University of Isfahan

Biological Science and Technology

Department of Cell and Molecular Biology

Cellular and Molecular Laboratory

Farzaneh Forouharfar

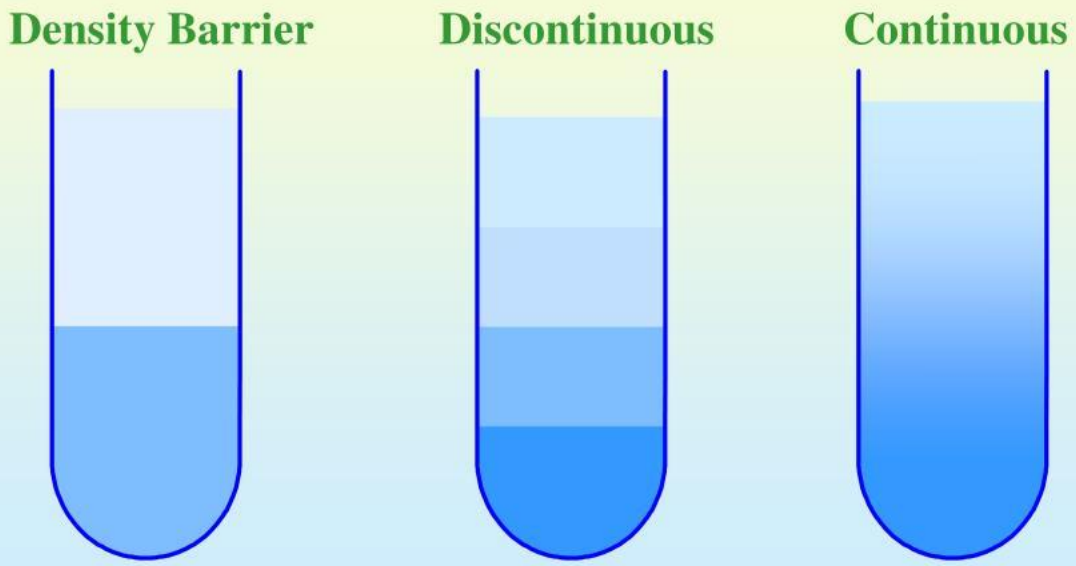
عنوان

آشنایی با روش‌ها و تکنیک‌های جزء به جزء کردن یاخته‌ها و اجزاء درون‌یاخته‌ای 2

اهداف

- ✓ تفکیک سلول ها و اجزاء درون سلولی با استفاده از شیب غلظت(Density gradient) بر اساس اندازه و چگالی یا دانسیته
- ✓ تفکیک اجزاء تشکیل دهنده بافت خونی در شیب غلظت سوکروز
- ✓ استفاده از شیب غلظت پیوسته(Continioues)و یا شیب غلظت ناپیوسته (DisContinioues)
- ✓ بررسی شیب غلظت سوکروز و تفکیک گلبول های قرمز سالم

Density gradient centrifugation



مراحل جداسازي سلول ها و اجزاء ياخته‌اي

۱.همگن‌سازي بافت و تهيه عصاره يا سوسپانسيون سلولي در بافر استخراج buffe extract

با توجه به نوع بافت دراين مرحله همگن سازی به روش‌هاي متفاوتي انجام مي‌شود:

الف) روش مكانيكي(Mechanical Method)

در محلول‌هاي بافري مناسب، حاوي غلظت‌هاي معيني از يون‌هاي مختلف با هاون چينی يا هموژنايزرهاي برقي يا دستي، به روش فيزيكي بافت يا سلول تخريب مي‌شود.

ب) روش شيميايي(Chemical Method)

با دادن شوك يوني يا اسمزي با استفاده از محلول‌هايي كه حاوي يونهايي خاص با مولاريته‌هاي مشخص مي‌باشند، غشاء تخريب شده و اجزاء درون سلولي رها مي‌گردند.

ج) روش فرا صوتی(Ultrasonic Method)

در اين روش با استفاده از امواج مافوق صوت نمونه مورد نظر به صورت سوسپانسيون درآورده‌می‌شود.

د) روش آنزيمي(Enzymatic Method)

با استفاده از آنزيم‌هاي هضم كننده ساختار ديواره‌ي سلولي (عمدتاً در باكتري‌ها) انجام مي‌شود.

2.فيلتراسيون يا عبور سوسپانسيون سلولي از صافي چندلايه مثل پشم شيشه يا صافي پارچه‌اي يا كاغذی با سوراخهای مناسب

3.جداسازي و تفكيك اجزاء با استفاده از نيروي گريز از مركز با سانتريفوژ كردن براساس شكل، اندازه و دانسيته يا چگالي اجزاء. اين مرحله عمدتاً به دو روش صورت مي‌گيرد:

الف:سانتريفوژ افتراقي يا مرحله به مرحله(Diffrential Centrifugation)

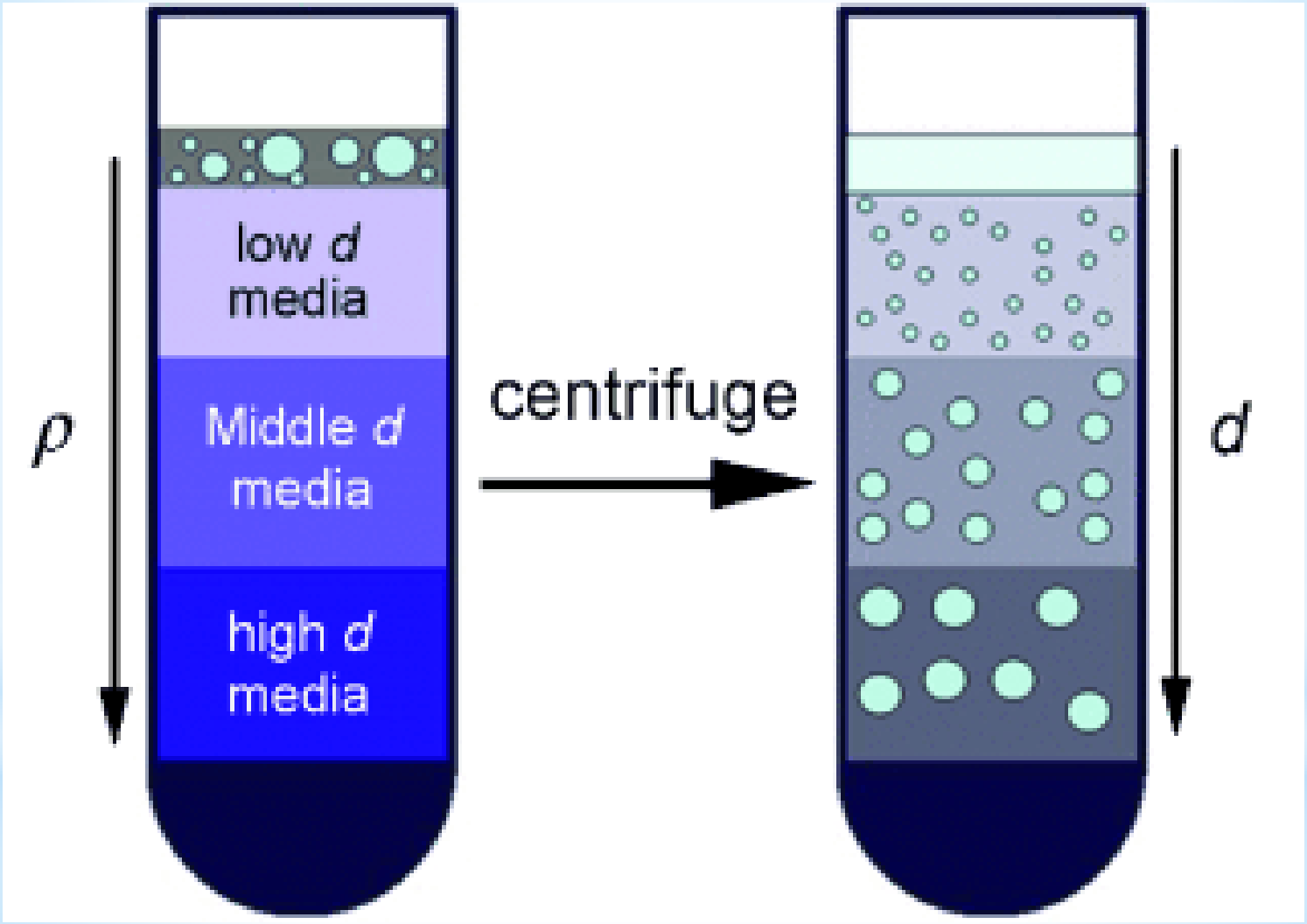
ب:سانتريفوژ در شيب غلظت كه يا به روش شيب غلظت پيوسته و يا ناپيوسته صورت مي‌گيرد.(Density gradient Centrifugation)

در روش سانتريفوژ درگراديان يا شيب غلظت اجزاء سلولي بر اساس چگالي خاص خود از هم جدا مي‌شوند. سوسپانسيون سلولي در لوله سانتريفوژ حاوي تركيبي كه دانسيته آن در طول يك لوله يكسان نيست،قرار مي‌گيرد.

تركيبات مناسب جهت تهيه شيب غلظت سوكروز/ فيكول يا لنفودكس/و پركول و كلرور سزيم با دانسيته هاي متفاوت ميباشند.

در شيب غلظت پيوسته، غلظت در طول لوله سانتريفوژ به طور پيوسته تغيير مي‌كند و بي‌نهايت باند غلظتي وجود دارد.

در شيب غلظت ناپيوسته غلظت‌هاي متفاوت و با تعداد محدود در طول لوله سانتريفوژ وجود خواهند داشت.بطوريكه، چگالي در بالاي لوله كمتر و در پايين لوله بيشتر مي‌باشد، در طي عمل سانتريفوژ هر جزء از عصاره سلولي به مكاني مشخص در لوله كه چگالي آن مساوي با چگالي شيب غلظت می باشد، منتقل شده و با وجود ادامه چرخش در همان دور و سرعت مشخص، ديگر حركت نمي‌كند.


low d
media
Middle d
media
high d
media
ρ
centrifuge
d

Overview

ficoll

Ready-to-use sterile density gradient media designed for the preparation of mononuclear cells from peripheral blood, bone marrow and cord blood.

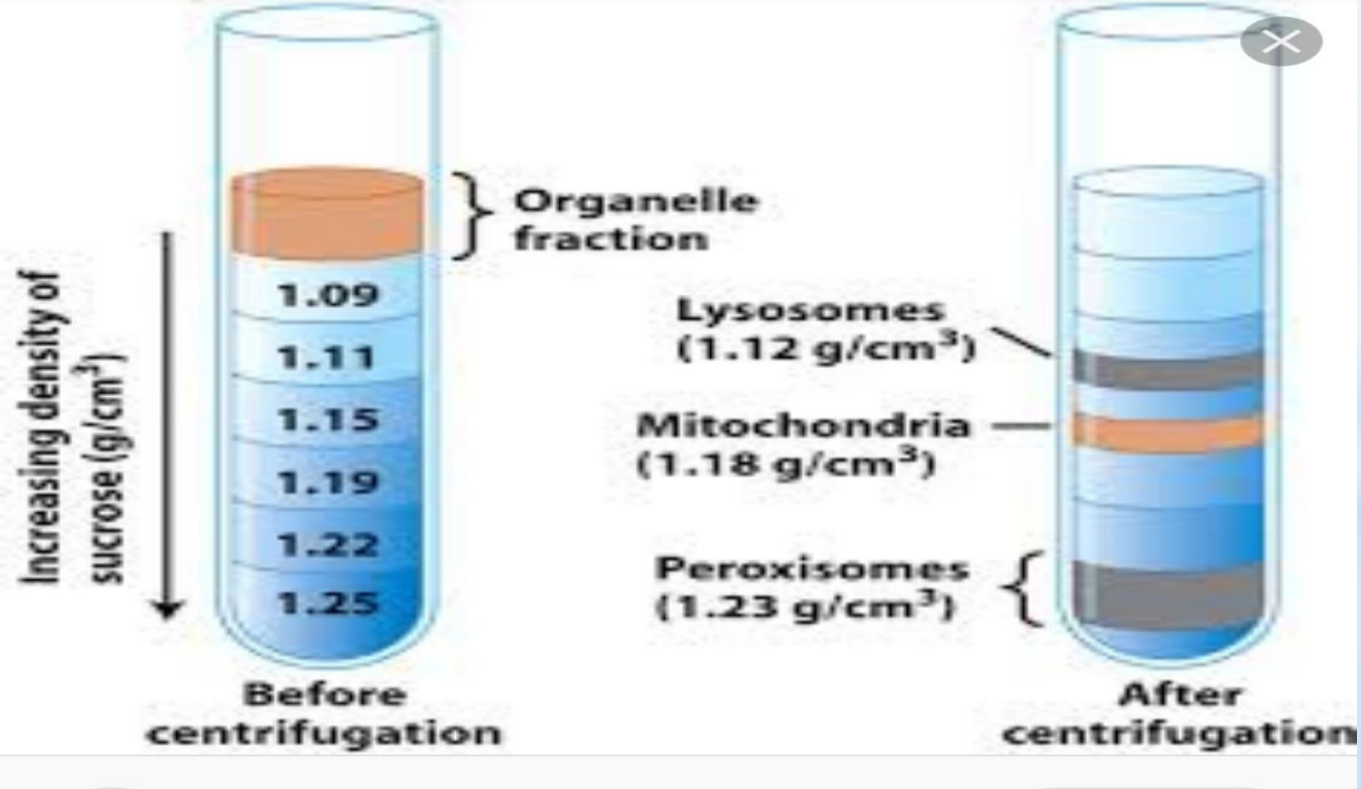
فایکول یا لینفودکس محلول استاندارد بی‌رنگ و استریل با دانسیته های مختلف می‌باشد و کاربرد آن در جداسازی سلول‌های لنفوسیت خون محیطی یا خون بند ناف در گرادیان غلظت است.

برخی از کاربرد های تفکیک سلول ها و اجزاء سلولی بر اساس شیب غلظت

جداسازی اندامک‌های درون سلولی در شیب غلظت سوکروز

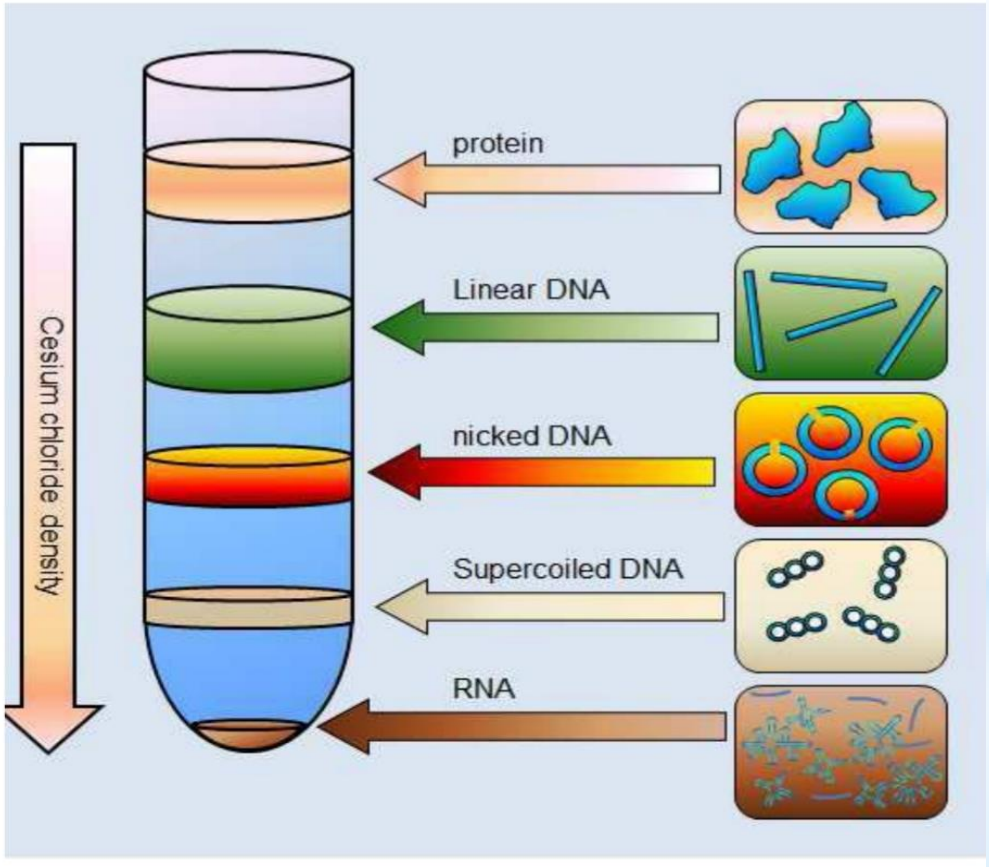
تفکیک میتوکندری، لیزوزوم و پراکسی زوم

در شیب غلظت سوکروز همانطور که در تصویر مشاهده می‌شود پس‌از سانتریفوژ لیزوزوم در بالا ، سپس میتوکندری و در انتهای لوله پراکسی زوم قرارگرفته و این اندامک ها از هم تفکیک می‌شوند.



جداسازی DNA ,RNA وپروتئین در شیب غلظت کلرور سزیم

دراین شیب غلظت همانطور که در تصویر مشاهده می‌شود پس‌از سانتریفوژ: پروتئین ها در بالا، سپس DNA و در انتهای لوله RNA قرارگرفته و این ماکرومولکولها از هم تفکیک می‌شوند.



سلول درمانی وجداسازی سلول های بنیادی خون محیطی یا خون بندناف

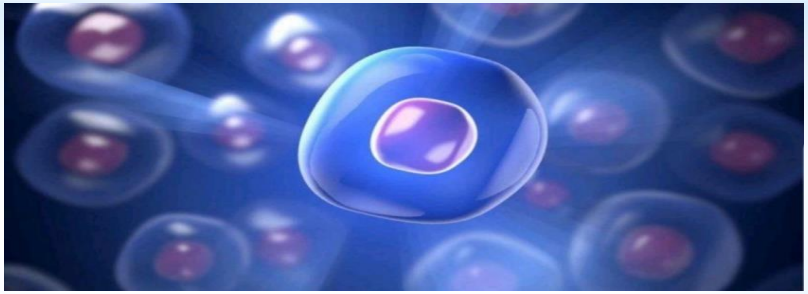
در پروسه سلول‌درمانی می‌توان سلول‌های بنیادی را مستقیماً به قسمت موردنظر تزریق و یا این‌که از ترشحات این سلول‌ها شامل مولکول‌های فعال زیستی هورمون‌ها و فاکتورهای مهم در رشد و ترمیم استفاده نمود.

سلول های تک هسته ای خون محیطی در شیب غلظت فایکول جداسازی و در سلول درمانی مورد استفاده قرار میگیرند.

منابع مهم سلول‌های بنیادی

خون بند ناف یکی از منابع بسیار مهم سلول های بنیادی است.

سلول‌ها ی تک هسته ای خون محیطی سلول‌های بافت پیوندی بند ناف سلول‌های جفت سلول‌های مغز استخوان دندان شیری و دندان عقل و فولیکول مو و سلول‌های چربی نیز از منابع دیگر سلول های بنیادی می‌باشند.



مراحل جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی

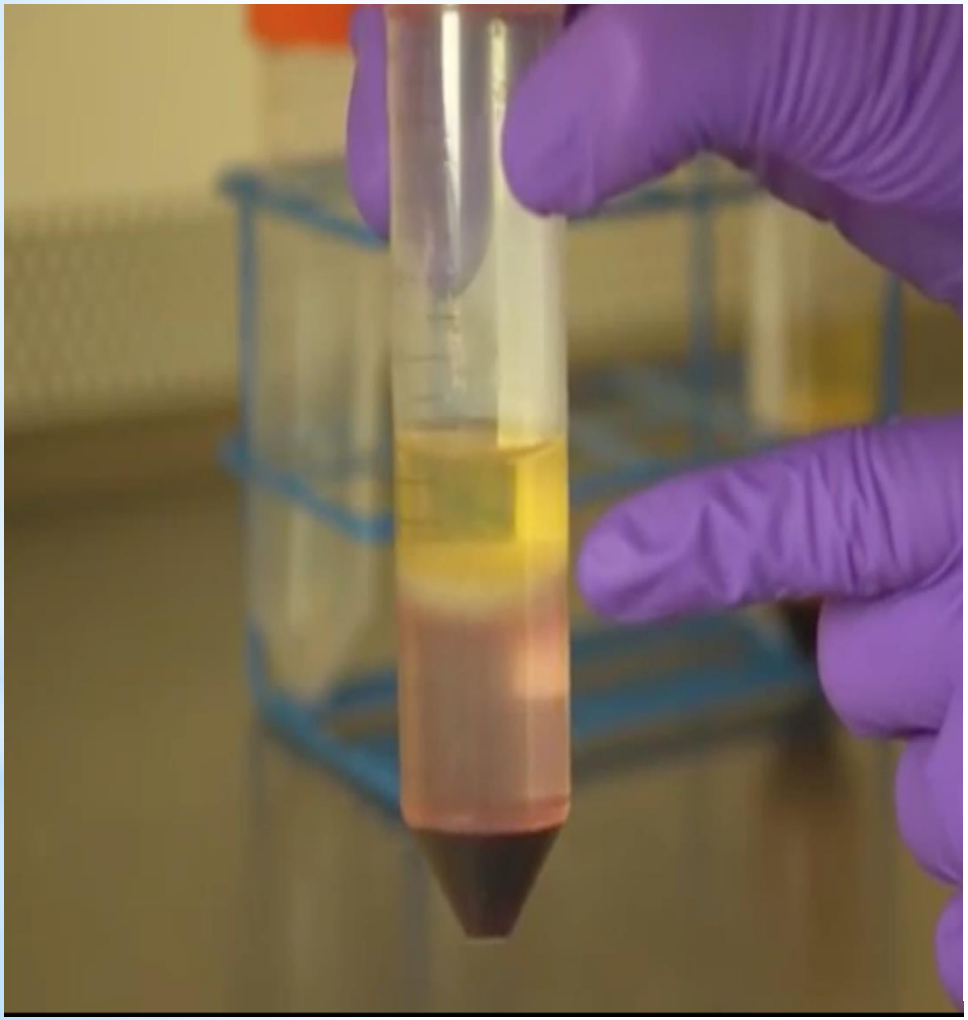
۱ ـ ۱۰ سی‌سی از خون محیطی را به نسبت مساوی با محلول رقیق‌کننده pbs یا بافر فسفات سالینه رقیق کنید این محلول بافر نمکی با پایه آبی است و غلظت یون‌های آن مشابه شرایط آیزوتونیک و مایعات بیولوژیکی بدن انسان است که شامل کلرید سدیم و فسفات سدیم یا کلرید پتاسیم و فسفات پتاسیم می‌باشد و به ثابت ماندن ph و فشار اسمزی و غلظت‌های یونی کمک می‌کند.

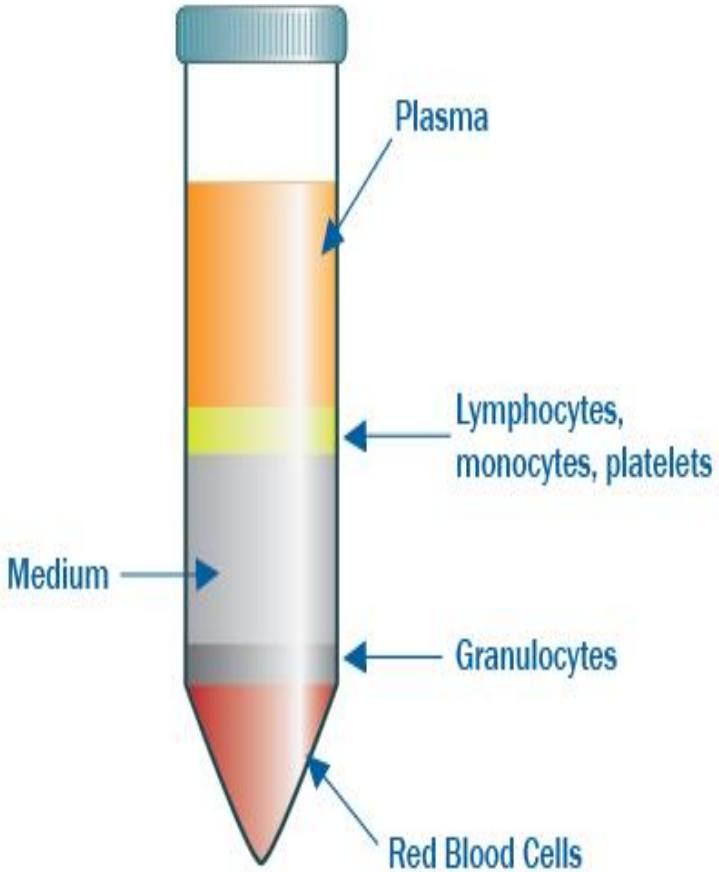
۲ـ خون رقیق‌شده را به ارامی بر روی محلول فایکول در لوله سانتریفوژ ریخته تا 2 لایه تشکیل شود و در دور2500 rpm به مدت 15 الی 20 دقیقه سانتریفوژ کنید. چگالی فایکول بیشتر از چگالی سلول‌های لنفوسیت خون و کمتر از چگالی گلبول‌های قرمز می‌باشد بنابراین پس‌از پایان سانتریفوژ بترتیب در لوله سانتریفوژ از بالا به پایین ابتدا پلاسما زردرنگ/ سپس بافی کوت حلقه‌ی شیری‌رنگ شامل سلول‌های تک هسته ای گلبول سفید و پلاکت ها / بعد از آن فایکول محلول شفاف /و در انتها گلبول‌های قرمز به رنگ قرمز تیره مشاهده می‌شود.

۳ـ ناحیه سلول‌های تک هسته‌ای را توسط سمپلر به‌دقت جدا کرده و با محلول pbs شستشو دهید و به محیط کشت مناسب و مغذی جهت تبدیل به سلول‌های موردنظر اضافه کنید. پس از کشت سلول های بنیادی تک هسته ای جدا شده در محیط های کشت مغذی و القاء فاکتور های رشد مختلف به انها این سلول ها قادرند به سلول های کبدی،غضروفی،استخوانی و غیره تبدیل شوند.

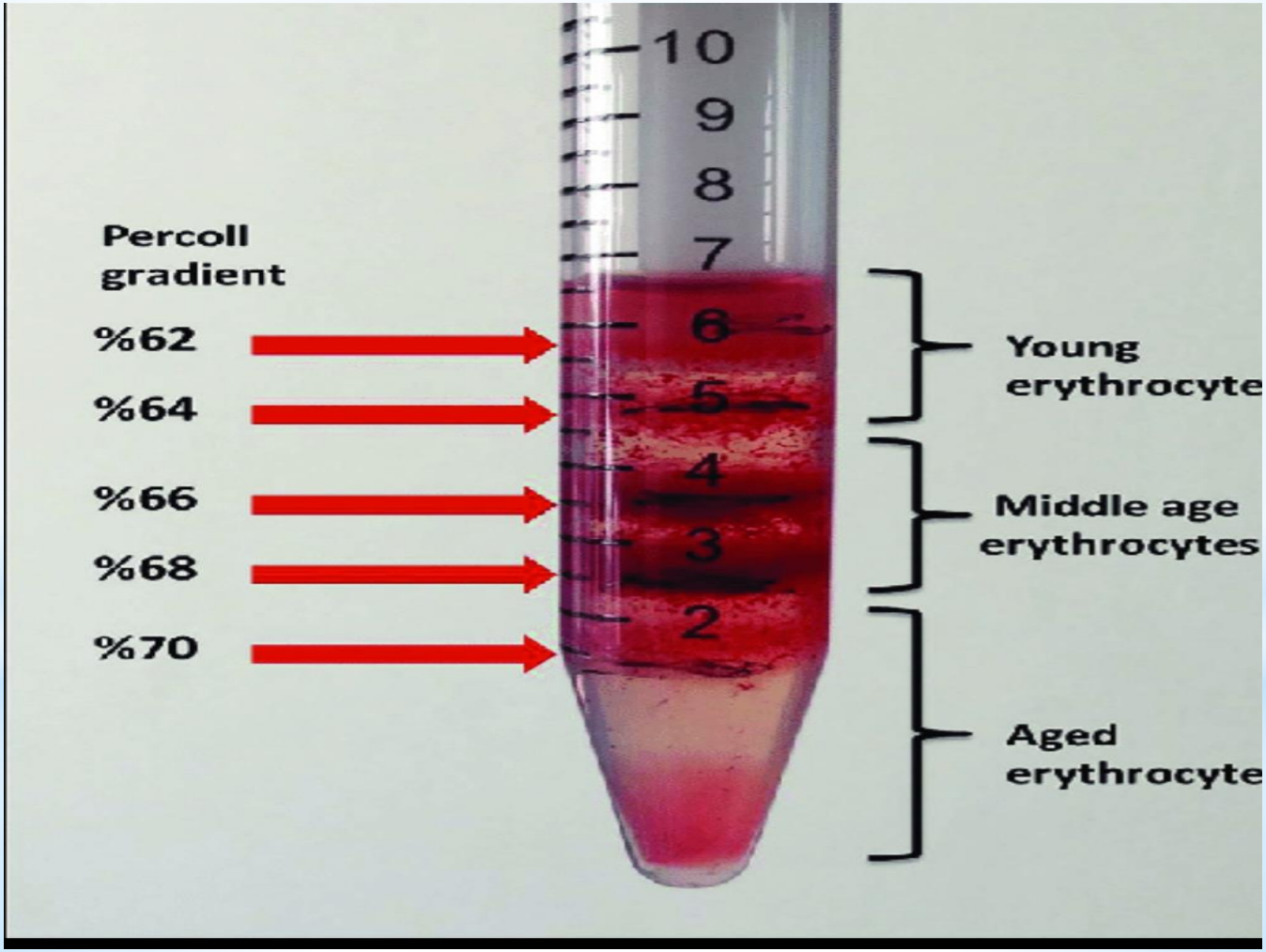
Ficoll Only
Before Centrifugation
After Centrifugatio
45
mL
40
35
30
25
20
15
10
5

مشاهده ناحیه بافی کوت Buffy coat





جداسازی گلبولهای قرمز خون در سنین مختلف بلوغی در شیب غلظت پرکول

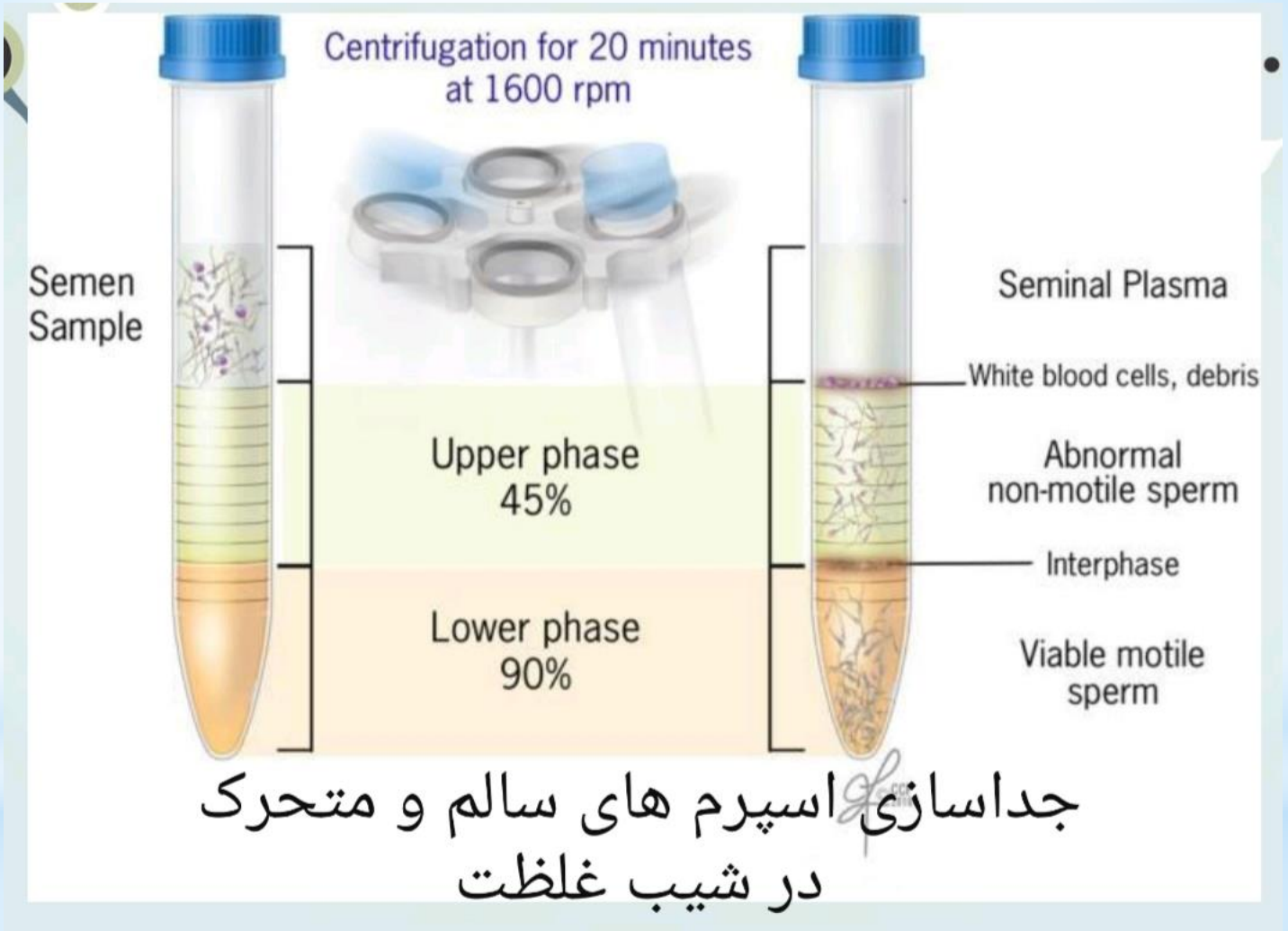


جداسازی پي آر پي PRP از خون تام

پي ار پي مخفف PLATELET RICH PLASMA يا پلاسماي غني از پلاكت ميباشد كه در حقيقت عصاره اي طبيعي براي جوان سازي ودرمان ميباشد.
در واقع غلظت بالاي پلاكت خون فرد از خون تازه و تام طي فرايندي جداسازي و تغليظ می گردد و در روند بازسازي و ترميم بافتي در چند جلسه درماني مورد استفاره قرار ميگيرد.
جهت جداسازی پی آرپی از خون انسان نمونه خون تازه با سرعت ۳۴۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲ تا ۱۶ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ میشود سرعت، زمان و دمای مناسب در این جداسازی بسیار مهم است به‌دلیل این‌که سرعت پایین باعث عدم جداسازی دقیق و دمای بالا ناشی از اصطکاک حین انجام سانتریفوژ باعث می‌شود فاکتورهای لازم زودتر از زمان موردنظر یعنی قبل‌از ورود به بدن انسان وارد فاز فعال‌سازی شده و هنگام استفاده کاربرد مؤثری نداشته باشند.

درمان ناباروری

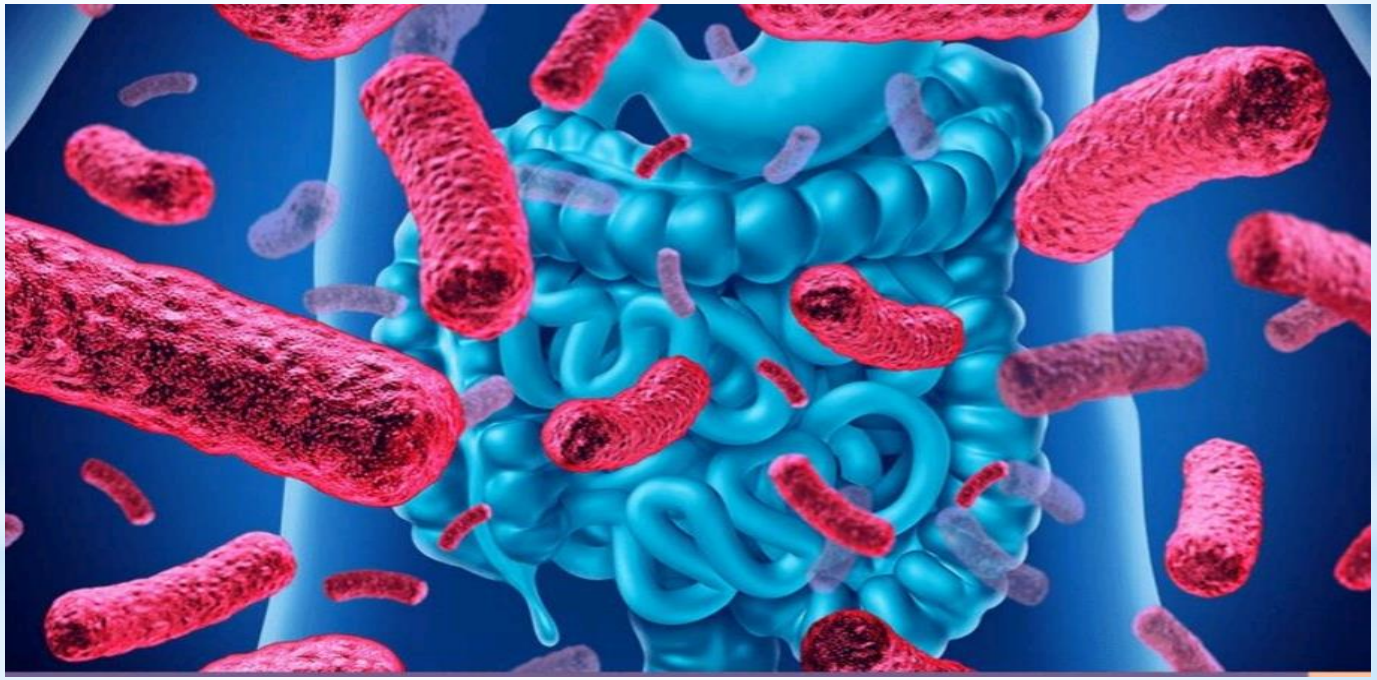
مسئله ناباروری دلائل مختلف دارد.یکی از راههای درمان انجام لقاح خارج رحمی می باشد. برای تلقیح سلول اسپرم مناسب در موارد لقاح خارجی رحمی با تخمک،بایستی اسپرم سالم با دانسیته مشخص و استاندارد از نظر محتوای سلولی و خصوصیات سیتولوژیکی هسته و ترکیبات کروماتینی و سیتوپلاسم، در شیب غلظت پرکول جداسازی و جهت تزریق به تخمک مورد استفاده قرار گیرد.



جداسازی اسپرم های سالم و متحرک
در شیب غلظت

جداسازی عفونت های باکتریایی

جداسازی باکتری ها از سلول های طبیعی در عفونت های میکروبی و باکتریایی در شیب غلظت می تواند انجام شود و سپس سلول در صورت لزوم در محیط مناسب کشت داده شود.



مهندسی ژنتیک و آزمایشات مولکولی

جداسازی و خالص سازی DNA باکتریایی از DNAپلاسمیدی و DNA ژنومی و ازRNA و پروتئین ها.
جداسازی DNA ازRNA و پروتئین ها در شیب غلظت کلرور سزیم(Cscl) انجام می شود.
در شیب غلظت کلرور سزیم مولکول های پروتئین در بالا،DNAدر وسط و RNAدر قسمت پایین تر قرار می گیرد.
پس از تفکیک و جداسازی با سوراخ کردن لوله ها توسط سرنگ استخراج DNAصورت می گیرد و سپس در صورت لزوم تکثیر،همانندسازی،کلونینگ،نوترکیبی در مهندسی ژنتیک صورت می گیرد.

مواد و وسایل مورد نیاز

مواد و وسایل مورد نیاز

1.آب مقطر
2.لام و لامل
3.محلول سوکروز اشباع
4.میکروسکوپ نوری
5.خون تام
6.پاستور پی‌پت یا میکرو پی پت یا سرنگ
7.لوله سانتریفوژ
8.سانتریفوژ
9.لوله آزمایش
10. لوله مخصوص خونگیری حاوی ضد انعقاد

روش کار

در این آزمایش با استفاده از شیب غلظت ناپیوسته سوکروز به روش سانتریفوژ در شیب غلظت، سلول‌هاي سازنده بافت خوني از هم تفكيك می شوند.

ابتدا خون را از رگ گرفته و در لوله حاوی ضد انعقاد میریزیم .چون بافت خوني به صورت سوسپانسيون مي‌باشد، مرحله تهيه عصاره سلولي و عبور از صافي را نخواهيم داشت.

چند قطره خون تام و کامل را در لوله سانتريفوژي كه حاوي غلظت‌هاي ناپيوسته سوكروز بترتيب از پايين لوله با درصدهای ۱۰۰ ، ۷۵ ، ۵۰ ، ۲۵ ، ۰ درصد مي‌باشد ريخته و به مدت 3 دقيقه در دور rpm 1000 سانتريفيوژ كنيد.

جهت انجام این آزمایش بایستی قبلاً غلظت‌های تعیین شده از سوکروز را طبق جدول زیر تهیه کنید.

جدول تهیه 2 cc از غلظت های مختلف سوکروز

شماره باند غلظت	حجم محلول اشباع سوکروز (cc)	حجم آب (cc)	درصد اشباع محلول سوکروز (%)
1	2	0	100
2	1.5	0.5	75
3	1	1	50
4	0.5	1.5	25
5	0	2	0

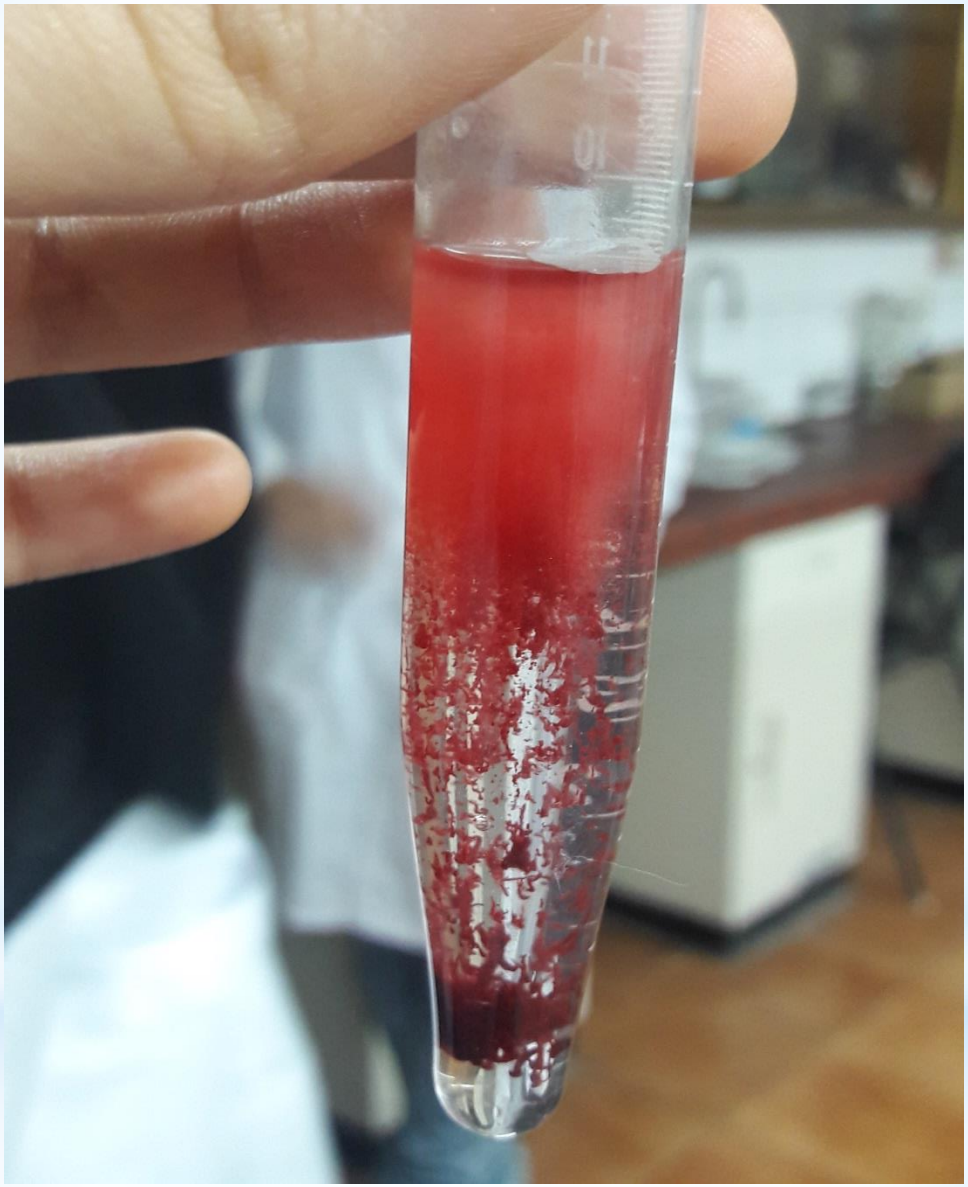
توجه شود که جهت قرار دادن هرکدام از غلظت‌هاي فوق در لوله سانتريفوژ به نحوي که با هم مخلوط نشوند و 5 غلظت ساخته شده به طور مجزا در لوله قرار گيرند، بايستي نهايت دقت را به کار گرفت و با استفاده از سرنگ داراي سوزن، غلظت‌ها را قطره‌قطره روي سرهم قرار داد.

در غير اين صورت غلظت‌ها تفکيک شده نخواهند بود و مخلوط مي‌گردند. بنابراين غلظت‌ها از کم به زياد به آرامي توسط سوزن سرنگ از جدار لوله سانتريفوژ وارد لوله گردند، بدين ترتيب سطوح غلظت قابل تفکيک می باشد.

پس از پايان سانتريفوژ به آرامي توسط پاستور پيپت يا سمپلر از غلظت‌هاي صفر درصد، 25 درصد و 100 درصد طوريکه لايه‌ي‌هاي غلظتي به هم نخورد و با هم مخلوط نشوند، نمونه‌برداري کنيد. لامل گذاري کرده و زير ميکروسکوپ در بزرگنمايي 40 مشاهده نماييد.

در یک میدان دید تصاویر میکروسکوپی نمونه‌های مربوط به شیب غلظت 25 درصد و 100 درصد را رسم کنید و نتایج را تفسیر نمایید.

Cellular and Molecular Lab_FarzanehForouharfar



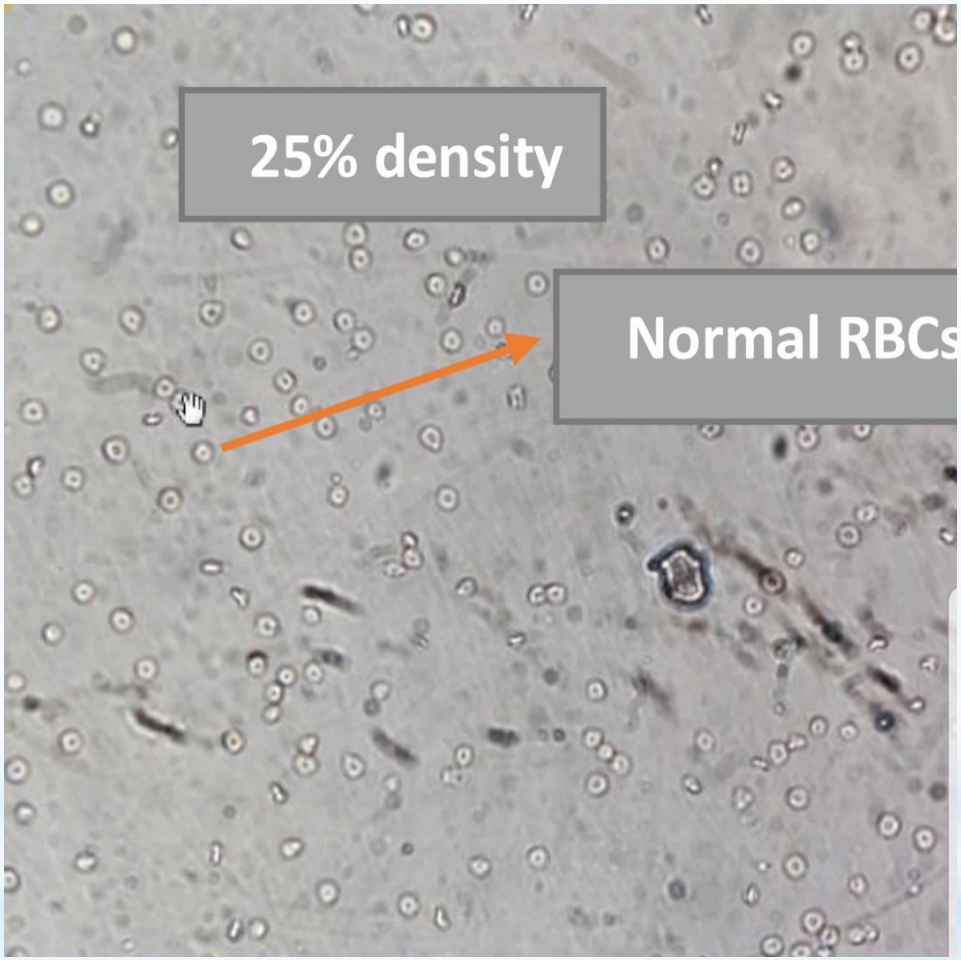
9
8
7
3
1

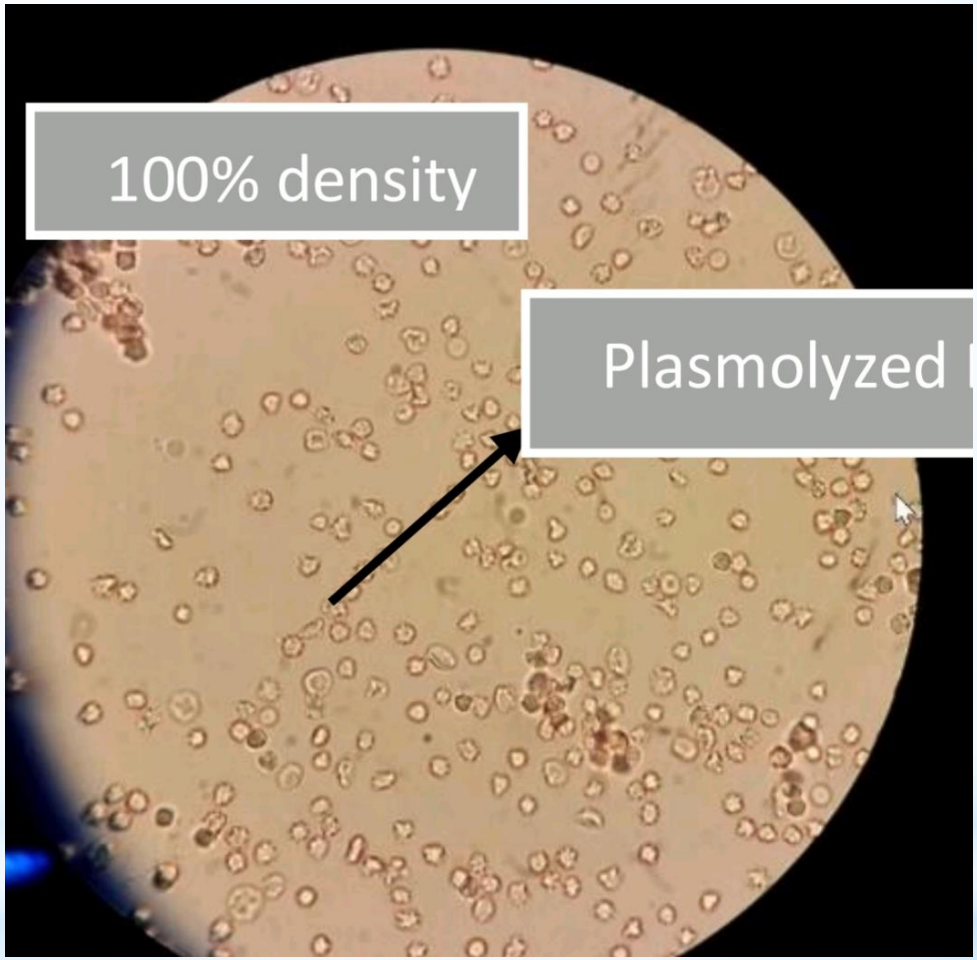
تفسیر نتایج

پس از پایان سانتریفیوژ بافت خونی در شیب غلظت ناپیوسته سوکروز به دقت از غلظت های مختلف سوکروز نمونه برداری کرده نمونه ها را را از نظر وجود گلبولهای قرمز سالم تفکیک شده در زیر میکروسکوپ بررسی نمایید.

همانطور که در تصاویر مشاهده میشود در این ازمایش که در شیب غلظت ناپیوسته سوکروز انجام شده و هدف جداسازی سلولهای گلبول قرمز سالم بوده در ناحیه صفر درصد سوکروز فقط پلاسمای خون درناحیه 25 درصد سلولهای گلبول قرمز سالم و در ناحیه 50 و 75 و 100 درصد گلبولهای قرمز تخریب و دچار پلاسمولیز میشوند.

گلبولهای سفید نیز در ناحیه 25 در صد وجود دارند اما بدلیل اینکه حجم خون مورد استفاده در این ازمایش بسیار کم بوده و همچنین رنگ امیزی اختصاصی جهت شناسایی انها استفاده نشده تشخیص انها براحتی برای شما امکان پذیر نیست.


25% density
Normal RBCs


100% density
Plasmolyzed