



Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica empleando gradiente de Ficoll.

Created: Jun 16, 2008; **Last modified:** Nov 7, 2013, **Version:** 3.0

Este protocolo describe el procedimiento para aislar Células Mononucleares Humanas (CMN) por medio del gradiente de Ficoll-1077 (Histopaque-1077™). Este protocolo ha demostrado ser igual de eficaz para el procesamiento de muestras de concentrados leucocitarios derivadas de bancos de sangre así como de muestras de sangre entera recolectadas con Vacutainers™ de tapa amarilla (ACD). Este procedimiento deberá realizarse en el interior del gabinete de seguridad biológica (GSB) clase II A/B3 y preferentemente dentro del Cuarto de Cultivo Celular (CCC) para las muestras destinadas a transformación hacia líneas celulares.

Procedimiento

1. Con una pipeta serológica dispense 3 mL de Ficoll-1077 en un tubo cónico de 15 mL. Estos tubos podrán prepararse con antelación y mantenerse refrigerados hasta antes de su uso.
2. Mezcle gentilmente la muestra de sangre entera contenida en el Vacutainer® o el concentrado leucocitario presente en la bolsa de recolección de banco de sangre hasta homogeneizarla.
3. Retire la tapa del Vacutainer® y colóquela a un lado sobre una gasa esteril.
4. Con una pipeta serológica de 10 mL dispense 5 mL de Sangre Entera Anticoagulada hacia un tubo cónico de 15 mL previamente cargado con 5 mL de PBS, pH 7.4 esteril. Alternativamente corte con las tijeras romas del GSB uno de los tubos de alimentación de la bolsa de recolección de banco de sangre y adicione directamente 2 mL del Concentrado Leucocitario a un tubo cónico de 15 mL previamente cargado con 2 mL de PBS.
5. Homogeneice gentilmente por inversión la mezcla de sangre y PBS.
6. Utilizando la misma pipeta serológica de 10 mL tome 10 mL de la mezcla de sangre entera y PBS (o 4 mL de la mezcla de Concentrado Leucocitario y PBS) y colóquela cuidadosamente sobre la superficie del Ficoll-1077 sin perturbar la interfase escurriendo la mezcla lentamente por la pared del tubo inclinado. Al terminar este paso el tubo cónico presentará dos estratos, uno inferior con Ficoll-1077 y uno superior con la mezcla de sangre y PBS.
7. Limpie el exterior de las cubetas de la centrífuga con etanol al 70% e introdúzcalas al GSB. Coloque cuidadosamente los tubos en las cubetas sin perturbar los estratos y asegure las tapas de contención de aerosoles.
8. Centrifugue a 400 G por 20 minutos seleccionando el programa #1 de la CL31 del CCC. Verifique que los parámetros sean los correctos: 400 G, 1500 RPM, 20 minutos, rotor de 161 mm, aceleración y desaceleración lenta (Opción 1).





9. Retire cuidadosamente las cubetas de la centrífuga e intrdúzcalas al GSB. Retire las tapas de contención de aerosoles de las cubetas y cuidadosamente retire los tubos cónicos de las cubetas sin perturbar los estratos que se han formado. En este momento existirán cuatro estratos diferentes: el primero, de abajo hacia arriba, contiene eritrocitos y granulocitos, el inmediatamente superior contiene Ficoll-1077, el inmediatamente superior al Ficoll es el estrato más discreto y contiene tanto a las CMN como a las plaquetas y, por último, el estrato superior que contiene el plasma.
10. Empleando una micropipeta P1000 transfiera el estrato correspondiente a las CMN a un tubo de cultivo de fondo redondo de 12 mL. De ser necesario podrá eliminarse parte del estrato de plasma superior antes de cosechar las CMN.
11. Afore los tubos de cultivo de fondo redondo a 10 mL con PBS, pH 7.4 y homogeneíce gentilmente por inversión.
12. Coloque los tubos de cultivo de fondo redondo en las cubetas y asegure las tapas de contención de aerosoles. Centrifugue a 100 G por 10 minutos seleccionándo el programa #2 de la CL31 del CCC. Verifique que los parámetros sean los correctos: 100 G, 760 RPM, 10 minutos, rotor de 161 mm, aceleración y desaceleración rápida (Opción 5).
13. Retire las cubetas de la centrífuga e intrdúzcalas al GSB. Retire las tapas de contención de aerosoles de las cubetas y retire los tubos cónicos de las cubetas. Descarte el sobrenadante por decantación hacia una solución de Hipoclorito de Sodio (NaOCl) al 0.5%.
14. Resuspenda las CMN en el volumen remanente de PBS dando pequeños golpes a la punta del tubo con el dedo índice. ¡Es indispensable asegurar la resuspensión completa de las CMN!
15. Afore el tubo a 10 mL con PBS, pH 7.4 nuevamente. Homogeneíce gentilmente por inversión.
16. Coloque los tubos de cultivo de fondo redondo en las cubetas y asegure las tapas de contención de aerosoles. Centrifugue a 100 G por 10 minutos seleccionándo el programa #2 de la CL31 del CCC. Verifique que los parámetros sean los correctos: 100 G, 760 RPM, 10 minutos, rotor de 161 mm, aceleración y desaceleración rápida (Opción 5).
17. Retire las cubetas de la centrífuga e intrdúzcalas al GSB. Retire las tapas de contención de aerosoles de las cubetas y retire los tubos cónicos de las cubetas.
18. Descarte el sobrenadante por decantación hacia una solución de Hipoclorito de Sodio (NaOCl) al 0.5%.
19. Resuspenda las CMN en el volumen remanente de PBS dando pequeños golpes a la punta del tubo con el dedo índice. ¡Es indispensable asegurar la resuspensión completa de las CMN!
20. Agregue a cada tubo con CMN 1 mL de Medio de Cultivo Básico suplementado con 10% de Suero





Bovino Fetal (FBS) y resuspensa a las CMN con golpeteo digital.

21. Continúe con el protocolo “*Conteo y Viabilidad de CMN*” o con el de “*Criopresevación-Descongelación de CMN*”.

Notas

1. Se recomienda emplear guantes sin polvo, ya que este activa a los monocitos.
2. Este procedimiento permite aislar un $60 \pm 20\%$ de los linfocitos y $95 \pm 5\%$ de las CMN presentes en la muestra original con una contaminación de $3 \pm 2\%$ de granulocitos, $5 \pm 2\%$ de eritrocitos y menos del 0.5% de plaquetas de la muestra original. La viabilidad de los linfocitos extraídos a partir de sangre entera anticoagulada con heparina, EDTA, ACD o citrato es generalmente superior al 90%.
3. Este procedimiento ha sido optimizado para temperaturas de procesamiento entre 18 y 20°C.
4. La adición de una proporción distinta de sangre a PBS se traducirá en mayor contaminación por eritrocitos.
5. Mayores G's a las estipuladas incurren en mayor contaminación por plaquetas.
6. La dilución de la sangre entera con PBS permite disminuir el número de linfocitos que son secuestrados por los eritrocitos agregados y por ende maximizar su recuperación.

Referencias

1. Sigma-Aldrich, Histopaque-1077, Procedure No. 1077.
2. Skoog, W.A. and Beck, W.S., "Studies in the fibrinogen, dextran, and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes." *Blood* 11: 436-454, 1956.
3. Bøyum, A., "Separation of white blood cells." *Nature* 204: 793-794, 1964.
4. Bøyum, A., "Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood." *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21 Suppl. 97 (Paper IV): 77-89, 1968.
5. Thorsby, E. and Bratlie, A., "A rapid method for preparation of pure lymphocyte suspensions." *Histocompatibility Testing* ed. P.I. Terasaki: 665-666, 1970.
6. Ting, A. and Morris, P.J., "A technique for lymphocyte preparation from stored heparinized





blood." *Vox Sang* 20: 561-563, 1971.

7. Fotino, M., Merson, E.J. and Allen, F.H., "Micromethod for rapid separation of lymphocytes from peripheral blood." *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1: 131-133, 1971.
8. Wottawa, A., Klein, G. and Altman, H., "A method for the isolation of human and animal lymphocytes with Ficoll-Urografi n." *Wiener Klin. Wochenschr.* 86: 161-163, 1974.
9. Fotino, M., Merson, E.J. and Allen, F.H., "Instant lymphocytes". *Vox Sang* 21: 469-470, 1971.
10. Peper, R.J., Tina, W.Z. and Mickelson, M.M., "Purification of lymphocytes and platelets by gradient centrifugation." *J. Lab. and Clin. Med.* 72: 842-848, 1968.

Revision history

- 1.0 Original document.
- 2.0 Optimized protocol.
- 3.0 Changes to document format only.

