**🔴 جداسازی سلولهای تک هسته ای خون محیطی**

**Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) isolation**

**محلول فايكول، يك تركيب كربوهيدراتي، محلولي بي رنگ و استريل است كه براي جداسازي لنفوسيت هاي انساني استفاده مي شود. كه براي جداسازي لنفوسيت ها در خون محيطي، مغز استخوان و خون بند ناف مناسب است.**

**روش کار:**

**قبل از باز کردن به مدت یک الی دو دقیقه شیک کنید یا روی روتاتور قرار بدید.**

 **-1ابتدا حجم 5 میلی لیتر خون EDTA# شده از هر نمونه را در فالکون تیوب 15 میلی لیتری را با نسبت یک به یک (50%-50%) با 5 میلی لیتر PBS برای دریافت غلظت مناسب رقیق می کنیم . سپس دو تا سه بار فالکون را سرو ته می نمائیم .**

**-2 مقدار 5 میلی لیتر محلول فایکول را در لوله مشابه دیگری ریخته و سپس بوسیله پیپت پاستور و پیپتور خون رقیق شد . در مرحله قبل را به آهستگی و به شکلی که با محلول فایکول مخلوط نشود از کنار دیواره و به آرامی روی سطح فایکول می ریزیم.**

**نکته: نباید خون رقیق شده با محلول فایکول ترکیب شود و می بایست خون روی سطح فایکول قرار گیرد.**

 **-3سپس فالکون را در سانتریفیوژ یخچال دار قرار داده با دمای 20 تا 18 درجه سانتیگراد و دور 400 g و برای حداکثر 4دقیقه سانتریفیوژ می کنیم تا لایه های مختلف براساس شیب چگالی جدا شوند.**

**نکته: در صورتیکه از زمان خونگیری بیش از 2 ساعت گذشته باشد، می بایست مدت زمان سانتریفیوژ را افزایش داد.**

**-4 پس از انجام سانتریفیوژ فالکون حاوی لایه های متمایز به ترتیب از بالا به پایین شامل : پلاسما (زردرنگ)، Buffy Coat )حلقه شیری رنگ کدر)، فایکول (شفاف) و گلبولهای قرمز (قرمز تیره ) می باشد. بوسیله پیپت پلاستیکی یا سمپلر و با دقت کامل، حلقه شیری رنگ و کدر بین سرم و فایکول را جدا کرده و به لوله ای دیگر منتقل می کنیم.**

**نکته: حلقه شیری رنگ کدر Buffy Coat حاوی سول های PBMC می باشد.**

**-5به نمونه Buffy Coat جدا شده تا حجم 10 میلی لیتر ،PBS اضافه می کنیم.**

**-6فالکون حاوی Buffy Coat و PBSرا در دمای 4 تا 6 درجه سانتیگراد برای مدت 5 دقیقه و با دورrpm 1400 در سانتریفیوژ یخچال دار سانتریفیوژ می کنیم ( مرحله شستشو)**

**-7مرحله شستشوی فوق را بار دیگر تکرار می کنیم.**

**-8سلولهای ته نشین شده را جداسازی نموده و برای انجام مراحل بعد به میکروتیوب های 5/1 میلی لیتری منتقل می نماییم.**

**سوالات :**

**رقیق سازی خون**

1. **1-مقدار دقیق رقیق کردن خون به چه صورت ست ؟**

**برای خون های تازه گرفته شده در صورتی که مقدار RBC 2-یا غلظت خون فرد گرفته شده بالا نباشد**

**می توان بدون رقیق سازی و به نسبت یک به یک رقیق کردن و نسبت یک به یک با فایکول استخراج و انجام داد اما اگر خون غلظت بالای داشته باشد باید حتما به نسبت یک به بک رقیق شود . توجه کنید مقدار رقیق کردن خون ممکن است در کانت سلول استخراج شده موثر یاشد .**

**مقدار فایکول**

 **اصول مقدار فایکول استفاده شده چه مقدار باید باشد ؟**

**مقدار فایکول باید نسبت یک به یک با خوند اسنفاده شود حالت بهینه اما می توان در بعضی موارد زمانی که خون رقیق شده استفاده می کنیم مقدار فایکول رو کمتر از**