

Metoda: Imunomagnetická separace buněk

Michaela Klozová, Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví, 2. ročník

Školitelé: Mgr. Diana Macečková, Mgr. Robin Klieber

Princip:

Existují dva základní typy imunomagnetické separace. Prvním z nich je takzvaná pozitivní selekce. Během této selekce označíme v sérii kroků požadované buňky, které chceme izolovat a ty se zachytí na rozdíl od ostatních buněk, které filtrem volně projdou. Opakem této selekce je selekce negativní, kdy se použije frakce, která nebyla označena protilátkou. Tento postup se jeví jako vhodnější, protože na rozdíl od pozitivní selekce nejsou buňky nijak ovlivněny separační technikou. Navázaná selekční buňka totiž může měnit funkční vlastnosti buněk.

Princip obou technik selekce vycházejí ze společného základu. Použijí se magnetické partikule, které jsou potaženy požadovanou protilátkou. Po inkubaci buněčné populace s příslušnými partikulami jsou umístěny do magnetického pole, ve kterém jsou zachytí buňky s navázanou protilátkou. Z hlediska časové náročnosti patří imunomagnetická separace mezi rychlé metody. Většinou se pohybujeme v časovém horizontu dvou hodin. Délka procesu samozřejmě závisí na typu kytu a na buněčném typu. Konečná čistota buněčné frakce je vysoká a většinou přesahuje devadesát procent.

Uplatnění metody:

Tato metoda se používá k vyšetření složek buněčné imunity. Tento typ separace funguje díky expresi různých povrchových antigenů. Může být tak použita pro izolaci jakékoli buňky. Jediným limitem jsou tady protilátky (specifita a dostupnost). Tímto způsobem můžeme vyselektovat jakoukoliv buňku v případě, že dokážeme najít vhodnou protilátku. Existuje tu řada výrobců, kteří se specializují na výrobu setů pro imunomagnetickou separaci. V současné době se již tato metoda rozšiřuje do rutinní praxe. Někteří výrobci nabízejí i velkokapacitní zařízení pro separaci velkého množství buněk pro klinické využití. Nyní můžeme například izolovat hematopoetické kmenové buňky na základě exprese molekuly CD34 nebo například můžeme také izolovat jednotlivé lymfocytární populace (CD4+, CD8+ lymfocyty T, lymfocyty B nebo monocyty).

Úskalí metody:

U této metody je naprosto klíčové dodržovat všechny postupy dodané konkrétním výrobcem. Stejně kity od různých výrobců se mohou lišit. Mohou se lišit například z hlediska času inkubace, množstvím buněk v reakci nebo množstvím protilátky potřebné k jejich označení. Velmi důležité je tu i dodržování teploty, většina celého procesu by měla probíhat při teplotě 4 °C a to z důvodu zabránění vazbě monoklonální protilátky na jiné buněčné populace. Abychom se ujistili, že selekce proběhla správně můžeme k ověření využít průtokový cytometr.

Přístrojové vybavení:

Základním vybavením, když pomineme to nejzákladnější vybavení jako jsou například pipety je určitě laminační box, ve kterém probíhá velká část celého procesu. Další nedílnou součástí je separátor, do kterého umístíme kolonku s buněčnou populací a označenými partikulami. V neposlední řadě potřebujeme i centrifugu, ale ta patří do základní výbavy snad každé větší laboratoře.

Odběr a transport:

Vzorek podléhá běžné manipulaci. Nejsou třeba zajistit zvláštní podmínky přepravy. Používat se mohou i zmražené vzorky v případě, že se pozvolna vytemperují na požadovanou teplotu.