

# Aislamiento de leucocitos polimorfonucleares (granulocitos)

German Alberto, Lily Johanna Toro, Diana Carolina Henao

## Abstract

Se realiza la extracción de la fracción rica en leucocitos a partir de sangre total usando la sedimentación de los eritrocitos en una solución con carboximetil celulosa e iodoxanol al 12%. La extracción de los PMNs a partir de dicha fracción en un gradiente discontinuo de densidad de 1,077- 1,095 g/ml. Basado en el protocolo de la empresa Axis-shield application sheet C11 usando optiprep (iodioxanol 60%). (isolation of human polymorphonuclear leukocytes (granulocytes) from a leukocyte rich plasma in a discontinuous iodoxanol gradient).

La realización de este protocolo fue posible gracias al apoyo del departamento administrativo de ciencia tecnología e innovación, Colciencias a través del proyecto 111356933173 convocatoria569-2012.

**Citation:** German Alberto, Lily Johanna Toro, Diana Carolina Henao Aislamiento de leucocitos polimorfonucleares (granulocitos). **protocols.io**

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

**Published:** 15 Nov 2017

## Guidelines

La purificación de PMNs se basa en la extracción de la fracción leucoplaquetaria y posterior extracción de los PMNs en un gradiente discontinuo de densidades de 1.095gr/mL y 1.077gr/mL.

## Before start

La preparación de los reactivos se debe hacer por lo menos con un día de anterioridad, principalmente porque la carboximetil celulosa demora mucho tiempo para diluirse.

## Materials

Sodium Hydroxide BP359500 by [Fisher Scientific](#)

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

1kg EDTA, Disodium Salt (Ethylenediaminetetraacetic acid, disodium dihydrate) [RC-048](#) by [G-Biosciences](#)

1kg Sodium Chloride [RC-094](#) by [G-Biosciences](#)  
250g HEPES, Free Acid [RC-121](#) by [G-Biosciences](#)  
RPMI 1640 Medium [11875093](#) by [Thermo Fisher Scientific](#)

## Protocol

### Preparación de reactivos

#### Step 1.

1. Optiprep (mezclar gentilmente antes de usar) (iodixanol 60% en agua, densidad 1,320 gr/ml +/- 0,001, 170 +/- 15 mOsm).
2. Soluciones Stock:
  - NaCl 8,5% p/v (0,85gr/10ml)
  - EDTA 100mM (0,372gr/10ml)
  - HEPES 100mM (0,238gr/10ml)
  - NaOH 1M (1,999gr/50ml)
  - Optiprep 40% v/v (densidad 1,215gr/ml) (tomar 4 volúmenes de optiprep 60%, y adicionar 2 volúmenes de diluyente 1)
1. Diluyente1 = NaCl 0,85% (p/v); 30mM HEPES-NaOH; pH 7,4 (para 10 ml tomar 1ml de NaCl 8,5%, llevar a 5ml con agua destilada, 3ml de HEPES 100mM, ajustar el pH 7,4 con NaOH 1M y llevar a 10ml.) (densidad aprox 1,006gr/ml)
2. Diluyente 2 = NaCl 0,85% (p/v); 10mM HEPES-NaOH, pH7,4. (para 10ml: tomar 1ml de NaCl 8,5%, llevar a 5ml con agua destilada, 1ml de HEPES 100mM llevar a 8 ml, ajustar el pH 7,4 con NaOH 1M y llevar a 10ml.) (densidad aprox 1,006 gr/ml).
3. Solución de aislamiento de la fracción leucoplaquetaria: 12% iodixanol, 130mM NaCl, 1,6 % p/v carboximetil celulosa. (para 10ml: 2ml de optiprep 60%, 893µl de (NaCl 8,5% p/v), 0,16gr de carboximetil celulosa).
4. Solución de densidad 1,077 gr/ml: 10ml = 3,396ml de optiprep 40% más 6,604ml de diluyente 2.
5. Solución de densidad 1,095 gr/ml: 10ml = 4,26ml de optiprep 40% más 5,74ml de diluyente 2.
6. Solución de lisis = NaCl 1,8% (p/v); 20mM HEPES NaOH, pH 7,4.

### Extracción de sangre

#### Step 2.

Extraer sangre fresca (no trabajar con sangre con más de seis horas de extraída) en tubos EDTA 2mM (concentración final) o con otro anticoagulante, homogenizar la sangre total con el anticoagulante.

### Extracción de fracción leucoplaquetaria.

#### Step 3.

En un tubo 15 mL nuevo adicionar 1mL de la solución de aislamiento de la fracción leucoplaquetaria y sobre esta; adicionar suavemente 3 mL de sangre total extraída en el paso anterior (Figura 1).

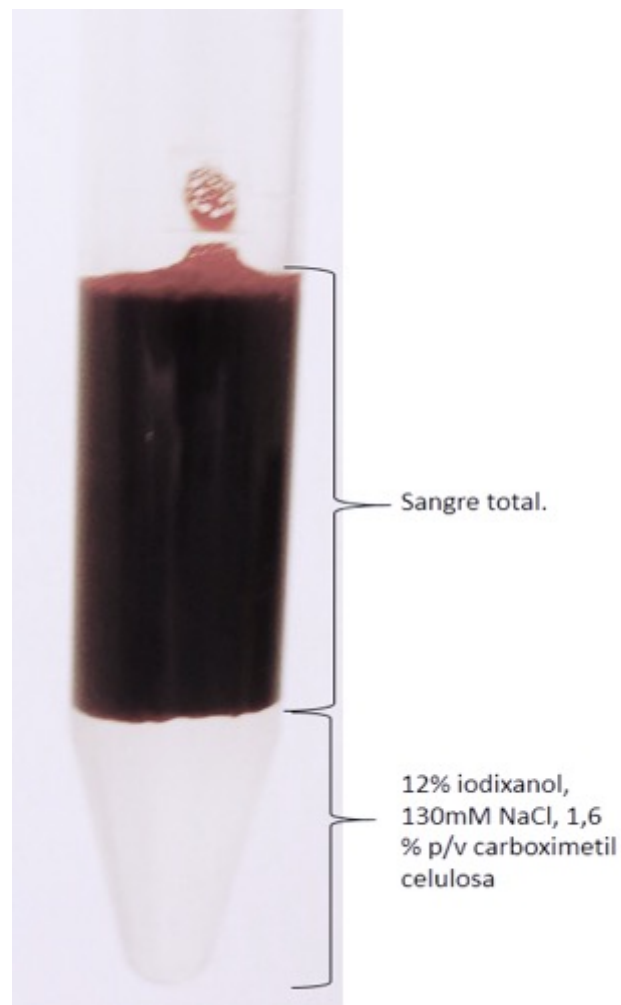


Figura 1. Barrera de densidad con 12% de iodixanol, 130mM de NaCl y 1,6% p/v carboximetil celulosa sobre la cual se encuentra sangre total.

Dejar sedimentar los eritrocitos a traves de esta barrera de densidad por cerca de 1 hora y media a 2 horas, despues de las cuales, en la fase superior quedara ubicado el plasma rico en leucocitos (Figura 2).



Figura 2. Fracciones obtenidas después de 2 horas de incubación, donde se pueden observar los eritrocitos sedimentados.

#### 📌 NOTES

**Lily Johanna Toro** 02 Nov 2017

NO centrifugar la sangre total, ya que los PMN se sedimentan junto con los eritrocitos.

Extracción de polimorfonucleares.

**Step 4.**

Tome la fracción leucoplaquetaria (o plasma rico en leucocitos) que se visualizan en la figura 2, con cuidado, sin llevarse la fracción donde se encuentran los eritrocitos y adicione 3mL de esta fracción en un tubo conico de centrifuga de 15mL nuevo.

Utilice una pipeta paster de boquilla angosta para adicionar 3mL de solución de densidad de 1,077 g/ml lentamente debajo de la fracción leucoplaquetaria (Figura 3 - paso 3).

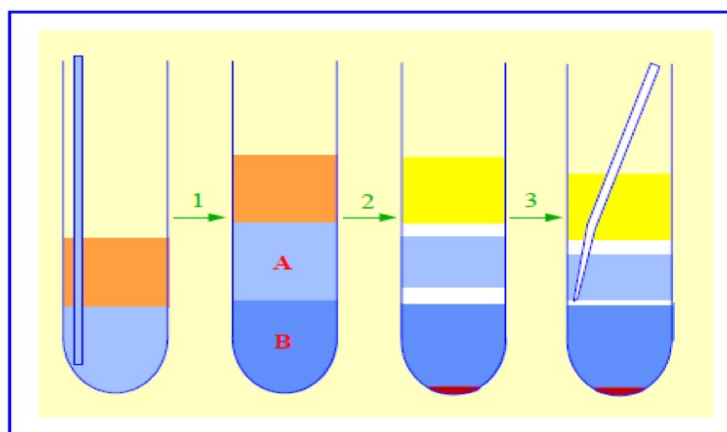


Figura 3. Paso 1, 2 y 3 en la adición de las barreras de densidad con una pipeta paster de boca angosta A. barrera 1.077gr/mL. B. Barrera de densidad 1.095gr/mL.

Debajo de la barrera de densidad de 1,077 g/mL sin llegar a mezclar adicione gentilmente por las paredes del tubo 3-4mL de solución de densidad de 1,095g/ml.

Centrifugue a 800g por 25 minutos a 18-22°C sin freno.

#### 📌 NOTES

**Lily Johanna Toro** 02 Nov 2017

La densidad de 1,095 es escogida virtualmente todos los PMNs se retendrán por esta barrera de alta densidad. Experimentalmente si se usa densidad de 1,090 los polimorfos nucleares se sedimentan con los eritrocitos

#### Separación de las barreras por densidad

##### Step 5.

Usando una pipeta paster, o puncionando el tubo con una aguja gentilmente tome las dos bandas (en tubos separados) que separan las tres interfaces (plasma, barrera densidad 1,077g/mL y barrera de densidad de 1,095g/mL) las células mononucleares (PBMCs) quedaran en la fase superior y los PMN

en la inferior (Figura 4).

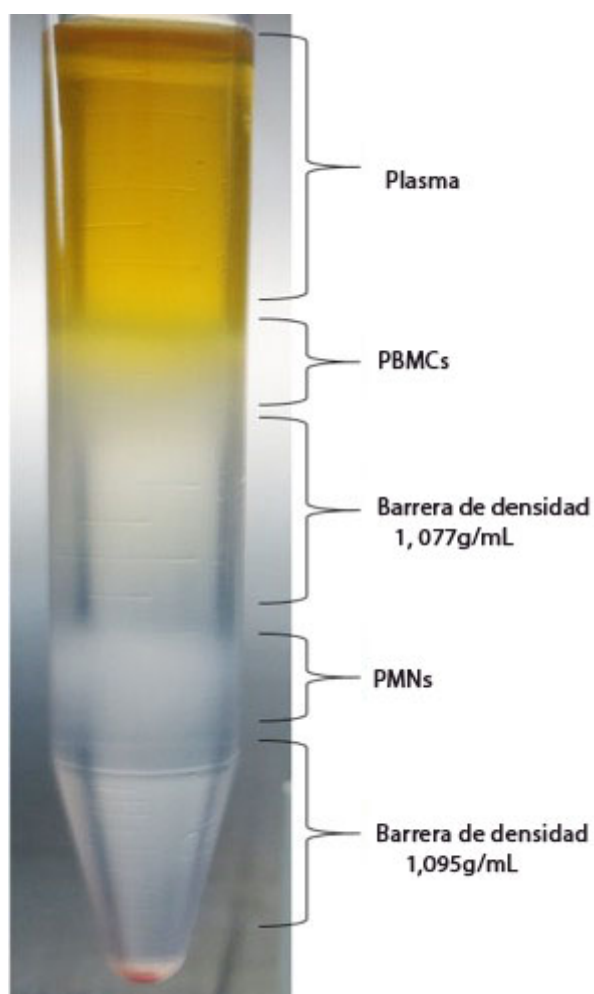


Figura 4. Separación de las fase obtenidas después de la adición de las barreras de densidad y centrifugación.

Diluya la suspensión de PMN en un volumen igual al diluyente y colecte las células por centrifugación a 250g por 10 minutos.

Resuspenda el pellet en el medio adecuado (previamente atemperado).

Los PMN son células que se activan muy fácilmente, por lo tanto cuando se resuspenda el pellet, hacerlo de manera muy lenta y poner el medio 10 minutos antes a atemperar a 37°C.

#### Verificación.

##### Step 6.

Para remover alguna contaminación con eritrocitos de los PMN resuspenda el pellet de células en 3 mL de solución de lisis e incube a 37°C por 7 minutos, o resuspenda los PMN en 3ml de agua destilada fría (hielo) y después de 30 segundos adicione igual cantidad de NaCl 1,8% 20mM HEPES NaOH pH 7,4

Colectar por centrifugación a 250g por 5 minutos a temperatura ambiente y resuspender en un medio adecuado.

Realizar conteo de células en hemocitometro o cámara de Neubauer y viabilidad por azul tripán.

Preferiblemente, verificar la población celular por citometría de flujo con 'side scatter y forward scatter' para la fracción rica en leucocitos, y la fracción de PMN.

#### Análisis de los resultados

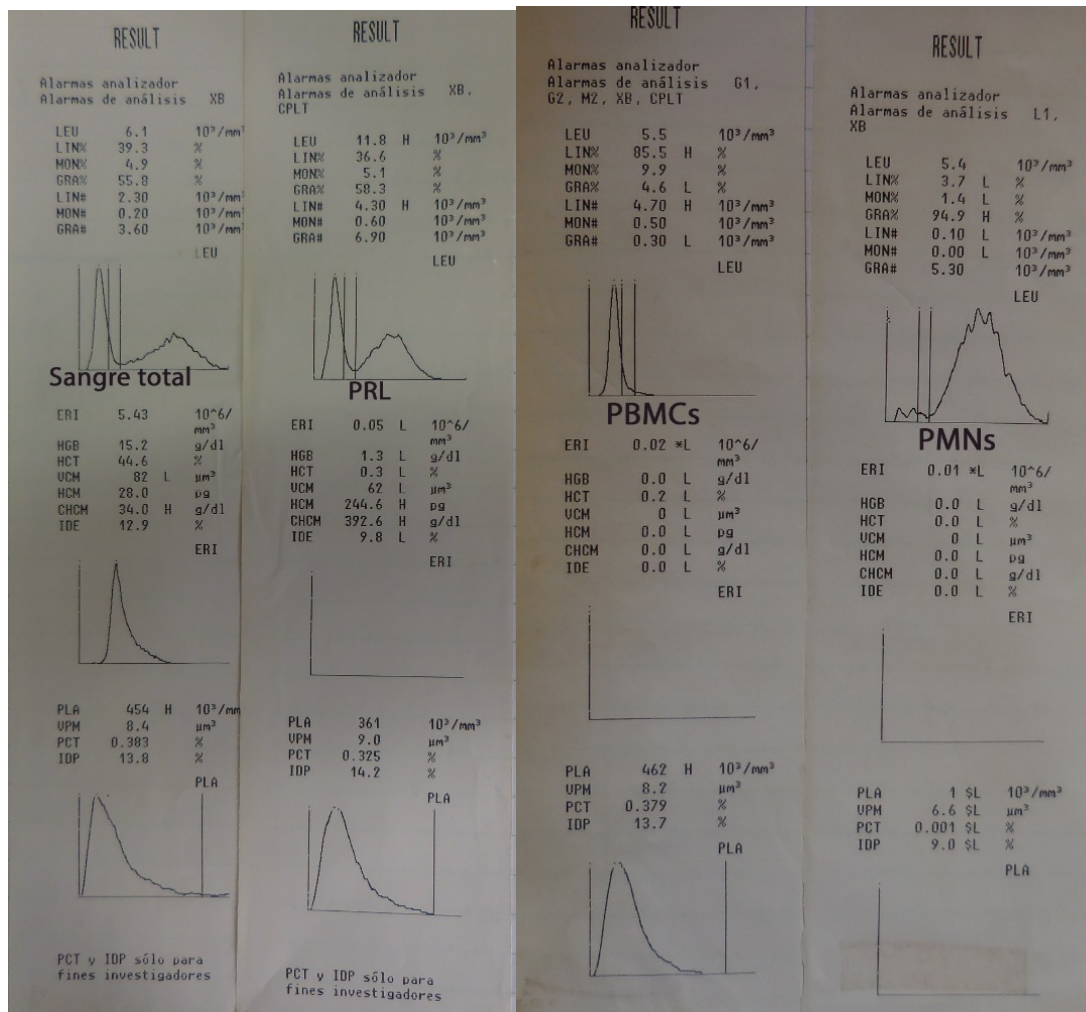
##### Step 7.

Después de la obtención de las diferentes fases. Medir cada fase por hemocimetría, con lo cual se obtendrán los siguientes resultados.

PRL: Plasma Rico en Leucocitos.

PBMCs: Células Mononucleares de Sangre Periferica.

PMNs: Polimorfo Nucleares.



## Warnings

Debido a que se trabajará con sangre total, preferiblemente, utilizar doble guante, tapabocas y gafas. Adicionalmente tener especial cuidado en el momento de la preparación de NaOH