روش جداسازی سلول DC از طحال موش

۱- قبل از هر کار باید مواد مورد استفاده تهیه گردد.

(به طرزتهیه مواد مراجعه شود) که شامل PBS EDTA , CLLAGENAZE DNASE+HANKS, PBS, ظرف حاوی یخ، پنس، قیچی، مش، دیش شیشه ای، مش استریل می باشد.

۲- طحال موش را بصورت استریل بیرون آورده :

ابتدا موش را (یا به روش قطع نخاع ویا از طریق گاز CO2) می کشیم سپس موش را در الکل 70% فرو برده تا استریل شود. سپس طحال موش را زیر هود جدا می کنیم.

نحوه جدا سازی طحال: جهت این کار بهتراست یک شیشه به اندازه ۲۰×۳۰ تهیه نموده و در زیر هود آن را با الکل استریل نموده موش را بر روی آن انتقال داده موش را به پهلو خوابانده تا سمت چپ آن در معرض دیده ما قرار گیرد سپس پهلوی چپ را با قیچی استریل باز کرده در این حالت طحال مشخص شده سپس آن را با پنس خارج نموده و در Petry Dish قرار می دهیم.

نکته۱: سعی شود بافت چربی اطراف طحال حتماً جدا گردد.

نکته۲: جسم طحال را در PBS شناور نموده و با پیپت پاستور چند بار پر و خالی نموده سپس بافر را را از ظرف(Petry Dish) خارج نموده.

۳- تزریق کلاژناز به طحال:

طحال را با پنس گرفته و با سرنگ انسولین مقدار یک میلی لیتر از کلاژناز را به آن تزریق نموده این عمل را چند بار انجام داده تا طحال کم رنگ تر شود.در واقع با این عمل تعداد بسیار زیادی از سلولها از طحال خارج می شود. این مایع خارج شده از طحال را به لوله فالکون انتقال داده و لوله را در ظرف حاوی یخ یا یخچال قرار می دهیم .

حال باقی مانده طحال را با قیچی یا ته سرنگ استریل له نموده و بافت له شده را در آنزیم کلاژناز شناور می کنیم و به مدت نیم ساعت در انکوباتور قرار داده.

طرز تهیه کلاژناز:

مقدار ۲۵ میلی گرم پودر از آنزیم کلاژناز نوع D را در ۳ میلی لیتر بافر HANKS حل کرده و آن را برای استریل کردن از فیلتر عبور داده و به مقدارتقریبی ۷۰۰ لاندا Aliquot در هرمیکروتیوب فریز می کنیم. و برای استفاده نهایی باید آن را به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق کنیم. بطو ر مثال برای سه عدد طحال ۷۰۰ لاندا را به ۷ سی سی می رسانیم.

Autoimmune Diseases Research Center

۴- شستشوی سلولها وشمارش کلی:

در این مرحله ابتدا مایع حاوی سلول راکه از طحال خارج کردیم ودر دمای ۴درجه گذاشتیم را همراه سلولهای له شده ای که پس از مدت ۳۰ دقیقه درانکوباتور گذاشتیم مخلوط کرده واز مش استریل در لوله ۵۰ میلی لیتر رد می کنیم ومابقی تکه های طحال که از مش رد نشده اند را با ته سرنگ بر روی مش دوباره له می کنیم تا رنگ اضافات باقی مانده سفید رنگ شوند.

پس از آن سلولها را حد اقل ۳بار با بافر 5Mm PBS EDTA شستشومیدهیم (دور سانترفیوز۵۰۰ G) وسلولهارا شمارش میکنیم وانها را از نظر viability با رنگ تریپان بلو چک میکنیم.

نکته۱: برای کاربا مش از لوله فالکون۵۰ میلی لیتر بعلت قطر مش استفاده میکنیم.

نکته۲: 5Mm PBS EDTA بایددر دمای ۴درجه قرارگیرد و از سانترفیوژیخچال دار استفاده شود.

طرز تهیه بافر PBS EDTA, 100mM : مقدار 3.75 گرم پودر EDTA رادر100 میلی لیتر اب مقطر دایانیز حل کرده وPH آن را به 7.2 رسانده برای تهیه5Mm انرا 1/20 با PBS رقیق کرده و استریل میکنیم.

۵-جدا کردن سلولهای DC از مابقی سلولها بوسیله روش Nycodens (NycoPrep1.077):

ابتدا 5-7ml از محیط CM10 دارای 5Mm PBS EDTA را تهیه کرده(250λ از100mM ,PBS EDTAرا به5ml محیط CM10 اضافه میکنیم) و بعد از اخرین مرحله شستشو سلولها را در آن حل می کنیم. پس از ان سوسپانسیون سلولی درست شده را به ارامی روی Nycodens اماده شده (4320µl Nycodens I+ PBS 680 µl)می بریم ولوله مورد نظر را به سانترفیوژ یخچال دار به مدت25 min, دور 500gو دمای ۴ درجه منتقل میکنیم. پس ازان Ring سلولی بدست امده رابا احتیاط جدا کرده و۳بار شستشومی دهیم، این عمل نیزباید در شرایط سرد PBS سرد و سانترفیوژ یخچال دار به مدت 10minدور 300g و دمای ۴ درجه انجام شود.

نکته۱: در مرحله Ring ترمز سانترفیوژ باید 0 یاoff باشد.

نکته۲: سلولهای DC بدست امده دراین مرحله خالص نیستند و با سلولهای RBC, MQ مخلوط هستند.

Autoimmune Diseases Research Center

۶- انکوبه کردن سلولها:

سلولهای DC بدست امده از مرحله قبل که خالص نیستند را در پلیتهای petridish 2 -4 cm (به پلیتهای۳2 cmمیلی لیترسوسپانسیون سلولی همرا با CM10)ریخته ودر انکو باتور37° co2 به مدت ۲ ساعت قرار می دهیم

۷- خالص سازی سلولهای DC:

ابتدا یک شعله به مدت ۱۵ دقیقه زیر هود میگذاریم تا دمای هود تقریبا ۳۷ درجه شود وپس از ان پلیتها را از انکوباتور بیرون آورده وزیر هود برده وسلولها را با پیپت پاستور به ارامی شستشو میدهیم تا سلولهای غیر DC جدا شوند و پس از ان بروی سلولهای باقیمانده کهDC هستند محیط ریخته وبه مدت ۱۸- ۱۴ساعت دوباره در انکو باتور قرار میدهیم.

Autoimmune Diseases Research Center