

FICOLL PROTOCOL FOR WBC EXTRACTION

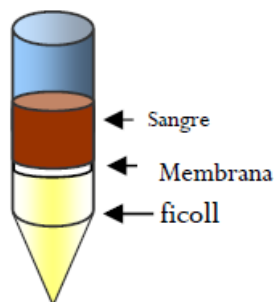
1 Obtaining MONONUCLEAR cells of peripheral blood with LEUCOSEP tube

Optional: put together the content of all them tubes of extraction of blood in a single tube falcon of 50 ml to homogenize the blood.

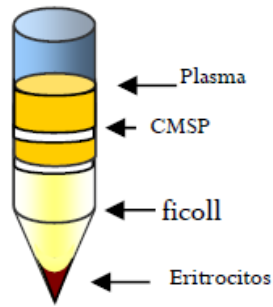
1. Add 3,2 ml of Ficoll to each labeled tube Leucosep 10 ml (empty tubes). It depends of the volume of LEUSEP tube. The ficoll must reach the filter.



2. Centrifuge the Leucosep tube containing the ficoll to 1000xg for 1 min. Remove the excess Ficoll with pipette or decantation.
3. Centrifuge tubes of blood at 1500 g for 15 min
4. Vacuum plasma without catch mononuclear cells that form a white layer above the erythrocytes and granulocytes and discard.
5. Sucking 2 ml of the mononuclear cell layer and put it in a tube falcon 15 ml containing 4 ml of PBS. Invert the tube to mix the solution well.
6. Add the layer of mononuclear cells with PBS or blood to the Leucosep tube of point 1.



7. Centrifuge tubes to 800 g for 15-30 min. to 18-25 ° C without brake

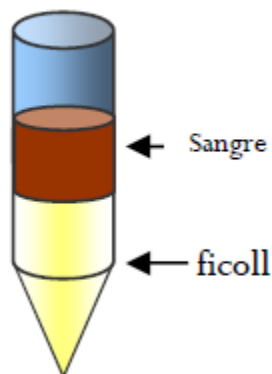


From here continue at point 3.1

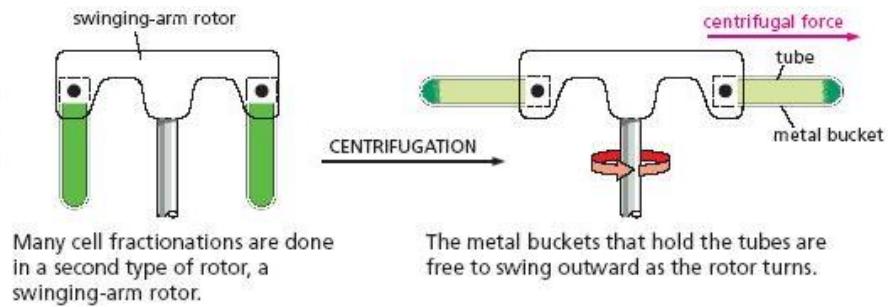
2 Obtaining MONONUCLEAR cells of peripheral blood without LEUCOSEP tube

Optional: Gather the contents of all the tubes of blood in a single 50ml falcon tube to mix the blood.

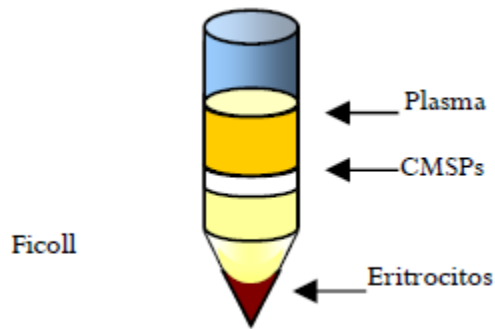
1. Add a volume of Ficoll for each two volumes of blood (Ficoll: blood 1:2)
2. Centrifuge tubes of blood to 1500g for 15 min.
3. Vacuum plasma without catch mononuclear cells that form a white layer above the erythrocytes and granulocytes and discard. Add PBS in amount equal to the withdrawn plasma volume.
4. Mix the blood with the PBS and pass to the next step.
5. Sucking 2 ml of the mononuclear cell layer, pour it into a Falcon 15 ml tube containing 4 ml of PBS. Invert the tube to mix the solution well.
6. Add the layer of mononuclear cells with PBS or as horizontal as possible (drop to drop in the wall of the tube, slowly), the blood on the ficoll with tube so the ficoll and blood do not mix.



7. Centrifuge the tube at 500 g for 10 min at 18-25 ° C without brake. (type of rotor: swing-arm rotor)



Web to calculate your RPM/G-force (<http://www.endmemo.com/bio/grpm.php>)



From here continue at point 3.1

3. Obtaining of MONONUCLEAR cells from peripheral blood

1. Remove the White halo of CMSPs carefully with a Pasteur pipette and transfer to a sterile tube. Make up the volume with PBS.
2. Centrifuge the tube at 500 g for 10 min at 18-25 ° c
3. Remove tubes supernatant by decantation taking care not to break the cell button. Resuspend the pellet in PBS.
4. Extract a sample of 10-25 µl and carry out a count.
5. Centrifuge the tube at 500 g for 10 min at 18-25 ° c
6. Discard the supernatant and resuspend the pellet in half-full:
 - For cultivation (RPMI + 10% FBS)
 - To freeze (SBF+7, 5 - 10% DMSO)
7. Perform the appropriate dilution to get a desired concentration:
 - For freezing 7 - 15 x 10⁶ cel. ml.
8. freeze or put into cultivation.

FICOLL PROTOCOL FOR WBC EXTRACTION(Spanish)

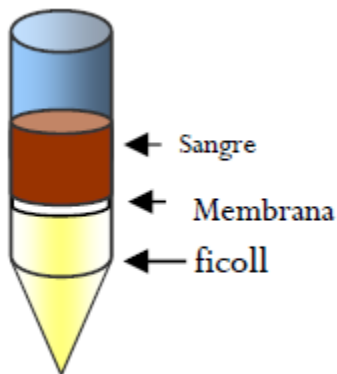
1. *OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA EMPLEANDO TUBOS LEUCOSEP*

Opcional: Juntar el contenido de todos los tubos de extracción de sangre en un único tubo falcon de 50ml para homogeneizar la sangre.

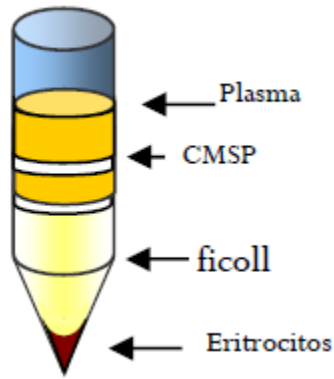
1. Añadir 3,2 ml de Ficoll a cada tubo etiquetado Leucosep (tubos vacíos). Depende del volumen del tubo Leusep. El ficoll debe alcanzar el filtro



2. Centrifugar el tubo Leucosep que contiene el ficoll a 1000xg durante 1 min. Retirar el Ficoll sobrante por decantación o con pipeta.
3. Centrifugar los tubos de sangre a 1500g durante 15 min
4. Aspirar el plasma sin coger células mononucleadas que forman una capa blanca por encima de los eritrocitos y granulocitos y descartarlo.
5. Aspirar 2 ml de la capa de células mononucleares y depositarla en un tubo falcon de 15 ml que contenga 4 ml de PBS. Invertir el tubo para mezclar bien la solución.
6. Añadir la capa de células mononucleares con el PBS o la sangre al tubo Leucosep del punto 3.1.



7. Centrifugar los tubos a 800 g durante 15-30 min. a 18-25 °C sin frenos

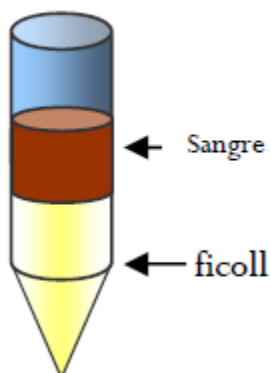


A partir de aquí continuar en el punto 3.1

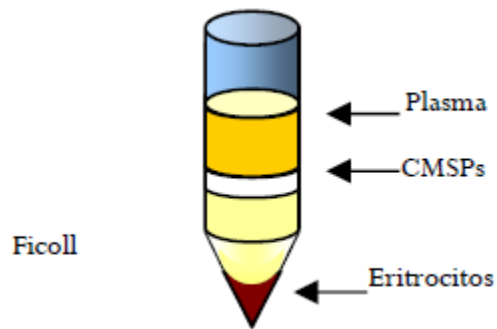
2. *OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA SIN TUBOS LEUCOSEP*

Opcional: Juntar el contenido de todos los tubos de extracción de sangre en un único tubo falcon de 50ml para homogeneizar la sangre.

1. Añadir un volumen de Ficoll por cada dos volúmenes de sangre (Ficoll: Sangre 1:2)
2. Centrifugar los tubos de sangre a 1500g durante 15 min. Opción: homogeneizar la sangre y pasar al punto 6.4.5
3. Aspirar el plasma sin coger células mononucleadas que forman una capa blanca por encima de los eritrocitos y granulocitos y descartarlo o alicuotarlo según el PNT "Obtención de plasma". Opción: añadir PBS en cantidad igual al volumen de plasma retirado.
4. Homogeneizar la sangre con el PBS e ir al siguiente paso.
5. Aspirar 2 ml de la capa de células mononucleares y depositarla en un tubo Falcon de 15 ml que contenga 4 ml de PBS. Invertir el tubo para mezclar bien la solución.
6. Añadir la capa de células mononucleares con el PBS o la sangre sobre el ficoll con el tubo lo más horizontal posible, para que no se mezclen el ficoll y la sangre.



7. Centrifugar el tubo a 500 g durante 10 min. a 18-25 °C sin freno



A partir de aquí continuar en el punto 3.1

8. *OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA*

1. Extraer el halo blanco de CMSPs y transferirlo a un tubo estéril. Completar el volumen con PBS.
2. Centrifugar el tubo a 500 g durante 10 min. a 18-25 °C.
3. Eliminar el sobrenadante de los tubos por decantación procurando no romper el botón celular. Resuspender el pellet obtenido en PBS.
4. Extraer una muestra de 10-25 µl y realizar un conteo.
5. Centrifugar el tubo a 500 g durante 10 min. a 18-25 °C.
6. Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet en medio completo:
Para cultivo (RPMI+ 10 % SBF)
Para congelar (SBF+7,5 - 10 % DMSO)
7. Realizar la dilución oportuna para conseguir una concentración deseada:
Para congelación $7 - 15 \times 10^6$ cel. /ml.
8. Congelar o poner en cultivo.