

Izolace agranulocytů z periferní krve

- **Izotonický roztok sacharózy 1083 g.l⁻¹** – osmolarita nastavena chloridem sodným na 300 mosm.l⁻¹, zahustěno přídatkem 3 % želatiny, obarveno na modro potravinářským barvivem E-132
- **Izotonický roztok sacharózy 1077 g.l⁻¹** – osmolarita nastavena chloridem sodným na 300 mosm.l⁻¹, zahustěno přídatkem 3 % želatiny, obarveno na žluto potravinářským barvivem E-102
- **Fyziologický roztok** – chlorid sodný 0,9 g.l⁻¹
- **LeucoPHAN**
- **Heparinizovaná krev** ředěná 1:1 fyziologickým roztokem

Princip

Na diskontinuálním gradientu s médii o hustotě 1083 a 1077 g.l⁻¹ se krvinky při centrifugaci rozdělí tak, že erytrocyty sedimentují na dno zkumavky, granulocyty klesnou na rozhraní obou médií a agranulocyty s destičkami zůstanou nad méně hustým roztokem.

Přítomnost leukocytů v izolované suspenzi prokážeme pomocí komerčního testu LeukoPHAN. Leukocytární esterázy štěpí ester indoxylu, který následně reaguje s diazotovanou solí za vzniku barevného konjugátu.

Postup

1. Do polypropylenové centrifugační zkumavky se odměří 3 ml roztoku s hustotou 1083 g.l⁻¹. Nad něj se opatrně převrství 3 ml roztoku s hustotou 1077 g.l⁻¹. Oba roztoky se nesmějí smíchat.
2. Nad gradient se opatrně nanese 6 ml ředěné krve.
3. Centrifugace 20 minut při 2000 ot/min.
4. Plastovou Pasteurovou pipetou se odsaje plazma nad gradientem, přičemž se ponechá asi 7mm vrstva plazmy nad horním okrajem gradientu.
5. Do skleněné zkumavky se plastovou Pasteurovou pipetou odebere část sloupce nacházejícího se mezi 7 mm nad a 7 mm pod okrajem gradientu. Tato frakce obsahuje agranulocyty a trombocyty.
6. Přítomnost leukocytů ve frakci se prokáže pomocí LeukoPHANu – políčko po ponoření zžloutne.
7. Frakce agranulocytů s destičkami se ponechá pro další pokusy.

Odkazy

Zdroj

- VEJRAŽKA, M.: *Základní techniky práce s tkáňovými kulturami*. Praha, 2004.