**Purification des GB**

**Matériel :**

* Tube de sang
* Tube Falcon 15mL
* Cryotube de 1.5 mL
* Pipettes 1mL et 200µL
* Cônes bleus et jaunes
* RPMI Medium
* Ficoll (milieu de séparation des lymphocytes) densité de 1.077

**Protocole :**

* Après centrifugation du sang et prélèvement du plasma, prélever l’anneau de GB (prélever large, avec restes de plasma et GR) et déposer dans falcon 15mL
* Diluer le sang au ½ avec du RPMI, bien mélanger !
* Ajouter 1/3 de Ficoll au volume total (pencher le tube à 45° pour ajouter le Ficoll)
* Centrifuger 10 min à 2000 rpm sans frein et pente douce (2-2)
* Eliminer à l’aide d’une pipette une partie de la phase supérieure
* Récupérer l’anneau blanc de GB (en penchant le tube à 45°, avec le même cône) et le transférer dans un tube de 15mL
* Ajouter environ 4mL de RPMI et mélanger doucement par retournement
* Centrifuger 5 min à 1200 rpm avec frein et pente forte (9-9) 🡪 formation culot !
* Enlever le surnageant en renversant le tube au-dessus d’une poubelle jaune
* Ajouter 1mL de RPMI et mélanger avec la pipette
* Centrifuger 5 min à 1200 rpm avec frein et pente forte (9-9)
* Renverser le tube au-dessus d’une poubelle jaune pour enlever le surnageant (en garder un peu)
* A l’aide d’une pipette, mélanger le reste de RPMI avec le culot de GB et transférer dans un cryotube de 1.5mL
* Conserver à -80°C.