

General Lab Product

Isolamento più rapido di PBMC utilizzando Ficoll-Paque® Plus nelle centrifughe da banco polivalenti 5920 R e 5910 Ri di Eppendorf

Nicole Seeligmüller, Eppendorf AG, Hamburg, Germany

Sommario

La nuova serie di Centrifuge 59xx, dotate di eccezionale capacità di carico, elevata versatilità e velocità, hanno colmato il divario tra le tradizionali centrifughe da banco e le centrifughe da pavimento. La loro straordinaria varietà di applicazioni ne include diverse del campo della biologia molecolare e cellulare, come ad es. l'isolamento di cellule mononucleate da sangue periferico (PBMC). Questo metodo si basa sull'applicazione della centrifugazione in gradiente di densità con Ficoll-Paque® in provette coniche da 15/50 mL o in provette per la raccolta del sangue. Ottenere PBMC pulite e ben separate e con una resa massima di cellule vitali è essenziale per ridurre al minimo la perdita di campione. Le centrifughe polivalenti 5920 R e 5910 Ri hanno fornito risultati eccezionali per questa applicazione, anche con rapporti di accelerazione / decelerazione di 9/3.



Figura 1: Centrifuge 5910 Ri con Rotor S-4xUniversal

Introduzione

Il sangue umano è composto in parti uguali da plasma sanguigno e cellule ematiche. Queste comprendono gli eritrociti (globuli rossi), i leucociti (globuli bianchi) e i trombociti (piastrine). I leucociti si suddividono ulteriormente in diverse tipologie di cellule, tra cui i linfociti e i monociti, i quali (in cooperazione con altre cellule) costituiscono la base del sistema immunitario non specifico e sono chiamati cellule mononucleate da sangue periferico (PBMC), in quanto possiedono un solo nucleo cellulare. Con il termine linfocita si fa riferimento a due classi principali, i linfociti B e i linfociti T. I linfociti B sono responsabili della produzione di anticorpi, mentre i linfociti T producono molecole di segnalazione le quali porteranno alla rimozione di cellule malate o estranee.^[1]

I linfociti sono isolati da "buffy coat" (concentrati di sangue intero senza siero). Le PBMC possono essere separate da altri componenti del sangue, come ad es. gli eritrociti e i granulociti, tramite centrifugazione in gradiente di densità utilizzando Ficoll-Paque PLUS. Ficoll-Paque presenta una densità di 1,007 g/mL.

Per via della loro densità superiore, gli eritrociti, i granulociti e le cellule morte passano attraverso lo strato di Ficoll, mentre i linfociti e i monociti si accumulano sul limite del gradiente del plasma poiché hanno una densità inferiore (figura 2). Questo approccio è concorde con il metodo per l'isolamento di PBMC sviluppato da Bøyum nel 1968.^{[2] [3]}

Nella ricerca odierna, innumerevoli applicazioni fanno affidamento su popolazioni cellulari altamente vitali e funzionalmente intatte. Poiché può essere eseguita senza complicazioni e in sicurezza, la centrifugazione in gradienti di densità è ora un'applicazione diffusa in tutto il mondo. Un prerequisito fondamentale per il successo dell'isolamento di PBMC è assicurare un'interfase definita. A tal fine, l'intera procedura deve essere effettuata con una vibrazione minima. In generale, è possibile evitare la miscelazione delle fasi soltanto se il freno del rotore è disattivato^[4] – una misura che richiede un'enorme quantità di tempo durante questa applicazione.

Questa nota applicativa dimostra che le nuove centrifughe polivalenti 5920 R e 5910 Ri di Eppendorf, in combinazione con una serie di rotori basculanti, sono in grado di soddisfare le richieste più elevate e contemporaneamente gli utenti trarranno un significativo risparmio di tempo grazie alla selezione specifica delle rampe di accelerazione e decelerazione.

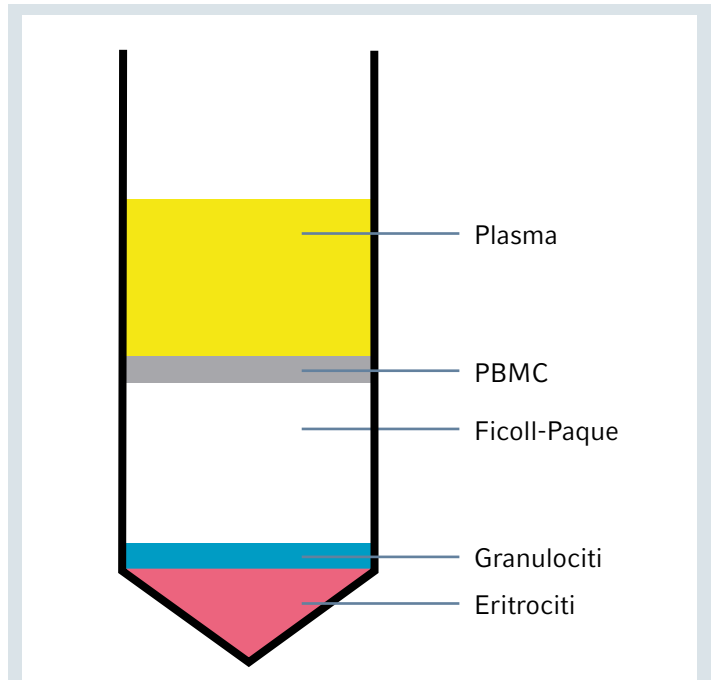


Figura 2: gradiente di densità di un buffy coat con Ficoll-Paque PLUS (schematico)

Materiali e metodi

Metodi

Centrifugazione in gradiente di densità Ficoll-Paque PLUS

1. Portare Ficoll-Paque PLUS e il tampone fosfato salino a temperatura ambiente.
2. Capovolgere più volte Ficoll-Paque PLUS.
3. Pulire la sacca di sangue con etanolo al 70%, tagliare il tubo inferiore e travasare il sangue in una fiasca a collo largo in condizioni di sterilità.
4. Diluire il sangue con un rapporto di 1:1 con il tampone fosfato salino, chiudere il flacone e miscelare capovolgendolo con cautela.
5. Versare 15 mL di Ficoll-Paque in ciascuna delle Eppendorf Conical Tubes 50 mL.
6. Ricoprire Ficoll-Paque con la miscela sangue/tampone fosfato salino utilizzando una pipetta sierologica alla minima velocità impostabile.

CONSIGLIO: per evitare di compromettere il livello di purezza a valle delle PBMC, si deve assolutamente evitare di mescolare Ficoll-Paque con il sangue. Per questo motivo, è meglio tenere la provetta inclinata e, per ottenere una buona copertura, la miscela di sangue deve essere fatta fuoriuscire lentamente dalla pipetta, toccando la parete della provetta.

7. Centrifugare il campione nel rotore basculante desiderato a $400 \times g$ e a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ per 30 min, selezionando la rampa di accelerazione/decelerazione di 9/0 o 9/3* con l'impostazione "rpm definiti".
CONSIGLIO: generalmente, i freni del rotore devono essere disattivati completamente per poter prevenire efficacemente la miscelazione delle fasi. Di uguale importanza è il rispetto scrupoloso delle specifiche sulla temperatura in quanto le differenze di temperatura modificano i rapporti di densità dei liquidi e potrebbero pertanto influire negativamente sui risultati della separazione.
8. Al termine della centrifugazione, togliere con cautela i campioni dalla centrifuga per evitare la miscelazione delle fasi.

*Possibili impostazioni della rampa per Centrifuge 5920 R/5910 Ri: accelerazione e decelerazione disattivate (0/0), fino all'accelerazione massima e frenata (9/9).

Purificazione di linfociti

1. Aspirare con cautela 2/3 dello strato superiore (contenente il plasma e le piastrine) usando una pipetta sierologica sterile fino ad avvicinarsi all'interfase (contenente le cellule mononucleate).
2. Utilizzando una pipetta Eppendorf, aspirare l'intero strato di linfociti, mantenendo il volume a un livello minimo, e trasferirlo in una nuova provetta.

CONSIGLIO: durante questo passaggio, si deve fare attenzione a trasferire il meno possibile Ficoll-Paque PLUS e i supernatanti.

3. Aggiungere almeno 3 volumi di tampone fosfato salino allo strato di linfociti e miscelare con cautela aspirando e rilasciando con la pipetta.
4. Centrifugare a 100 x g e a 20 °C per 10 min ed eliminare i supernatanti.
5. Ripetere i passaggi 3 e 4.
6. Sospendere nuovamente il pellet cellulare in un terreno adatto alle applicazioni a valle.

Test di vitalità e determinazione della resa

1. Diluire le cellule con un rapporto di 1:1 in Trypan blue e quindi effettuare un conteggio manuale delle cellule oppure analizzare le cellule servendosi di un contatore cellulare automatizzato.
2. Determinare la vitalità e la resa.

Materiali

Centrifuga da banco polivalente 5920 R di Eppendorf con i seguenti rotori basculanti:

1. Rotore S-4xUniversal-Large più adattatore per provette coniche da 50 mL
2. Rotore S-4x1000 con cestelli a capacità elevata più adattatore per provette coniche da 50 mL
3. Rotore S-4x750 più adattatore per provette coniche da 50 mL (non in figura)

Centrifuga da banco polivalente 5910 Ri di Eppendorf con i seguenti rotori basculanti:

1. Rotore S-4xUniversal più adattatore per provette coniche da 50 mL (non in figura)
2. Rotore S-4x750 più adattatore per provette coniche da 50 mL (non in figura)
3. Rotore S-4x500 più adattatore per provette coniche da 50 mL (non in figura)

> Provette coniche da 50 mL

> Pipetta Eppendorf Research® plus da 1000 µL, Eppendorf

> Ausilio di pipettaggio elettronico per pipette sierologiche

> Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare Bio-Sciences AB

> Tampone fosfato salino Dulbecco 1x(DPBS), gibco® di Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific®

> Buffy coat, umani, Clinica Universitaria di Eppendorf, Istituto di medicina trasfusionale, negativi ai test per le patologie infettive e i virus dell'herpes (del giorno prima)

> Pipette sierologiche da 25 mL

> Fiasca a collo largo da 400 mL, Eppendorf

> Disinfettante per superfici BacilloI® plus, Bode Chemie®

> Trypan blue 0,4%, SIGMA-ALDRICH®

> Microscopio Axio Observer.A1, Zeiss®

Risultati e discussione

Per poter valutare la qualità della separazione, si verifica se è osservabile un'interfase definita con transizioni di fase chiaramente delineate. La torbidità del liquido può indicare una separazione subottimale delle PBMC. Nella figura 3 (a-d) si possono osservare i risultati ottenuti dalla centrifugazione in gradiente di densità eseguita con Centrifuge 5920 R utilizzando rotori basculanti diversi (i risultati ottenuti con Centrifuge 5910 Ri sono equivalenti; non in figura).

Per ogni rotore sono stati testati i rapporti di accelerazione e decelerazione 9/0 e 9/3. È evidente che in ogni singolo caso è stata ottenuta un'ottima separazione dei componenti ematici e che sono stati evitati in gran parte gli effetti del vortex durante la decelerazione del rotore. Questo risultato è di importanza considerevole se confrontato con altre centrifughe con cui sono stati ottenuti dei risultati meno sorprendenti, molto probabilmente a causa della vibrazione del rotore durante il ciclo (figura 3e).

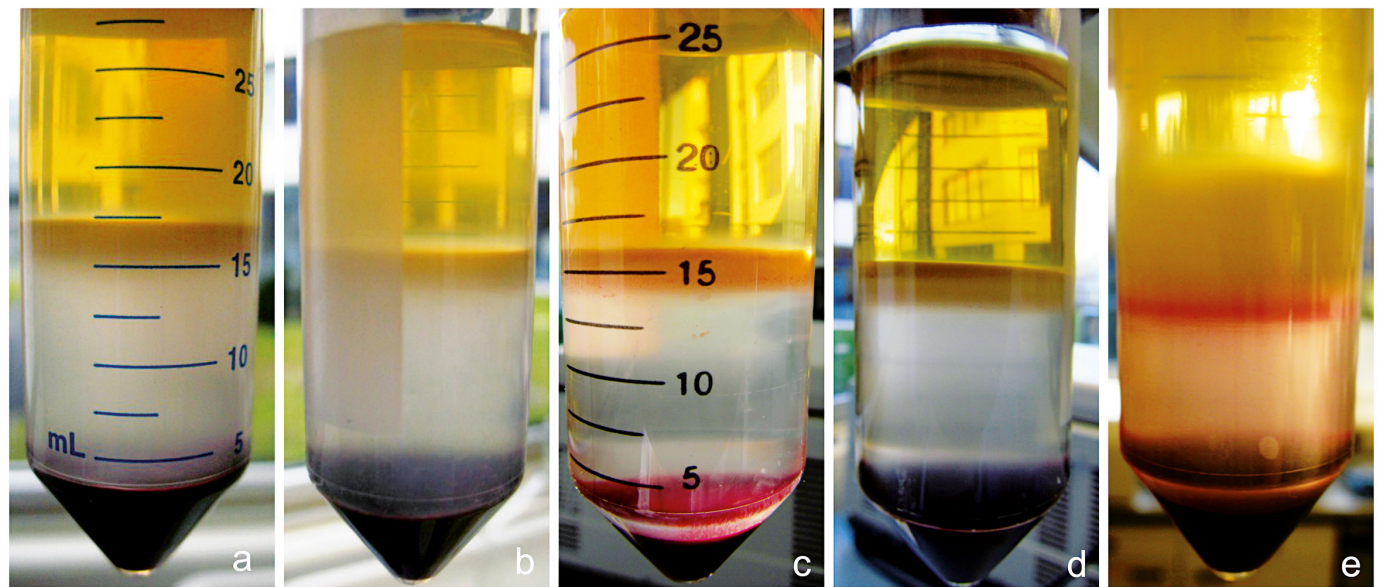


Figura 3: risultati ottenuti dopo la centrifugazione in gradiente di densità nella Centrifuge 5920 R.

- a) Rotore S-4x1000 con cestelli a capacità elevata (rampa 9/0)
- b) Rotore S-4x1000 con cestelli HC (rampa 9/3)
- c) Rotore S-4xUniversal-Large (rampa 9/0)
- d) Rotore S-4xUniversal-Large (rampa 9/3)
- e) Esempio negativo: interfase non limpida, fase plasma/Ficoll torbida. (risultati per Centrifuge 5910 Ri non in figura, però identici)

Per poter confermare la qualità dell'isolamento di PBMC utilizzando Ficoll-Paque PLUS, i campioni di PBMC ottenuti dal rotore S-4xUniversal-Large sono stati sottoposti a un'analisi della resa e della vitalità, oltre a un controllo visivo. Sono stati presi a riferimento i dati forniti da GE Healthcare®, che ha regolarmente raggiunto una vitalità del 95% (+/-5%) durante i test interni.^[6] Gli studi condotti alla Eppendorf hanno rilevato una vitalità media del 94%, in linea con i valori previsti.

In base alla letteratura di riferimento, la resa prevista per le cellule mononucleate è compresa tra $0,8$ e $3,2 \times 10^6$ cellule/mL di sangue.^[6] Pertanto, anche i risultati per il buffy coat

di $3,0 \times 10^6$ cellule/mL (rampa 9/0) e $2,16 \times 10^6$ cellule/mL (rampa 9/3) fanno rientrare la resa totale delle cellule vitali in un intervallo ottimale.

Questi risultati dimostrano che Centrifuge 5920 R e Centrifuge 5910 Ri soddisfano appieno i requisiti di un funzionamento a basse vibrazioni, indipendentemente dal rotore basculante utilizzato e dal fatto che sia stato selezionato un rapporto di accelerazione / decelerazione di 9/0 o di 9/3. In più, una rampa di 9/3 permette di risparmiare tempo in modo considerevole, fino a 23,8 minuti (88%) rispetto ai parametri di centrifugazione consigliati nello studio (freno disattivato) (figure 4 e 5).^[7]

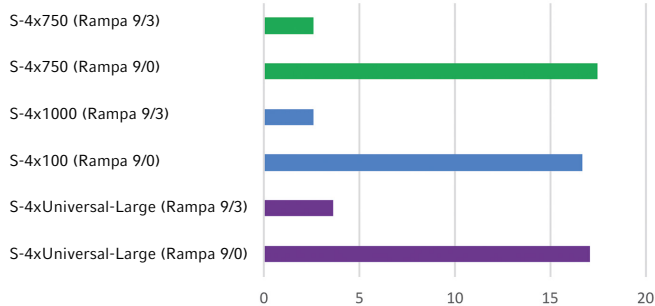
Tempi di frenatura (min.) rotori basculanti Centrifuge 5920 R


Figura 4: tempi di frenata determinati per la nuova centrifuga polivalente 5920 R di Eppendorf, utilizzata assieme a diversi rotori basculanti con una rampa impostata a 9/0 o a 9/3 (i rotori erano completamente carichi; i tempi di frenata si riducono al ridursi del carico).

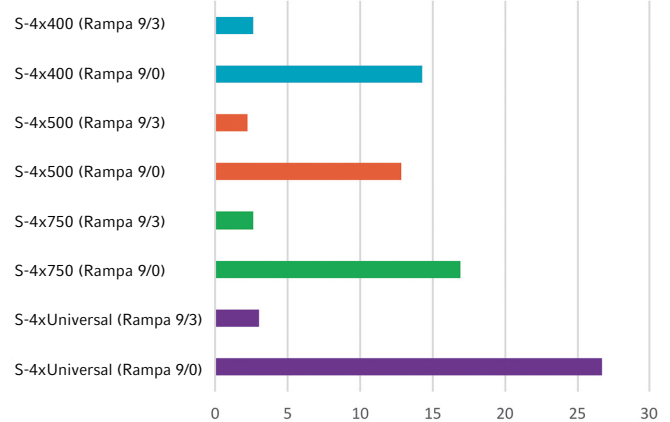
Tempi di frenatura (min.) rotori basculanti Centrifuge 5910 Ri


Figura 5: tempi di frenata determinati per la nuova centrifuga polivalente 5910 Ri di Eppendorf, utilizzata assieme a diversi rotori basculanti con una rampa impostata a 9/0 o a 9/3 (i rotori erano completamente carichi; i tempi di frenata si riducono al ridursi del carico).

Conclusione

Eppendorf raccomanda la nuova serie di centrifughe da banco polivalenti 59xx per la centrifugazione in gradiente di densità con Ficoll-Paque PLUS per ottenere rese elevate di PBMC vitali a scopi di ricerca. Secondo i dati attuali, si può fare affidamento su risultati con una qualità elevata costante

per tutti i rotori basculanti disponibili. Grazie alla loro grande capacità e alla possibilità di ridurre considerevolmente il tempo richiesto per la decelerazione del rotore, entrambe le centrifughe sono ideali per i laboratori di ricerca che manipolano volumi elevati di campione.

Bibliografia

- [1] Kleiveland C.R. (2015). *Peripheral Blood mononuclear cells*. (Cellule mononucleate da sangue periferico). In: Verhoeckx K. et al. (eds) *The Impact of Food Bioactives on Health*. (L'impatto dei bioattivi alimentari sulla salute). Springer, Cham[2] Bøyum A. *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood*. (Isolamento di cellule mononucleate e granulociti dal sangue umano). *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* 1968, 21 (Suppl. 97): 77-89
- [3] Graham J. *Biological Centrifugation: The Basics from background to bench*. (Centrifugazione biologica: nozioni di base dagli aspetti preliminari alle operazioni sul banco). Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited; 2001.
- [4] Heine H, Uschkureit T. *Software-controlled acceleration and deceleration rates for optimal isolation of mononuclear cells*. (Rapporti di accelerazione e decelerazione controllati da software per un isolamento ottimale delle cellule mononucleate). Nota applicativa 74 di Eppendorf; www.eppendorf.com
- [5] Istruzioni di Ficoll-Paque PLUS. www.gelifesciences.com
- [6] HIV/AIDS Network Coordination: *Cross-Network PBMC Processing Standard Operating Procedure*. (Procedura operativa standard comune per tutte le reti per la manipolazione di PBMC). www.hanc.info
- [7] Luttman W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. *Der Experimentator: Immunologie*. (Lo sperimentatore: immunologia). 4ª edizione, Heidelberg: Springer Publishers; 2014

Your local distributor: www.eppendorf.com/contact

Eppendorf s.r.l. · Via Zante 14 · 20138 Milano 1

eppendorf@eppendorf.it · www.eppendorf.it

www.eppendorf.com

Ficoll-Paque® and GE Healthcare® are registered trademarks of GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden. Gibco® is a registered trademark of Life Technologies Corporation, USA. Thermo Fisher Scientific® is a registered trademark of Thermo Fisher Scientific Inc., USA. Bacillo® and Bode Chemie are registered trademarks of Bode Chemie GmbH, Germany. SIGMAR-ALDRICH® is a registered trademark of Sigma-Aldrich Co. LLC, USA. Zeiss® is a registered trademark of Carl Zeiss AG, Germany. Eppendorf®, the Eppendorf Brand Design, Eppendorf Research® are registered trademarks of Eppendorf AG, Germany. U.S. Design Patents are listed on www.eppendorf.com/ip. All rights reserved, including graphics and images. Copyright © 2021 by Eppendorf AG, Germany.