

دستورالعمل آماده سازی نمونه برای جداسازی سلول

روش آماده سازی سلول برای جداسازی:

- سلول های چسبنده (Adherent Cells):
 - ۱- ابتدا محیط رویی را خارج نموده
 - ۲- سلول ها را یکبار با PBS^- شست و شو دهید تا اثر سرم حذف شود.
 - ۳- سلول ها را با یکی از روشهای رایج (تریپسینه کردن، اضافه کردن PBS^- ، به صورت مکانیکی) از ته ظرف کشت جدا کنید.
 - ۴- آنها را با دور rpm ۱۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید و محلول رویی را خارج نمایید
- سلول های شناور (Suspend Cells):

سلول ها را به همراه محیط کشت با دور rpm ۱۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید و محلول رویی را خارج نمایید
- بافت (Tissue):

سلول ها را با Digest کردن (با کمک کلاژنازها یا به صورت مکانیکی یا هر دو روش) بصورت Single cell درآورید

نکته: بهتر است مراحل رنگ آمیزی را در Staining Buffer with DNase انجام دهید

Staining Buffer with DNase

PBS with 1% human serum albumin
100 unit /ml DNase I
1mM MgCl₂

نحوه ی رنگ آمیزی و آماده سازی نمونه ها برای جداسازی سلول:

- ۱- مراحل رنگ آمیزی سلول ها و آماده سازی نمونه های کنترل، همانند آماده سازی نمونه برای تکنیک فلو سایتومتری می باشد) به پروتکل های مربوط در آزمایشگاه مراجعه فرمایید)
- ۲- بعد از زمان انکوباسیون، سلول ها را با PBS^- شست و شو دهید و به ازای هر یک میلیون سلول، نیم میلی لیتر محلول Sorting Buffer به آن اضافه کنید.
- ۳- سوسپانسیون سلولی را از فیلتر (Pre-separation Filter) عبور دهید

نکته ۱: اگر میخواهید بعد از جداسازی، سلول ها را کشت دهید، مراحل رنگ آمیزی و آماده سازی باید زیر هود و در شرایط استریل انجام شود



Sorting Buffer

1× PBS (Phosphate Buffer Saline (Ca / Mg free))

1mM EDTA

25 mM HEPES pH: 7.0

1% FBS or BSA

نکته ۲: در تمامی مراحل سلول ها را روی یخ نگهداری کنید تا احتمال Clamp شدن سلول ها کمتر شده و زنده مانی آنها حفظ شود

نکته ۳: حتما سلول بدون آنتی بادی (unstain control) را به عنوان نمونه ی کنترل به همراه داشته باشید

نکته ۵: Sorting Buffer را در شرایط استریل تهیه نمایید و از فیلتر ۰٫۲ μm عبور دهید. این محیط را میتوانید به مدت یک ماه در دمای یخچال نگهداری کنید

نکته ۶: حتما سلول ها را قبل از رنگ آمیزی شمارش کرده و زنده مانی آن را بررسی نمایید، سلول ها برای جداسازی باید بیش از ۹۰ درصد زنده مانی داشته باشد

جمع آوری سلو لهای در حین جداسازی

به تعداد جمعیت های مورد نظر برای جداسازی (حداکثر ۴ جمعیت) لوله های جمع آوری (۱۵ میلی لیتر، ۷۵×۱۲ میلی متری، ۱٫۵ میلی لیتر) مورد نیاز است که میزان محیط کشت در لوله جمع آوری سلول به میزان سلول اولیه و بیان مارکر مورد بررسی بستگی دارد