

Oct 20, 2017 Version 2

## Protocolo de extracción de PBMCs por densidad con iodoxanol V.2

DOI

[dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kdmcs46](https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kdmcs46)

Lily Johanna Toro<sup>1</sup>, Germán Alberto Téllez Ramírez<sup>2</sup>, Diana Carolina Henao<sup>2</sup>, Jhon Carlos Castaño Osorio<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Biomédicas - Universidad del Quindío;

<sup>2</sup>Centro de investigaciones biomédicas. Universidad del Quindío.

Grupo de inmunología m...



Lily Johanna Toro

Centro de Investigaciones Biomédicas - Universidad del Quind...

OPEN  ACCESS



DOI: [dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kdmcs46](https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kdmcs46)

**Protocol Citation:** Lily Johanna Toro, Germán Alberto Téllez Ramírez, Diana Carolina Henao, Jhon Carlos Castaño Osorio 2017. Protocolo de extracción de PBMCs por densidad con iodoxanol . **protocols.io**

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kdmcs46>

**Manuscript citation:**

Tomado de (<http://www.axis-shield-density-gradient-media.com/C03.pdf>) Isolation of mononuclear cells from human blood by sedimentation on to a density barrier. Application sheet C03.

**License:** This is an open access protocol distributed under the terms of the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

**Protocol status:** Working

**Created:** October 20, 2017

**Last Modified:** March 28, 2018

**Protocol Integer ID:** 8333

**Keywords:** Células Mononucleares de Sangre Periferica, Inmunología, Plasma, Barrera de densidad.



## Abstract

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

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

## 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 a1.077g/mL. La intefase que contiene los PBMCs se extrae y se diluye en solucion A 1:1 y se centrifuga a 150 g por 10 minutos; el pellet celular es resuspendido en medio de cultivo (RPMI 1640, Antibiotic antimicotic 1X).

Las celulas son cultivadas por 12 horas antes del ensayo a 37 °C y 5 %CO<sub>2</sub>.

## Materials

### STEP MATERIALS

⊗ RPMI 1640 Medium **Thermo Fisher Scientific Catalog #11875093**

⊗ Optiprep ( Iodixanol) **Merck MilliporeSigma (Sigma-Aldrich) Catalog #D1556-250ML**

⊗ 10 mM HEPES (pH 7.5)

⊗ 0.1 M NaOH

⊗ NaCl **Merck MilliporeSigma (Sigma-Aldrich) Catalog #53014**

⊗ RPMI 1640 Medium **Thermo Fisher Scientific Catalog #11875093**

⊗ Optiprep ( Iodixanol) **Merck MilliporeSigma (Sigma-Aldrich) Catalog #D1556-250ML**

⊗ 10 mM HEPES (pH 7.5)

⊗ 0.1 M NaOH

⊗ NaCl **Merck MilliporeSigma (Sigma-Aldrich) Catalog #53014**



## Protocol materials

⊗ 0.1 M NaOH

⊗ 10 mM HEPES (pH 7.5)

⊗ NaCl Merck MilliporeSigma (Sigma-Aldrich) Catalog #53014

⊗ RPMI 1640 Medium Thermo Fisher Scientific Catalog #11875093

⊗ 10 mM HEPES (pH 7.5)

⊗ NaCl Merck MilliporeSigma (Sigma-Aldrich) Catalog #53014

⊗ RPMI 1640 Medium Thermo Fisher Scientific Catalog #11875093

⊗ Optiprep ( Iodixanol) Merck MilliporeSigma (Sigma-Aldrich) Catalog #D1556-250ML

⊗ 0.1 M NaOH

⊗ Optiprep ( Iodixanol) Merck MilliporeSigma (Sigma-Aldrich) Catalog #D1556-250ML

⊗ 10 mM HEPES (pH 7.5)

⊗ 0.1 M NaOH

⊗ NaCl Merck MilliporeSigma (Sigma-Aldrich) Catalog #53014

⊗ RPMI 1640 Medium Thermo Fisher Scientific Catalog #11875093

⊗ Optiprep ( Iodixanol) Merck MilliporeSigma (Sigma-Aldrich) Catalog #D1556-250ML

## Safety warnings

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

## 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).

## Preparación de Soluciones


- 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  
1,077g/mL = 2,5mL Sln A + 8,5mL Sln B = 11mL

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

 RPMI 1640 Medium Thermo Fisher Scientific Catalog #11875093

 Optiprep ( Iodixanol) Merck MilliporeSigma (Sigma-Aldrich) Catalog #D1556-250ML


 10 mM HEPES (pH 7.5)

 0.1 M NaOH

### Note

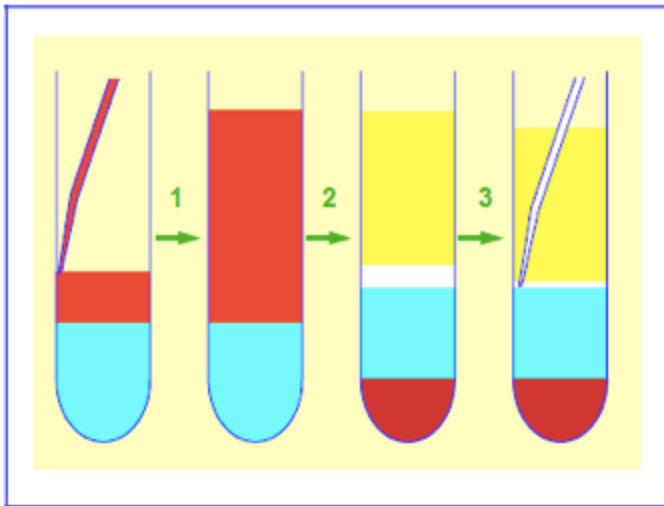
**A partir de 6mL de sangre se obtienen aproximadamente 8 millones de PBMCs.**

 NaCl Merck MilliporeSigma (Sigma-Aldrich) Catalog #53014

 01:00:00

## Procedimiento

- 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 Sln 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.

01:00:00