



University of Isfahan
Biological Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
Cellular and Molecular Laboratory
Farzaneh Forouharfar

جداسازی سلول های تک هسته ای لنفوسیت و مونوسیت از خون انسان

مقدمه

با استفاده از تکنیک های جداسازی سلول ها بر اساس شیب غلظت می توان سلول های تک هسته ای خون را از سایر سلول ها جدا نمود و جهت تشخیص برخی از بیماری ها و آزمایشات مختلف مورد شمارش و بررسی قرار داد. در این آزمایش از ماده ای به نام فایکول استفاده می شود که عملکرد آن بر اساس اختلاف غلظت می باشد.

مواد و وسایل مورد نیاز

۱- سرنگ ۵ میلی لیتری

۲- فایکول Ficol

۳- لوله حاوی ضد انعقاد و هپارین

۴- سانتریفیوژ

۵- محلول رقیق کننده هانک

۶- سمپلر



مواد و وسایل مورد نیاز

روش کار

ابتدا حدود ۵ میلی لیتر خون از شخص گرفته و بدون جداسازی به سرعت مورد استفاده قرار گیرد. دمای نمونه خون باید بین ۲۲-۱۵ درجه سانتی گراد باشد و در دمای اتاق نگهداری شود. خون را توسط محلول هانک به نسبت ۱ به ۲ رقیق کنید. این محلول رقیق کننده جهت حفظ و نگهداری سلول های تک هسته ای بسیار مفید است. در یک لوله سانتریفیوژ مدرج حدود ۳ میلی لیتر محلول فایکول ریخته و سپس خون رقیق شده را به آرامی توسط پاستور پیت یا سمپلر از جدار لوله طوری داخل لوله بریزید که با فایکول مخلوط نشود و بر روی سطح فایکول قرار گیرد تا کل حجم حدود ۷ میلی لیتر شود.

سپس لوله را به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۲۸۰۰ rpm سانتریفیوژ کنید. پس از پایان سانتریفیوژ لوله را به آرامی از دستگاه خارج کنید. دقت شود که ۵ فاز مختلف لایه سلول های مونسیت و لنفوسیت را در لوله تشکیل شده است. فاز اول در پایین ترین قسمت و سنگین ترین لایه شامل گلبول های قرمز است.

فاز دوم لایه ای نازک از گرانولوسیت هاست. فاز سوم لایه‌ی فایکول می باشد. فاز چهارم به صورت حلقه ای بسیار نازک و سفیدی از مجموع سلول های لنفوسیت و مونوسیت می باشد و در فاز پنجم یا بالاترین لایه سرم خون که سبک ترین قسمت و فاقد سلول است قرار دارد. توسط پاستور پیپت به آرامی می توان لایه ها را از هم جدا و در لوله های مختلف قرار داد. لایه سلول های مونوسیت و لنفوسیت را توسط محلول هانک رقیق کنید و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۵۰۰ rpm سانتریفیوژ کنید.

دوبار این عمل را جهت جداسازی فایکول از سلول ها انجام دهید. پس از پایان سانتریفیوژ دور دوم سلول ها در ته لوله آزمایش رسوب کرده اند. ۱ سی سی محلول هانک به آن ها اضافه کرده و توسط سمپلر شست و شو دهید. سلول های جدا شده و شسته شده لنفوسیت و مونوسیت را می توانید جهت آزمایشات و مطالعات بعدی مورد استفاده و شمارش قرار دهید. توسط سمپلر یا پاستور پیپت تعدادی از سلول ها را بر روی لام انتقال داده و در زیر میکروسکوپ مشاهده کنید.