

Protocolo de extracción de PBMCs por densidad con iodioxanol

Lily Johanna Toro, Germán Alberto Téllez Ramírez, Diana Carolina Henao, Jhon Carlos Castaño Osorio

Abstract

Procedimiento basado en la sedimentación a través de una barrera de densidad de 1,077g/ml dejando en la interfase los PBMCs.

Citation: Lily Johanna Toro, Germán Alberto Téllez Ramírez, Diana Carolina Henao, Jhon Carlos Castaño Osorio Protocolo de extracción de PBMCs por densidad con iodioxanol . **protocols.io**

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.jxecpje

Published: 20 Sep 2017

Guidelines

Para aislar Celulas Mononucleares de Sangre Periferica (PBMCs), extraer 4 mL de sangre de una persona voluntaria sana. Bajar la densidad de la sangre y sedimentar por centrifugación en una barrea de densidad a 1.077g/mL. La interfase que contiene los PBMCs se extrae y se diluye en solución A 1:1 y se centrifuga a 150 g por 10 minutos; el pellet celular es resuspendido en medio de cultivo (RPMI 1640, Antibiotic antimycotic 1X).

Las células son cultivadas por 12 horas antes del ensayo a 37 °C y 5 %CO₂.

Before start

Prepare la solución A con materiales libres de LPS.

Quite el freno de la centrifuga y organice el programa con el que va a trabajar (700 g - 20 minutos - temperatura ambiente - SIN FRENO).

Protocol

Preparación de Soluciones

Step 1.

Sln A: Optiprep: iodixanol 60% = 1,32g/mL (agitar gentilmente antes de usar)

Sln B: Hepes buffer salino= NaCL 0,85% p/v, Hepes 10mM – NaOH pH7,4.

Para 50mL: pesar 0,425g de NaCl y 0,119g de Hepes diluir hasta 45mL y ajustar pH a 7,4 con NaOH (aprox 20-25µl 5M). Llevar a 50ml y filtrar por 0.22µm.

Barrera con densidad: 1,077g/mL = 5 Vlns Sln A + 17 Vlns Sln B

$$1,077\text{g/mL} = 2,5\text{mL Sln A} + 8,5\text{mL Sln B} = 11\text{mL}$$

Medio de cultivo: 20 mL de medio RPMI 1640 con antibiótico antimicótico 1X.



REAGENTS

RPMI 1640 Medium [11875093](#) by [Thermo Fisher Scientific](#)

Optiprep (Iodixanol) [D1556-250ML](#) by [Sigma Aldrich](#)

✓ 10 mM HEPES (pH 7.5) by Contributed by users

✓ 0.1 M NaOH by Contributed by users

NaCl [53014](#) by [Sigma Aldrich](#)

NOTES

Lily Johanna Toro 18 Sep 2017

A partir de 6mL de sangre se obtienen aproximadamente 8 millones de PBMCs.

Procedimiento

Step 2.

- Tomar sangre de un paciente saludable con EDTA (1,5-2mM EDTA) y hacer una dilución 1:1 en Sln B (Ej: para 3mL de sangre, adicionar 3mL de Sln B).
- Adicionar 3 mL de la barrera de densidad (1,077g/mL) en un tubo de 15mL limpio y encima (muy lentamente) adicionar 6mL de la muestra diluida.
- Centrifugar a 700g por 20 min. (temperatura ambiente y **SIN FRENO**)
- Tomar la interfase mediante punción del tubo de 15mL con una jeringa de 21G con el bisel mirando hacia arriba, o por pipeteo con pipeta pasteur (Ver figura 1).

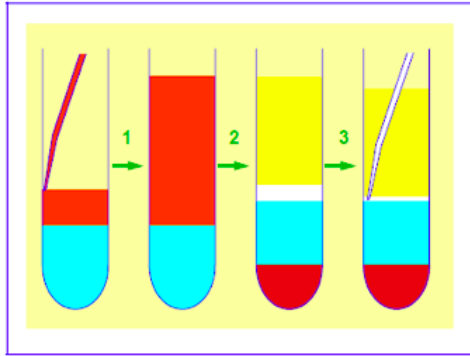


Figure 1: Isolation of PBMCs: diluted blood layered on top of iodixanol (1); after centrifugation at 700g for 20 min mononuclear cells band at interface (2) and are harvested using a pipette (3)

- Diluir las células colectadas a una relación 1:1 con SIn B.
- (Opcional para remover exceso de plaquetas): Centrifugar a 150g por 10 min temp ambiente, tomar el pellet y resuspenderlo en 2mL aproximadamente de RPMI con antibiótico 1X.
- Para la cuantificación de los PBMCs en la cámara de Neubauer, hacer una dilución 1:16 con medio de cultivo y al final con azul tripan (Ej: 10µL de RPMI + 10µL de PBMCs= 20µL (1:2) de estos 10µL de RPMI + 10µL (1:2)= 20µL (1:4) de estos 10µL de RPMI + 10µL (1:4)= 20µL (1:8) de estos 10µL de azul tripan + 10µL de (1:8)= 20µL 1:16 tomar 10µL y leer en cámara).

$\text{Células/mL} = (\text{total células contadas}/4) * 10000 * \text{factor de dilución}$

$\text{Células/mL} = (\text{total células contadas}/4) * 10000 * 16.$

- Sembrar 200.000-250.000 PBMCs (células/pozo) en placa de 96 pozos. o en cajas de cultivo T25 o T75.

Warnings

Tener especial cuidado en la manipulación de la sangre (doble guante, tapabocas y gafas de protección).