

Методы разделения клеток иммунной системы.

Подготовил студент
группы 3.4.01
Блескин Дмитрий
Алексеевич

МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК

```
graph TD; A[МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК] --> B[Методы, основанные на физических свойствах клеток (размеры, плотность, заряд)]; A --> C[Методы, основанные на экспрессии поверхностных антигенов]; B --> B1[• Адгезия на стекле или пластике]; B --> B2[• Центрифугирование в градиенте плотности]; C --> C1[• Аффинная хроматография]; C --> C2[• Розеткообразование]; C --> C3[• Цитоллиз]; C --> C4[• Пэннинг]; C --> C5[• Клеточный сортер]; C --> C6[• Иммуномагнитная сепарация];
```

Методы, основанные на физических свойствах клеток (размеры, плотность, заряд)

- Адгезия на стекле или пластике
- Центрифугирование в градиенте плотности

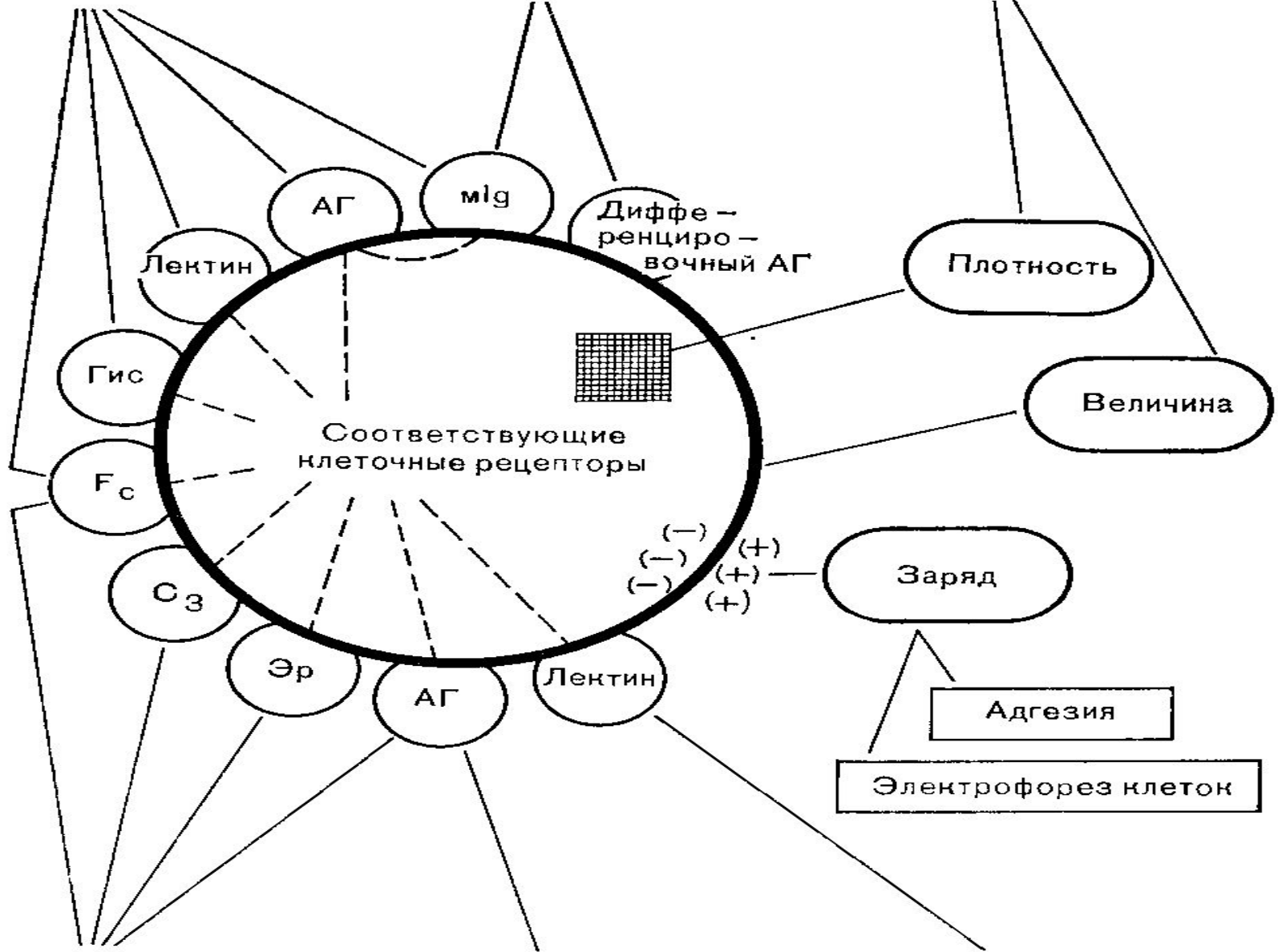
Методы, основанные на экспрессии поверхностных антигенов

- Аффинная хроматография
- Розеткообразование
- Цитоллиз
- Пэннинг
- Клеточный сортер
- Иммуномагнитная сепарация

Аффинная хроматография

Цитолиз, ФАСК

Разделение в градиенте плотности



Образование розеток

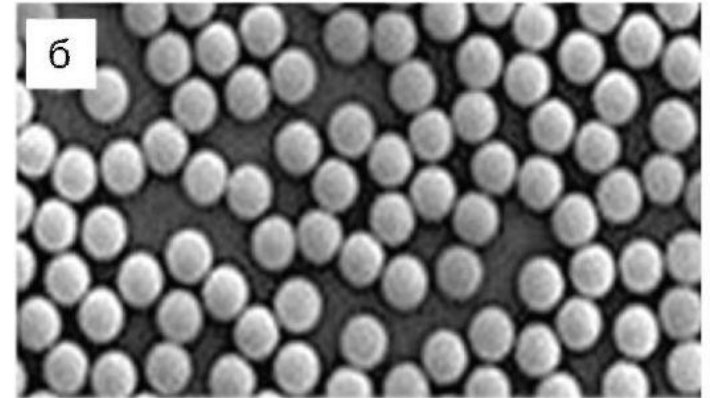
Монослой

Агглютинация

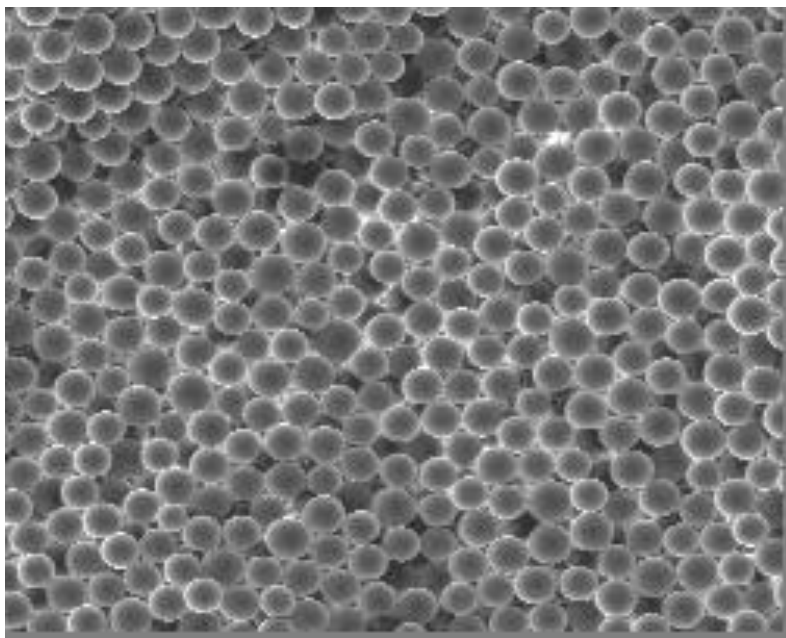
Иммуномагнитная сепарация клеток

Принцип метода:

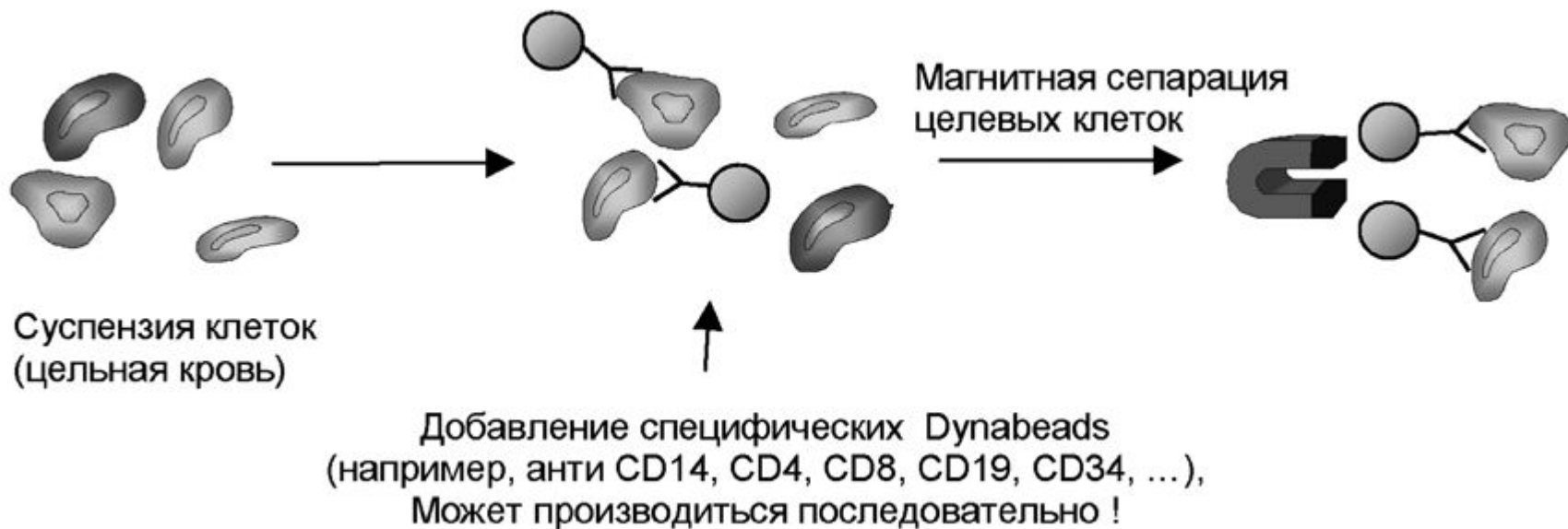
Магнитная сепарация клеток основана на использовании парамагнитных бус (микросфер), покрытых моАТ против поверхностного антигена, специфичного для интересующих клеток. Магнитные бусы имеют диаметр около 50 нм, невидимы при световой микроскопии, подвергаются биodeградации и не травмируют клетки. Использование однородных по размеру и форме микросфер обеспечивает быстрое и эффективное связывание клеток, минимизирует неспецифическое связывание, позволяя достичь высокой воспроизводимости результатов.



Микросферы добавляют непосредственно к исследуемому образцу, что обеспечивает быстрый и прямой доступ к максимальному числу целевых клеток. После 10-20 минутной инкубации пробирку с образцом помещают в магнитный штатив, где клетки интересующей популяции, связанные с магнитными частицами, улавливаются, после чего супернатант удаляют пипеткой. Выделенные целевые клетки ресуспендируют в буфере и анализируют согласно протоколу исследования. При необходимости магнитные частицы можно отделить от целевых клеток при помощи специального буфера.



Прямой метод - клетки инкубируют с микробусами, нагруженными моноклональными антителами к клеточным антигенам.



- **Непрямой метод** - клетки на первом этапе инкубируют с первичными антителами к клеточным антигенам, которые бывают:
 - а) немечеными;
 - б) конъюгированы с биотином;
 - в) конъюгированы с флюорохромом.
- На втором этапе клетки инкубируют с вторичными антителами к иммуноглобулину (в случае использования неконъюгированных первичных антител), антителами к биотину или микробусами, конъюгированными со стрептавидином (в случае использования первичных антител, конъюгированных с биотином) или антителами к флюорохрому (в случае использования первичных антител, конъюгированных с флюорохромом).



Негативное выделение клеток

Негативное выделение клеток осуществляется при удалении всех нежелательных клеточных популяций из образца моноклеарной суспензии.

- целевые клетки не связываются с антителами в течение и после процедуры выделения
- выход целевых клеток $>85\%$
- сохранение жизнеспособности клеток $>95\%$
- клетки могут быть использованы для любых исследований

Позитивное выделение клеток

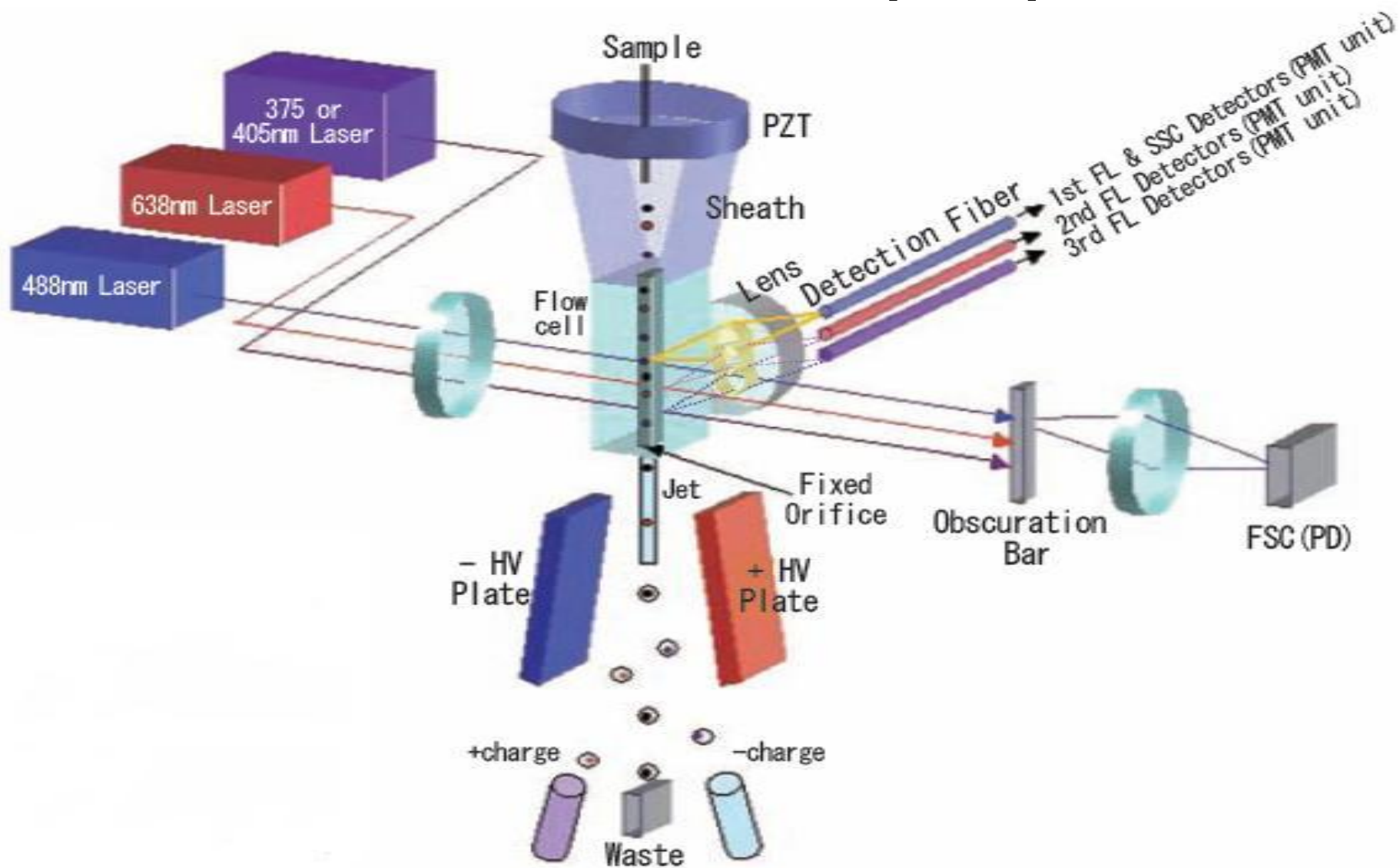
Для позитивного выделения клеток используются полимерные магнитные микросферы, конъюгированные с первичными антителами, специфичными по отношению к поверхностным маркерам целевой клеточной популяции.

- прямое улавливание целевых клеток из любого
- образца
- высокий уровень чистоты выделенной фракции 99%
- выход целевых клеток $>95\%$
- возможность отделения частиц от выделенных
- клеток

Достоинства метода

- Высокий уровень корреляции с проточной цитометрией
- Высокая чувствительность: 10-20 клеток на мкл
- Экономичность, нет необходимости в дорогостоящем оборудовании
- Абсолютный счет, нет необходимости в определении формулы крови
- Нет необходимости в калибровке, возможность исследования единичных образцов
- Хорошая внутрилабораторная и межлабораторная воспроизводимость результатов
- Время анализа: 45-60 минут

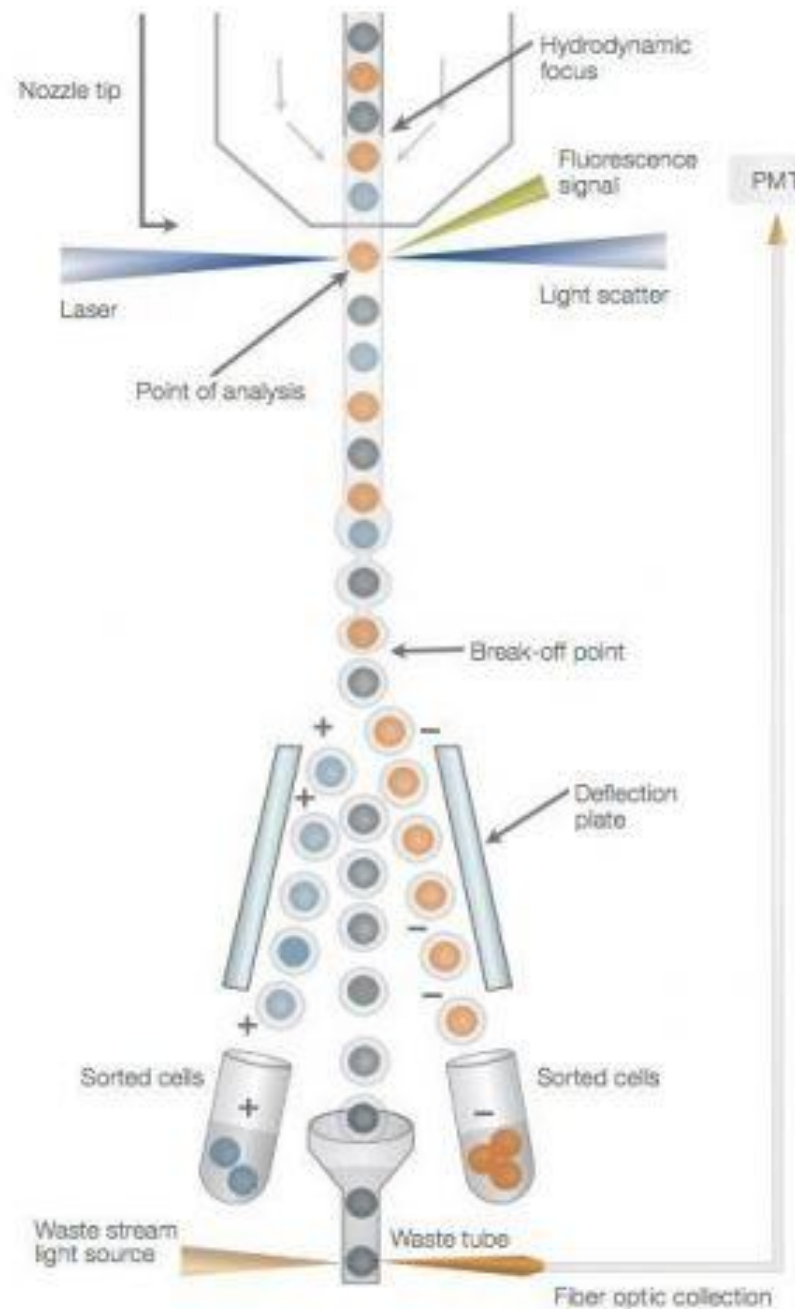
Клеточный сортер



Процесс разделения клеток происходит следующим образом:

Заранее изготовленную суспензию клеток помещают в пробоотборник, после чего по системе трубочек суспензия перемещается в центральную кювету прибора. Далее с помощью тонкой иглы суспензия впрыскивается в постоянно текущую струю омывающей жидкости. Специальный носик «дробит» струю таким образом, что в каждой капле находится ровно по одной клетке. На определенном участке пути установлен лазер, просвечивающий пролетающие мимо клетки. Свет лазера, слегка измененный клеткой, через которую он прошел, попадает на детектор, который регистрирует его параметры. Другой существенной частью прибора является камера, изображение с которой выводится на управляющий монитор, настроенная так, что с помощью нее прибор «знает» о положении каждой отдельной клетки, прошедшей лазер.

- Само разделение клеток проводится с помощью двух металлических пластин под напряжением в 4000 вольт, между которыми пролетают капли. В зависимости от «решения» прибора капля предварительно заряжается. Заряженная капля, пролетая между пластинами, отклоняется в ту или иную сторону в зависимости от заряда.
- Максимальная скорость такой сортировки – 20000 клеток в секунду.



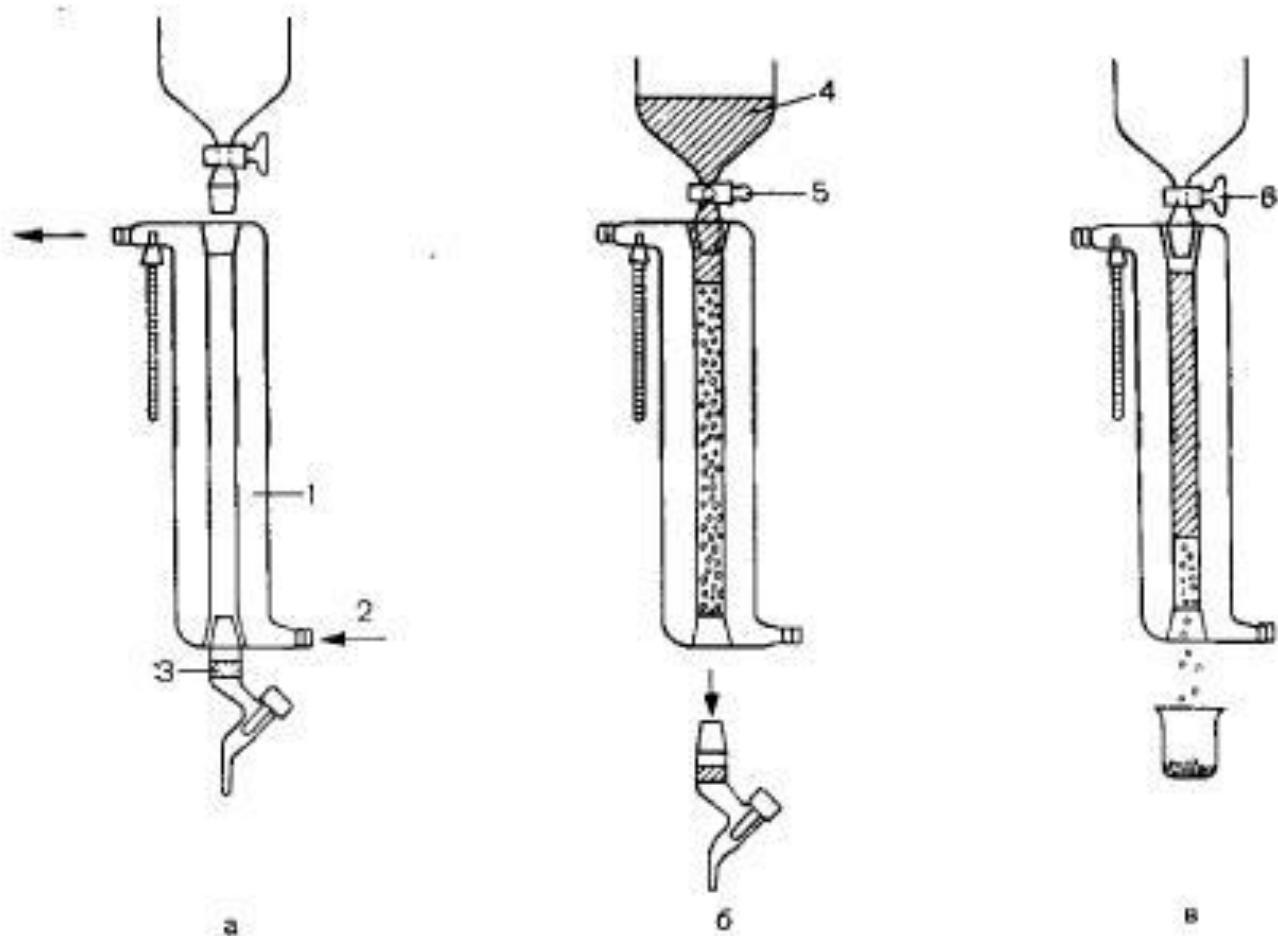
Разделение клеток при помощи адгезии.

Фагоцитирующие клетки, в том числе и часть лимфоцитов, имеют тенденцию к адгезии на твердых поверхностях.

Различают две формы адгезии:

- У фагоцитов это активный процесс, зависящий от интенсивности метаболизма и от температуры. Эти клетки могут быть отделены от твердой фазы при помощи сред, не содержащих Ca^{2+} и Mg^{2+} или содержащих ЭДТА.
- Адгезия лимфоцитов не зависит от температуры и наличия ЭДТА, но подвержена влиянию концентрации белка в среде.

Для разделения клеток в настоящее время используют стеклянные и плексигласовые гранулы, сефадекс и нейлон.



1 — охлаждающая рубашка; 2 — термостат; 3 — марля; 4 — среда; 5 — кран закрыт; 6 — кран открыт

Разделение клеток на нейлоновых волокнах

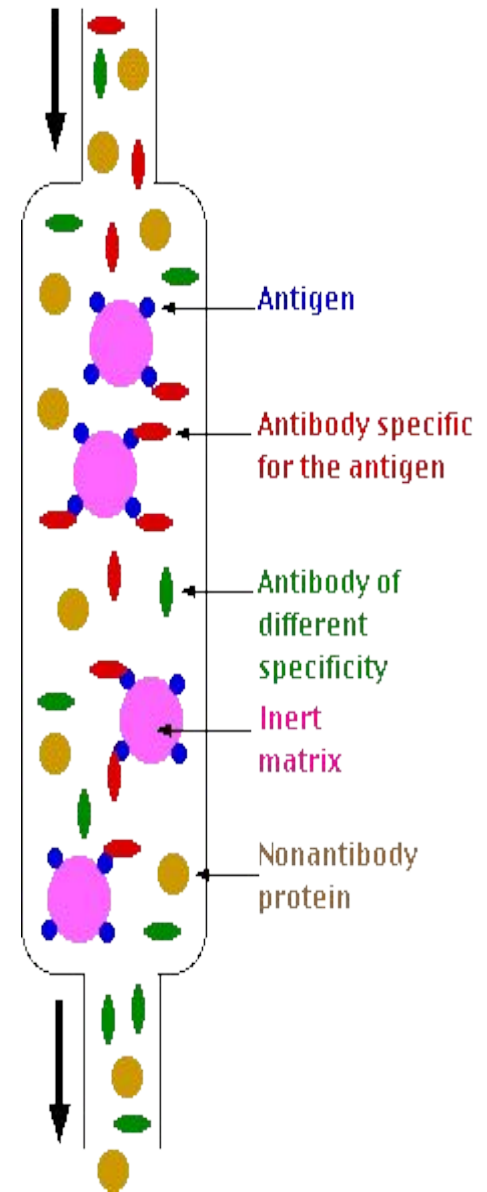
Фракционирование на нейлоновой вате представляет собой простой и быстрый метод разделения Т- и В-лимфоцитов. Это наиболее часто применяемый метод.

Данные о степени чистоты получаемых клеточных популяций варьируют у различных авторов. На адгезирующие спленоциты мыши после 1-кратного пропускания через колонку приходится еще 10—20% В-лимфоцитов. На колонке преимущественно задерживаются антителообразующие клетки и фагоцитирующие клетки, однако в виде примеси присутствует 10—20% Т-лимфоцитов.

В обеих фракциях выход составляет не более 25—50% от исходного числа клеток.

Элиминация Ig-положительных клеток из лимфоцитов крови человека составляет также около 50%. Различия в эффективности разделения могут быть обусловлены также свойствами разделяющих материалов.

- Аффинная хроматография – метод разделения и очистки высокомолекулярных биологических соединений, основанный на уникальном свойстве макромолекул – их биологической специфичности. Именно благодаря этой особенности данным методом можно теоретически получить абсолютно чистые вещества в отличие от других хроматографических методов разделения, основанных на физико-химических свойствах макромолекул, которые у отдельных молекул могут быть практически одинаковы. Биоспецифическое взаимодействие отличается исключительной избирательностью, а зачастую и очень высокой степенью сродства между партнерами.



Разделение клеток на аффинных колонках

Аффинная сепарация основана на избирательной сорбции клеток различных субпопуляций носителями, содержащими вещества, к которым клетки данной субпопуляции имеют высокое сродство.

Связывание может быть обратимым или необратимым.

Специфически реагирующими компонентами клеточной мембраны могут служить мембранные Ig, а также рецепторы комплемента (C3), Fc-фрагмент антител, антигены, лектины, гистамин.

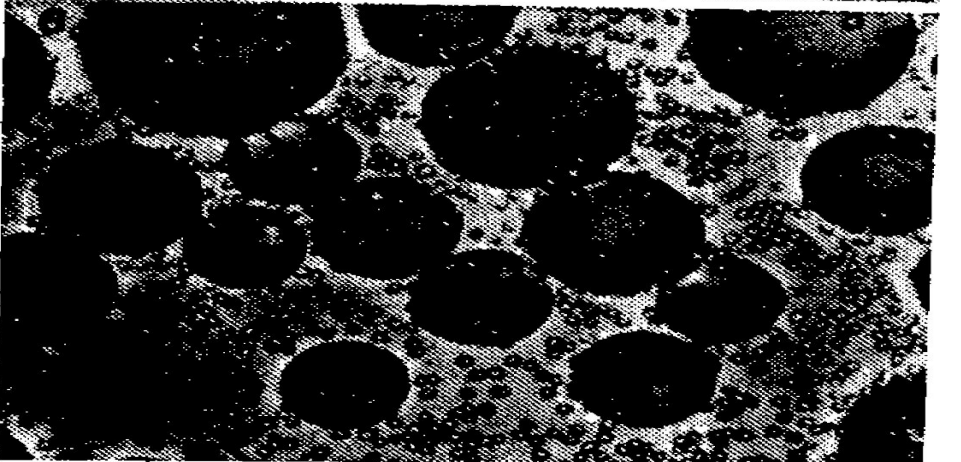
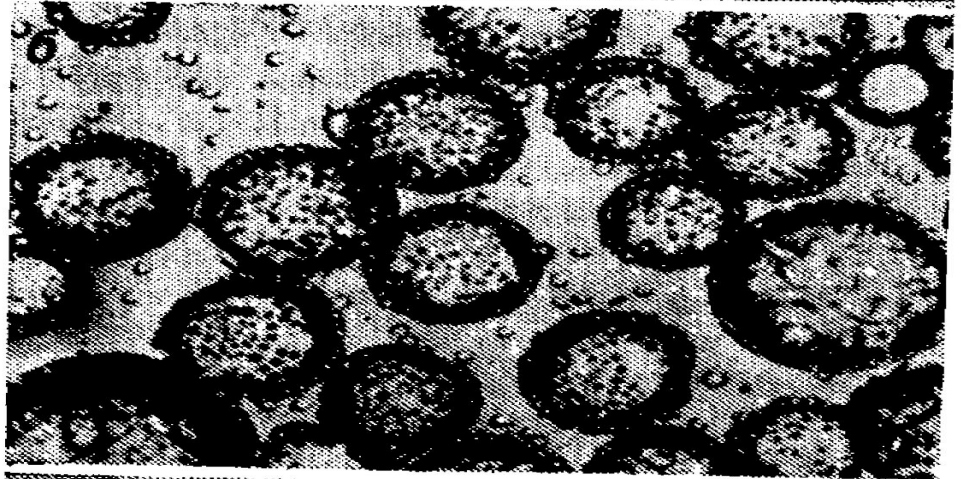
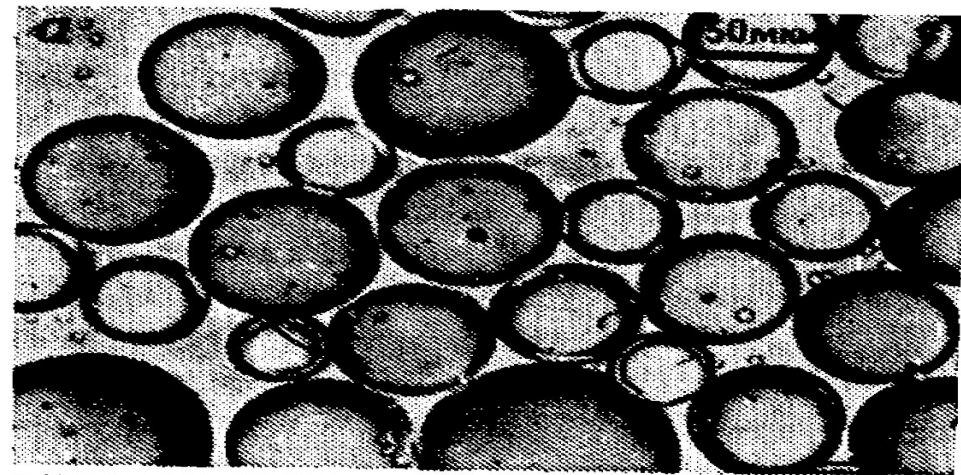
В качестве носителя для антигенов, антииммуноглобулина или комплексов антиген-антитело служат материалы со слабым неспецифическим связыванием. К этим материалам относятся гранулы из сыворотки телят, сефадекс, сефароза, биогель (полиакриламид) и сферой (гидроксиалкилметакрилатный гель).

В зависимости от условий опыта связывающая способность биогеля колебалась от 40% до 0.

Оценка метода:

Степень чистоты выделенных Т- или В-лимфоцитов достигает почти 100%, т. е. она выше или равна той, которую удастся получить при помощи нагруженных стеклянных гранул или дегалана. Это существенное преимущество уравнивает недостаток, обусловленный сложной процедурой разделения. Неспецифическое селективное связывание антителообразующих клеток с сефадексом, белковыми гранулами или сефарозой не может быть полностью исключено. Кроме этого, уменьшение потерь клеток, достигаемое ЭДТА, не селективно в отношении Т- или В-лимфоцитов.

Методы разделения на колонках обладают еще и тем преимуществом, что их легче стандартизировать в отличие от методов разделения в чашках Петри, пробирках и пр., так как в последнем случае более или менее сильное встряхивание может стать причиной расхождения результатов. Кроме того, следует отдавать предпочтение методам, которые не вызывают стимуляции клеток. Вышеописанные методы в этом смысле пригодны для получения Т-лимфоцитов, так как элюируемые В-лимфоциты нельзя рассматривать как нестимулированные



Спасибо за внимание!!!