فایکول Lymphodex Inno-train

فایکول یک محلول استاندارد آزمایشگاهی بی رنگ و استریل است، برای جداسازی لنفوسیت های T , B در مطالعات آزمایشگاهی از این محلول استفاده می شود، برای جداسازی لنفوسیت ها از خون محیطی مغز استخوان و خون مناسب است، جداسازی رده سلول های لنفوسیت از محتویات باقی مانده لکوسیتی با استفاده از گرادیان غلظتی ماده فایکول و سانتریفیوژ انجام می شود، اهمیت این ماده در حفظ بقا لنفوسیت ها و سطح پایین اندوتوکسین آن است، فایکول Lymphodex Innotrain یکی از با کیفیت ترین فایکولهای موجود می باشد که بسیاری از مراکز تحقیقاتی از این برند استفاده می کنند واین شرکت ارائه دهنده فایکول هایinnotrain آلمان با

بهترین قیمت در سطح کشور می باشد.

روش جداسازی سلولهای تک هسته ای خون محیطی با فایکول اینوترین

فایکول اینوترین آلمان یکی از بهترین محلول های موجود در بازاربوده که با کیفیت بسیار بالا استخراج سلولی را میتوان انجام داد.

جهت استفاده از محصول دقیقا طبق پروتوکل زیر مراحل کار را انجام دهید.

رقیق سازی خون :

1- ابتدا حجم 5 میلی لیتر خون EDTA شده از هر نمونه را در فالكون 15میلی لیتری را با نسبت یک به یک (50%-50%) با 5 میلی لیتر PBS یا بافر مورد استفاده برای دریافت غلظت مناسب رقیق می کنیم . < در صورتی خون به صورت فرش باشد و و مقدار غلظت (RBC( خون بالا نباشد میتوانید از خون غلیظ مستقیم استفاده کنید. <در صورتی که در این قسمت از استخراج سوال دارید به مجموعه سوالات انتهای برشور مراجعه کنید.

￼￼

مقدار فایکول: 2- مقدار 5 میلی لیتر محلول فایكول را در لوله فالکون مشابه دیگری ریخته و سپس بوسیله پیپت پاستور خون رقیق شده در مرحله

قبل را به آهستگی و به شکلی که با محلول فایكول مخلوط نشود از کنار دیواره و به آرامی روی سطح فایكول می ریزیم. > نباید خون رقیق شده با محلول فایكول تركیب شود و می بایست خون روی سطح فایكول قرار گیرد. <در صورتی که در این قسمت از استخراج سوال دارید به مجموعه سوالات انتهای برشور مراجعه کنید.

￼￼￼￼

مرحله سانترفیوژ: 3-سپسفالكونرادرسانتریفیوژیخچالدارقراردادهبادمای20تا18درجهسانتیگرادودورrpm 4000(،g400)

برای 9 الی 10 دقیقه سانتریفیوژ می کنیم تا لایه های مختلف براساس شیب چگالی جدا شوند. اگر از سانترفیوژ یخچال دار استفاده میکنید برای بهتر استخراج شدن سلول با کیفیت 9:Break :0 ،Acceleration را تنظیم کنید. > در صورتی که در این قسمت از استخراج سوال دارید به مجموعه سوالات انتهای برشور مراجعه کنید.

برداشت سلول:

4- پس از انجام سانتریفیوژ فالكون حاوی لایه های متمایز به ترتیب از بالا به پایین شامل : پلاسما (زردرنگ) Buffy Coatحلقه شیری رنگ کدر)، فایكول ( 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 فایكول را جدا کرده و به لوله ای دیگر منتقل می کنیم. > حلقه شیری رنگ کدر Buffy Coat حاوی سول های PBMC می باشد.

5- به نمونه Buffy Coat جدا شده تا حجم 10 میلي لیترPBS ، یا بافر مورد استفاده رواضافه می کنیم 6- فالكون حاوی Buffy Coat و PBSرا در دمای 4 تا 6 درجه سانتیگراد برای مدت 5 دقیقه و با دور 2500 rpm در سانتریفیوژ

یخچال دار سانتریفیوژ می کنیم

مرحله شستشو: 7- مرحله شستشوی فوق را بار دیگر تکرار می كنیم. 8- سلولهای ته نشین شده را جداسازی کرده و برای انجام مراحل بعد به میکروتیوب های1الی 5میلی لیتری منتقل مي نماییم.

￼￼

سوالات :

رقیق سازی خون

1- مقدار دقیق رقیق کردن خون به چه صورت است ؟

برای خون های تازه گرفته شده در صورتی که مقدار RBC یا غلظت خون فرد گرفته شده بالا نباشد میتوان بدون رقیق کردن و به نسبت یک به یک با فایکول استخراج رو انجام داد اما اگر خون غلظت بالای داشته باشد باید حتما به نسبت یک به یک رقیق شود .

مقدار فایکول 1-اصول مقدار فایکول استفاده شده چه مقدار باید باشد ؟

مقدار فایکول باید نسبت یک به یک با خون استفاده شود حالت بهینه اما میتوان در بعضی موارد زمانی که خون رقیق شده استفاده میکنیم مقدار فایکول رو کمتر از حجم خون رقیق شده ریخت برای مثال 5 سی سی خون رقیق شده 4 سی سی فایکول استفاده کرده .

مرحله سانترفیوژ

بهترین زمان و ودور سانترفیوژ برای فالکون 15 و فالکون 50 چثدر است ؟ برای فالکون 15 دور 4000 rpm زمان 8 الی 10 دقیقه بهترین حالت برای استخراج میباشد 9:Break :0 ، Acceleration برای فالکون 50 دور 4000 rpm زمان 7 الی 9 دقیقه بهترین حالت برای استخراج میباشد 9:Break :0 ، Acceleration برداشت سلول 1-رینگ تشکیل نشده ؟ در صورتی که رینگ تشکیل نشده دو حالت رو باید برسی کنید: حالت اول زمان و دور سانتر کردن بیشتر از مقدار تعیین شده بوده است حالت دوم مقدار سلول نمونه کمتر از حد ممکن بوده است.

2-رینگ قابل دیدن نیست بسیار شفاف است؟￼

در این حالت که رینگ سلولی قابل دیدن نیست یا خیلی شفاف است به این دلیل است که خون بیشتر از حد رقیق شده یعنی غلظت بالای نداشته ، میتوانید مقدار فایکول را کمتر کنید یا خون بخ نسبت کمتری رقیق شود .

￼