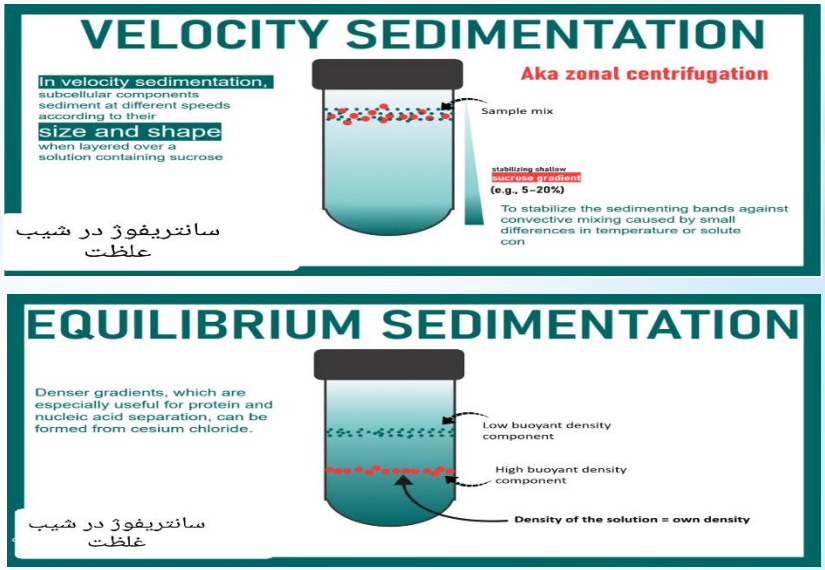


University of Isfahan
Biological Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
Cellular and Molecular Laboratory
Farzaneh Forouharfar

عنوان

آشنایی با روش‌ها و تکنیک‌های جزء به جزء کردن یاخته ها و اجزاء درون یاخته‌ای



اهداف

-جداسازی یاخته‌ها و اجزای درون یاخته‌ای با استفاده از شیب غلظت (Density Gradient)

-آشنایی با انواع گرادیان غلظت : بریرر یا سد غلظت(Barrier Density)پیوسته (Continuous) و ناپیوسته (Discontinuous) یا (Step Gradient)

-آشنایی با انواع روش های سانتریفوژ

-جداسازی اجزای بافت خونی روی شیب غلظت ناپیوسته سوکروز

-آشنایی با تکنیک جدا سازی سلول های تک هسته ای خون در شیب غلظت فایکول و کاربردهای آن

انواع گرادیان چگالی

گرادیان چگالی به سه نوع تقسیم می‌شود:

-گرادیان سدي یا بریري Barrier Density: در این روش شیب غلظتی یک لایه میانی است که به‌عنوان مانع/بریر عمل می‌کند.

-گرادیان ناپیوسته یا پله‌ای Step Gradient / Continuous Gradient:در شیب غلظت ناپیوسته، تعداد محدودی غلظت مشخص در طول لوله وجود دارد که هر یک به صورت یک پله عمل می‌کند.در این روش، محلول‌هایی با چگالی‌های متفاوت، به‌صورت لایه‌لایه و با دقت روی یکدیگر قرار می‌گیرند. چگالی محلول‌ها از پایین به بالا کاهش می‌یابد و مرز بین لایه‌ها مشخص است.

-گرادیان پیوسته Continuous Gradient:در این روش، محلول‌ها با نسبت‌های مختلف با یکدیگر مخلوط می‌شوند، به‌گونه‌ای که چگالی محیط به‌صورت تدریجی و یکنواخت از پایین به بالا کاهش می‌یابد.در شیب غلظت پیوسته، غلظت در طول لوله به‌طور پیوسته تغییر می‌کند و عملاً بی‌شمار باند غلظتی پدید می‌آید و مرز بین لایه‌ها مشخص نیست.



مراحل جداسازي اجزاء ياخته‌اي

1.همگن‌سازي بافت و تهيه عصاره سلولي در بافر استخراج buffer extract: با توجه به نوع بافت دراين مرحله همگن سازی در بافر استخراج ایزوتونیک خاص نمونه صورت مي‌گيرد و به روش‌هاي متفاوتي انجام مي‌شود:

الف) روش مكانيكي(Mechanical Method):

در محلول‌هاي بافري مناسب، حاوي غلظت‌هاي معيني از يون‌هاي مختلف با هاون چینی یا هموژنایزرهاي برقي يا دستي به روش فيزيكي بافت يا سلول ها تخريب مي‌شوند.

ب) روش شيميايي(Chemical Method):

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

ج) روش فرا صوتی(Ultrasonic Method):

در این روش با استفاده از امواج مافوق صوت نمونه مورد نظر به صورت سوسپانسیون سلولی درآورده می‌شود.

د) روش آنزيمي(Enzymatic Method):

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

2.فیلتراسیون:عبور سوسپانسیون سلولي از صافي چندلایه مثل پشم شیشه یا صافي پارچه‌اي یا کاغذي انام می شود تا بافت‌های پیوندی و ذرات درشت از ابتدا حذف شوند.

3.سانتریفوژ کردن:جداسازي و تفکیك اجزاء با استفاده از نیروي گریز از مرکز با سانتریفوژ کردن. این مرحله معمولاً به دو روش صورت مي‌گیرد:

الف:سانتریفوژ افتراقي یا مرحله به مرحله (Diffrential Centrifugation)

این روش جداسازی به عنوان تکنیک جداسازی مرحله‌ای یا «استخراج پله‌ای» شناخته می‌شود، بر پایه تفاوت در «جرم و ابعاد فیزیکی اندازه و وزن» ذرات و اجزا استوار است. در این فرآیند، نمونه تحت نیروهای گریز از مرکز g-force قرار می‌گیرد که به تدریج در هر مرحله افزایش می‌یابد. در هر مرحله، ذراتی که دارای ضریب رسوب گذاری بالاتر و جرم بیشتری هستند، سریع‌تر از فاز مایع جدا شده و به شکل رسوب Pellet درانتهای لوله متمرکز می‌شوند. مایع رویی Supernatant که حاوی ذرات سبک‌تر و کوچک‌تر است، در مرحله بعد مجدداً سانتریفیوژ می‌شود تا جداسازی ذرات با ابعاد کمتر میسر گردد. این تکنیک، انتخابی ایده‌آل برای فرکشن بندی اولیه اجزای سلولی (مانند جداسازی هسته از ازا سبکتر سلولی مثل میتوکندری) محسوب می‌شود.

Preparative Ultracentrifugation

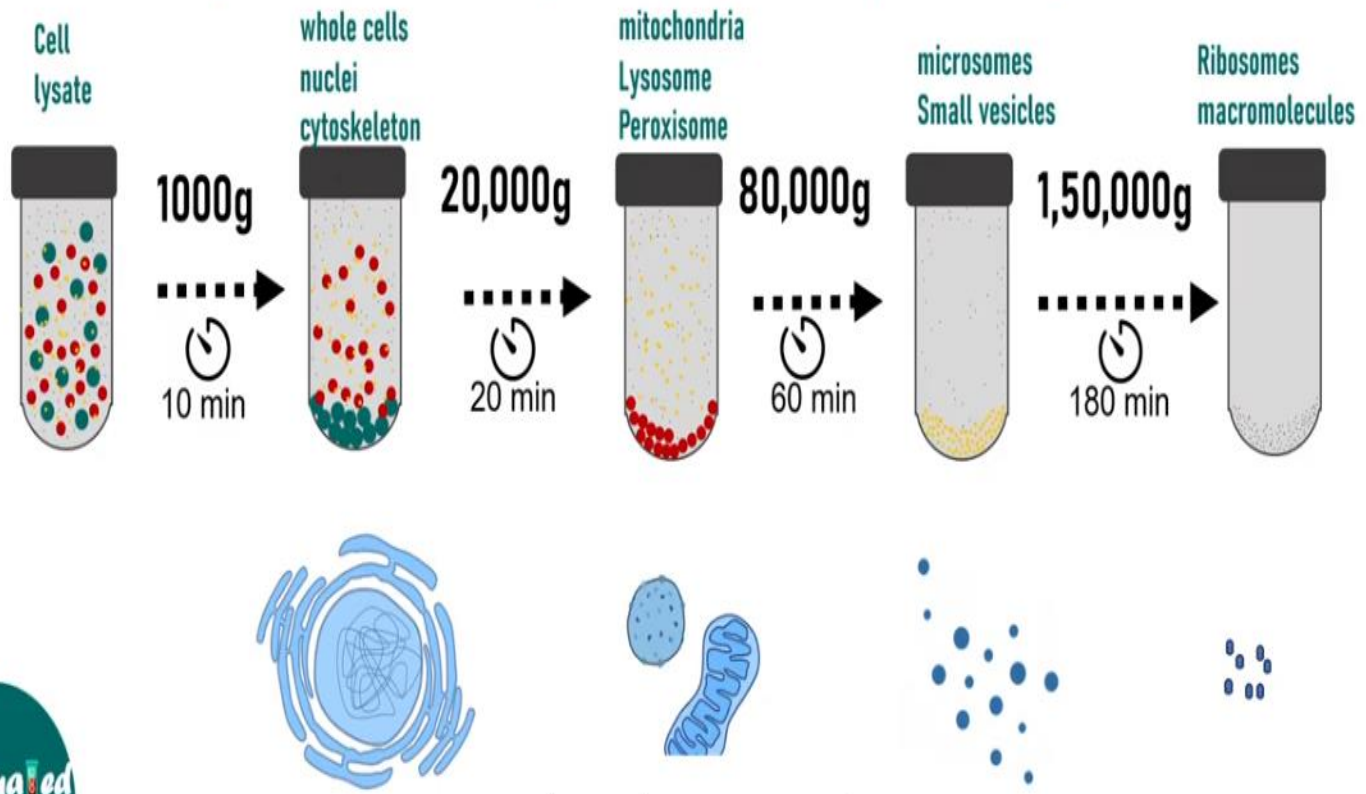
Purpose: Used for the large-scale separation and isolation of particles, such as cells, organelles, viruses, or macromolecules



- **Differential Centrifugation**: Separates particles based on size by sequentially increasing speed.
- **Density Gradient Centrifugation**:
  - **Zonal Centrifugation**: Particles are layered over a density gradient, and separation is based on size and mass.
- **Isopycnic Centrifugation**: Particles move through a gradient until they reach a point where their density matches the surrounding medium.

Cell fractionation using Ultracentrifugation

Different components of the cell can be separated by using different speed of centrifugation and time



سانتریفوژ افتراقی

ب:سانتریفوژ در شیب غلظت (Density gradiant Centrifugation)

در سانتریفیوژ شیب غلظت، سوسپانسیون سلولی در لوله سانتریفوژ حاوی ترکیبی قرار می‌گیرد که دانسیته آن در طول لوله یکسان نیست. مثال هايي از ترکیبات مناسب شیب غلظت،سوکروز،فیکول یا لنفودکس، پرکول و کلرور سزیم با دانسیته هاي مشخص میباشند.

این تکنیک به دو روش رایج انجام می شود که عبارتند از روش ناحیه ای سرعتی یا زونال ریت و روش ایزوپیکنیک یا تعادلی.

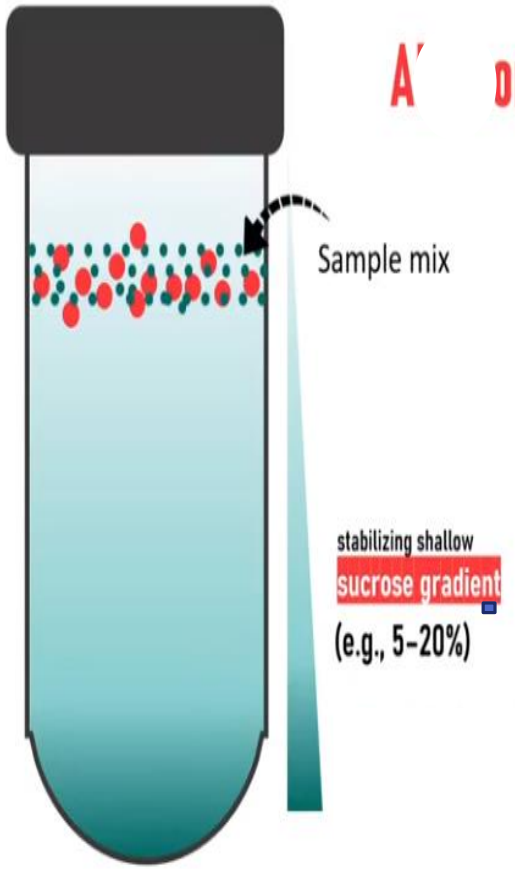
1-سانتریفیوژ ناحیه‌ای سرعتی :Rate-Zonal Centrifugation

این تکنیک که اغلب با نام سانتریفیوژ«سرعتی» شناخته می‌شود، به طور مستقیم بر «سرعت رسوب‌گذاری»Velocity Sedimentation متکی است و در محیطی با گرادیان چگالی از پیش تعیین شده (معمولاً سوکروز) انجام می‌پذیرد. در این روش، ذرات بر اساس سرعتِ متفاوتِ حرکتشان در گرادیان از یکدیگر تفکیک می‌شوند؛ این سرعت، تابعی از جرم، شکل هندسی و ضریب اصطکاک ذرات است. نکته حائز اهمیت در این فرآیند، ماهیت «وابسته به زمان» Time-dependentآن است؛ چرا که جداسازی باید پیش از رسیدن ذرات به ته لوله متوقف گردد تا باندهای مجزا در نواحی یا Zones مختلفِ گرادیان حفظ شوند.دقت شود که اگر سانتریفیوژ بیش از حد طول بکشد، همه ذرات به ته لوله می‌رسند. این روش برای جداسازي کمپلکس‌های پروتئینی که چگالی نزدیکی به هم دارند، بسیار کارآمد است.

VELOCITY SEDIMENTATION

In velocity sedimentation,
subcellular components
sediment at different speeds
according to their
size and shape
when layered over a
solution containing sucrose

A onal centrifugation



سانتریفوژ در شیب
علظت

2-سانتریفیوژ ایزوپیکنیک: Isopycnic Centrifugation

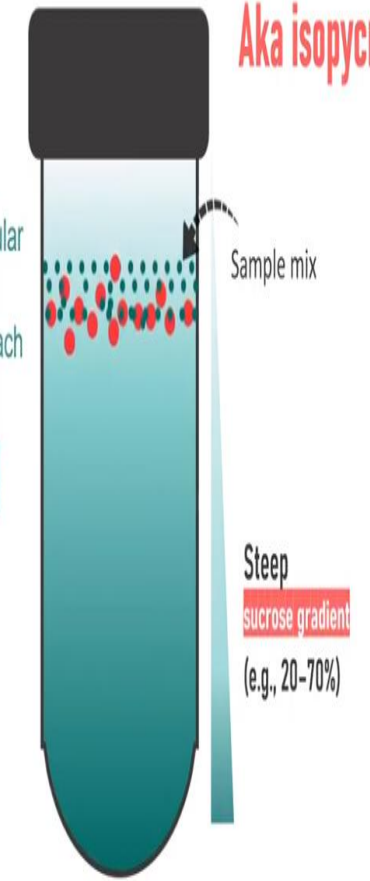
این روش که با نام «سانتریفیوژ تعادلی» یا شناوری شناخته می‌شود، کاملاً مستقل از ابعاد و شکل ذرات بوده و صرفاً بر اساس «چگالی شناوری» Buoyant Density عمل می‌کند. در این تکنیک، ذرات درون یک محیط گرادیان چگالی (اغلب سزیم کلراید) تحت نیروی گریز از مرکز قرار می‌گیرند تا زمانی که به نقطه‌ای در گرادیان برسند که چگالی آن‌ها دقیقاً با چگالی محیط اطرافشان برابر شود در این وضعیت تعادلی،حرکت ذره متوقف شده و ذرات در نواحي متناسب با چگالی ذاتی خود، تثبیت می‌گردند. از آنجا که این فرآیند یک حالت ترمودینامیکی پایدار است، تداوم سانتریفیوژ (پس از رسیدن به نقطه تعادل) تغییر محسوسی در موقعیت باندها ایجاد نمی‌کند. این حالت، اصل ایزوپیکنیک Isopycnicاست.وقتی ذره‌ای به نقطه تعادل ایزوپیکنیک می‌رسد، «حرکت نمی‌کند» به این معنا که برآیند نیروی شناوری و نیروی گریز از مرکز صفر می‌شود. باید توجه داشت که در حالت ایزوپیکنیک جداسازی بر پایه چگالی است و سلول یا ذره در جایی متوقف می‌شود که چگالي محیط یا مدیوم با چگالي پارتیکل یا نمونه مساوي مي شود: $\rho_p = \rho_m$.

مثال: گرادیان کلرید سزیم برای جداسازي پروتیین و DNA وRNA بر اساس چگالي شناوري از هم بسیار مناسب است. تفاوت روش ایزوپیکنیک و سرعتی: در روش ایزوپیکنیک، ذرات در موقعیتی قرار می‌گیرند که چگالی محیط با چگالی شناوری آن‌ها برابر است؛ اما در روش سرعتی، جداسازی بر اساس تفاوت سرعت رسوب‌گذاری در لایه هاي غلظتي انجام می‌شود و زمان سانتریفیوژ اهمیت اساسی دارد.

EQUILIBRIUM SEDIMENTATION

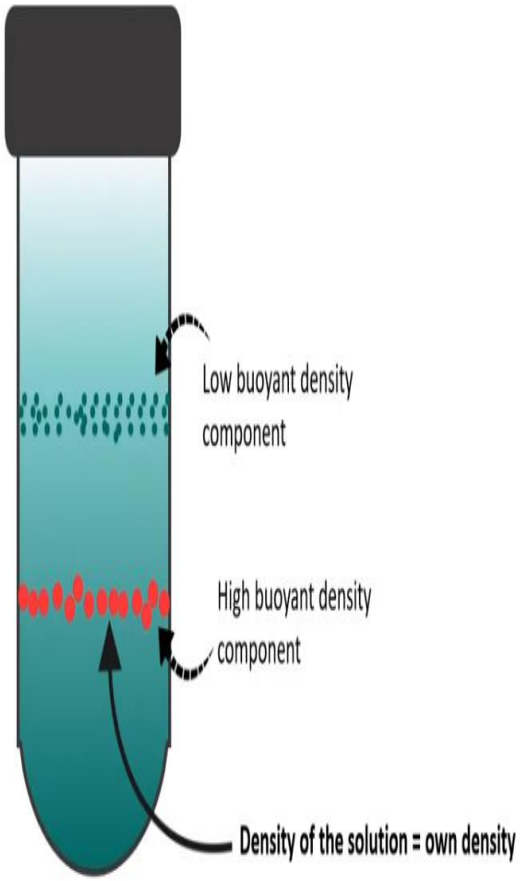
Aka isopycnic centrifugation.

In equilibrium sedimentation, subcellular components move up or down when centrifuged in a gradient until they reach a position where their density matches their surroundings.



EQUILIBRIUM SEDIMENTATION

Denser gradients, which are especially useful for protein and nucleic acid separation, can be formed from cesium chloride.



سانتریفوژ در شیب غلظت

چگونه سه روش را از هم تشخیص دهیم

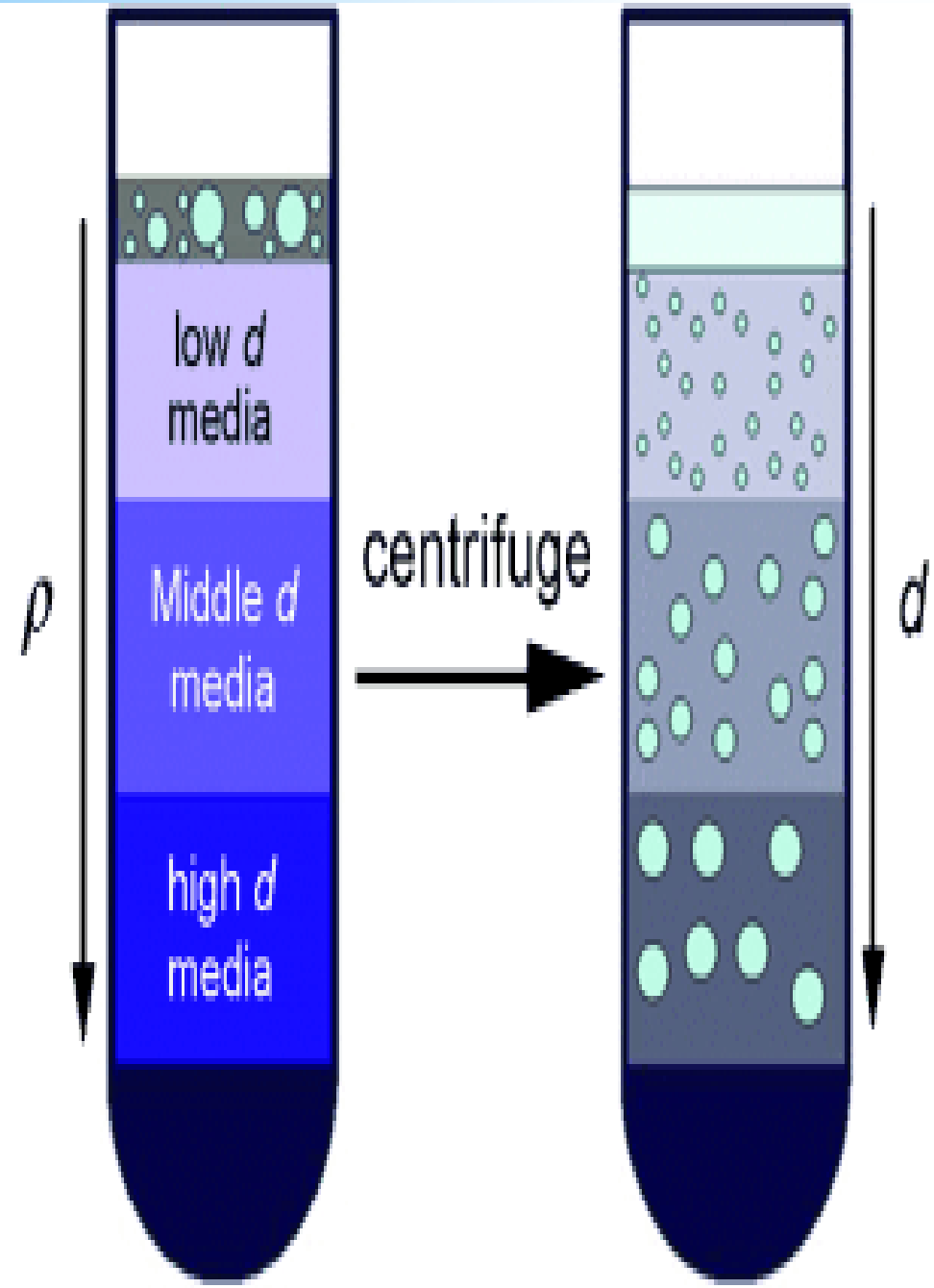
برای تشخیص سریع، به این پرسش توجه کنید: ذرات بر اساس چه چیزی از هم جدا می‌شوند؟ اگر پاسخ اندازه و جرم باشد، روش افتراقی است؛اگر تفاوت در سرعت حرکت ذرات مطرح باشد، روش ناحیه‌ای زونال ریت است؛ و اگر جایگاه نهایی ذرات را چگالی شناوری تعیین کند، روش ایزوپیکنیک است.

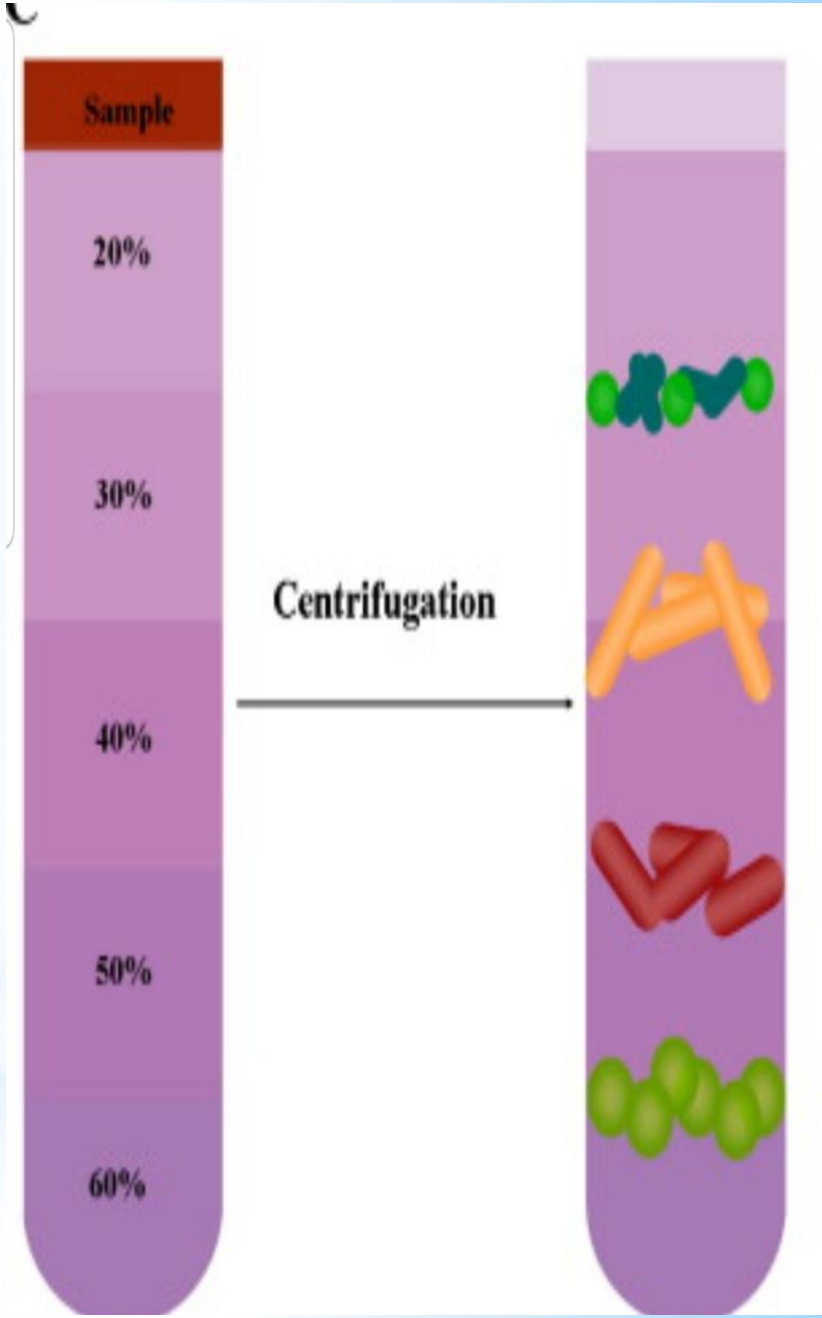
در سانتریفیوژ افتراقی، نمونه در چند مرحله سانتریفیوژ می‌شود. در هر مرحله، بخشی از ذرات رسوب می‌کند و مایع رویی برای مرحلهٔ بعدی نگه داشته می‌شود.

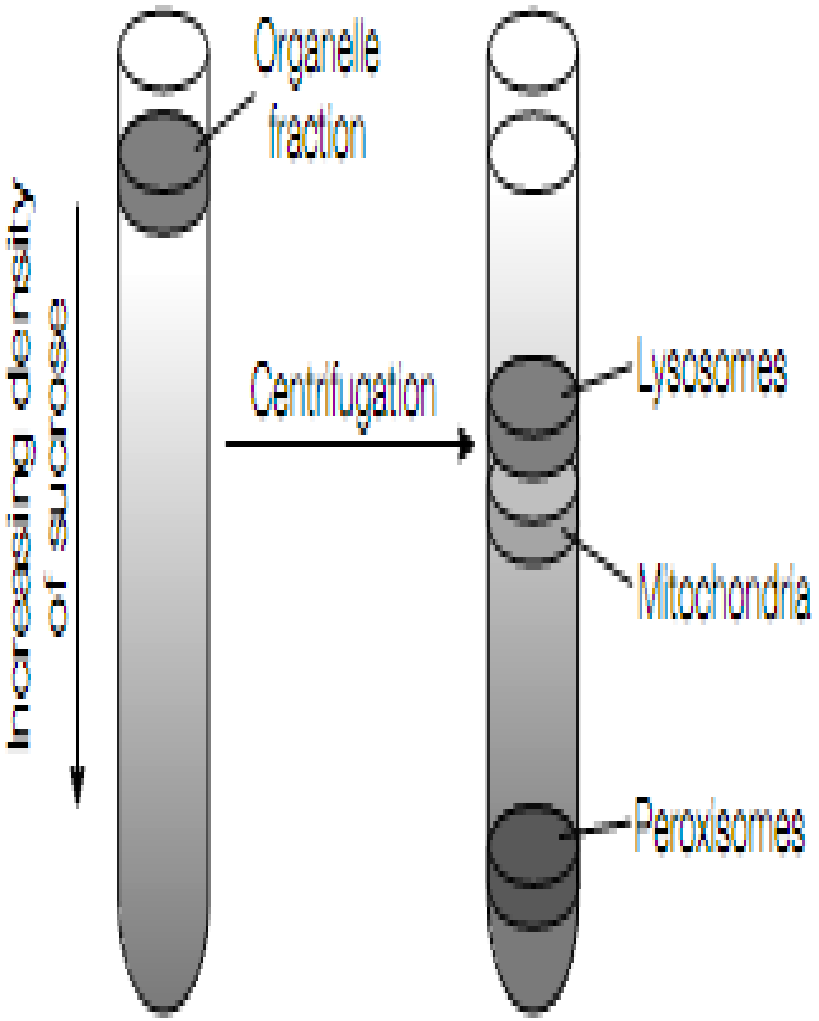
در روش ناحیه‌ای زونال ریت، ذرات در گرادیان چگالی با سرعت‌های متفاوت حرکت می‌کنند؛ بنابراین زمان سانتریفیوژ باید کنترل شود تا جداسازی بر پایهٔ سرعت باقی بماند.

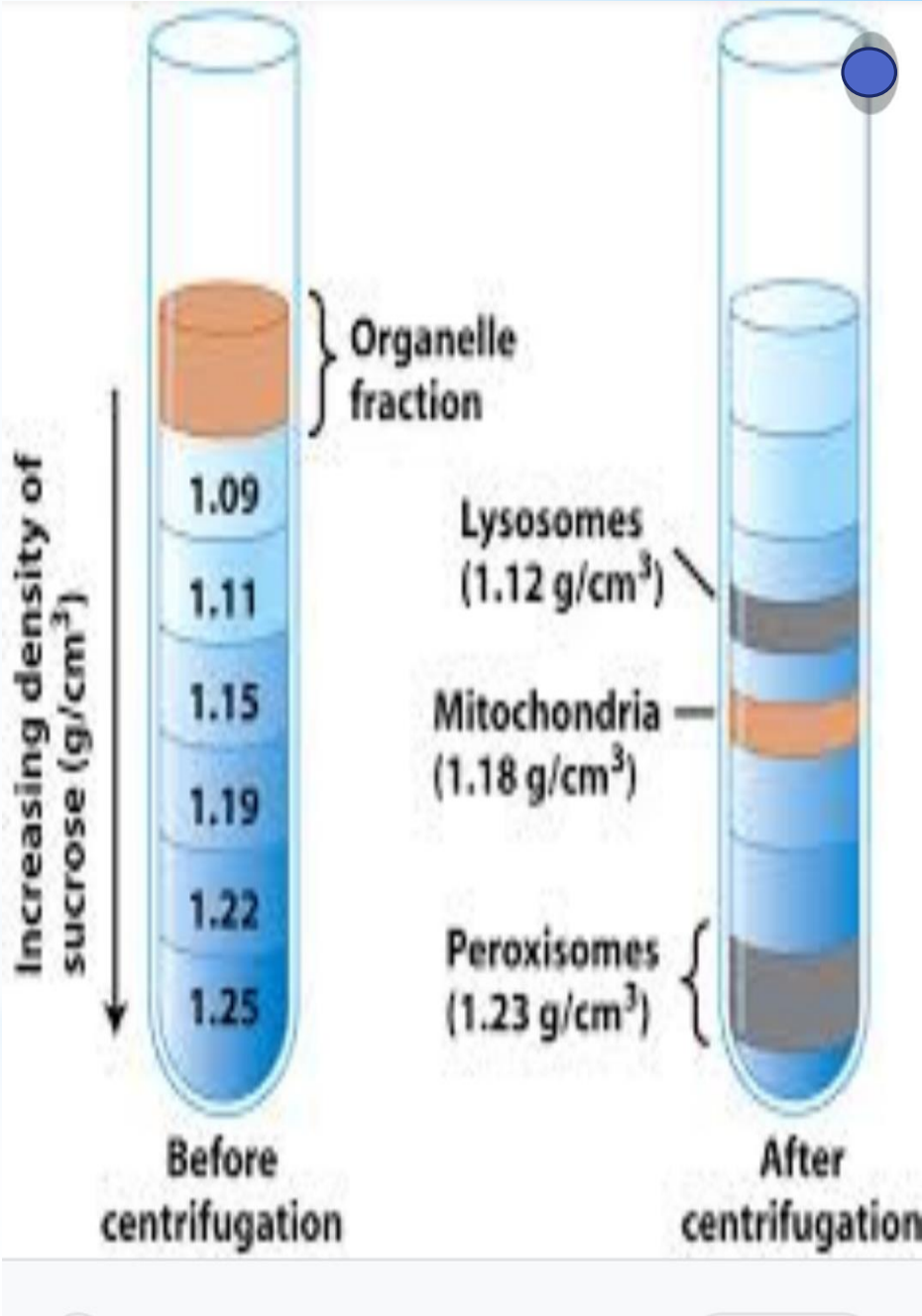
در روش ایزوپیکنیک، ذرات تا رسیدن به ناحیه‌ای حرکت می‌کنند که چگالی محیط با چگالی شناوری آن‌ها برابر شود؛ در این روش جایگاه تعادلی ملاک است، نه صرفاً سریع‌تر یا کندتر بودن ذرات.

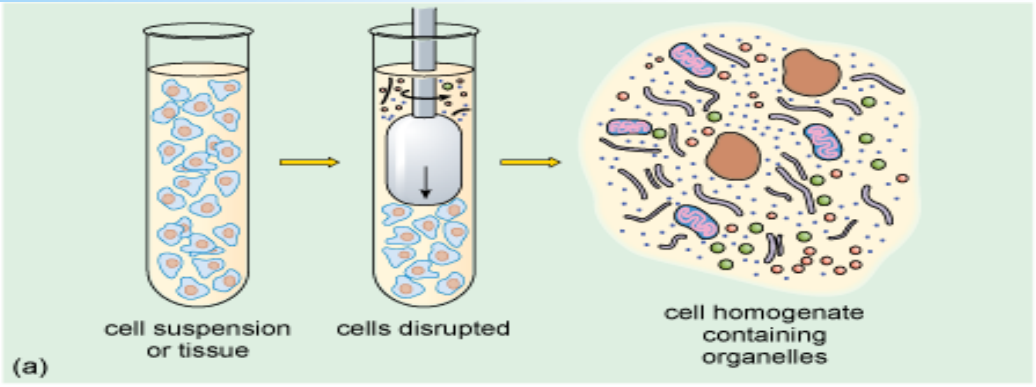
ویژگی	افتراقی (Differential)	ناحیه‌ای/سرعتی (Rate-Zonal)	ایزوپیکنیک (Isopycnic)
مبنای جداسازی	اندازه و جرم ذرات	سرعت رسوب‌گذاری	چگالی شناوری
عامل‌های مؤثر	اندازه، جرم و نیروی گریز از مرکز	اندازه، شکل و ساختار ذره؛ زمان	چگالی ذره و گرادیان
نحوه اجرا	چند مرحله با افزایش تدریجی نیرو	ذرات روی گرادیان قرار می‌گیرند و در زمان محدود جدا می‌شوند	ذرات در گرادیان حرکت می‌کنند تا به چگالی برابر برسند
اهمیت زمان	اجرای چند مرحله‌ای	بسیار مهم؛ توقف پیش از رسیدن ذرات به ته لوله	ادامه تا رسیدن به تعادل
خروجی معمول	رسوب (Pellet) و مایع رویی (Supernatant)	ناحیه‌ها یا باندهای جداگانه در گرادیان	باندها در جایگاه چگالی متناظر

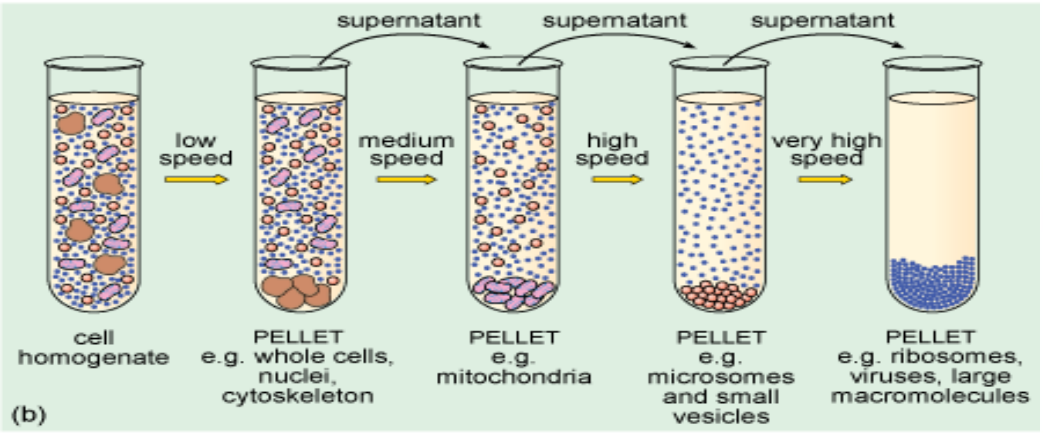

low d
media
Middle d
media
high d
media
ρ
centrifuge
d

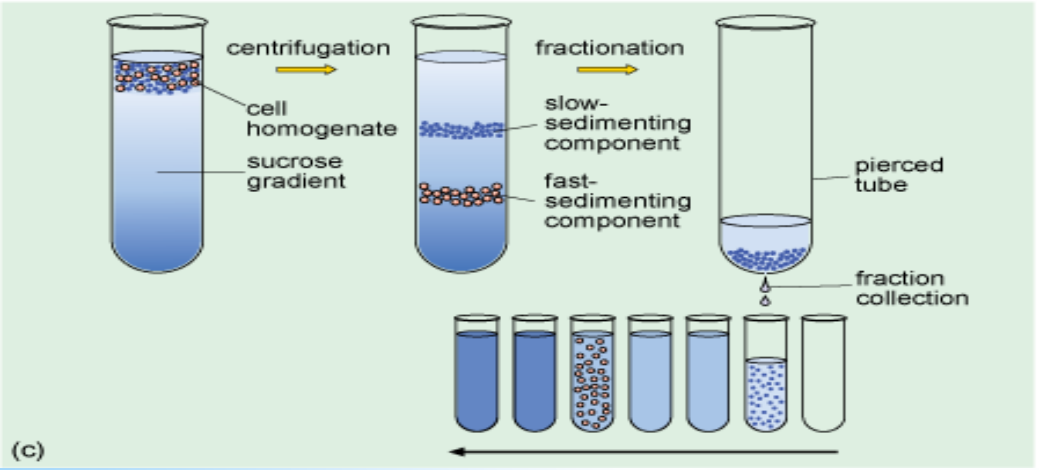

Sample
20%
30%
40%
50%
60%
Centrifugation

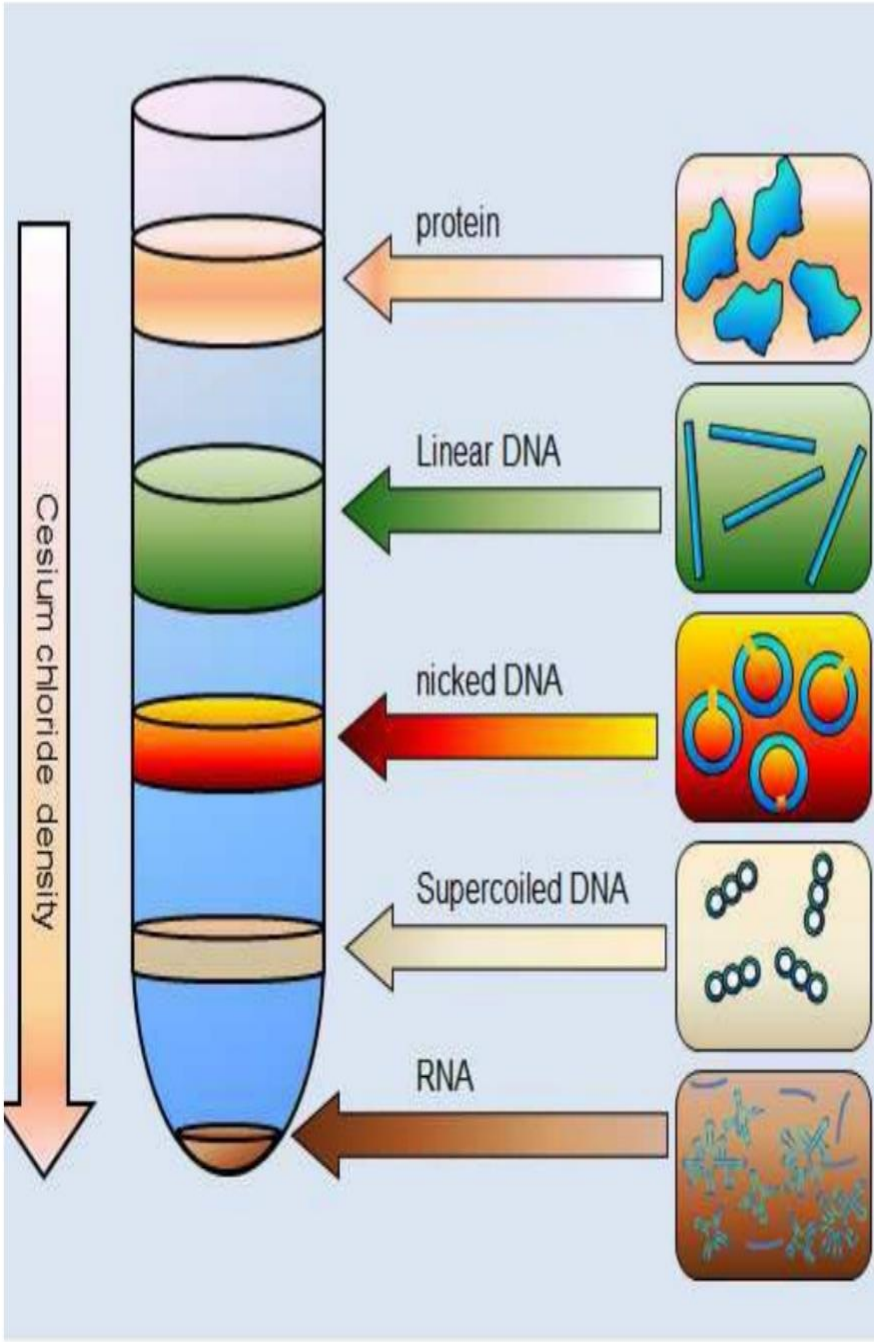

Organelle fraction
Increasing density of sucrose
Centrifugation
Lysosomes
Mitochondria
Peroxisomes


Organelle fraction
1.09
1.11
1.15
1.19
1.22
1.25
Increasing density of sucrose (g/cm³)
Lysosomes (1.12 g/cm³)
Mitochondria (1.18 g/cm³)
Peroxisomes (1.23 g/cm³)
Before centrifugation
After centrifugation


cell suspension or tissue
cells disrupted
cell homogenate containing organelles
(a)


supernatant
supernatant
supernatant
low speed
medium speed
high speed
very high speed
cell homogenate
PELLET e.g. whole cells, nuclei, cytoskeleton
PELLET e.g. mitochondria
PELLET e.g. microsomes and small vesicles
PELLET e.g. ribosomes, viruses, large macromolecules
(b)


centrifugation
fractionation
cell homogenate
sucrose gradient
slow-sedimenting component
fast-sedimenting component
pierced tube
fraction collection
(c)

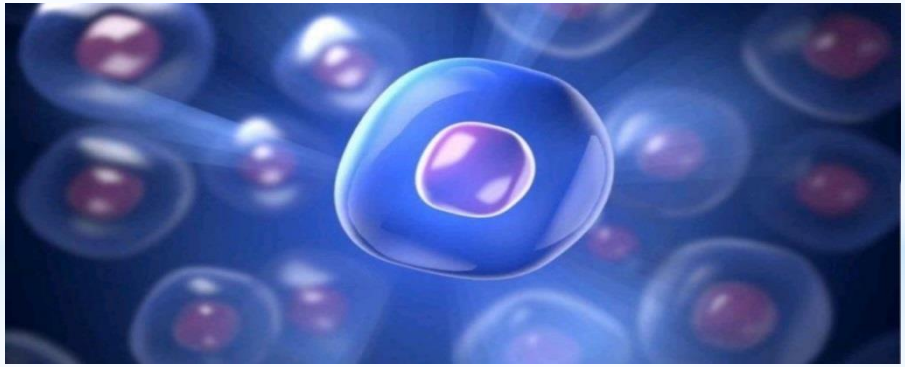

Cesium chloride density
protein
Linear DNA
nicked DNA
Supercoiled DNA
RNA

کاربرد های تفکیک اجزاء سلولی و میکروسکوپی بر اساس شیب غلظت

-جداسازی سلول های بنیادی از خون بند ناف

خون بند ناف منبعی از سلول‌های بنیادی خونساز است. برای جداسازی بخش سلولی مونونوکلئر خون،از محیطهایی مانند فایکول یا لنفودکس(Lymphodex) با چگالی تقریبی 1/077 گرم بر میلی‌لیتر استفاده می‌شود. پس از سانتریفیوژ مناسب، سلول‌های مونونوکلئر یا تک هسته اي در مرز پلاسما و محیط جداکننده لنفودکس جمع می‌شوند. سرعت و مدت دقیق سانتریفوژ باید بر اساس دستورالعمل همان محیط تعیین شود.

پس از کشت سلول های بنیادی تک هسته ای جدا شده در محیط های کشت مغذی و القاء فاکتورهای رشد مختلف به انها این سلول ها قادرند به سلول های کبدی،غضروفی،استخوانی و سلول های چربی تمایز یابند.

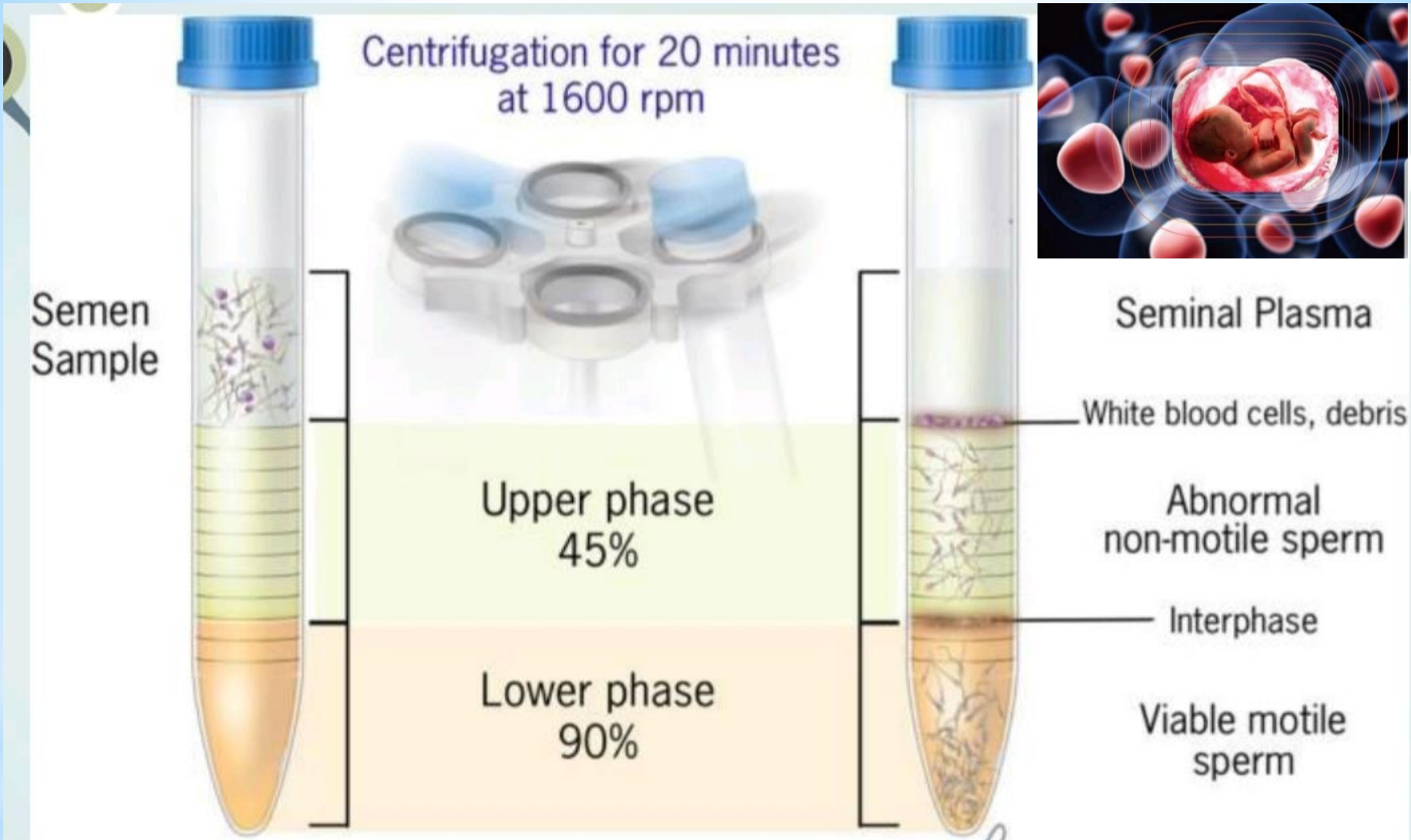


-جداسازی پي آر پي PRP از خون تام

PRP مخفف PLATELET RICH PLASMA يا پلاسماي غني از پلاكت است كه در حقيقت عصاره اي طبيعي براي جوان سازي و درمان ميباشد و از خون تام و تازه خود فرد تهيه می‌شود. در طي روش دو مرحله‌ای سانتریفیوژ نخست سلول‌های خونی را از پلاسما جدا می‌شوند و مرحله دوم پلاکت‌ها را تغلیظ میگردند. کاربرد درمانی آن به شرایط بالینی و شواهد مربوط وابسته است و صرفا PRP به‌تنهایی به معنی اثربخشی برای هر بیماری نیست.در واقع غلظت بالاي پلاكت خون خود فرد در روند بازسازي و ترميم بافتي در چند جلسه درماني مورد استفاره قرار ميگيرد.

-درمان ناباروری

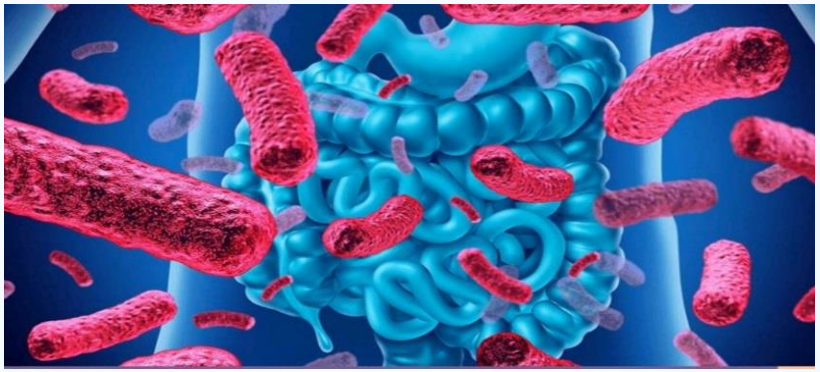
مسئله ناباروری دلائل مختلف دارد.یکی از راههای درمان انجام لقاح خارج رحمی است. برای تلقیح سلول اسپرم مناسب در موارد لقاح خارجی رحمی با تخمک،بایستی اسپرم سالم با دانسیته مشخص و استاندارد از نظر محتوای سلولی و خصوصیات سیتولوژیکی هسته و ترکیبات کروماتینی و سیتوپلاسم، در شیب غلظت جداسازی و جهت تزریق به تخمک مورد استفاده قرار گیرد. در برخی روش‌های آماده‌سازی اسپرم برای لقاح آزمایشگاهی، گرادیان‌های پرکول (Percoll) برای غنی‌سازی جمعیت اسپرم‌های متحرک و دارای مورفولوژی مناسب به‌کار مي رود.استفاده بالینی به پروتکل و مقررات محل وابسته است و البته گزینش اسپرم با گرادیان به‌تنهایی تضمین کننده لقاح یا بارداری نیست.



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.



-در مهندسی ژنتیک و آزمایشات مولکولی

DNA باکتریایی از DNA پلاسمیدی و DNA ژنومی و ازRNA و پروتئین ها با چگالی شناوری متفاوت در نواحی جداگانه قرار می‌گیرند.

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،DNA در وسط و RNA به‌علت چگالی شناوری بالاتري که دارد در پایین‌تر قرار می‌گیرد.

پس از تفکیک و جداسازی با سوراخ کردن لوله ها توسط سرنگ،استخراج اجزا انجام شده و سپس در صورت لزوم تکثیر،همانندسازی،کلونینگ،نوترکیبی و غیره در مهندسی ژنتیک صورت می گیرد.

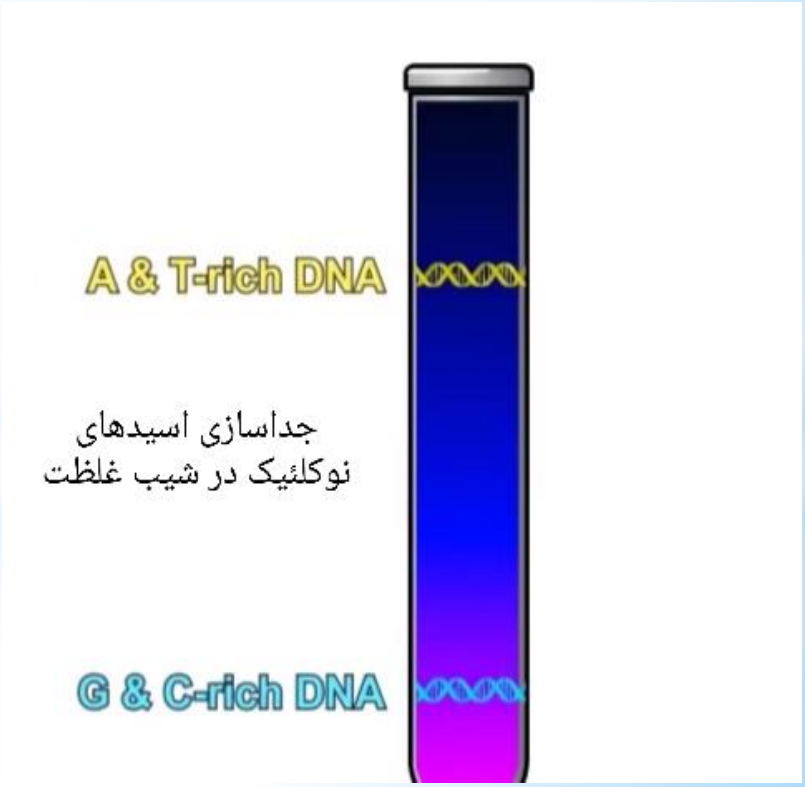
-جداسازی رشته‌های اسید نوکلئیک بر اساس چگالی

رشته‌های اسید نوکلئیک را می‌توان بر اساس تفاوت چگالی از یکدیگر جدا کرد.

علت این تفاوت آن است که رشته‌های غنی از گوانین و سیتوزین G و C، چگالی بیشتری نسبت به رشته‌های غنی از آدنین و تیمین A و T دارند.

در این مورد نمی‌توان از گرادیان سوکروز استفاده کرد؛ زیرا چگالی سوکروز از چگالی اسیدهای نوکلئیک کمتر است. در عوض، از گرادیان کلرید سزیم Cesium Chloride CsCl استفاده می‌شود که چگالي مناسبي دارد.






مواد و وسایل مورد نیاز

مواد و وسایل مورد نیاز

۱.آب مقطر
۲.لام و لامل
۳.محلول سوکروز اشباع
۴.میکروسکوپ نوری
۵.خون تام
۶.پاستور پی‌پت یا میکرو پی پت یا سرنگ
۷.لوله سانتریفوژ
۸.سانتریفوژ
۹.لوله آزمایش
۱۰. لوله مخصوص خونگیری حاوی ضد انعقاد

روش کار

دقت شود: این آزمایش یک مدل شبیه سازی تئوریک و آموزشی برای بحث درباره سانتریفوژ در شیب غلظت و بررسي اثر غلظت و فشار اسمزي بر سلولهای خون مي باشد،نه یک پروتکل معتبر برای جداسازی و خالص سازی سلول‌های زنده خوني.

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

ابتدا خون را از رگ گرفته و در لوله حاوی ضد انعقاد میریزیم . چون خون یک بافت سوسپانسیون است، برخلاف بافت جامد، مراحل هموژن سازی و فیلتراسیون انجام نمی‌شود.

چند قطره خون تام و کامل را در لوله سانتریفوژي که حاوي غلظت‌هاي ناپیوسته۱۰۰ ، ۷۵ ، ۵۰ ، ۲۵ ، ۰ درصد سوکروز مي‌باشد ریخته و به مدت ۳ دقیقه در دور۰ ۱۰۰ rpm سانتریفیوژ کنید.

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
جهت ایجاد گرادیان 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 قطره قطره 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.

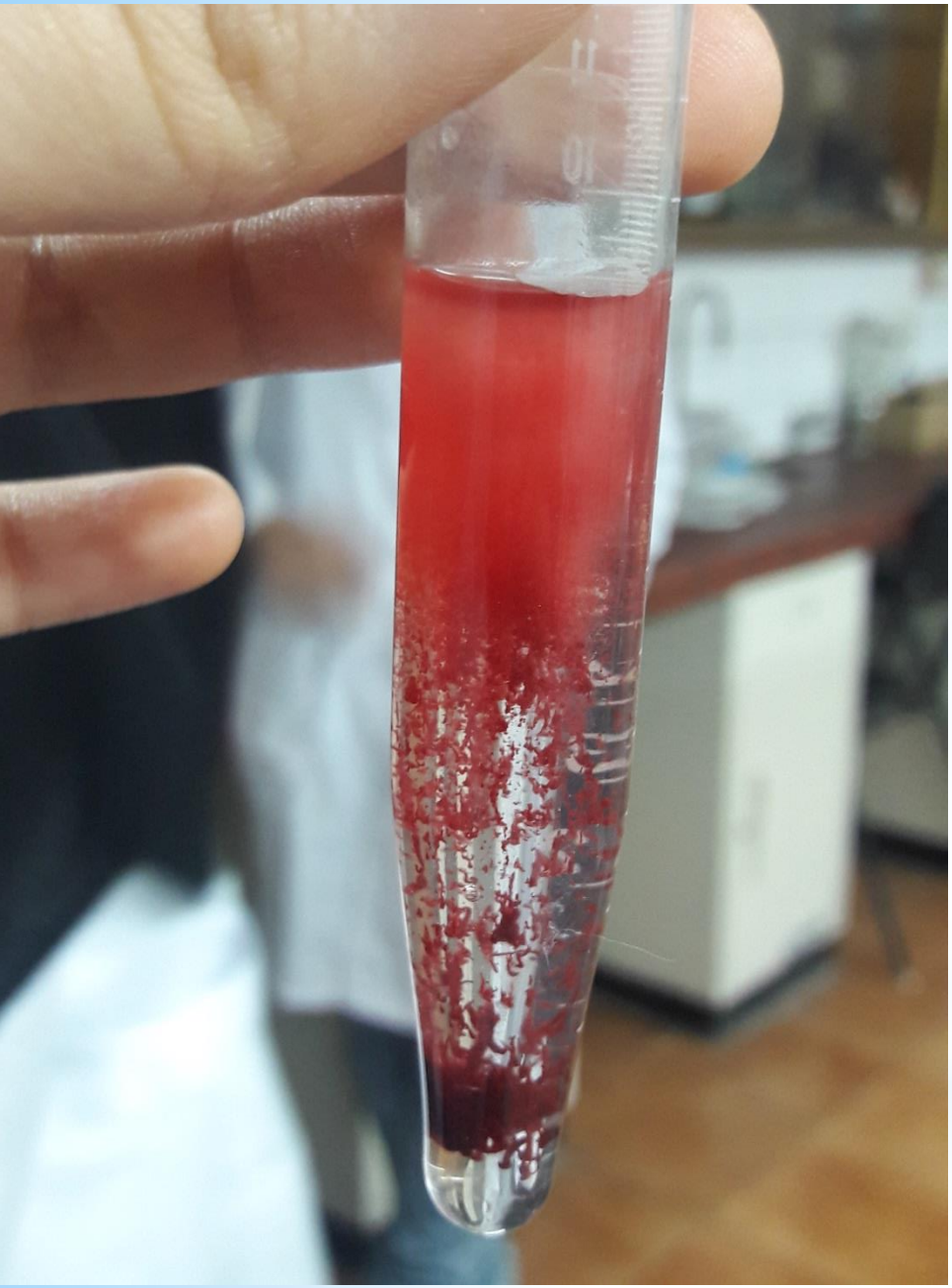
پس از پايان سانتريفوژ به آرامي توسط پاستور پيپت يا سمپلر از غلظت‌هاي صفر درصد، 25 درصد و 100 درصد طوريکه لايه‌ي‌هاي غلظتي به هم نخورد و با هم مخلوط نشوند، نمونه‌برداري کنيد. لامل گذاري کرده و زير ميکروسکوپ در بزرگنمايي 40 مشاهده نماييد.

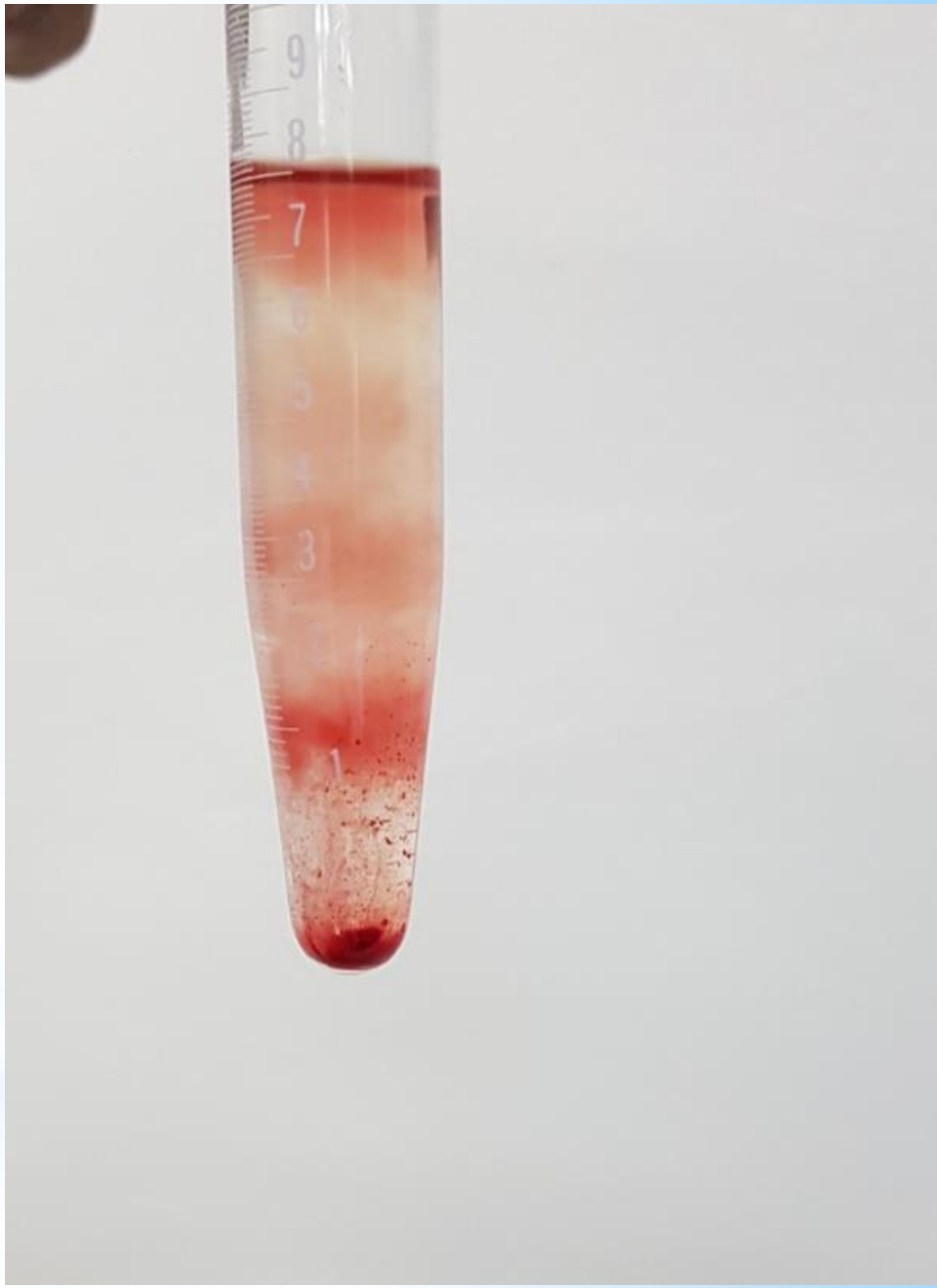
در یک میدان دید تصاویر میکروسکوپی نمونه‌های مربوط به شیب غلظت 25 درصد و 100 درصد را رسم کنید و نتایج را تفسیر نمایید.





Cellular and Molecular Lab_Farzaneh Forouharfar





تفسیر نتایج

پس از پایان سانتریفیوژ بافت خونی در شیب غلظت ناپیوسته سوکروز به دقت به لوله آزمایش نگاه کرده و در غلظت های صفر درصد،25 درصد و 100 در صد سوکروز نتایج را از نظر وجود گلبولهای قرمز سالم تفکیک شده بررسی نمایید.این ازمایش که در شیب غلظت ناپیوسته سوکروز انجام شده وهدف جداسازی سلولهای گلبول قرمز سالم است.

ناحیه صفر درصد برای گلبول قرمز محیطی هیپوتونیک بشمار می‌رود ورود آب بدرون گلبول های قرمز می‌تواند موجب تورم و همولیز سلول شود.در این حالت هموگلوبین آزاد می‌شود و مايع حاصل «پلاسما» و هموگلوبين ازادشده از سلولهاي هموليز شده مي باشد.

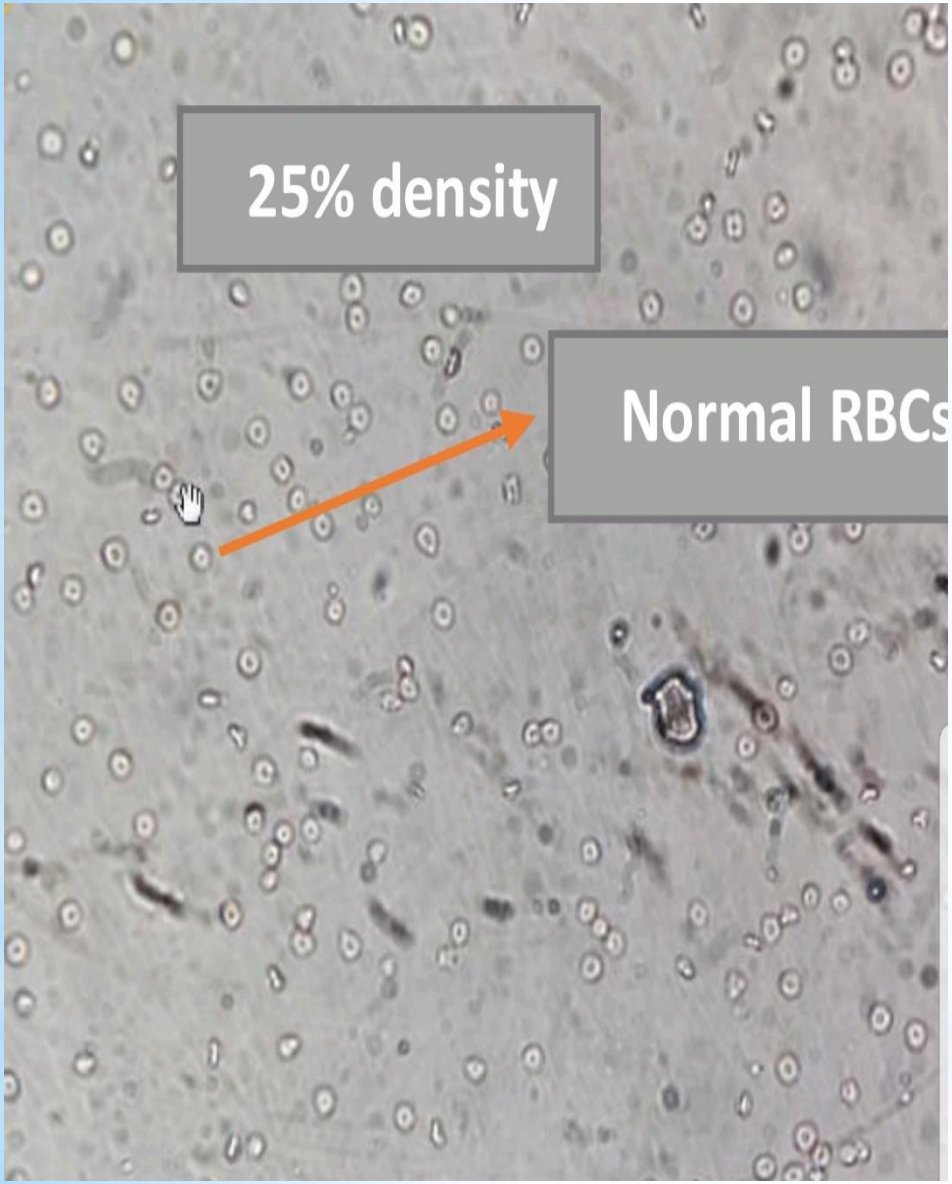
پلاسما بخش مايع خون پيش از لخته شدن است و حاوي تركيبات مختلفي مانند ليپيدها قندها هورمون ها اب و املاح و يون هاي مختلف مي باشد.

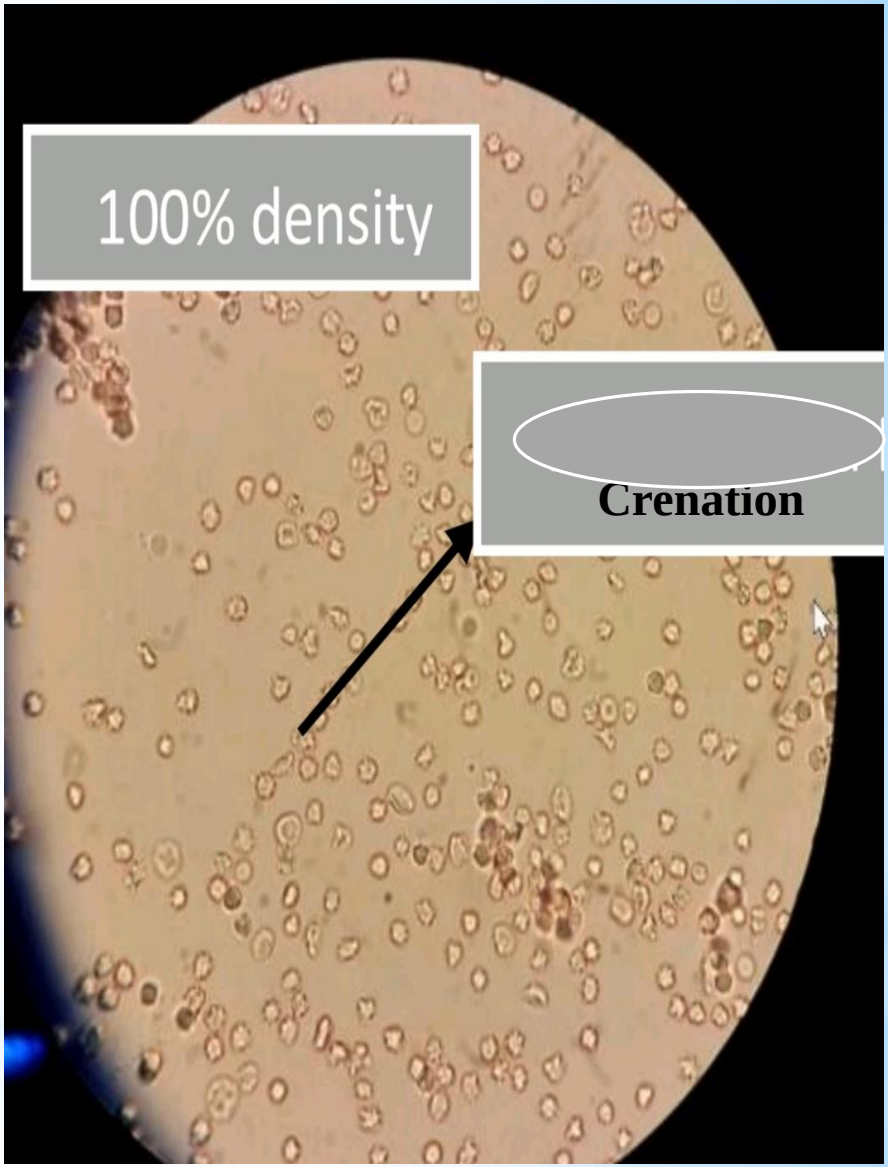
ناحيه 25 درصد تا حدودي ايزوتونيک است و گلبول قرمز تفكيک شده و سالم مي مانند.

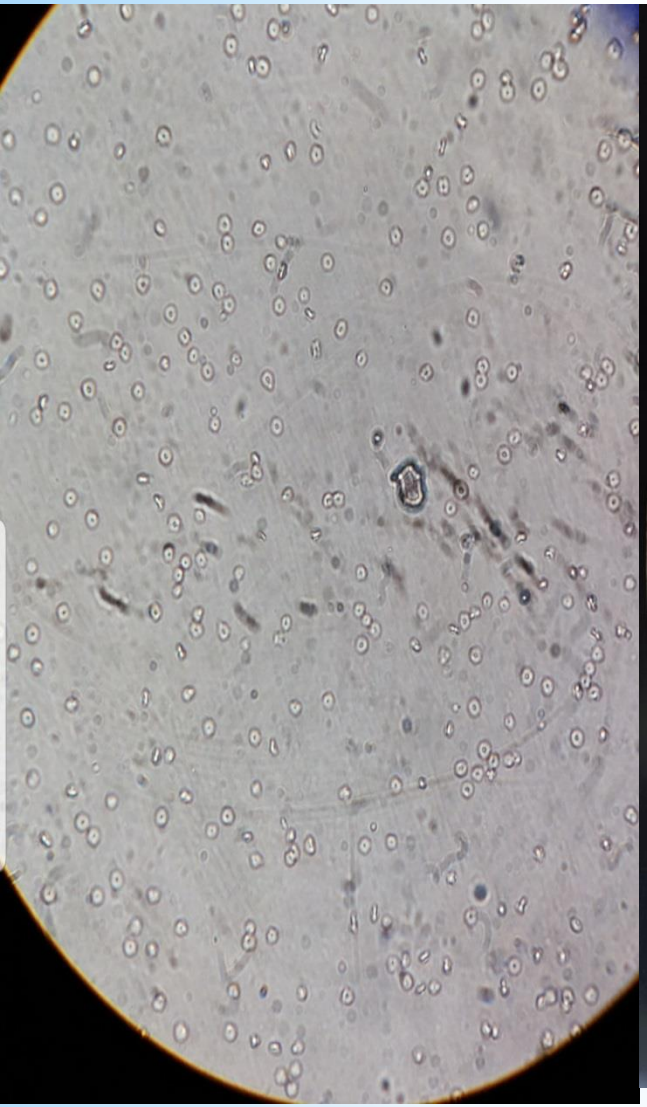
درناحيه 50 و 75 و 100 درصد گلبولهای قرم دچار آسیب و چروکیدگي یا کرنِیشن (Crenation) یعنی جمع‌شدگی و دندانه دار شدن غشا به دنبال خروج آب میشوند.

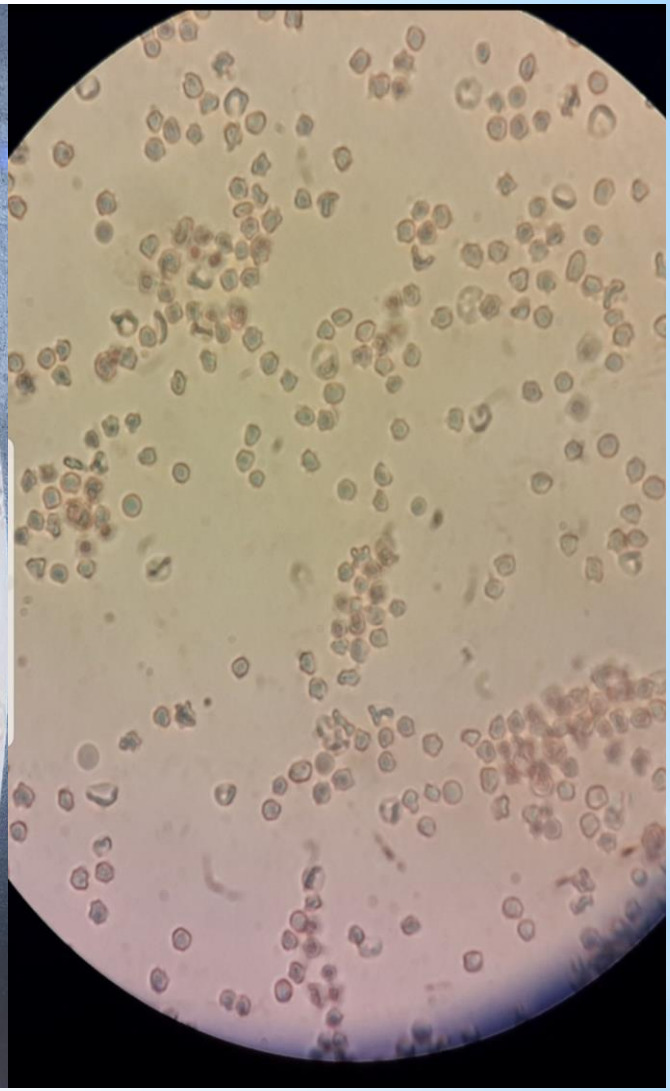
محلول‌های بسیار غلیظ سوکروز آب را از گلبول قرمز خارج می‌کنند و موجب چروکیدگی و تغییر شکل یا آسیب سلولی می‌شوند.اصطلاح «پلاسمولیز» برای گلبول قرمز پستانداران دقیق نیست، زیرا این سلول دیواره سلولی ندارد.

تصاوير مشاهده شده ميكروسكوپي در غلظت هاي مختلف

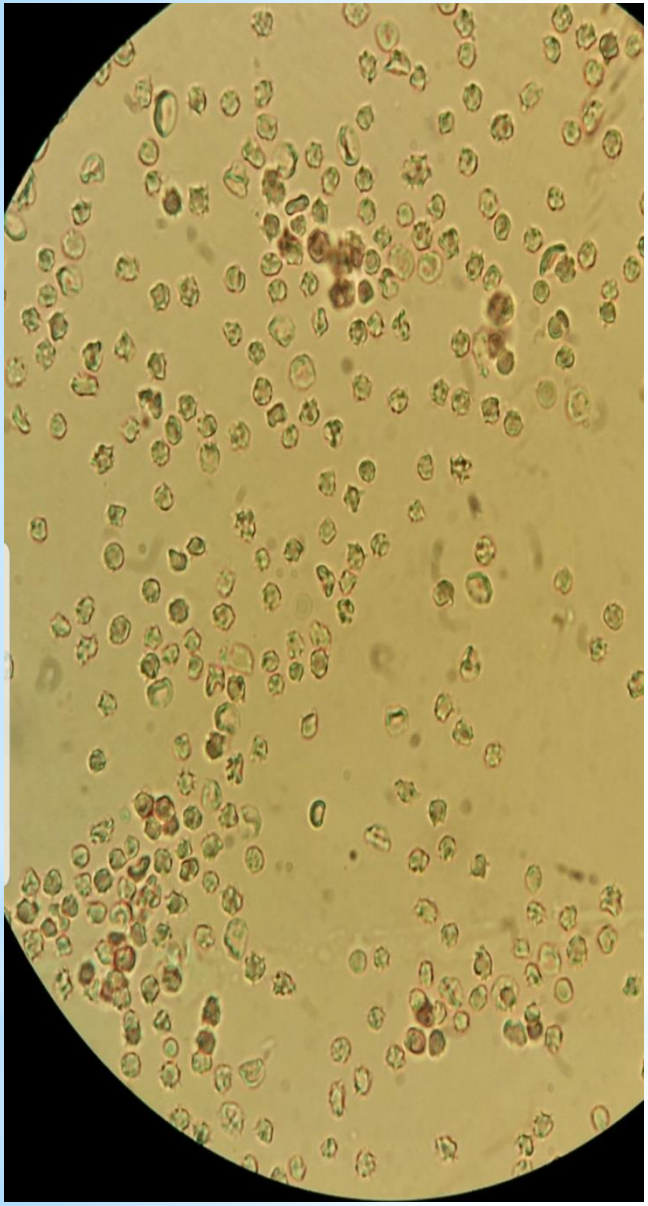


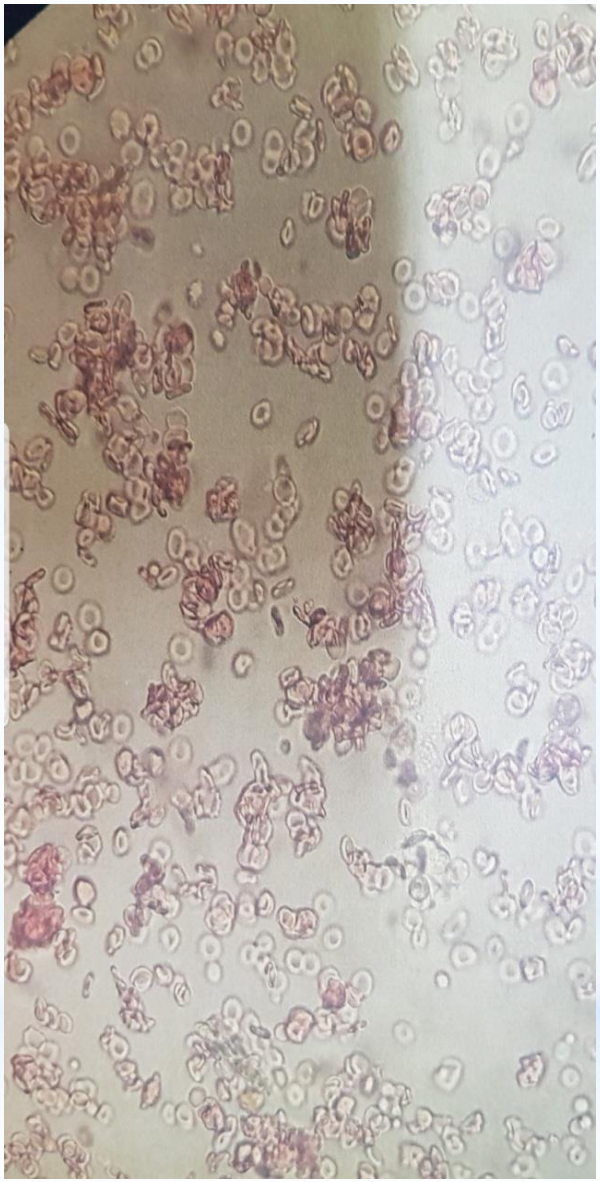


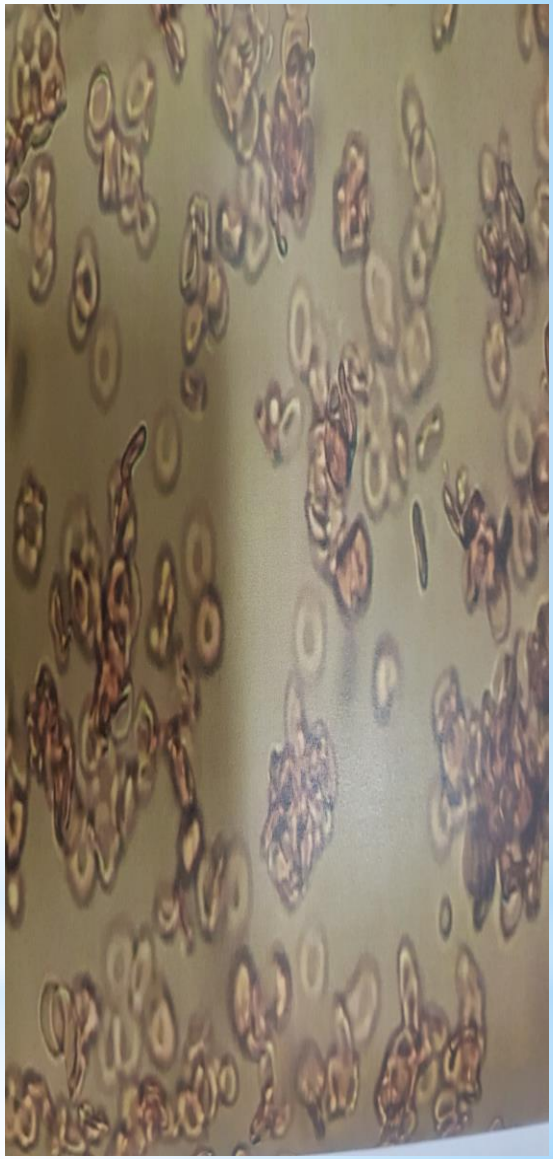




سلول هاي اسيب ديده در باندهاي غليظ تر از 25 درصد







تصاویر مشاهده شده زیر میکروسکوپ

سانتریفوژ درشیب غلظت فایکول جهت جداسازي بافی‌کوت و لایه‌های خون

جداسازی سلول‌های مونونوکلئر خون در شیب غلظت فایکول که از نظر تکنیکی تقریباً مشابه این آزمایش است، انجام می شود.پس از سانتریفیوژ در دور و زمان ستاپ شده بر اساس پروتوکل، پلاسما در قسمت بالاتر، لایه نازک بافی‌کوت (Buffy coat) شامل پلاکت‌ها و گلبول‌های سفید مونونوکلئر مثل لنفوسیت ها و مونوسیت ها در قسمت پایین‌تر و چون تعدادشان بسیار کمتر است، این لایه نازک است. بعد از آن ناحیه جدا کننده فایکول و سپس گلبول‌های قرمز در انتهای لوله قرار می‌گیرند.

Overview ficoll

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





محلول فایکول با چگالی ۱,۰۷۷ یک لایه میانی است که به‌عنوان مانع/برير Barrier Density عمل می‌کند و سلول‌های مونونوکلئر را از پلاسما و گلبول‌های قرمز جدا می‌سازد.

زیرلایه‌های بافی‌کوت:

با مطالعه دقیق‌تر و رنگ‌آمیزی اختصاصی مشخص می‌شود که بافی‌کوت به‌علت اختلاف چگالی اجزایش به سه زیرلایهٔ میکروسکوپی تقسیم می‌شود که براحتی قابل مشاهده نیستند و به ترتیب عبارتند از پلاکت‌ها،لنفوسیت‌ها ومونوسیت‌ها.این بخش در سلول درمانی (Cell Therapy) کاربرد دارد.

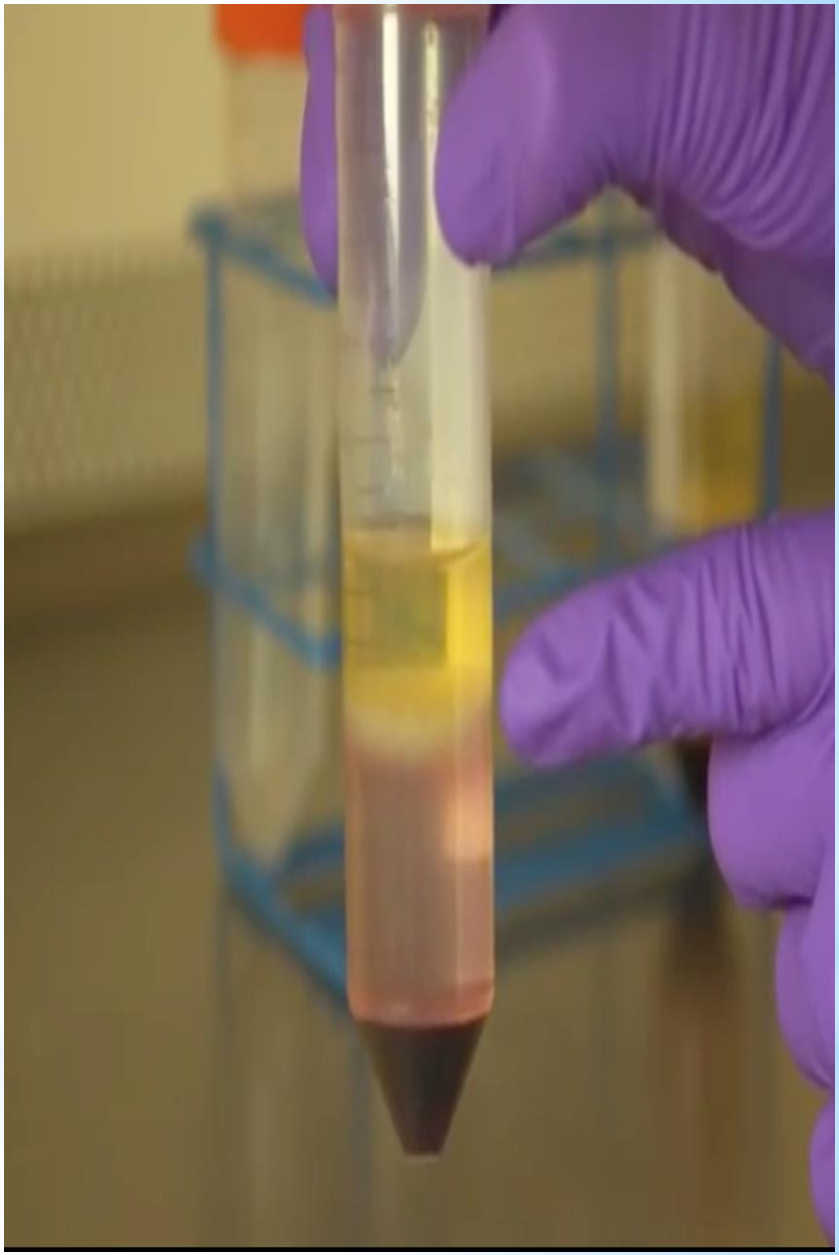
زیرلایه‌های گلبول قرمز:

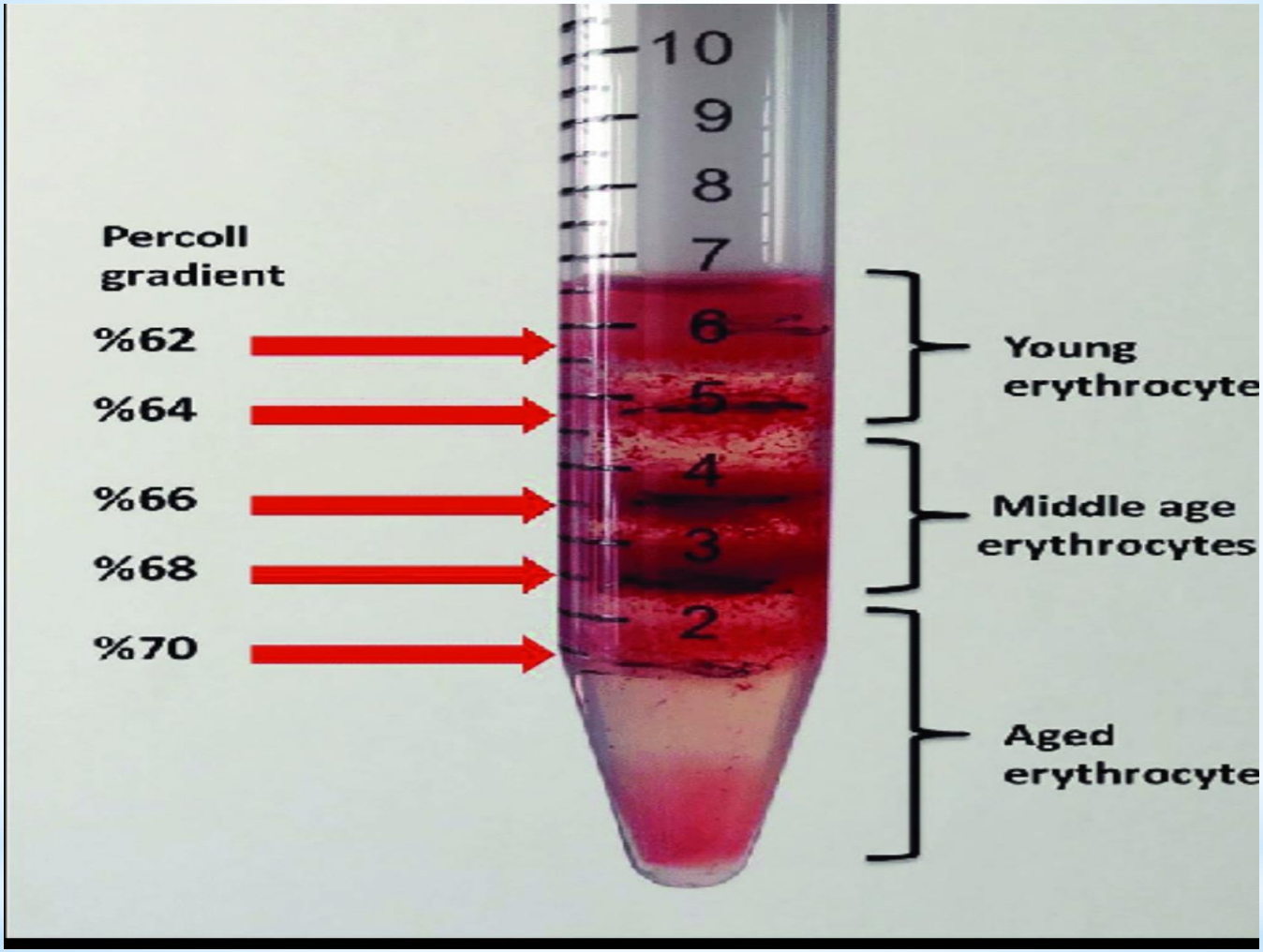
در انتهای لوله، گلبول‌های قرمز به ترتیب رتیکولوسیت‌ها (سبک‌تر و نابالغ) در بالا، گلبول‌های قرمز بالغ در وسط و گلبول‌های قرمز پیر و چروک شده در انتها قرار می‌گیرند.

گلبولهای قرمز در سنین مختلف بلوغی را در شیب غلظت مناسب پرکول می توان از هم تفکیک کرد.

توجه داشته باشید موارد فوق در ازمایشگاه آموزشي انجام نمیشود و جهت تکمیل اطلاعات ارائه شده و دانستن انها جهت تکمیل مطالب این جلسه اموزشي ضروری می باشد.


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





جداسازي سلولهاي خوني گلبول قرمز با سنين مختلف در شيب غلظت پركول