VERSION 2

OCT 19, 2017

OPEN ACCESS

DOI:

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

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

Germán Alberto Téllez

Lily Johanna Toro¹, Ramírez²,

Diana Carolina

Henao²,

Jhon Carlos Castaño

Osorio²

¹Centro de Investigaciones Biomédicas - Universidad del Quindío;

²Centro de investigaciones biomédicas. Universidad del Quindío.

Grupo de inmunología molecular

Lily Johanna Toro

Centro de Investigaciones Biomédicas - Universidad del Quind...

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 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 antimicotic 1X).

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

Created: Oct 19, 2017

Last Modified: Mar 28, 2018

PROTOCOL integer ID: 8333

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

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) Contributed by users
- ✕ 0.1 M NaOH Contributed by users
- ✕ 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) Contributed by users
- ✕ 0.1 M NaOH Contributed by users
- ✕ NaCl Merck MilliporeSigma (Sigma-Aldrich) Catalog #53014

SAFETY WARNINGS

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

BEFORE START INSTRUCTIONS

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) Contributed by
users

0.1 M NaOH Contributed by users

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).

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

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

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

🕒 01:00:00