بافر تریپسین – 0.05 EDTA (1X)

فقـط بـرای کـارهای تحقیقـاتی

شمـاره کاتالوگ: BI-1601

توصیـف محصـول

تریپسین، سرین پروتئازی است که از پانکراس خوک گرفته می‌شود. این آنزیم یک پروتئین تک زنجیره حاوی ۲۲۳ اسیدآمینه است که محل اصلی فعالیت آن زنجیره جانبی دارای لایزین و آرژنین با بار مثبت است. تریپسین غالباً زنجیره‌های پپتیدی را از سمت عامل کربوکسیل لایزین و آرژنین می‌شکند (مگر اینکه بعد از آن‌ها پرولین قرار داشته باشد). تریپسین عموماً برای جدا کردن سلول‌های چسبیده به فلاسک محیط کشت و همچنین جدا کردن سلول‌ها از هم استفاده می‌شود. تریپسین همچنین می‌تواند باعث شکست پیوندهای استری و آمیدی در مشتقات سنتتیک اسیدهای آمینه شود. همچنین EDTA (اتیلن دی آمین تترا استیک اسید) به عنوان عامل شلاته کننده، اغلب برای افزایش فعالیت آنزیم تریپسین افزوده می‌شود. EDTA از طریق خنثی کردن یون‌های کلسیم و منیزیم که باعث افزایش اتصال سلول به سلول می‌شوند عمل می‌کند.

ویژگی‌ها

- این محصول، تریپسین ۰/۰۵ درصد و EDTA در بافر فسفات سالین دالبکو است.
- این محصول حاوی بیکربنات سدیم و فنل رد در HBSS است.

نکـات مهم

- مهارکننده‌های سرین پروتئاز، مانند DFP، TLCK، APMSF، AEBSEF، و آپروتینین، تریپسین را مهار می‌کنند.
- غلظت تریپسین مورد نیاز برای جدا کردن سلولها از سوبسترا، ابتدائا به نوع سلول، سن کشت، و تراکم کشت‌های سلول بستگی دارد.
- این محصول بصورت منجمد در دمای ۱۰- تا ۴۰- درجه سانتیگراد نگهداری می‌شود. از فریز و ذوب کردن مکرر اجتناب کنید.
- این محصول حاوی فنل رد است. به دلیل اینکه بر روی یخ خشک منتقل می‌شود ممکن است مقدار قابل توجهی دی اکسید کربن در داخل بسته باشد. این دی اکسید کربن ممکن است به محلول نفوذ کرده و pH آن را کمی کاهش داده و باعث تغییر رنگ آن از صورتی به نارنجی شود. محلول نارنجی هنوز قابل استفاده است، یا می‌توان با بیکربنات سدیم pH آن را تنظیم کرد.
- انکوبه کردن مدت طولانی سلول‌ها با غلظت‌های خیلی بالای تریپسین می‌تواند باعث آسیب به غشاء سلولی و در نتیجه مرگ سلول شود.
- محلول کردن تریپسین یا رقیق سازی آن از یک محلول غلیظ، باید با یک محلول نمک بافری فاقد کلسیم یا منیزیم انجام شود.
- محلول‌های تریپسین باید شفاف و عاری از هر گونه ذرات معلق باشد. در صورتی که محلول کدر بوده یا حاوی ذراتی معلق و یا رسوب است از آن استفاده نکنید. شواهد دیگر تخریب، شامل کاهش خصوصیات فیزیکی یا عملکردی است.

روش استفاده

قبل از اجرای هر گونه پروتوکل، غلظت مناسب محلول تریپسین (۰/۰۵ درصد با شماره کاتالوگ BI-1601، یا ۰/۲۵ درصد با شماره کاتالوگ BI-1602) و همچنین زمان انکوباسیون لازم برای جداسازی را بصورت تجربی برای رده‌های سلولی مورد نظر خود تعیین کنید. غالباً زمان لازم برای جداسازی سلول‌ها از سطح، به نوع سلول، تراکم سلولی، پتانسی تریپسین، غلظت سرم در محیط رشد، و فاصله زمانی از آخرین ساب کالچر بستگی دارد.

۱. با استفاده از پیپت، محیط استفاده شده را از ظرف کشت خارج کنید.

۲. با افزودن بافر نمکی متعادل (PBS) فاقد کلسیم و منیزیم (BI-1401) به کناره فلاسک در سمت مقابل سلولها، تک لایه سلولی را شستشو دهید.

۳. با تکان دادن آهسته فلاسک به مدت ۱ تا ۲ دقیقه، لایه سلولی را شستشو داده و محلول شستشو را دور بریزید.

۴. محلول تریپسین – 0.05 EDTA (BI-1601) را از سمت مقابل سلولها به کناره فلاسک بیافزایید. میزان محلول تریپسین مورد استفاده باید به اندازه‌ای باشد که

روی لایه سلولی را بپوشاند.

۵. فلاسک را به آرامی تکان داده تا مطمئن شوید که محلول جداسازی، کل لایه سلولی را پوشانده است.

۶. فلاسک را به مدت ۲ تا ۳ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه کنید. روند جداسازی را با قرار دادن فلاسک زیر میکروسکوپ اینورت بررسی کنید. زمانی که جداسازی کامل شود، سلول‌ها معلق بوده و گرد به نظر می‌رسند. علاوه بر تکان دادن آرام، در مورد فلاسک های رده سلولی که بطور مشخص جداسازی آنها از لایه زیرین مشکل است ضربه زدن باعث تسریع جداسازی می‌شود.

نکته: توجه داشته باشید که زمان دقیق مورد نیاز برای جداسازی سلول‌ها، بر اساس رده سلولی متفاوت است. فرایند جداسازی باید پیوسته کنترل و نظارت شود تا از آسیب سلول‌ها جلوگیری شود.

۷. به محض تکمیل جداسازی سلول، سرم حاوی محیط کامل را به فلاسک بیفزایید تا تریپسین را مهار کرده و از تخریب بیشتر سلول‌ها جلوگیری کند.

۸. سلول‌ها را با پیپت کردن مکرر از هم جدا کرده و بصورت یک سوسپانسیون سلولی واحد درآورید.

۹. سلول‌ها را شمارش کرده و ساب کالچر دهید.

کنترل کیفی

- ظاهر: قرمز، محلول شفاف
- pH: ۷/۶-۷
- استریلیته: تأیید شده
- عمر مفید: ۱۲ ماه

شرایط نگهداری

- به محض دریافت، محصول را در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد فریز کنید. بعد از ذوب شدن، محصول برای حدود ۲ هفته در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد پایدار است.
- فریز و ذوب کردن مکرر محصول موجب کاهش فعالیت آنزیمی می‌شود، بنابراین از این کار اجتناب کنید. بعد از ذوب شدن، محلول را در حجم‌های کوچکتر تقسیم کرده و برای استفاده‌های بعدی در فریزر نگهداری نمایید.

منـابـع

1. Treadwell, P. E., and J. D. Ross. "Growth of HeLa cells in human adult and bovine fetal serum medium." Experimental Biology and Medicine 111.1 (1962): 197-201.
2. FORM, DAVID M. "Endothelial Cell Proliferation." (1962).

ارجـاعـات

1. Amini-Sarteshnizi, Nematallah, et al. "Anticancer activity of ethanolic extract of propolis on AGS cell line." Journal of HerbMed Pharmacology 4.1 (2015).
2. Hashemitabar, Mahmoud, et al. "Isolation and Characterization of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells and Their Differentiation into Pdx-1+ Cells." Journal of Biomedical Science and Engineering 8.11 (2015): 780.
3. Amini-Sarteshnizi, Nematollah, et al. "Morphological changes of apoptosis and cytotoxic effects induced by Caffeic acid phenethyl ester in AGS human gastric cancer cell line." Journal of HerbMed Pharmacology 3.2 (2014).
4. Hadavi, M., et al. "Novel calcified gum Arabic porous nano-composite scaffold for bone tissue regeneration." Biochemical and biophysical research communications 488.4 (2017): 671-678.
5. Fayazi, Mehri, Mojdeh Salehnia, and Saeideh Ziaei. "Characteristics of human endometrial stem cells in tissue and isolated cultured cells: An Immunohistochemical Aspect." Iranian biomedical journal 20.2 (2016): 109.