CD8/a-CD25			

Kontrola izotypowa * -

jest przeciwciałem, które zachowuje podobne właściwości do pierwotnego przeciwciała, ale nie ma specyficznego wiązania z celem. Ta kontrola negatywna stosowana jest zamiast pierwotnego przeciwciała, dzięki czemu pomaga określić udział niespecyficznego tła w barwieniu.

Kontrolę izotypową powinny ściśle pasować do właściwości pierwszorzędnego przeciwciała i być stosowane w identycznych warunkach eksperymentalnych, aby jak najlepiej określić obecność i zakres wiązania niespecyficznego.

Kontrolę izotypową powinny pochodzić od tego samego gatunku gospodarza, klasy i podklasy (izotyp), mieć ten sam stosowany fluorochrom oraz być stosowane w tym samym stężeniu, co przeciwciało pierwotne.



<https://www.novusbio.com/products/isotype-controls>

Rozkład populacji limfocytów w poszczególnych narządach limfatycznych

	% limfocytów T	% limfocytów B
Grasica	97	0,1
Węzły chłonne	77	18
Śledziona/spleen	35	38
Krew	70	24
Przewód piersiowy	80	19

