

INSTRUCCIÓN TÉCNICA

Título	Extracción Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMCs)					
Código	IT/002			Entrada en vigor		25/01/2024
Revisión	Realizado	Fecha	Revisado	Fecha	Aprobado	Fecha
6	ASL	24/01/2024	EGMS	24/01/2024	TEM	24/01/2024

La obtención de **PBMCs** se realiza a partir de sangre recolectada en tubos con EDTA o Heparina.

1. Preparación de muestras

- Centrifugar el tubo a 1500g 15 minutos.
- Separar el plasma sobrenadante.
- Diluir la capa blanca y el excedente de sangre en **medio completo** (RPMI con 1 % antibiótico (AB: penicilina/estreptomicina), 1 % L-Glutamina, 1 % HEPES) hasta un volumen máximo de 7ml.
- Para evitar la agregación de las PBMCs, la sangre diluida debe permanecer en agitación suave (*roller*) por lo menos 1 h.

2. Extracción de PBMCs con Histopaque (con membrana)

- Añadir 3 ml de Histopaque a un tubo con membrana (tipo Leucosep™) y centrifugar 5 minutos a 500g.
- En el tubo preparado según el punto anterior, añadir los 7ml de la capa blanca diluida en **medio completo**.
- Centrifugar a 800g 20 minutos SIN FRENO.
- Con ayuda de una pipeta pasteur y con cuidado de no mezclar las fases formadas tras la centrifugación extraer el halo de aspecto blanco donde se encuentran las PBMCs. Transferir a un tubo estéril y completar hasta 10ml con **medio completo**.
- Centrifugar el tubo a 500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente (RT) y con freno 9.
- Se elimina el sobrenadante decantando los tubos con cuidado de no romper el botón celular. Se resuspende el botón celular en 2 ml de **medio completo** para realizar el conteo. Pasar 50ml de la suspensión celular aun eppendorf de 0,75ml para el conteo. (Ver punto 4. Contaje de células).
- Centrifugar el tubo a 500 g durante 10 minutos a RT y deceleración 9.

- Se elimina el sobrenadante decantando los tubos con cuidado de no romper el botón celular y se resuspenden las células a la concentración deseada.
 - Para cultivo, resuspender las células en 90 % medio completo+ 10 % SBF.
 - Para congelar, resuspender las células en 50% SBF + 50% medio de congelación (SBF + 15% DMSO). Idealmente, la concentración de células debe ser entre 7-20x10⁶celulas; siendo el estándar de congelación 10x10⁶celulas.

3. Extracción de linfocitos con Histopaque SIN MEMBRANA. Para muestras pediátricas o de aquellas de las que disponemos de poco volumen de sangre (inferior a 3 ml)

- Se añade 3 ml de histopaque a un tubo de 10 mL. Con ayuda de una pipeta pasteur estéril, dejar caer en el tubo los 7 mL de sangre diluida en medio completo. NO SE PUEDE MEZCLAR LA SANGRE DILUIDA CON EL HISTOPAQUE.
- Centrifugar a 800g durante 20 minutos a RT y deceleración 0.
- Con ayuda de una pipeta pasteur y con cuidado de no mezclar las fases formadas tras la centrifugación se extrae el halo de aspecto blanco donde se encuentran las PBMCs. Para su lavado, se transfieren a un nuevo tubo estéril de 15 ml completando el volumen con medio completo hasta 10ml.
- Centrifugar el tubo a 500g durante 10 minutos a RT y deceleración 9.
- Se elimina el sobrenadante decantando los tubos con cuidado de no romper el botón celular. Se resuspende el botón celular en 2 ml de medio completo para realizar el contaje, separar 50 ml de la suspensión celular en un tubo eppendorf de 0,75 ml y realizar el contaje según el punto 4.
- Centrifugar el tubo a 500g durante 10 minutos a RT y deceleración 9.
- Se elimina el sobrenadante decantando los tubos con cuidado de no romper el botón celular y se resuspenden las células a la concentración deseada:
 - Para cultivo, resuspender las células en 90 % medio completo+ 10 % SBF.
 - Para congelar, resuspender las células en 50% SBF + 50% medio de congelación (SBF + 15% DMSO). Idealmente, la concentración de células debe ser entre 7-20x10⁶celulas; siendo el estándar de congelación 10x10⁶celulas.

4. Contaje de células

Equipo: Contador de células automatizado ADAM™ MC (NanoEn Tek Inc.)

Kit para contaje: kit AccuChip; Staining method - Acridine Orange (AO) for high concentration (NanoEn Tek Inc.)

- Añadir 200 ml de medio completo obteniendo un volumen final de 250 ml.
- Contaje de células totales: añadir 50 µl de AccuStain Solution T, resuspender y cargar 12 µl en el AccuChip 4X (canal T) evitando la formación de burbujas.

- Contaje de células no viables: añadir 50 µl de AccuStain Solution N, resuspender y cargar 12 µl en el AccuChip 4X (canal N) evitando la formación de burbujas.
- Insertar el chip en el contador y leer el resultado.
- Multiplicar x20 para obtener el número de células vivas total.

5. Descongelación de células

- Descongelar el vial de células en el baño a 37°C durante un minuto.
- Resuspender inmediatamente las células en un falcon con 10ml de medio de cultivo completo para diluir el DMSO (tóxico para las células).
- Centrifugar el tubo a 500g durante 10 minutos a 4°C.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 2ml de medio de cultivo completo.