

Laboratuvar Teknikleri

Eozinofil İzolasyonu

Periferik kandan eozinofillerin izolasyonu iki ana bölümden oluşmaktadır. İlk bölümde periferik kandan iki farklı dansiteye sahip ficol kullanılarak dansite gradient ile mononükleer hücreler ve polimorfonükleer (PMN) hücreler birbirinden ayrılır. İkinci aşamada ise eozinofilleri ve nötrofilleri içeren PMN'lerden manyetik işaretli kürecikler sayesinde negatif izolasyon ile eozinofiller ayrıştırılır.

A. PMN İZOLASYONU (ŞEKİL 1)

1. Hastalardan 100 mL periferik kan örneği heparin içeren enjektörlere alınır.

2. Histopaque 1077 (H1077) ve 1119 (H1119) kullanılmadan önce oda ısısına getirilir.

3. 50 mL falkon tüp içerisine 10 mL H1077 konulur. Bu tabakanın altına 11 mL H1119 yavaşça ilave edilir.

4. Kan eşit hacimde "Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)" ile karıştırılır.

5. Kan-HBSS karışımının 20 mL'si falkon tüp içerisinde hazırlanmış olan H1077-H1119 karışımının üstüne yavaşça tabaka oluşturacak şekilde ilave edilir. Kanın histopaque tabakaları ile kesinlikle karışmamasına dikkat edilir.

6. Tüpler 2000 rpm'de 20°C'de 30 dakika santrifüj edilir. Santrifüj esnasında tabakalaşmanın bozulmaması için fren sistemi kullanılmaz.

7. Periferik kan mononükleer hücre (PBMC) tabakasının üst kısmındaki plazmayı içeren kısım, PBMC tabakası, üstteki H1077 tabakası

atılır. Altındaki PMN hücrelerini içeren tabaka, H1119 ve altındaki eritrosit tabakasının üst yarısı yeni bir falkon tüpüne aktarılır.

8. Üzerine son hacim 45 mL olacak şekilde HBSS ilave edilir. Tüpler 1500 rpm'de 4°C'de 10 dakika süreyle santrifüj edilir.

Bu aşamadan sonraki basamaklar buz üzerinde gerçekleştirilir.

9. Hipotonik lizis: Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 21 mL buzda soğutulmuş steril deiyonize su ilave edilerek çökelmiş hücreler yeniden çözülür ve 1 dakika beklendikten sonra 3 mL %7.2 NaCl ilave edilip iyice karıştırılır. Son hacim HBSS ile 45 mL'ye tamamlanır.

10. Tüpler 1350 rpm, 4°C'de 10 dakika santrifüj edilir.

11. Basamak 9 ve 10 tekrar edilir.

12. Hücreler 20 mL buzda soğutulmuş HBSS ilave edilerek çözülür ve 11 mL soğuk H1077 hücre süspansiyonunun altında bir tabaka oluşturacak şekilde ilave edilir.

13. Tüpler 1750 rpm, 4°C'de fren kullanılmadan 30 dakika santrifüj edilir.

14. Süpernatant uzaklaştırılır ve hücreler 20 mL soğuk HBSS ilave edilerek yıkanır.

15. Tüpler 1350 rpm, 4°C'de 10 dakika santrifüj edilir.

16. Süpernatant uzaklaştırılır ve hücreler buzda soğutulmuş %0.1 BSA içeren "phosphate buffered saline (PBS)" ile yeniden sulandırılır. Tüm tüpler birleştirilerek hücreler sayılır.

Yazışma Adresi: Dr. E. BİRBEN

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Allerji ve Astım Ünitesi, ANKARA
e-posta: esrabirben@yahoo.com

17. Tüpler 1350 rpm, 4°C'de 10 dakika santrifüj edilir. Hücreler aşağıda belirtilen konsantrasyonda olacak şekilde yeniden sulandırılarak polipropilen tüpe aktarılır.

Hücre Sayımı

Hücreler "tryphan blue" boya solüsyonu ilave edilip hemositometre kullanılarak ışık mikroskopunda sayılır. Sayım için sayım kamerasının dört köşesinde bulunan 16 küçük kareden oluşan bölgedeki hücreler sayılır ve dörde bölünür. Toplam hücre miktarını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılır:

Ortalama hücre sayısı x 10^4 x total hacim = Total hücre sayısı

"Tryphan blue" hücrelerin canlılığını belirlemede kullanılmaktadır. Eğer hücre ölü ise hücre duvarı yapısı bozulduğu için hücre boyayı içine alarak koyu mavi renge dönüşür. Canlı hücreler ise boyayı almadığı için parlak ve renksiz olarak görülür.

B. PMN'LERDEN EOZİNOFİLLERİN İZOLASYONU

1. Hücrelerin primer antikor CD16 ile kaplanması: Hücreler 50-100 x 10^6 /mL olacak şekilde yeniden sulandırıldıktan sonra üzerine 1 µg CD16/ 10^6 PMN olacak şekilde primer antikor ilave edilir.

2. Tüpler 45 dakika boyunca her 5 dakikada bir çalkalamak suretiyle buz üzerinde inkübe edilir. Örneğin hacmi içinde bulunduğu tüp kapasitesinin %20-80'i kadar olmalıdır.

3. İnkübasyon sonunda örnekler soğuk %0.1 BSA içeren PBS ile 15-20 katı sulandırılır. Tüpler 1350 rpm, 4°C'de 10 dakika santrifüj edilir ve süpernatant uzaklaştırılır.

4. Üçüncü basamak tekrar edilir.

5. Hücreler 2.5-25 x 10^6 hücre/mL olacak şekilde %0.1 BSA içeren PBS ile yeniden sulandırılır.

6. Hücreler yıkanmış dynabead (manyetik işaretleyiciler)'lerin üzerine ilave edilir.

7. Örnekler 45 dakika bir rotatorun üzerinde soğuk odada inkübe edilir.

8. İnkübasyon sonucunda tüpler manyetik bir tüplük içerisine yerleştirilir ve 5 dakika bekletilir.

9. Süpernatant temiz bir tüpe aktarılır ve yukarıda anlatıldığı şekilde hücre sayısı ve canlılık oranı tespit edilir.

10. Hücreler santrifüj edilir ve 1 x 10^6 /mL olacak şekilde 50 mM %10 FBS ve antibiyotik içeren RPMI 1640 besiyeri içinde yeniden sulandırılır.

Dynabead'lerin Yıkınması

1. İstenilen miktar dynabead 50 mL bir falcon tüp içine aktarılır. Gerekli miktarı hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılır:

PMN sayısı x 20 = Gerekli bead'lerin sayısı

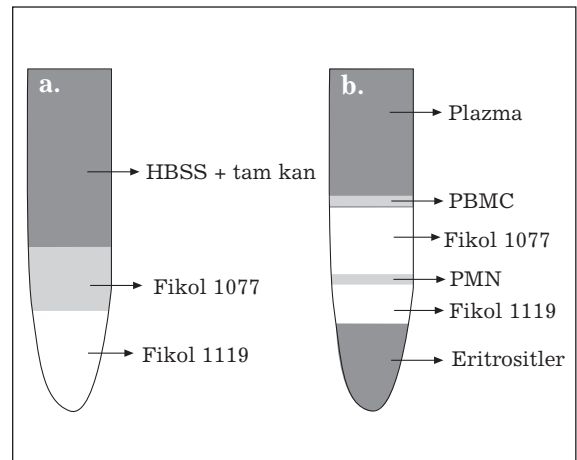
Bead'lerin sayısı/400 x 10^6 bead/mL = bead'lerin total hacmi

2. Tüp manyetik tüplük içine yerleştirilir ve sıvı kısım atılır.

3. Tüp manyetik tüplükten alınır ve üzerine 2 mL %0.1 BSA içeren PBS ilave edilerek bead'ler yıkanır ve tüp tekrar manyetik alana yerleştirilir.

4. Sıvı kısım pipetlenerek atılır ve beadler başlangıçtaki orjinal hacimleri kadar %0.1 BSA içeren PBS ilave edilerek yeniden sulandırılır.

Son basamak ile manyetik işaretli eozinofil dışı hücreler ortamdaki uzaklaştırılır. Tüpte sadece eozinofiller kalır.



Şekil 1. a. Hücre izolasyon tüpünde farklı yoğunluktaki ficol ve kan katmanları.

b. Santrifüj sonrasında farklı ficol ve hücre gruplarının katmanlara ayrışması.

E. BİR BEN*

* Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk Allerji ve Astım Ünitesi
ANKARA