

Esercitazione di Patologia Molecolare e Immunopatologia

A.A. 2025/2026

Stratificazione di campione di sangue umano

Il sangue intero viene prelevato da pazienti con patologie autoimmuni reumatiche nel reparto di Reumatologia del Policlinico Umberto I e viene inserito in provette con anticoagulante.

In seguito, il sangue contenuto nelle provette viene versato in una falcon 50 sotto cappa biologica e diluito in Phosphate Buffered Saline (PBS 1x) in modo da raddoppiare il volume del sangue (rapporto 1:1).

Il sangue diluito viene stratificato in un rapporto 3:1 con il Lympholyte Cell Separation Media es. 30 ml di sangue diluito + 10 ml di Lympholyte che è composto da:

- Un polisaccaride non ionico che aiuta a creare il gradiente di densità necessario per la separazione cellulare.
- Diatrizoato di sodio, un agente di contrasto iodato che contribuisce alla densità della soluzione, permettendo così di differenziare le cellule in base al loro peso.

Con estrema cautela facciamo scendere il sangue sulla soluzione di Lympholyte evitando che le due fasi si mescolino (vedi filmato).

La falcon con il sangue e il Lympholyte viene centrifugata a 1800 rpm per 30 minuti, impostando un programma che tolga il freno e l'acceleratore alla centrifuga.

Si ottiene una stratificazione come quella in figura in cui la parte gialla in alto è il plasma, alla cui base c'è l'anello di PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell), la parte trasparente è il Lympholyte e sul fondo si raccolgono gli eritrociti e i granulociti più densi.



Isolamento delle cellule mononucleari del sangue periferico mediante gradiente di Ficoll

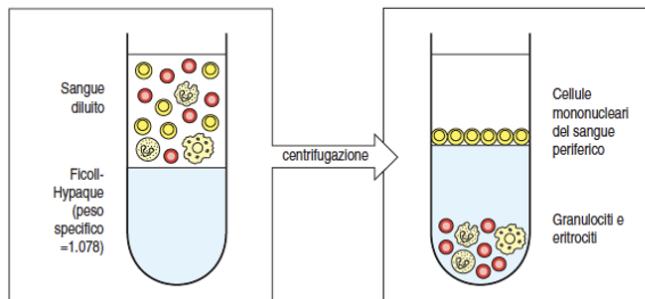
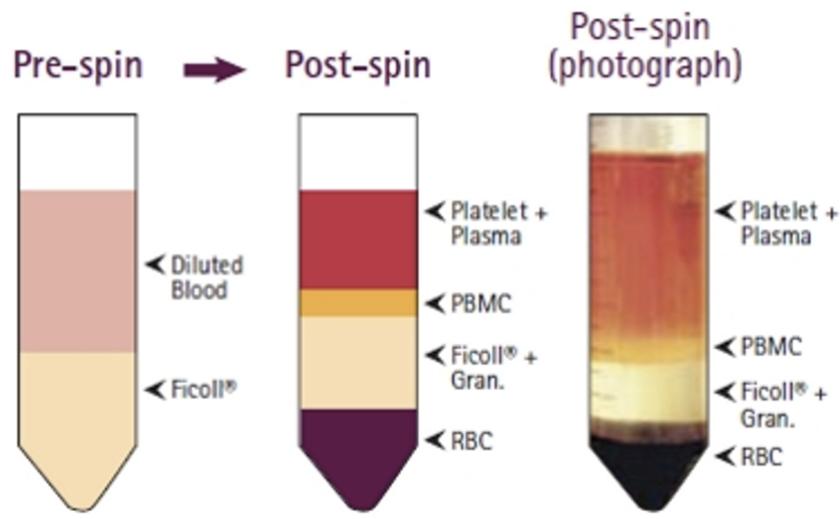


Fig. A.23 Le cellule mononucleari del sangue periferico possono essere isolate tramite centrifugazione con gradiente Ficoll-Hypaque™. Il sangue diluito anticoagulato (riquadro di sinistra), viene stratificato con Ficoll-Hypaque™ e poi centrifugato. Gli eritrociti e i leucociti polimorfonucleari o granulociti sono più densi e passano attraverso il gradiente Ficoll-Hypaque™, mentre le cellule mononucleari, principalmente linfociti e alcuni monociti, formano uno strato sopra il Ficoll-Hypaque™ e possono così essere recuperate (riquadro di destra).

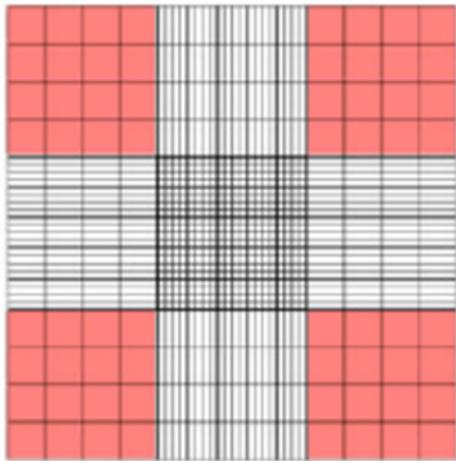


Estrazione dei PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell)

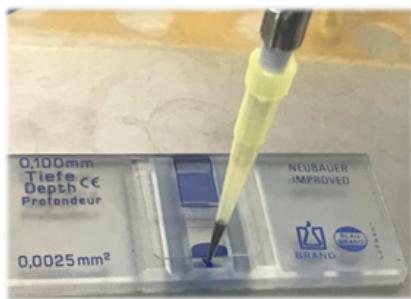
Con una pipetta sierologica da 2 ml aspiriamo con molta precisione l'anello di PBMC, cercando di non prelevare anche il Lymphocyte, e lo diluiamo con PBS 1x fino ad un volume di 40 ml in una falcon 50 per contare le cellule.

Conta cellulare con camera di Neubauer

La camera di Neubauer è composta da 4 quadranti grandi (in rosso), ognuno dei quali formato da ulteriori 16 quadrati più piccoli.



La conta delle cellule viene effettuata con l'uso del Trypan Blue, un colorante vitale che colora solo le cellule morte che andranno escluse dalla conta. Il volume di Trypan da aggiungere ad ogni sospensione cellulare è di 1:1 (generalmente prendiamo 10 μ l di cellule e 10 μ l di Trypan). Si contano le cellule vive (quelle non blu) contenute nei 4 quadrati grandi. Il numero delle cellule totali sarà diviso per 4 e moltiplicato per 2. Il numero delle cellule sarà moltiplicato per 10^4 per ottenere il numero di cellule per ml.



NB. se la sospensione cellulare è molto concentrata possiamo fare delle diluizioni.

Esempio: Contiamo nei 4 quadranti in totale 24 cellule

$$N^{\circ} \text{ cells/ml} = (24/4) \times 2 \times 10^4 = 12 \times 10^4/\text{ml}$$

Staining per analisi della componente linfocitaria dei PBMC

Preleviamo 100.000 cellule dai PBMC totali li poniamo in una eppendorf e analizziamo la componente linfocitaria mediante colorazione con gli anticorpi anti-CD3+ APC, anti-CD4+ PE e anti-

CD8+ FITC e in un'altra provetta trasferiamo altre 100.000 cellule per il controllo negativo fatto con gli anticorpi di controllo dell'isotipo coniugati con gli stessi fluorocromi.

Una volta contate le cellule, calcoliamo il volume da prelevare per lo staining.

Per l'esperimento ho bisogno di 2 condizioni da 100.000 cellule ciascuna.

Quanti μ l devo pescare dal volume iniziale per avere 100.000 cellule?

Trasferiamo 100.000 cellule in due eppendorf diverse e le centrifughiamo a 3000 rpm per 5 minuti per pellettarle. Successivamente rimuoviamo il surnatante ed al pellet di un'eppendorf aggiungiamo 2 μ l di Abs (anticorpi) anti-CD3+; 2 μ l di Ab anti-CD4+ e 2 μ l di Ab anti-CD8+. Per il campione di controllo aggiungiamo al pellet 2 μ l di Ab isotipo di controllo per anti-CD3+, 2 μ l per anti-CD4+ e 2 μ l per anti-CD8+. Lasciamo le nostre provette in ghiaccio per 30 minuti prima di proseguire all'analisi citofluorimetrica.

Purificazione dei linfociti T CD8+ da PBMCs con separazione magnetica

I linfociti T CD8+ sono purificati tramite deplezione negativa, usando prima un cocktail di anticorpi monoclonali che si legano in modo specifico a CD4, CD15, CD16, CD19, CD34, CD36, CD123, TCR γ/δ , CD235a (Glicoforina A), CD14, CD61 e successivamente incubando le cellule con delle biglie magnetiche.

Le cellule vengono risospese in un Buffer (2mM EDTA, 0.5% BSA, PBS a volume), incubate con il cocktail di anticorpi per 5 minuti a +4°C.

Successivamente si aggiunge dell'altro buffer e le MicroBeads. Si risospende con la micropipetta la soluzione e si incubano le cellule per 10 minuti a +4°C.

Per la separazione magnetica, posizioniamo la colonna LS nel magnete di un MACS separator. Prepariamo la colonna sciacquandola con il buffer (scartarlo), applichiamo la soluzione cellulare alla colonna e recuperiamo quello che scende (in questo caso i nostri linfociti T CD8+). Poi laviamo la colonna nuovamente con in buffer e recuperiamo il buffer che potrebbe contenere un'altra piccola percentuale di linfociti T CD8+.

Procedere contando i linfociti T CD8+.

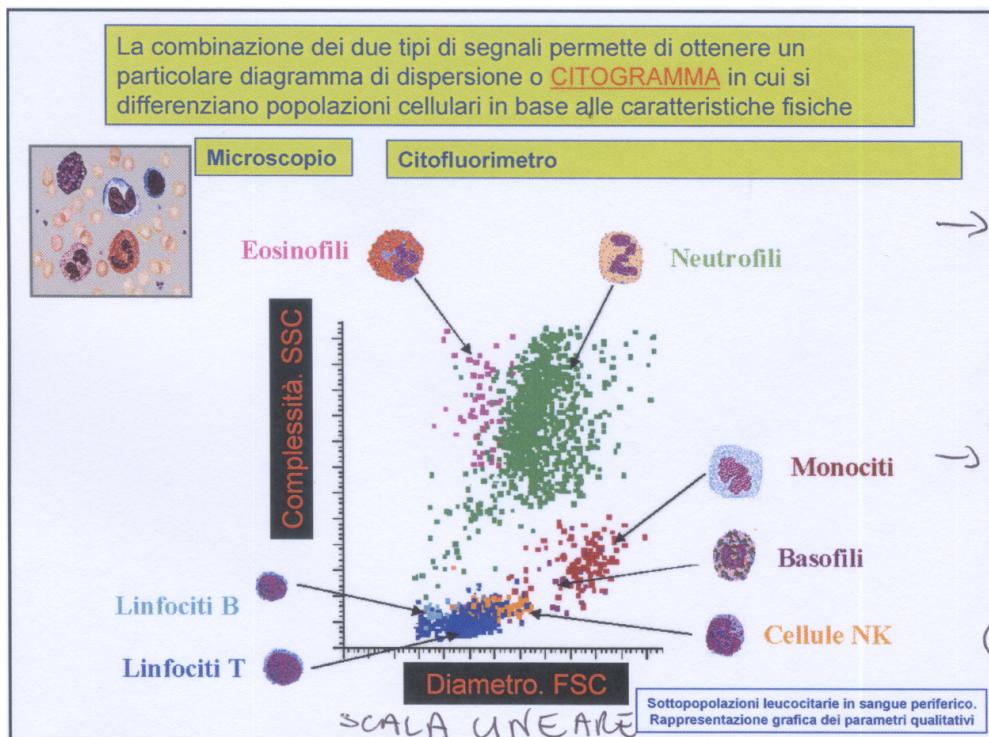
Lettura al citofluotimetro FACS Calibur



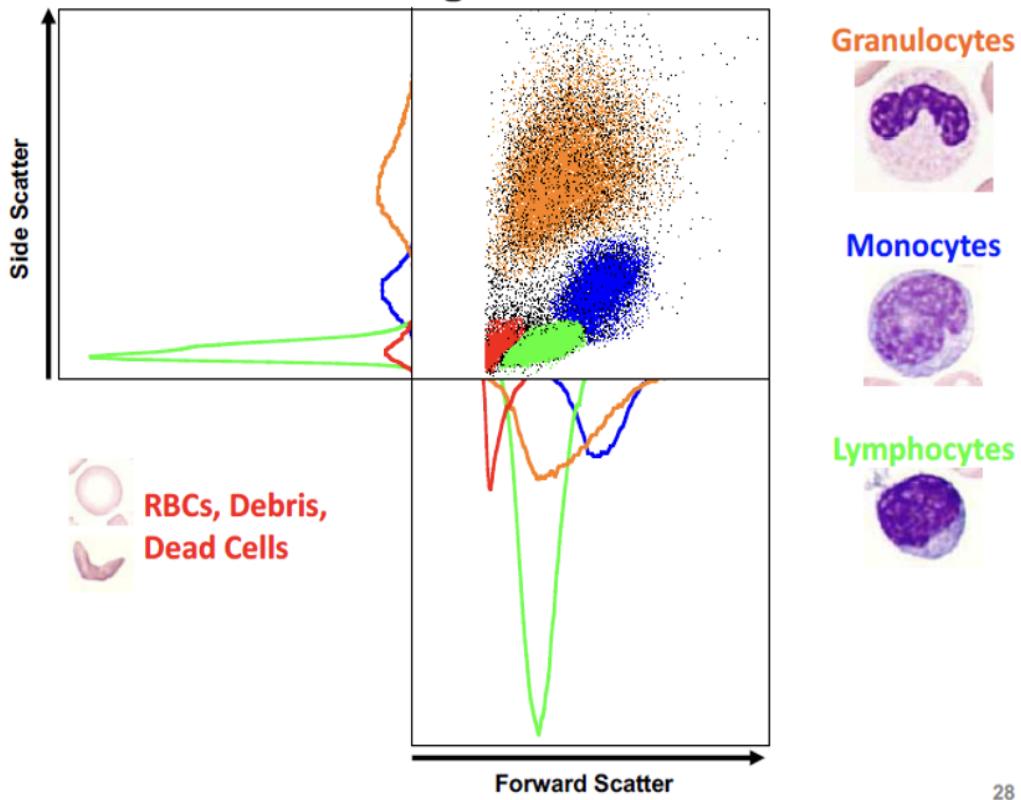
I campioni vengono poi letti al citofluorimetro sulla base dei parametri fisici (Dimensioni: Forward Scatter o FSC, luce diretta; Complessità Interna o Granulosità: Side Scatter o SSC, luce a 90°) e della fluorescenza.

Immagine rappresentativa di un Citogramma: trasposizione cartesiana di due istogrammi.

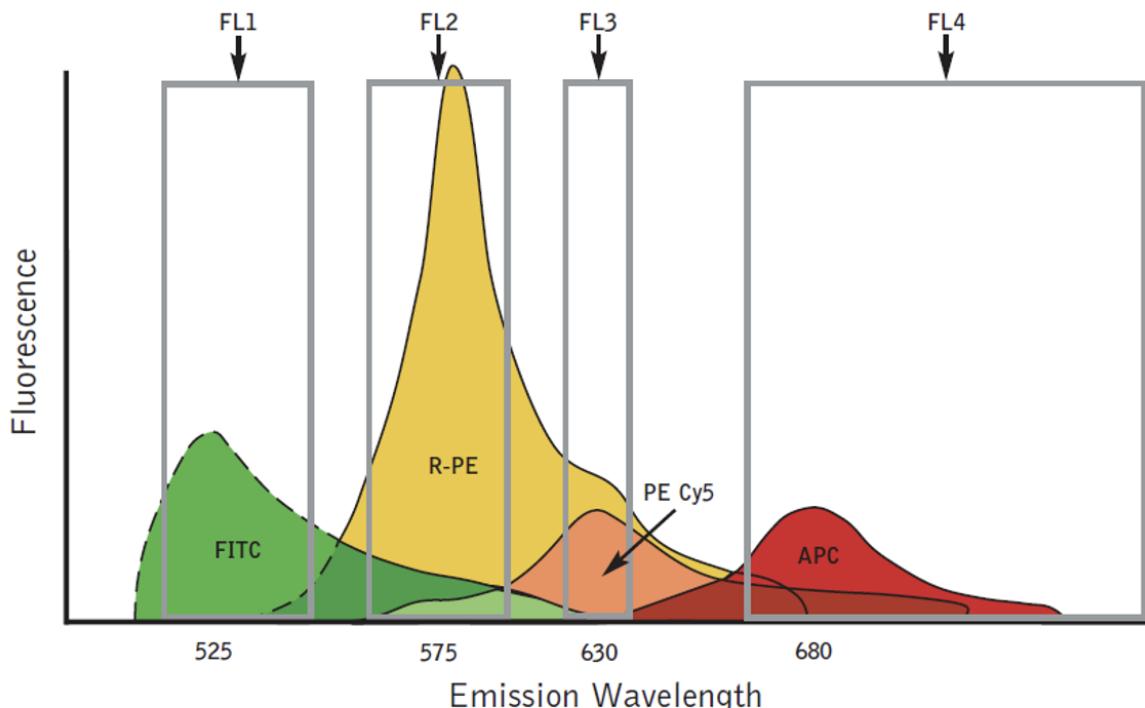
Sottopopolazioni leucocitarie del sangue periferico



Citogramma: trasposizione cartesiana di due istogrammi



Spettro di emissione dei diversi fluorocromi



A variety of different fluorochromes may be used for multi-color, immunofluorescence analysis of several cell bound antibodies or entities. The gray bands represent the wavelength range detected by the flow cytometer channels (the filter path bands, FL1, FL2 etc.). Fluorescence from **FITC (green)** is measured in the FL1 channel (525 nm) and **R-PE (orange)** fluorescence is detected in the FL2 channel (575 nm). Due to the overlap of the emission spectra, some green fluorescence from the FITC molecule will be detected by the FL2 channel and some orange fluorescence from R-PE will be detected by the FL1 channel. If the overlap is not corrected by compensation, the data will include the signal from each of the fluorochromes that has been detected by the inappropriate detector. This could lead to incorrect analysis of results due to the presence of false-positive cell populations.