جدا سازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی
(PBMC: peripheral Blood Mononuclear Cell)

مقدمه:

گاهی برای انجام برخی تست‌های تشخیصی و تحقیقاتی به جداسازی سلول از خون یا بافت‌ها نیاز داریم. از جمله این تست‌ها می توان به **WBC Cross – match (Screening for Alloantibodies)، HLA – Typing، LTT (Lymphocyte Transformation Test)، Rosette (B & T)، CH50، RIA، Culture، Cloning** و **PCR** را نام برد. در جزوه حاضر به طور مختصر به انواع روش‌های جداسازی سلول‌ها اشاره شده است.

روش‌های جداسازی سلول‌ها

روش‌های جداسازی سلول‌ها به دو گروه روش‌های اختصاصی و غیراختصاصی تقسیم بندی می‌شوند.

روش‌های غیراختصاصی: در این روش‌ها جداسازی سلول‌ها بر اساس وزن، چگالی و اندازه سلول‌ها صورت می‌گیرد. جداسازی با فایکول و پرکول و حتی فیلتراسیون از جمله روش‌های غیراختصاصی می‌باشند.

روش‌های اختصاصی: در این روش‌ها جداسازی به کمک آنتی‌بادی‌های اختصاصی صورت می‌گیرد.

روشهای اختصاصی خود به دو دسته Positive Selection و Negative Selection تقسیم می‌شوند.

در Positive Selection آنتی‌بادی به کار رفته بر علیه سلول هدف است و برای جدا کردن همان سلول طراحی شده است. اما در Negative Selection آنتی‌بادی به کار رفته بر علیه سلول‌های دیگر است و نه سلول هدف.

انواع روشهای غیراختصاصی

Percoll (پرکول)

جهت جداسازی سلول‌ها، ارگان‌های سلولی، ویروس و ... بر اساس دانسیته و به کمک سانتریفیوژ استفاده می‌شود.

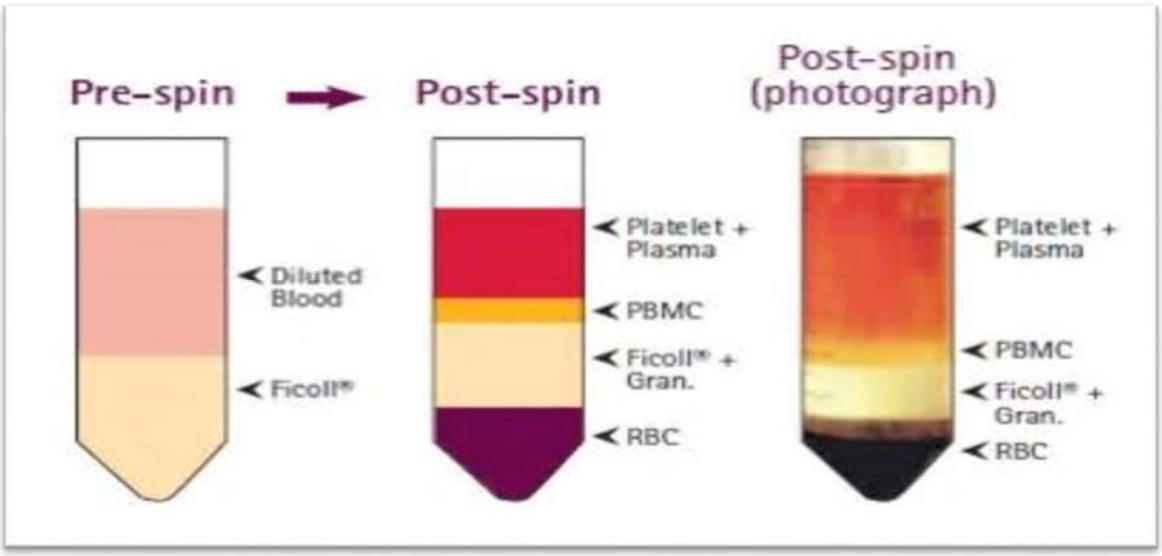
Ficoll (فایکول)

یک محلول استریل و مناسب جهت خالص‌سازی سلول‌های تک هسته‌ای (مونوسیت و لنفوسیت) است که مانند پرکول جداسازی بر اساس دانسیته و به کمک سانتریفیوژ صورت می‌گیرد.

فایکول

فایکول یک پلی‌ساکارید هیدروفیل با شاخه‌های فراوان است که با دانسیته‌های مختلف (۱/۰۷۷، ۱/ ۰۸۴ g/ml) جهت جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC)، سلول‌های مغزاستخوان و خون بندناف موجود است.

برای جداسازی PBMC به طور معمول از فایکول با دانسیته ۱/۰۷۷ استفاده می‌شود. چگالی فایکول بیشتر از چگالی لنفوسیت‌ها و کمتر از چگالی اریتروسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها است. پس از سانتریفیوژ کردن اریتروسیت‌ها و نوتروفیل‌ها از میان فایکول عبور کرده و زیر آن در کف لوله قرار می‌گیرند؛ در حالیکه سلول‌های PBMC در سطح مشترک پلاسمای غنی از پلاکت و فایکول قرار می‌گیرند. در حدود ۸۰٪ از سلول‌های PBMC را لنفوسیت‌ها و ۲۰٪ را مونوسیت‌ها تشکیل می‌دهند.



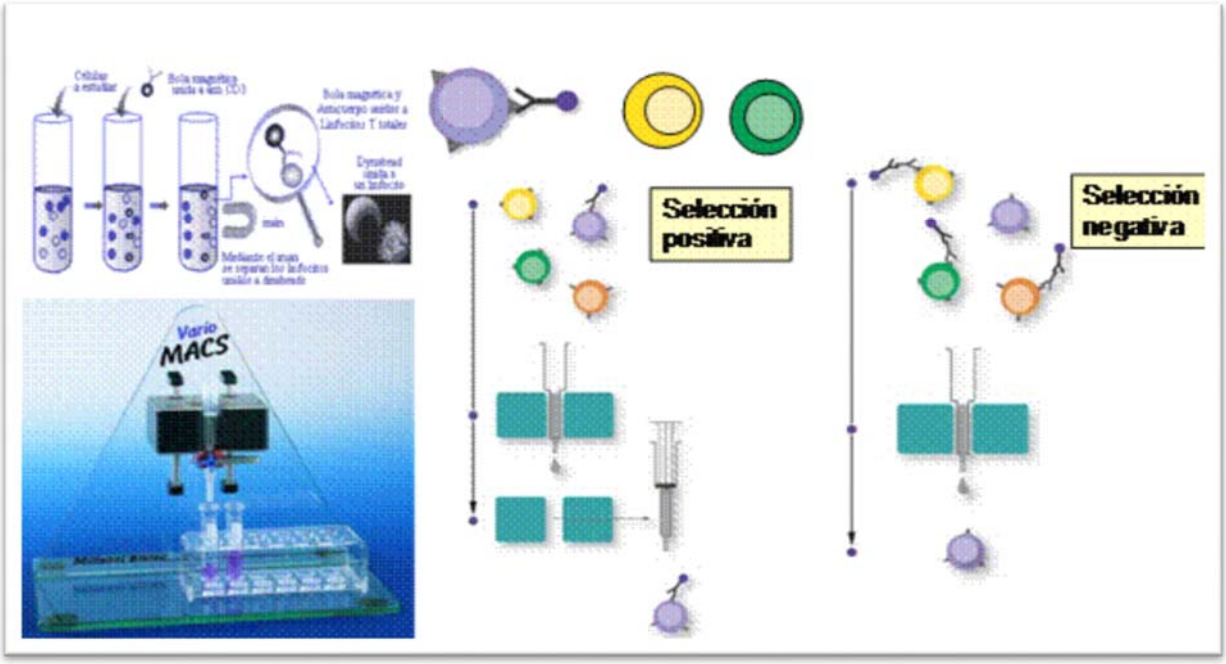
انواع روشهای اختصاصی

Rosetting

در این متدها با استفاده از RBC، بیدهای مغناطیسی و ذرات لاتکس می توان سلول‌ها را جدا کرد که از معروف ترین آنها RBC Rosetting که مثالی از آن استفاده از گلبول قرمز گوسفند یا SRBC برای جدا کردن لنفوسیت‌های T می‌باشد. متداولترین متد Rosetting استفاده از بیدهای مغناطیسی در تکنیک MACS است.

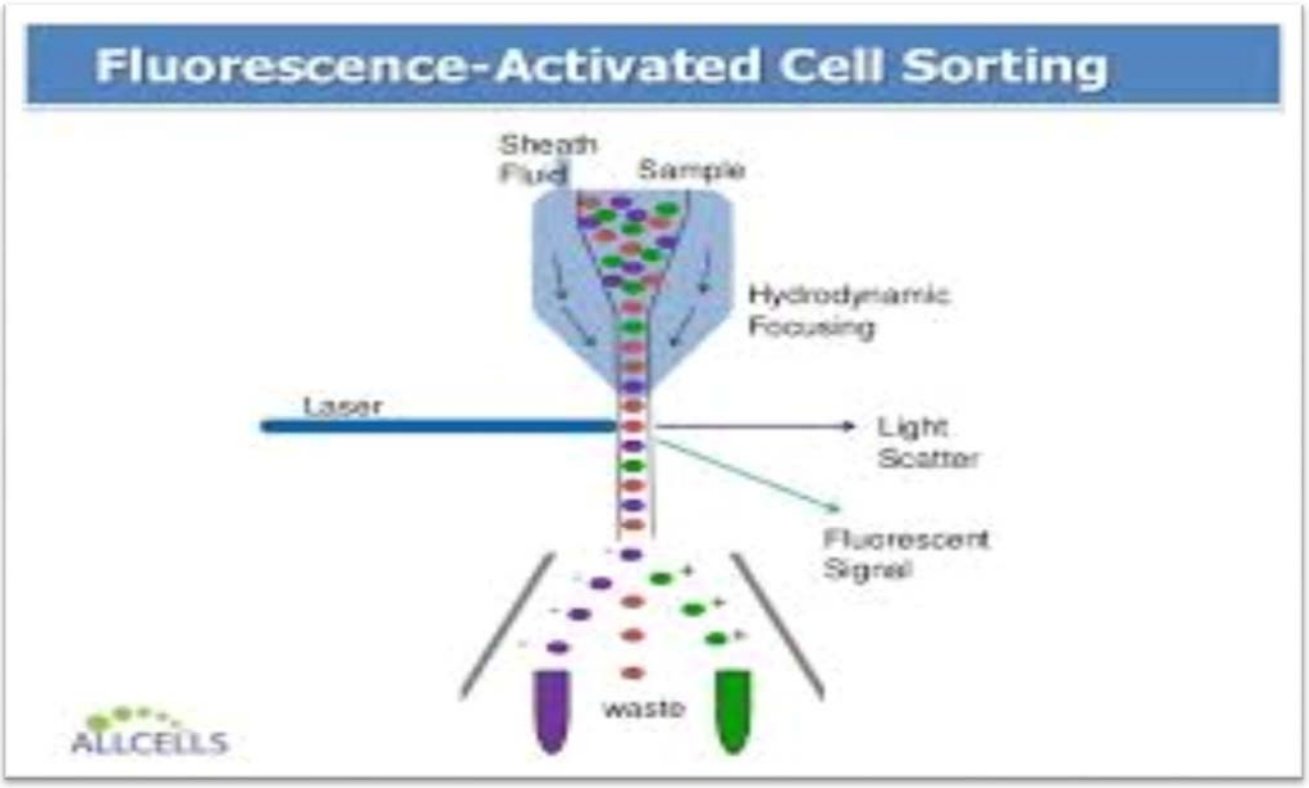
MACS (Magnetic Activated Cell Sorting)

جهت خالص سازی جمعیت‌های مختلف سلولی بر اساس مارکرها و یا آنتی‌ژن‌های سطحی آنها به کمک بیدهای مغناطیسی و مگنت انجام می‌شود.



FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)

این تکنیک جداسازی بسیار اختصاصی است و تا ۹۹٪ خلوص سلولی می‌دهد. در این تکنیک آنتی‌بادی اختصاصی مارکرهای سلولی با مواد فلوئوروکروم لیبل می‌شوند و پس از اتصال این آنتی‌بادی‌ها به سلول‌های مربوطه، این کمپلکس سلول-آنتی‌بادی فلوئورسنت در یک میدان الکترومغناطیسی قرار گرفته و جدا می‌شوند.



روشهای ایمنوادهیژن مانند تکنیک Panning

در متد Panning، آنتی‌بادی‌ها به صورت غیرکووالان به یک فاز جامد متصل می‌شوند و پس از اضافه کردن مخلوط سلولی، سلول‌های دارای آنتی‌ژن موردنظر به آنتی‌بادی اتصال می‌یابند و سلول‌های فاقد آنتی‌ژن به دقت شستشو داده می‌شوند. از آنجاییکه سلول‌های متصل به پلیت دچار تغییراتی می‌شوند، کاربرد این روش عمدتاً برای از میان برداشتن گروهی از سلول‌ها است.

کاربردهای این روش شامل: جداسازی سلول‌های Thو Tc با آنتی‌بادی‌های ضد CD4 و CD8 و یا جداسازی لنفوسیت‌های T از B با استفاده از آنتی ایمونوگلوبولین می‌باشد.

روشهای ایمنوتوکسیسیتی

مانند Complement Mediated Cytotoxicity که جزو روش‌های Negative Selection جهت القای سیتولیز انتخابی در سلول‌ها می‌باشد. بدین منظور در سلول‌های بیان کننده یک آنتی‌ژن خاص بواسطه آنتی‌بادی اختصاصی آن و کمپلمان ایجاد سیتولیز می‌شود.

Cell affinity Chromatography

در این روش آنتی‌بادی اختصاصی سلول به ستون متصل می‌شود و سپس سوسپانسیون مخلوط سلولی از ستون عبور می‌کند. این روش هم به صورت Negative Selection و هم به صورت Positive Selection انجام می‌شود.

جداکردن PBMC با فایکول:

مواد و تجهیزات لازم:

- ✓ نمونه خون انسانی
- ✓ فایکول
- ✓ بافر مناسب (PBS، نرمال سالین و...)
- ✓ رنگ تریپان بلو جهت بررسی viability سلول‌ها
- ✓ لوله فالکون
- ✓ پیپت پاستور
- ✓ سانتریفیوژ
- ✓ لام نئوبار
- ✓ میکروسکوپ نوری

روش انجام

۱. خون دفیبرینه (یا نمونه خون تهیه شده با EDTA، هپارین و سیترات) را با نسبت مساوی با PBS (بافر مناسب) رقیق نمایید.

۲. با دقت و آهستگی نمونه خون را روی فایکول اضافه کنید به گونه‌ای که با هم مخلوط نشوند.

۳. با سرعت و زمان مناسب (طبق دستورالعمل شرکت سازنده) سانتریفیوژ نمایید.

۴. با یک پیپت لایه سلول‌های مونونوکلئار(PBMC) را که بین فایکول و پلاسما قرار گرفته جدا نمایید به گونه‌ای که حداقل فایکول با آن مخلوط شود.

۵. سلول‌های مونونوکلئار را با اضافه کردن PBS یا بافر مناسب شستشو دهید و سپس به آهستگی مخلوط کرده تا دوباره سلول‌ها سوسپانسیون شوند و مجدد شستشو نمایید تا آلودگی پلاکتی کاهش یابد.

۶. مقداری از سوسپانسیون تهیه شده را با رنگ تریپان بلو مخلوط نموده و روی لام نئوبار بریزید تا میزان viability سلول‌ها بررسی شود.

۷. تعداد لنفوسیت‌هارا شمرده (شمارش در منطقه شمارش RBC انجام شود.) و تعداد سلول‌های زنده را از فرمول زیر محاسبه نمایید:

تعداد لنفوسیت‌ها = تعداد سلول های شمارش شده × فاکتور رقت × حجم سوسپانسیون سلولی × ۱۰۰۰۰

۸. میزان viability را طبق فرمول زیر محاسبه می‌کنند. سلول‌های زنده روی لام بی‌رنگ و سلول‌های مرده رنگ آبی تریپان‌بلو را به خود می‌گیرند.

Viability٪=تعداد سلول‌های زنده / مجموع سلول‌های زنده و مرده ×۱۰۰

مثال:

تعداد لنفوسیت‌های شمارش شده در مربع بالایی: ۱۹۸ لنفوسیت

تعداد لنفوسیت‌های شمارش شده در مربع پایینی: ۳۲۳ لنفوسیت

حجم سوسپانسیون سلولی: ۰,۵ ml

فاکتور رقت: ۲

بنابراین داده‌ها را در فرمول به صورت زیر وارد می کنیم :

$$10000 \times 2 \times 0.5 \times \frac{198+323}{2} = 2650000$$