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 ۱۵۰۰ rpm 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 ۱۵۰۰ rpm 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 DNase Staining Buffer with 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 فلوسایتومتری 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.

Flow cytometry Lab

۳- سوسپانسیون سلولی را از فیلتر (Pre-separation Filter) عبور دهید

نکته۱ : 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
0.5% BSA

نکته۲ : 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

نکته۵: 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 ی 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

نکته ی ۷: در صورتی کار با سلول های لنفوسیتی، EDTA را حذف نمایید.

نکته ی ۸: بهتر است برای سلول های چسبنده و غیر حساس درصد EDTA را تا 5mµ افزایش دهید

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، ۱۲×۷۵ 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

Flow cytometry Lab