1398/5/22

آزمایشگاه مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون

موضوع: گزارش کار از کارگاه استخراج میکروپارتیکل از پلاکت

_برای این منظور از کیسه های پلاکت 5 روزه استفاده شد.

خون از کیسه پلاکت به روشی کاملا استریل داخل لوله مورد نظر ریخته و طی دو مرحله سانتریفیوژ شد. در مرحله اول بعد از سانتریفیوژ، سوپرناتانت (محلول رویی) برداشته و به داخل لوله جدید منتقل شد و رسوب آن دور ریخته شد. سپس سوپرناتانت دوباره طبق همان شرایط سانتریفیوژ شد. پس از اتمام، مجددا محلول رویی به داخل لوله جدید (استریل) منتقل و سانتریفیوژ شد و رسوب آن هم دور ریخته شد.

-نتیجه کار: تشکیل دو لایه: بخشی که شامل پلاسمای بدون پارتیکل است (سوپرناتانت) که باید دور ریخته شود و بخش دیگری (pellet) که مورد نیاز است و نگه داشته می شود.

-این رسوب باید دو بار در PBS استریل شستشو داده شود. در مرحله اول در 2ml از PBS حل و سپس سانتریفیوژ شد .مایع رویی دور ریخته شده و مجددا روی رسوب ، PBS استریل(2ml) ریخته و باز هم سانتریفیوژ شد.در این مرحله مایع رویی را دور ریخته و روی رسوب مقداری PBS ریخته و آن را در 80- فریز می کنیم.تا زمان استفاده .

- بعد از این بخش نیاز است که محصول مورد نظر تعیین غلظت شود. برای تعیین غلظت از روش Bradford استفاده می کنیم.

برای این کار نیاز به Bovine serum albumin (BSA) داریم.

15 میلی گرم BSA را در 5 میلی لیتر PBS حل کرده تا غلظت نهایی به3mg/ ml برسد. با نانودراپ جذب نوری آن را بررسی می کنیم(در طول موج 280 نانومتر).

-سپس در 8 چاهک از میکروپلیت از BSA رقت تهیه می کنیم.

چاهک 1 : 50 لاندا از BSA +50 لاندا PBS

چاهک 2: از لوله اول 50 لاندا BSA برداشته + 50 لاندا PBS

چاهک 3:

چاهک 4:

چاهک 5:

چاهک 6:

چاهک 7:

چاهک 8:

سپس از تمامی چاهکها باید OD گرفته شود تا صحت و دقت کار تایید شود.

در چاهکهای دیگر(غیر از 8 چاهک اول که در آن رقت تهیه شده) هر یک از نمونه های موجود را به غلظت 1/2و 1/4 می رسانیم. سپس در قسمت دیگری از میکروپلیت به تعداد چاهکهایی که از BSA رقت تهیه کردیم (8چاهک) و به تعداد نمونه ها، در هر چاهک 200λ از محلول رقیق شده Bradford (5 برابر رقیق میشود) میریزیم و سپس 10λ نیز از همان چاهکهایی که در ابتدا پر شده بودند به 200λ اضاف می کنیم و سپس در طول موج 595 با دستگاه نانو دراپ از آن OD می گیریم.

رقتهای BSA+ PBS	نمونه	نمونه	نمونه			Brad+ (PBS+BSA)	(رقتهای نمونه+Brad)
1	نمونه 1 با رقت (1/2)	نمونه	نمونه			200λ BRAD 10λ (PBS + BSA)	200λ BRAD+ 10λ نمونه
2	نمونه 1 با رقت (1/4)	نمونه	نمونه			200λ BRAD 10λ (PBS+ BSA)	200λ BRAD+ 10λ نمونه
3	نمونه 2 با رقت (1/2)	نمونه	نمونه			200λ BRAD	200λ BRAD+ 10λ نمونه
4	نمونه 2 با رقت (1/4)	نمونه	نمونه			200λ BRAD	200λ BRAD+ 10λ نمونه
5	.	نمونه	نمونه			200λ BRAD	200λ BRAD+ 10λ نمونه
6	.	نمونه	نمونه			200λ BRAD	200λ BRAD+ 10λ نمونه
7	.	نمونه	نمونه			200λ BRAD	200λ BRAD+ 10λ نمونه
8	.	نمونه	نمونه			200λ BRAD	200λ BRAD+ 10λ نمونه

- مرحله اثبات میکروپارتیکل:

به دلیل نامشخص بودن ماهیت رسوبی که از پروسه شستشوی پلاکت به دست آمد باید وجود میکروپارتیکل را اثبات کنیم.

در این مرحله از روش فلوسایتومتری استفاده می شود.

تعیین سایز ذرات در این مرحله وجود میکروپارتیکل را اثبات میکند.

برای هر نمونه :500 میلی لیتر PBS + 11 لاندا از نمونه + x لاندا Bead فلوسایتومتری

با توجه به سایز Bead می توان وجود میکروپارتیکل را اثبات کرد.

- مرحله اثبات پلاکتی بودن میکروپارتیکل:

به دلیل اینکه پارتیکلهای به دست آمده ممکن است از اجزای مختلفی منشا گرفته باشند باید در این مرحله پلاکتی بودن آن را اثبات کرد.

در این مرحله نیز از تکنیک فلوسایتومتری استفاده می شود

نمونه کنترل منفی: Isotype control 2λ + x λ از نمونه + 500 میلی لیتر PBS

x λ از نمونه +anti CD 41 3λ + 500 میلی لیتر PBS