

PROTOCOLO NORMALIZADO DE TRABAJO 1
EXTRACCIÓN DE PBMC A PARTIR DE SANGRE
PERIFÉRICA

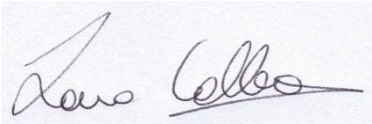
CONTROL DE CAMBIOS

<i>REVISIÓN Nº</i>	<i>FECHA</i>	<i>DESCRIPCIÓN DE LAS MODIFICACIONES</i>	<i>APARTADOS MODIFICADOS</i>
01	25-09-2007	Edición Inicial.	
02	30-11-2010	Proporciones de Ficoll, capacidad de trabajo, se fijó porcentaje de viabilidad, Recuento automatizado y test de viabilidad, se agregó referencias.	4, 5 (nota 2), 2 (nota) y Referencias
03	18-02-2011	Agregado Anexo A y B, implementación de hoja de cálculo Excel.	4
04	23-05-2011	Nº de células a guardar en viales de ADN y proteínas. Velocidad del último centrifugado.	4
05	19-01-2012	Consideraciones si la viabilidad de la muestra es menor al 80%.	4
06	09-10-2017	Modificación del volumen PBS	4
07	13-01-2019	Modificación en el procesamiento	4

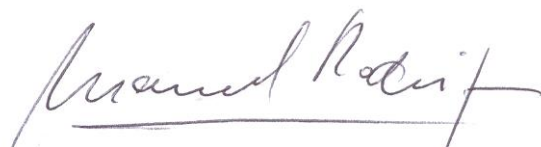
 MODIFICADO POR:
 LOURDES BOHORQUEZ



 REVISADO POR:
 LAURA CALLEROS



 APROBADO POR:
 MANUEL RODRIGUEZ PUYOL



EXTRACCIÓN DE PBMC A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA

1. ABREBIATURAS UTILIZADAS:

- *PBMC*: células mononucleadas de sangre periférica (*Peripheral Blood Mononuclear cells*).
- *T.A.*: temperatura ambiente (18-25°C).

2. MUESTRAS:

- Sangre venosa periférica (10-20ml), extraída en tubo K3 o K2 EDTA vacutainer. Transportadas al Biobanco a la temperatura de entre 4-6°C.

3. MATERIALES:

- Ficoll-Paque *Plus*[®] (*Amersham Biosciences*, ref.17-1440-03) protegido de la luz.
- Suero Bovino Fetal inactivado (*AbCys S.A.* ref. S1820).
- Dimetilsulfóxido estéril (DMSO) (*Sigma* ref. D2650).
- Tampón fosfato salino libre de Ca y Mg Estéril (PBS).
- Pipetas Pasteur estériles de plástico.
- Pipetas estériles para micropipeta P0.5 – 10 µl
- Pipetas estériles para micropipeta P10 – 100 µl
- Pipetas estériles para micropipeta de P100 – 1000 µl
- Puntas correspondientes para cada pipeta estériles.
- Tubos cónicos estériles con tapón a rosca, tipo Falcon, de 50 ml.
- Contador de células automático, countess[™] automated cell counter (invitrogen).
- Trypan Blue (invitrogen)

Muy importante: Todas las operaciones descritas a continuación deben realizarse en condiciones de esterilidad en cabina de flujo laminar y a temperatura ambiente una vez atemperadas las muestras de sangre.

4. PROCEDIMIENTO:

- Traspasar la sangre de cada paciente a un Falcon de 50 ml estéril y agregar el mismo volumen de PBS1X estéril, mezclar suavemente.
- Poner 15 ml de Ficoll en tubos Falcon de 50 ml estériles. Agregar con pipeta Pasteur estéril 20 ml de sangre diluida con mucho cuidado sobre el Ficoll con el tubo inclinado, para minimizar la mezcla entre sangre y Ficoll. **Proporción Sangre diluida/Ficoll 4:3.**

Sangre entera (ml)	PBS1X (ml)	Tubos de Ficoll a preparar/ paciente
10	10	1
20	20	2

- Centrifugar a 870xg 20 min. a T.A. (**programa 1 de centrífuga**). Es muy importante que la centrífuga esté programada con rampas de aceleración y frenado lo más lentas posibles.

Nota: La interfase celular debe de estar claramente definida como una nube blanquecina, sin agregados ni cúmulos celulares grandes. Si por inspección visual no se ven las células se centrifuga otra vez.

- Después de la centrifugación observamos tres fases: fase superior (plasma diluido). Fase intermedia (donde se hallan los PBMCs; amarillenta) y la fase de Ficoll (transparente). En el fondo del tubo quedan los eritrocitos (rojos).
- A continuación, colectar las PBMCs de la interfase plasma diluido/Ficoll y traspasarla a un tubo Falcon de 50 ml. Coger la menor cantidad de Ficoll posible. Unir la capa de células mononucleares de los dos tubos, en el caso

de que los haya, de cada paciente (si se procesa 20ml de sangre entera) y completar el tubo con PBS estéril.

- Centrifugar a 724xg durante 10 min. a T.A. (**Programa 2 de la centrífuga**). Aspirar y desechar el sobrenadante con cuidado de no romper el pellet.

Nota 1: Después de centrifugar se tiene que ver un cúmulo en el fondo del tubo: es el pellet o botón celular, de color blanco aunque en ocasiones puede tener color rojizo debido a la presencia de algunos eritrocitos. Se debe de evitar la presencia de eritrocitos pero no es motivo suficiente para descartar la muestra.

Nota 2: Si observamos que al centrifugar hay presencia de glóbulos rojos desechamos el sobrenadante y al pellet le agregamos 45 ml de agua estéril e inmediatamente completamos hasta 50 ml con PBS 10X en el falcon y volvemos a centrifugar (Programa 2 de centrífuga).

- Añadir 5/7ml (si se parte de 10ml de sangre) ó 10ml (si se parte de 20ml de sangre) de PBS1X estéril. Mezclar para resuspender muy bien el pellet celular. **Contar los PBMC y realizar test de viabilidad.**
- Alicuotar en criotubos según el requerimiento del proyecto (para aislar posteriormente según se requiera DNA y proteínas)*. Centrifugar a 4000 rpm 5 minutos a T.A. Quitar todo el sobrenadante. Etiquetar los tubos y guardar a -80°C .

5. CRIOPRESERVACIÓN DE PBMC en FBS con DMSO al 10%:

- Calcular el número de crioviales (n) que se utilizarán para guardar entre $8-10 \times 10^6$ células en cada uno. Etiquetarlos y colocarlos en los recipientes “Cryo Cooler” (que debe estar a 4°C).
- Centrifugar las células a 724xg 5 minutos T.A. Aspirar y desechar el sobrenadante con cuidado de no romper el pellet. Resuspender el pellet en la mitad de mililitros (n/2) de FBS. Agregar gota a gota el mismo volumen (n/2) de medio de congelación (FBS con 20% DMSO, preparado en el momento).

- Agregar 1 ml a cada criotubo nunca preparado anteriormente. A continuación guardar toda la noche a -80°C en Cryo cooler. Al día siguiente congelar en el tanque de Nitrógeno líquido, en la ubicación asignada.

Nota 1: La mezcla de FBS+DMSO se agrega a las células muy lentamente con pipeta Pasteur estéril. La capacidad del Cryo Cooler es de 36 posiciones se guardarán como máximo 36 viales de células viables por día. Se cambiará el Isopropanol después de 5 usos.

Nota 2: Para la criopreservación de células viables es indispensable que las células tengan una alta viabilidad, para ampliar el rango de pacientes con este tipo de muestra se utiliza el criterio de conservar células viables solamente de pacientes con un porcentaje de viabilidad (con trypan blue) mayor o igual al 80%.

Referencias:

- ✓ Healthcare G. *Instructions 71-7167-00 AG Ficoll-Paque PLUS*. 2007:1-15.
- ✓ Maecker HT, Moon J, Bhatia S, Ghanekar SA, Maino VC, Payne JK, Kuus-Reichel K, Chang JC, Summers A, Clay TM, Morse MA, Lysterly HK, DeLaRosa C, Ankerst DP, Disis ML. *Impact of cryopreservation on tetramer, cytokine flow cytometry, and ELISPOT*. BMC immunology. 2005; 6:17.
- ✓ Disis ML, dela Rosa C, Goodell V, Kuan L-Y, Chang JCC, Kuus-Reichel K, Clay TM, Kim Lysterly H, Bhatia S, Ghanekar SA, Maino VC, Maecker HT. *Maximizing the retention of antigen specific lymphocyte function after cryopreservation*. Journal of Immunological Methods. 2006; 308(1-2):13-8.