

PBMC (Peripheral blood mononuclear cell) isolation protocol

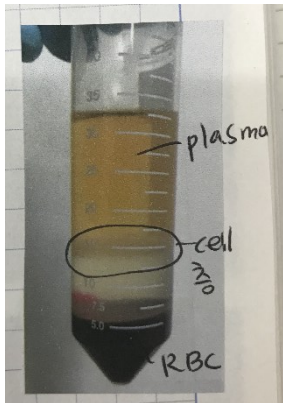
2021/06/10 권정원 업데이트

*혈액을 준비한다.

< PBMC isolation >

1. Blood tube에 알코올을 충분히 뿌려 컨텀 방지 후 pbs: blood = 1:1 로 섞는다.
2. ficol (원액): blood = 1:2 로 ficol 를 blood 위에 조심스럽게 얹는다.
3. 700g, 25°C, accel 5, decel:0 으로 20분 centri.
4. Centri 후 가운데 plasma와 ficol 가운데 층을 transfer pipette으로 떠낸다. (아래 그림 참조)

(transfer pipette도 미리 uv 소독후 사용하여 컨텀을 막음)



5. PBS 로 50ml tube을 가득 채워서 1800rpm, 25°C accel:9, decel:9 으로 10분 centri. (ficol washing)
6. Plain RPMI 로 10ml suspension 후 cell counting. (monocyte 가 벽에 붙으므로 media 로 잘 suspension 해야함)

< Monocyte isolation >

*MACS buffer 조성: 0.5% BSA, 2mM EDTA in TBS, pH 7.2 (filtering)

1. Buffer 30 μ l/10⁷ cells 로 suspension 한다.

2. Fc gamma receptor blocking reagent 10 μ l/10⁷ cells
3. Biotin-antibody cocktail 10 μ l/10⁷ cells 로 넣고 4 $^{\circ}$ C, 10분 incubation 시킨다.
4. Buffer 180 μ l 넣는다.
5. Anti-Biotin microbeads 20 μ l/10⁷ cells 넣고 4 $^{\circ}$ C, 15분 incubation 시킨다.
6. Buffer 10ml 넣고 1800rpm, 5분 centri.
7. Buffer 500 μ l/10⁸ cells 넣고 suspension.
8. Rinse MS: 500 μ l, LS: 3ml x 3번씩 한다.
9. MACS column 을 이용해서 separation 시킨다. (MS: total 2x10⁸ cells, LS: 2x10⁹ cells)
10. Washing MS: 500 μ l, LS: 3ml x 3번씩 한다.