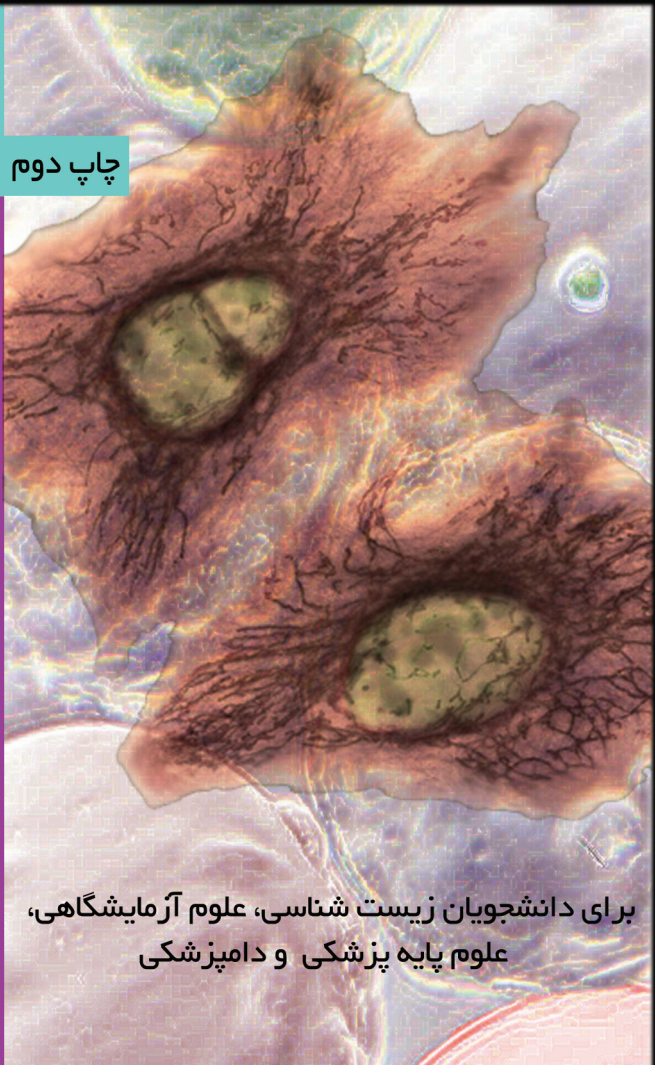




چاپ دوم

الفبای کشت سلولی



برای دانشجویان زیست شناسی، علوم آزمایشگاهی،
علوم پایه پزشکی و دامپزشکی

دکتر فاطمه واحدی

دکتر فرزین صارم

نازیلا آریایی نسب

کاظم بوذری

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

الفبای کشت سلولی

دکتر فاطمه واحدی

(دکترای تخصصی ایمونولوژی- مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی مشهد)

دکتر فرزین صارم

(دکترای تخصصی بیوشیمی- مرکز آموزش عالی علوم پزشکی وارنگان)

نازیلا آریایی نسب

(کارشناس ارشد فیزیولوژی- دانشگاه علوم پزشکی مشهد)

کاظم بوذری

(کارشناس علوم آزمایشگاهی- مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی مشهد)

عنوان و نام پدیدآورندگان: الفبای کشت سلولی / فاطمه واحدی ... [و دیگران]

مشخصات نشر: مشهد؛ وارسنگان، ۱۳۹۱

مشخصات ظاهری: ۱۹۲ص: مصور، جدول، نمودار: ۱۷.۵×۱۲.۵

فروست: الفبای علوم؛ ۲۷

شابک: ۹۷۸-۶۰۰-۶۲۵۲-۱۹-۳

وضعیت فهرست نویسی بر اساس اطلاعات فیپا

یادداشت: فاطمه واحدی، فرزین صارم، نازیلا آریایی نسب، کاظم بوذری

یادداشت: کتابنامه

موضوع: یاخته‌ها — کشت

موضوع: یاخته‌ها — کشت — دستنامه‌های آزمایشگاهی

شناسه افزوده: واحدی، فاطمه، ۱۳۴۹.

رده‌بندی کنگره: ۱۳۹۱ ۷الف / ۵۸۵/۲ QH

رده بندی دیویی: ۵۷۱/۶۳۸

شماره کتابشناسی ملی: ۲۷۶۴۷۳۵

نام کتاب	الفبای کشت سلولی
پدیدآوردگان	دکتر فاطمه واحدی، دکتر فرزین صارم، نازیلا آریایی نسب، کاظم بوذری
ناشر	انتشارات وارستگان (وابسته به مرکز آموزش عالی علوم پزشکی وارستگان)
طراح و صفحه آرا	الهه نوری/علی جهانگیر
ناظر فنی چاپ	حمیده خواجه نظام
قطع	جیبی
تاریخ چاپ	تابستان ۱۳۹۱
شمارگان	۱۰۰۰ نسخه
شابک	۹۷۸-۶۰۰-۶۲۵۲-۱۹-۳
سایت	www.varmed.com
لیتوگرافی، چاپ و صحافی	چاپ دقت
قیمت	۴۵۰۰۰ ریال

حق چاپ برای انتشارات وارستگان محفوظ است.

مرکز پخش: مشهد- بلوار لادن- نبش لادن ۳ - پلاک ۸۱ - مرکز آموزش عالی علوم پزشکی وارستگان
تلفن: ۵۰۹۱۱۶۰-۵۱۱ (واحد انتشارات)

مقدمه ناشر

ای که با نامت جهان آغاز شد دفتر ما هم به نامت باز شد

کتاب‌ها دوستان همیشگی ما هستند؛ دوستانی که پس از گذشت سال‌ها، اگر ببینیمشان نه لب به گلایه می‌گشایند و نه روی برمی‌گردانند، بلکه آغوش گرمشان را به نشانه استقبال می‌گشایند.

با این وجود، چرا ما کمتر سراغ آن‌ها می‌رویم و کمتر با آن‌ها انس می‌گیریم؟ ممکن است بگوییم لحظات به سرعت از ما می‌گریزند و فرصت مطالعه را از ما می‌ستانند.

به نظر می‌رسد اگر قدر ثانیه‌های بدون بازگشت را می‌دانستیم و از لحظه‌های با شکوه موفقیت چیزی شنیده بودیم، وقتی را برای با کتاب بودن کنار می‌گذاشتیم، و با خواندن کتاب، انگیزه بیشتری برای پیمودن قله‌های موفقیت کسب می‌کردیم؛ هنوز هم دیر نشده است. بدون شک هیچ‌گاه برای یک شروع دوباره و آن هم خواندن کتاب دیر نیست. اگر به جای تلاش دوباره، حسرت ایام از دست رفته را بخوریم مانند این است که تمام شب را برای از دست دادن خورشید گریه کنیم که در این صورت، لذت دیدن ستاره‌ها را از دست خواهیم داد.

برای گریز از این بن بست، انتشارات وارستگان قصد دارد دریچه‌ای نو به سوی خوانندگان خود بگشاید و مجموعه کتاب‌های الفبای علوم را با ارزش علمی بالا، حجم پایین و بهای اندک منتشر نماید.

خواندن کتاب‌های الفبای علوم، وقت چندانی از خوانندگان نمی‌گیرد و چون به زبان ساده‌ای نگاشته شده است، آن‌ها را در پیچ و خم دشواری‌های متن گرفتار نمی‌کند. با توجه به اندازه جیبی آن‌ها، در همه زمان‌ها و مکان‌ها قابل خواندن بوده و به دلیل راحتی حمل و نقل، همراه همیشگی خوانندگان خواهد بود.

کتاب‌های الفبای علوم در حجمی فشرده، موضوعات و مطالب تخصصی را به شیوه‌ای نوین به مخاطبانش انتقال می‌دهند. از آن‌جا که این مجموعه موضوعات گوناگونی را شامل می‌شود، در کنار هم، دایره‌المعارف علوم را برای استفاده همگان تشکیل خواهند داد.

انتشارات وارستگان دست همه نگارندگانی را که تمایل به انتقال یک پیام، کلام، تجربه و مهارت در قالب مجموعه‌ی الفبای علوم دارند به گرمی می‌فشارد.

امید که الفبای علوم مقبول خاطر دوستان افتد و باشد که کوچه باغ‌های خاطری را طراوت بخشد.

انتشارات وارستگان

مقدمه پدید آورندگان

در دایره‌ای که آمدن، رفتن ماست آن‌را نه بدایت نه نهایت پیداست
کس می‌نزند دمی در این عالم راست کاین آمدن از کجا و رفتن به کجاست

تاریخ علم، نقاط عطف بسیاری را تجربه کرده است. پایه‌گذاری برخی از روش‌های عملی، چنان در پیشرفت علوم تأثیرگذار بوده که باعث آشکارشدن معماهای بسیار و تحولات شگرف شده است.

یکی از آرزوهای دیرینه‌ی بشر، یافتن راز حیات و جاودانه‌شدن است و در پی این راز و در جستجوی چشمه‌ی حیات، به واکاوی درون و بیرون پرداخته و دوردست‌ها و کهکشان‌ها را درنوردیده است. گرچه در این تلاش‌ها بسیاری از مجهولات، معلوم گشته‌اند اما حاصل این تلاش‌ها تنها اعتراف به بزرگی "جهان نادیدنی" بوده است. در این مسیر، اجزای درون بدن و سلول‌ها، مورد توجهی بسیاری از دانشمندان علوم تجربی بوده است. با آغاز قرن بیستم، اولین تلاش‌های علمی برای نگهداری و تکثیر سلول‌های جانوری و گیاهی آغاز شد و در سال‌های اخیر به اوج خود رسیده به‌طوری که انسان در پی آرزوی خود و یافتن جاودانگی؛ به شبیه‌سازی موجودات پرداخته و به دنیای پر رمز و راز کوچک‌ترین واحدهای حیات رخنه نموده است.

این اصل پذیرفته شده است که یک آزمایشگاه فعال و پرحاصل، بسان سه ضلعی است که اضلاع آن را سخت‌افزارها و مواد اولیه تشکیل داده و قاعده‌ی

آن بر دانش و علم کارشناسان آن استوار است. انتخاب تجهیزات و مواد اولیه‌ی مناسب نیز تحت اثر دانش و اطلاعات کارشناسانه می‌باشد. در این کتاب که مجموعه‌ای از نکات تجربی و گردآوری شده از کتاب‌ها و دستورالعمل‌های معتبر می‌باشد تلاش شده است اضلاع یک آزمایشگاه کشت سلولی به تصویر کشیده شود.

آشنایی اینجانب با کشت سلولی، به سال‌های ۱۳۷۳-۱۳۷۱ و زمان تحصیل در دانشگاه علوم پزشکی شیراز در محضر آقای دکتر قادری که از مفاخر ایمنی‌شناسی ایران می‌باشند برمی‌گردد. از آن پس در آزمایشگاه کشت سلولی مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی مشهود مشغول به فعالیت بوده و در طی این سال‌ها به‌خصوص از همکاری آقای بوذری از کارشناسان مجرب مؤسسه رازی و همراهی دانشجویان علاقمندی از جمله خانم آریایی‌نسب بهره‌مند بوده‌ام. با توجه به احساس نیاز کارشناسان آزمایشگاه‌ها و دانشجویان علوم پزشکی و زیستی به فراگیری این روش‌ها و به توصیه‌ی استاد بزرگوار، آقای دکتر وارسته، که در نشر علم تلاش‌های ارزنده‌ای دارند، این کتاب منتشر می‌شود. در مراحل انتهایی نگارش این اثر، از تجربیات استاد بزرگوار آقای دکتر صارم در زمینه کشت سلولی، بهره‌مند شده و نکات تجربی ارزشمندی به این نوشتار افزوده گردید.

یقین است که این کتاب خالی از اشکالات نبوده و دریافت پیشنهادات و انتقادات در جهت تصحیح و تکمیل این نوشتار موجب سپاس قلبی اینجانب است.

اسرار ازل را نه تو دانی و نه من وین حلّ معماً نه تو خوانی و نه من
هست از پس پرده گفتگوی من و تو چون پرده بر افُتد نه تو مانی و نه من

دکتر فاطمه واحدی

vahedif@yahoo.com

تابستان ۱۳۹۱

فهرست

صفحه	عنوان	فصل
مقدمه‌ای بر کشت سلولی		
۱۹	تاریخچه‌ی کشت سلولی	اول
۲۴	کاربرد کشت سلول‌های جانوری	
۲۷	کاربرد کشت سلول‌های بنیادی	
۳۰	کشت سلول‌های جنینی	
۳۱	کاربرد کشت سلول‌های حشرات	
۳۳	کاربرد کشت سلول‌های گیاهی	
اجرای تکنیک کشت سلولی ...		
۴۰	طراحی آزمایشگاه کشت سلولی	دوم
۴۲	هود	
۴۲	انواع هودها	
۴۳	هودهای شیمیایی	
۴۴	هودهای لامینار	
۴۵	فیلترهای هپا	
۴۹	انواع BSCها	



صفحه	عنوان	فصل
... اجرای تکنیک کشت سلولی		
۴۹	نوع ۱ (Class I)	دوم
۵۰	نوع ۲ (Class II)	
۵۱	نوع ۳ (Class III)	
۵۲	نکات مهم در مورد کار با هودها	
۵۵	سانتریفوژها	
۵۵	نکات مهم در مورد کار با سانتریفوژ	
۵۶	انکوباتور CO ₂ دار	
۵۸	اتوکلاو (استریلیزر)	
۵۹	فور خشک (آون)	
۶۰	یخچال و فریزر	
۶۱	تانک ازت	
۶۱	فلاسک، پلیت و سایر ظروف کشت سلول	
۶۳	میکروسکوپ	
۶۴	شمارشگر سلولی	
عوامل فیزیکی - شیمیایی اصلی برای کشت سلول ...		
۶۹	محیط‌های کشت سلول	سوم
۷۲	نمک‌های غیر آلی	
۷۳	سیستم‌های بافری	



صفحه	عنوان	فصل
... عوامل فیزیکی - شیمیایی اصلی برای کشت سلول		
۷۷	کربوهیدرات‌ها	۳
۷۸	اسیدهای آمینه	
۷۸	ویتامین‌ها	
۷۹	پروتئین‌ها و پپتیدها	
۸۰	اسیدهای چرب	
۸۰	هورمون‌ها و فاکتورهای رشد	
۸۱	ریز عناصر	
۸۲	آنتی‌بیوتیک‌ها	
۸۲	سرم	
۸۷	محیط‌های کشت فاقد سرم	۴
۸۸	میتوزن‌ها	
انواع کشت سلولی ...		
۹۴	کشت‌های اولیه	۵
۹۵	سلول‌های معلق / سلول‌های مستقل از بستر	
۹۶	سلول‌های چسبنده یا وابسته به بستر	
۹۹	بستر کشت سلولی	
۱۰۲	کشت‌های ثانویه	
۱۰۴	رده یا دودمان سلولی	



صفحه	عنوان	فصل
... انواع کشت سلولی		
۱۰۴	رده‌های سلولی با عمر محدود	شماره ۱
۱۰۴	رده‌های سلولی پیوسته یا جاودان	
۱۰۵	کشت‌های سلولی تک‌لایه	
۱۰۵	کشت‌های معلق	
۱۰۷	خصوصیات اصلی کشت سلولی در طی رشد و تکثیر رده‌ی سلولی	
۱۰۷	مراحل رشد سلول	
۱۱۱	اصطلاحات خاص برای رده‌های سلولی	
۱۱۱	انطباق با کشت	
۱۱۳	سیستم‌های کشت سلولی در مقیاس بالا	
۱۱۷	کشت انبوه سلولی در مقیاس تجاری	
نگهداری مناسب سلول‌ها ...		
۱۳۵	ایجاد بانک سلولی	شماره ۲
۱۳۷	انجماد و نگهداری رده‌های سلولی	
۱۴۲	خطرات کار با ازلت مایع	
۱۴۳	تهیه رده‌ها یا دودمان‌های سلولی	
۱۴۷	جنبه‌های حفاظتی و امنیتی کشت سلولی	
۱۴۷	تشخیص و بررسی خطرات	



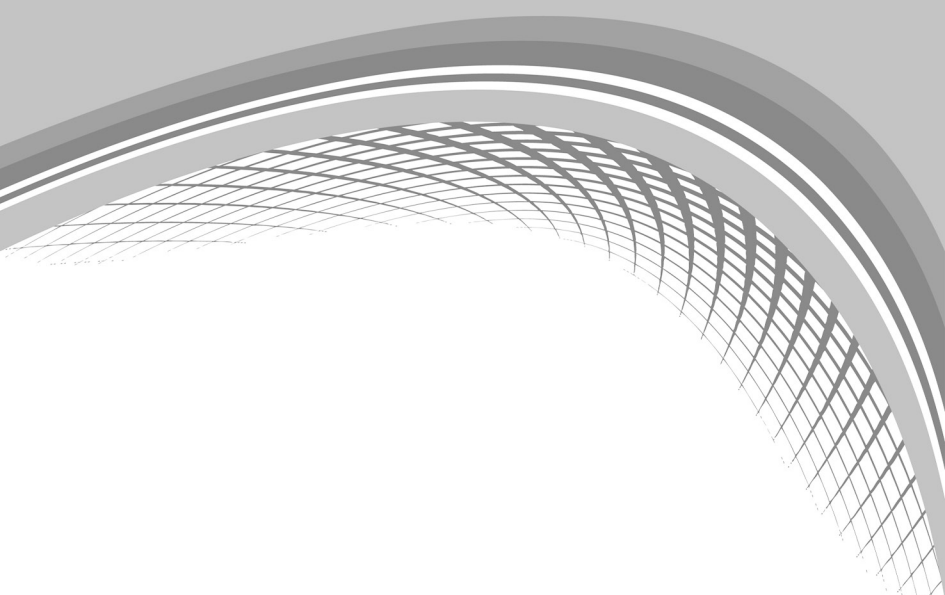
صفحه	عنوان	فصل
... نگهداری مناسب سلول‌ها		
۱۵۲	راه‌های مقابله با خطرات و یا اجتناب از آن‌ها	ع
۱۵۴	ضد عفونی و آلودگی‌زدایی	
۱۵۶	دفع پسماندها و زباله‌های آزمایشگاه کشت سلولی	
۱۵۷	جنبه‌های کنترل کیفی در کشت سلولی	
۱۵۷	مواد مصرفی در کشت سلولی و کنترل کیفیت آن‌ها	
۱۵۸	صحت رده‌های سلولی	
۱۵۹	آلودگی باکتری‌ها و قارچ‌ها	
۱۶۰	آلودگی مایکوپلاسمایی	
۱۶۱	آلودگی ویروسی	
۱۶۲	بررسی آلودگی‌های محیطی	
۱۶۲	اقدامات لازم در زمان مواجهه با آلودگی	
۱۶۳	مستندسازی رده‌های سلولی	
دستورالعمل‌ها ...		
۱۷۰	استریل کردن محلول‌ها و وسایل کار	ع
۱۷۴	تهیه محلول‌ها و محیط‌های مورد استفاده در کشت سلول	
۱۷۹	احیای سلول‌های منجمد	
۱۸۱	تعویض محیط کشت و پاساژ سلول‌های چسبنده	
۱۸۲	پاساژ سلول‌های معلق	



صفحه	عنوان	فصل
	... دستورالعمل ها	
۱۸۲	انجماد سلول ها	۳
۱۸۳	حمل و نقل سلول ها	
۱۸۴	بررسی کیفیت سلول ها	
۱۸۴	بررسی کمیت سلول ها به روش MTT assay	
۱۸۹	منابع	

فصل اول

مقدمه‌ای بر کشت سلولی



مقدمه

موجودات پرسلولی مانند جانوران و گیاهان از سلول‌های مختلفی تشکیل شده‌اند. حداقل ۱۰۰ نوع سلول متنوع در بدن جانوران وجود دارد. تنوع سلول‌ها باعث عملکرد اختصاصی آن‌ها شده است. هر چند اغلب سلول‌ها حاوی اندامک‌های داخلی مشترک بوده و مسیرهای متابولیک مشترکی را طی می‌کنند ولی هر سلول، اجزا یا محصولات خاصی را به طور اختصاصی تر و به مقدار متفاوتی بیان می‌کند. در حقیقت این بیان اختصاصی موجب عملکرد اختصاصی یک سلول و متمایز شدن آن از سایر سلول‌ها می‌شود.

سلول‌هایی که از بافت‌های بدن موجود زنده جدا می‌شوند، اگر با مواد غذایی و فاکتورهای رشد همراه گردند می‌توانند به رشد خود ادامه دهند. فرآیند فراهم

نمودن شرایط رشد و تکثیر سلول‌ها در خارج بدن موجود زنده “کشت سلول” نامیده می‌شود. در طی این فرآیند، رشد به‌جای این که در درون بدن اتفاق بیفتد، در ظروف آزمایشگاهی مانند فلاسک و پلیت انجام می‌شود. کشت سلول به سلول‌ها، اجازه می‌دهد تا به عنوان واحدهای مستقل عمل نمایند. کشت سلولی شامل کشت همه‌ی سلول‌ها اعم از گیاهی، جانوری و حشرات می‌باشد. در این کتاب تمرکز بر روش‌های کشت سلول‌های با منشاء غیر گیاهی شامل جانوری، سلول‌های بنیادی و حشرات است.

اصلی‌ترین استفاده‌ی کشت سلولی، به‌دست آمدن نتایج قابل تکرار است و البته مهم‌ترین اشکال آن احتمال ایجاد جهش در سلول‌ها و تأثیرگذاری بر نتایج آزمایشات است.

۱-۱) تاریخچه‌ی کشت سلولی

در سال ۱۹۰۲ هابرلنت^۱ تکنیک‌هایی برای کشت سلول‌های گیاهی جهت مطالعات فیزیولوژیکی ابداع نمود.

در قرن ۱۹ فیزیولوژیست انگلیسی به‌نام رینگر^۲، محلول‌های نمکی شامل کلریدهای سدیم، پتاسیم، کلسیم و منیزیم را برای حفظ بقای قلب جداشده از حیوانات در خارج بدن را ابداع کرد.

در سال ۱۸۸۵ دانشمند آلمانی، راکس^۳، قسمتی از جنین جوجه را جدا کرد

-
1. Haberland
 2. Sydney Ringer
 3. Roux



و در محلول نمکی گرم برای چندین روز نگهداری نمود و رشد زواید عصبی را نشان داد که در واقع آغاز کشت بافت بود.

در سال ۱۹۰۷، هاریسون^۱ نشان داد که می‌توان فیبرهای عصبی را در خارج بدن زنده و به‌صورت مستقل با تأمین مواد، زنده نگه داشت. او مفهوم "وابستگی سلول به یک بستر"^۲ را مطرح نمود و نیز نشان داد که سلول‌ها بر خلاف باکتری‌ها که در طی ۲۰ دقیقه تقسیم دوتایی دارند در طی چند روز دچار تقسیم می‌شوند. هاریسون، مشکل آلودگی باکتری‌ها در کشت سلولی را نیز مطرح نمود.

در سال ۱۹۱۲ کارل^۳، نگهداری و کشت بافت قلب جنین جوجه برای چندین ماه را گزارش نمود. این پزشک جراح برجسته، مفتخر به دریافت جایزه‌ی نوبل پزشکی گردید. قلبی که دکتر کارل در محیط کشت نگهداری کرده بود به مدت ۲۴ سال و حتی سال‌ها پس از مرگ وی در محیط کشت زنده بود. فلاسک‌های کارل، برای ممانعت از آلودگی از ابداعات دیگر این دانشمند است.

در سال‌های ۱۹۵۰-۱۹۴۰ با اپیدمی‌های مرگ‌آور فلج اطفال، کشت سلولی جهت تکثیر و کشت ویروس‌ها و تهیه‌ی واکسن مورد توجه قرار گرفت. واکسن فلج اطفال سالک^۴ در واقع اولین محصول در مقیاس انبوه با استفاده از روش‌های کشت سلولی بود.

-
1. Harrison
 2. Anchorage dependent
 3. Carrel
 4. Salk



دانشمندانی^۱ که سهم بسزایی در رشد و تکثیر ویروس فلج اطفال در سلول‌های فیبروبلاست کلیه‌ی میمون داشتند سال‌ها بعد، جایزه‌ی نوبل را دریافت نمودند.

کشف آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین در همین سال‌ها سبب موفقیت بیشتر کشت سلول‌ها و ممانعت از ایجاد آلودگی‌های باکتریایی در کشت سلول‌ها بود.

برای سال‌های متمادی از گستره‌های بافتی^۲ برای آزمایشات سلولی و بافتی استفاده می‌شد. تا این‌که مفهوم تولید جمعیتی از سلول‌ها از یک سلول منفرد توسط سنفود^۳ بنا نهاده شد.

در سال‌های ۱۹۵۰ اولین رده‌ی سلولی با منشاء کارسینومای انسانی به‌نام هلا^۴ معرفی شد. اولین سلول حشره نیز به‌نام Grace در همین سال‌ها تهیه شد.

در سال ۱۹۵۵ ایگل^۵، استفاده از مخلوط مواد مغذی مورد نیاز سلول‌ها شامل اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها، کربوهیدرات‌ها و نمک‌ها به‌جای عصاره‌ی بافت‌ها را مطرح و استفاده نمود و پایه‌گذار محیط‌های کشت سلولی ایگل بود.

بعد از این تحولات، سلول‌های منفرد زیادی به‌صورت کشت خالص تهیه شدند. اولین سلول‌های خالص به‌دست آمده شامل سلول‌های آدرنال، هیپوفیز،

1. Enders, Weller, Robbins

2. Tissue explants

3. Sanfood

4. HeLa

5. Eagle



نورون‌ها، میوسیت‌ها و هپاتوسیت‌ها بودند. کشت این سلول‌های خالص مشخص نمود که هر نوع سلول به مخلوط غذایی خاصی برای رشد مناسب نیاز دارد. در همین زمان مشخص گردید که سرم می‌تواند به عنوان منبع پروتئین‌های خاص، هورمون‌ها و فاکتورهای رشد استفاده شود.

تحول مهم بعدی در کشت سلولی در سال ۱۹۷۰ با ابداع روش‌های تولید سلول‌های هیبریدوما، حاصل ترکیب دو سلول مختلف، به وقوع پیوست که برای تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال استفاده می‌شود. این تکنیک حاصل تلاش میلشتین^۱، کهلر^۲ و جرن^۳ بود که در سال ۱۹۸۴ جایزه نوبل را به خود اختصاص دادند.

در دهه‌های اخیر ظهور تکنیک‌های DNA نو ترکیب و نیاز به تولید پروتئین‌ها در سلول‌های حیوانی برای بیان صحیح و کارآمد آن‌ها، کشت سلول‌ها را مورد استفاده‌ی بیشتری قرار داده است.

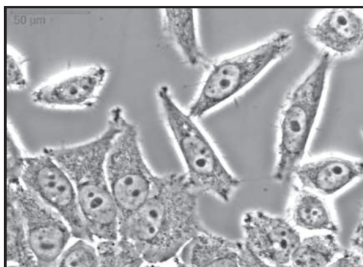
از اواخر سال‌های ۱۹۹۰ کشت سلول‌های بنیادی مطرح شد و بدون تردید با ظهور روش‌های بیولوژی مولکولی و دستکاری‌های ژنتیکی در درون سلول‌ها، دامنه‌ی کشت سلولی بسیار گسترده شده و تحولات در این زمینه رشد پرشتابی را به خود گرفته است.

-
1. Milstein
 2. Köhler
 3. Jerne



❖ **سرگذشت سلول‌های HeLa:** رده‌ی سلولی HeLa قدیمی‌ترین و پراستفاده‌ترین رده‌ی سلولی انسانی است. این سلول‌ها از خانمی به‌نام Henrietta Lacks در هشتم فوریه‌ی سال ۱۹۵۱ که دچار کارسینومای سرویکس بود از بیوپسی حاصل جهت تشخیص گرفته شد. وی مدتی بعد در چهارم اکتبر همان سال به‌خاطر این سرطان از دنیا رفت. سلول‌ها توسط George Otto Gey قبل از آن‌که هنریتا از دنیا برود تکثیر داده شد. وی به‌صورت رایگان این سلول‌ها را در اختیار درخواست‌کنندگان جهت تحقیق در زمینه‌ی پزشکی قرار داد بدون آن‌که اجازه‌ای از هنریتا و یا خانواده‌اش داشته باشد. بعدها کار Gey با شکایت خانواده‌ی هنریتا به دادگاه کشیده شد و البته در آن زمان، دادگاه اعلام نمود که ”بافت‌ها و سلول‌های دورانداخته شده‌ی یک فرد، جزء دارایی‌های فردی محسوب نمی‌شود و استفاده‌ی تجاری از آن اشکالی ندارد.“

برای ناشناس‌ماندن هویت اصلی هنریتا، نام بیمار ”Helen Lane“ یا ”Helen Larson“ و به اختصار HeLa اعلام شده بود و علی‌رغم این کار، نام اصلی وی چند سال پس از مرگش منتشر گردید. سلول‌های HeLa جاودان بوده و در سرتاسر دنیا منتشر شده و تاکنون بیش از تمام سلول‌های بدن هنریتا تکثیر شده و خدمات زیادی به علم پزشکی و زیست‌شناسی ارائه نموده است. شکل ۱-۱ نمایی از سلول‌های HeLa را نشان می‌دهد.



شکل ۱-۱: سلول‌های HeLa. این سلول‌ها با ظاهر اپیتلیالی، با منشاء سلول‌های سرویکس انسانی، از سلول‌های بسیار خوب رشد هستند.

۲-۱) کاربرد کشت سلول‌های جانوری

کشت سلول‌های جانوری کاربردهای مهم و منحصر به فردی دارد نظیر مطالعه نحوه رشد و مرگ سلول‌ها. بنابراین به منظور بررسی چرخه رشد سلولی، توسعه روش‌های کنترل رشد سلول‌های سرطانی و تعدیل بیان ژن‌ها نیاز به کشت سلول‌ها در خارج از بدن است. یکی دیگر از کاربردهای کشت سلول، مطالعه تکوین جانداران است. این که چگونه یک سلول لقاح‌یافته می‌تواند به جاندار پسرولی تبدیل شود که هریک از آن‌ها از لحاظ مورفولوژی و خصوصیات آنزیمی متفاوت باشد. شاخص‌ترین کاربردهای کشت سلول به شرح زیر می‌باشند:

۲-۱-۱) بررسی فیزیولوژی و بیوشیمی سلول‌ها

♦ اولین دلیل تهیه کشت‌های سلولی، مطالعه‌ی سلول‌ها در زیر میکروسکوپ و بررسی فیزیولوژی سلول‌ها بوده است.

♦ مکانیسم کنترل چرخه‌ی سلولی، شناسایی خصوصیات سلول‌های سرطانی، تشخیص و عمل فاکتورهای رشد، هورمون‌ها و ویروس‌ها و نیز مطالعه‌ی فرآیند تمایز سلول‌ها با استفاده از کشت سلولی آسان‌تر می‌شود.

♦ مطالعه‌ی فیزیولوژی یا بیوشیمی طبیعی سلول‌ها. به عنوان مثال برای تحقیق مسیرهای متابولیکی، پیش ماده‌های نشان‌دار در مواد غذایی مورد استفاده‌ی سلول‌ها به کار می‌رود.

۲-۲-۱) بررسی اثر مواد شیمیایی و داروها بر روی سلول‌های خاص یا انجام آزمایشات سیتوتوکسیسیته

♦ استفاده از سلول‌ها جهت بررسی سمیت مواد بر استفاده از حیوانات زنده به دلیل هزینه‌ی کمتر و نیز به دست آمدن نتایج یکدست‌تر ارجحیت دارد.

♦ استفاده از سلول‌ها به جای حیوانات بر اصول اخلاقی منطبق‌تر است.

♦ انجام تست بر روی سلول‌ها سریع‌تر بوده و ضمناً بررسی نحوه‌ی اثر و هدف سم را آسان‌تر می‌کند.

♦ آزمایش مواد بر روی رده‌های سلولی خاص، این مواد ممکن است متابولیت‌ها، هورمون‌ها یا فاکتورهای رشد باشند. می‌توان اثر ترکیبات سرطان‌زا بر روی سلول‌ها را نیز مورد ارزیابی قرار داد.



۳-۲-۱) استفاده از سلول‌ها برای بررسی حضور ویروس‌ها

♦ کشت سلول‌ها در آزمایشگاه‌های ویروس‌شناسی جهت بررسی حضور ویروس‌ها استفاده می‌شود. ویروس‌ها باعث آثار سیتوپاتیک^۱ خاصی بر روی سلول‌ها می‌شوند مانند تجمع سلول‌ها، ایجاد گرانول‌ها و لیز سلول‌ها. با استفاده از کنترل‌های مثبت و بررسی آثار ویروس‌ها بر روی سلول‌ها شناسایی ویروس انجام می‌شود. برای این آزمایشات، معمولاً از سلول‌هایی که دارای رشد سریع داشته و به بستر چسبندگی دارند مانند HeLa استفاده می‌گردد.

۴-۲-۱) تولید انبوه محصولات بیولوژیک مانند واکسن‌ها و آنتی‌بادی‌ها (جدول ۱-۱)

♦ تولید واکسن‌های ویروسی در تخم مرغ طولانی بوده و در کشت سلولی سریع‌تر است.

♦ تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال با استفاده از کشت سلولی آسان‌تر و ارزان‌تر می‌باشد.

♦ تولید پروتئین‌های نوترکیب با ورود ژن‌های کدکننده‌ی آن‌ها به درون سلول‌ها میسر شده است. اینترفرون‌ها، فعال‌کننده‌ی پلاسمینوژن بافتی و فاکتورهای انعقاد خون از پروتئین‌هایی هستند که با موفقیت در سلول‌ها تولید شده‌اند.

1. CPE: Cytopathic Effect

۵-۲-۱) استفاده از کشت‌های بافت برای تولید بافت‌های مصنوعی یا مهندسی بافت

♦ بازسازی بافت‌های مختلف انسانی حاصل از مخلوط سلول‌های مختلف برای درمان نقص‌های بافتی بسیار امیدبخش بوده است. این فرآیند برای تولید پوست مصنوعی در درمان سوختگی پتانسیل قابل ملاحظه‌ای دارد.

محصول	رده‌ی سلولی
Interferon	Human leucocytes
Interferon	Mouse fibroblasts
Urokinase	Human Kidney
Human protein (HPC)	Human kidney cell (293)
Canine distemper vamlane	Dog kidney
Foot and Mouth disease (FMD) vamlane	Cow kidney
Vamlines for influenza, measles and mumps	Chick embryo fluid
Vamlines for rabies and rubella	Duck embryo fluid
1. Tissue-type plasminogen activator (t-PA) 2. B-and gamma interferons 3. Factor VIII	Chinese hamster ovary (CHO) cells

جدول ۱-۱: تعدادی از محصولات‌ی که در رده‌های سلولی جانوری تولید شده‌اند.

۳-۱) کاربرد کشت سلول‌های بنیادی

سلول‌های بنیادی^۱ سلول‌هایی هستند که در بدن، توانایی تبدیل به انواع محدود یا نامحدود سلول‌ها را دارند. سلول‌های بنیادی، بخشی از سیستم

1. Stem cells



ترمیم بدن هستند که به لحاظ تئوری می‌توانند مادامی که شخص زنده است بدون محدودیت تقسیم شوند و به سلول‌های دیگر بدن تبدیل شوند. وقتی یک سلول بنیادی تقسیم می‌شود هر سلول دختری^۱ این ظرفیت را دارد که به‌صورت یک سلول بنیادی بماند یا به یک نوع سلول تخصص‌یافته با اعمال اختصاصی مانند سلول ماهیچه‌ای، گلبول قرمز یا سلول عصبی تبدیل گردد. انواع سلول‌های بنیادی عبارتند از:

۱. **سلول‌های پلوری پوتنت^۲:** که قابلیت تبدیل به هر نوع سلولی در بدن را

دارند به‌جز سلول‌هایی که سبب حمایت و تکوین جنین در رحم می‌شوند.

۲. **سلول‌های مولتی پوتنت^۳:** این سلول‌ها به انواع محدودی از انواع سلول‌ها تبدیل می‌شوند.

سلول‌های پلوری پوتنت از جنین چند روزه جدا می‌شوند و در کشت سلول به‌طور نامحدود رشد می‌کنند. این سلول‌ها همچنین از بافت‌های جنین ۸ هفته‌ای انسان نیز جدا می‌شوند. مغز استخوان ران بالغین و بند ناف نوزاد تازه متولد شده از دیگر منابع تأمین سلول‌های بنیادی هستند. در سال ۲۰۰۷ نوع دیگری از سلول‌های بنیادی به نام سلول‌های «پلوری پوتنت القا شده» معرفی شدند که در واقع سلول‌های بالغی هستند که با کمک تغییر بیان ژن‌ها و فاکتورهای مهم برنامه‌ریزی شده، ویژگی‌های سلول‌های بنیادی را پیدا می‌کنند.

1. Daughter cell

2. Pluripotent stem cells

3. Multipotent stem cells



سلول‌های بنیادی بالغ یا غیرجنینی، در بسیاری از اندام‌ها و بافت‌ها وجود دارند. معمولاً در هر بافت گروه کوچکی از سلول‌های بنیادی مولتی پوتنت وجود دارند که ظرفیت اندکی برای تکثیر دارند به این دلیل استفاده از آن‌ها در مقیاس وسیع در آزمایشگاه بسیار مشکل است. تصور بر این است که سلول‌های بنیادی در مکان‌های اختصاصی در هر بافتی وجود دارند (نیچ^۱ سلول‌های بنیادی). این سلول‌ها ممکن است سال‌ها خاموش و یا غیرفعال بمانند تا زمانی که به وسیله‌ی یک نیاز طبیعی برای تعداد بیشتر سلول، بیماری و یا آسیب بافتی، فعال شوند.

هنگامی که یک رده سلول بنیادی تهیه می‌شود، نامیرا بوده و پژوهشگران دیگر نیازی به جداسازی این سلول‌ها ندارند. این سلول‌ها را می‌توان در آزمایشگاه ذخیره و فریز نمود. رده‌های سلول‌های بنیادی که در آزمایشگاه رشد می‌کنند این موقعیت را برای پژوهشگران فراهم می‌آورد تا از آن‌ها در پیوند و درمان بیماری‌ها استفاده نمایند. برای مثال پیش از پیوند، (بافت، عضو یا سلول) ابتدا باید بر سیستم ایمنی میزبان غلبه نمود تا از پس زدن پیوند ممانعت گردد. اما در آینده پژوهشگران ممکن است قادر باشند تا سلول‌های بنیادی انسان را به شکلی تغییر دهند تا به کمک ژن درمانی یا سایر تکنیک‌ها از رد پیوند جلوگیری شود، همچنین ممکن است ژن‌های معیوب را با ژن‌های کارآمد جایگزین نموده و یا ژن‌های جدید، اضافه شده تا در نهایت منجر به درمان بیماری شود.

هم اکنون بررسی‌ها برای استفاده از سلول‌های بنیادی در درمان ضایعات قلبی عروقی، بیماری‌های نورودژنراتیو مانند ام‌اس، ضایعات مغزی نخاعی،

1. Niche



ویتیلیگو، دیابت تیپ ۱ و سایر بیماری‌های خودایمن در حال انجام است. اما با وجود همه‌ی تلاش‌ها، پیچیدگی سلول و مبهم‌بودن نوع عملکرد آن در بدن در تعامل با سایر سلول‌ها و فاکتورها، آینده‌ی مبهمی بر سر راه این علم و استفاده از آن در پزشکی و درمان بیماری‌ها قرار داده است.

۴-۱) کشت سلول‌های جنینی

از آن‌جا که بافت‌های جنینی بهتر از یکدیگر جدا می‌شوند، ضمناً سلول‌های زنده بیشتری دارند و سریع‌تر از سلول‌های بالغ در کشت تکثیر می‌یابند، لذا از تخم مرغ‌های عاری از پاتوژن (SPF)^۱ جنین‌دار به عنوان منبع سلولی استفاده می‌شود. این دسته از سلول‌ها در تشخیص ویروس‌ها، کاربرد زیادی دارند. مایع کیسه‌ی آمنیون با انجام آمنیوسنتز^۲، به‌دست می‌آید که حاوی مقدار کمی از سلول‌های جنینی است. برای افزایش این سلول‌ها، مایع آمنیون سانتریفوژ شده و سلول‌های ته‌نشین شده، جدا شده و کشت داده می‌شوند تا سلول‌ها، تکثیر شده و محتوای سلولی و کروموزومی آن‌ها افزایش پیدا کند. سپس آزمایشات اختصاصی مانند بررسی کروموزوم‌ها و یافتن ناهنجاری‌های کروموزومی احتمالی جنین انجام می‌شود.

-
1. Specific Pathogen Free
 2. Amniocentesis



۵-۱) کاربرد کشت سلول‌های حشرات

در سال ۱۹۱۵ اولین تلاش برای کشت سلول‌های حشرات توسط گلداسمیت^۱، حدود ۵۰ سال قبل از ارائه‌ی روش‌های موفق کشت سلولی انجام گرفت. در سال ۱۹۳۵ اولین مقاله‌ی علمی به‌وسیله‌ی تراگر^۲ در مورد کشت موفق باکولوویروس^۳ در کشت سلول تخمدان حشره کرم ابریشم انتشار یافت. محیط کشت استفاده شده ترکیبی از آلبومین تخم مرغ، قند مالتوز، پنج نمک، آب مقطر و همولنف کرم ابریشم بود.

در سال ۱۹۵۶ ویات^۴ روش‌هایی پیشرفته‌تری برای رشد و تکثیر سلول‌های حشرات و تکثیر ویروس‌ها ارائه نمود.

در سال‌های ۱۹۸۰ مطالعات کشت سلول‌های غیرمه‌ره‌داران شامل حشرات و گیاهان برای مطالعه‌ی ویروس‌های گیاهی و حشرات به اوج خود رسید. بین سال‌های ۱۹۶۰ تا ۱۹۹۰ حدود ۴۰۰ رده‌ی سلول حشرات تهیه شد و وسیله‌ی مهمی برای مطالعه‌ی پاتولوژی ویروس حشرات و ویروس‌های قابل انتقال از حیوانات به انسان فراهم گردید.

ارائه‌ی سیستم‌های بیان باکولوویروس یکی از مهم‌ترین پیشرفت‌ها و کاربردهای سلول‌های حشرات در بیوتکنولوژی است.

-
1. Goldschmidt
 2. Trager
 3. Baculovirus
 4. Wyatt



سلول Sf21 به وسیله‌ی ووگان^۱ در ۱۹۷۰ تهیه شد که مستعد آلودگی با ویروس بود. Sf9 نیز مشابه‌ی Sf21 بوده که هر دو نوع سلول، به صورت تک لایه و معلق رشد می‌کنند، سازگار با محیط‌های کشت فاقد سرم هستند و برای پذیرش ویروس بسیار مستعد می‌باشند. در حال حاضر از Sf9 رده سلولی دیگر حاصل شده است که با نام تجاری Sf+ در دسترس است. جدول ۱-۲ چهار نوع مهم سلول‌های حشرات و منشاء آن‌ها را نشان می‌دهد.

منبع	رده‌ی سلولی
Spodoptera frugiperda ovarian tissue	Sf9
Spodoptera frugiperda ovarian tissue	Sf21
Trichoplusia ni embryonic tissue	Tn5B1-4 (High Fives)
Drosophila	S2

جدول ۱-۲: اسامی چهار نوع رده‌ی سلولی حشرات و منشاء آن‌ها

در حال حاضر این سلول‌ها و سیستم بیان باکولوویروس در سلول‌های حشرات در بیوتکنولوژی جایگاه بی‌رقیبی دارند. این سیستم‌ها می‌توانند گلیکوپروتئین‌ها را به راحتی ترشح کنند. البته الگوی افزوده شدن قندها در پستانداران با سلول‌های حشرات متفاوت است.

در انسان، یک سیالیک اسید به انتهای گلیکوپروتئین‌ها افزوده می‌شود اما در سلول‌های حشرات این اتفاق نمی‌افتد و ضمناً گلیکوپروتئین‌ها در حشرات دارای مانوز بیشتری نسبت به انسان هستند. جدول ۱-۳ تعدادی از محصولات بیولوژیک تولید شده در سلول‌های حشرات را نشان می‌دهد.

<i>Spodoptera frugiperda</i> با استفاده از سلول‌های		
وضعیت	شرکت تولیدکننده	محصول
فاز سوم بالینی	Dendron	Provenge Vamline واکسن سرطان پروستات
فاز سوم بالینی	Protein Sciences	Flublok Vamline واکسن آنفلوانزای انسانی
فاز دوم بالینی	Virexx medical Corp	Chimigem Vamline C و B هیاتیت مزمن
تجاری	Intervet	Swine Fever Vamline واکسن آنفلوانزای خوکی
<i>Trichoplusia ni (High five)</i> با استفاده از سلول‌های		
تجاری	Medimmune/GSK	Cervix HPV Vamline واکسن سرطان سرویکس
فاز سوم بالینی	Favrille	Idiotype/KLH Vamline لنفوم B غیر هوچکین

جدول ۱-۳: تعدادی از محصولات بیولوژیک با استفاده از سلول‌های حشرات و نام شرکت تولیدکننده و وضعیت فعلی محصول

۶-۱) کاربرد کشت سلول‌های گیاهی

در زمینه‌ی تکثیر سلول‌های گیاهی بیشتر از اصطلاح «کشت بافت» استفاده‌ی می‌شود که مشتمل بر کشت پروتوپلاست، سلول‌ها، بافت‌ها یا اندام‌های گیاهی (در شرایط فاقد میکروب که منجر به تکثیر سلول‌ها یا بازسازی اندام‌ها یا کل گیاه می‌شود) است.



کشت بافت گیاهی منجر به تولید «کلون‌های سلولی» می‌شود. هر کلون شامل سلول‌هایی است که دارای ژنوتیپ مشابه‌ای هستند مگر این که در طی کشت دچار جهش شوند.

در اوایل سال‌های ۱۹۰۰ مطالعه‌ی کشت بافت‌های گیاهی آغاز شد و در سال‌های ۱۹۲۰، کشت بافت‌های گیاهی با تکثیر گل‌های ارکیده، اولین کاربرد تجاری خود را نشان داد. کشت سلول‌ها و بافت‌های گیاهی شباهت بسیاری با یکدیگر در مراحل عملی دارند. سلول‌های گیاهی برای رشد و تمایز به دو هورمون آکسین^۱ برای رشد ریشه و هورمون سیتوکینین^۲ برای رشد ساقه نیاز دارند.

مهم‌ترین کاربردهای کشت بافت‌های گیاهی به شرح زیر می‌باشند:

۱-۶-۱) تکثیر گیاهان

♦ با تکثیر بافت گیاهی می‌توان در زمان کوتاه و بدون محدودیت فصلی و تأثیر شرایط جوی، تعداد بسیار زیاد و حتی نامحدودی از آن گیاه را تولید نمود. ضمناً می‌توان گیاهان عاری از ویروس را پرورش داد.

۲-۶-۱) حفظ و نگهداری گیاهان

♦ گیاهان را می‌توان در دماهای بسیار پایین (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) برای سال‌های زیادی با اهدافی مانند حفظ ذخایر زیستی نگهداری نمود.

1. Auxin

2. Cytokinin

۳-۶-۱) ایجاد جهش بدون استفاده از تکنیک‌های نوترکیبی

♦ از این روش سلول‌هایی با تغییرات ژنتیکی ایجاد می‌شوند که منجر به تولید گونه‌های جهش‌یافته می‌شود که به‌عنوان مثال دارای مقاومت به بیماری‌ها یا کم‌آبی هستند.

۴-۶-۱) کشت جنین‌های گیاهی

♦ با کشت جنین‌های گیاهی می‌توان گیاهان هاپلوئید و دیپلوئید و گیاهان هیبرید یا دو رگه را تولید نمود.

۵-۶-۱) تولید محصولات صنعتی

♦ مهم‌ترین مواد شیمیایی تولید شده با استفاده از کشت سلولی، متابولیت‌های ثانویه هستند که در واقع موادی می‌باشند که سلول برای بقای خود نیازی به آن‌ها ندارد. از این مواد می‌توان به آلکالوئیدها، گلیکوزیدها مانند استروئیدها و فنولیک‌ها، تریپنوئیدها، لاتکس و تانین‌ها اشاره کرد. از گیاهان داروهای پرمصرفی مانند کدئین به عنوان مسکن و دیگوکسین^۱ جهت درمان اختلالات قلبی و عروقی به‌طور طبیعی تولید می‌شوند. در حال حاضر شیکونین^۲ که نوعی ماده‌ی رنگی است در مقیاس صنعتی برای استفاده در مواد غذایی و لوازم آرایشی از کشت سلول‌های گیاهی، حاصل می‌شود. با کشت سلولی تولید این مواد بسیار آسان‌تر و کم‌هزینه‌تر است.

1. Digoxin

2. Shikonine



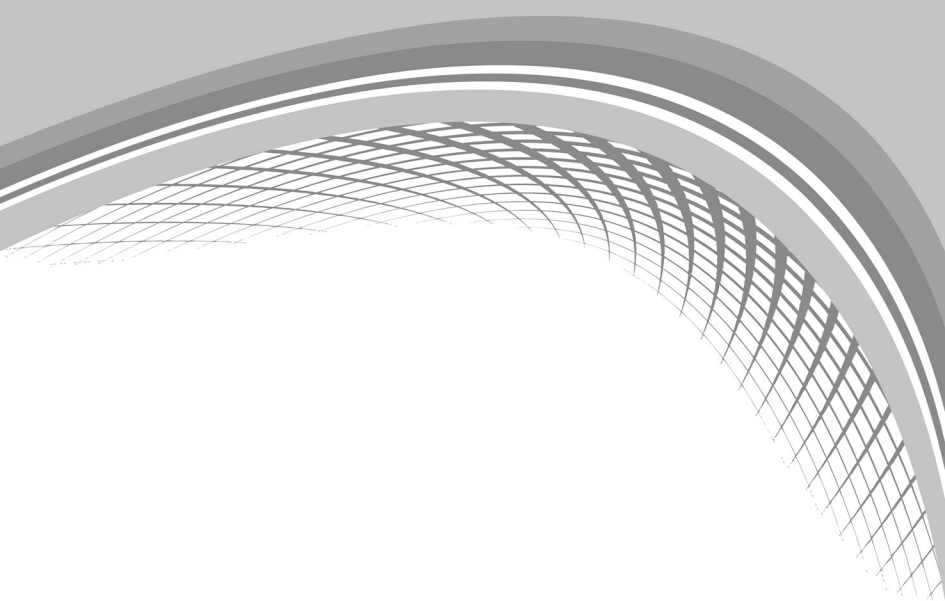
جدول ۴-۱ تعدادی از موادی که با استفاده از تکنیک‌های کشت سلول‌های گیاهی تولید می‌شوند را نشان می‌دهد.

محصول	منبع گیاهی	استفاده
Artemisin	Artemisia spp.	ضد مالاریا
Azadirachtin	Azadirachta indica	حشره‌کش
Berberine	Coptis japonica	ضدباکتریایی، ضد التهاب
Capsaicin	Capsicum annum	مسکن دردهای رماتیسمی
Codeine	Papaver spp.	آرام‌بخش
Camptothecin	Camptotheca amluminata	ضدسرطان
Cephalotaxine	Cephalotaxus harringtonia	ضدسرطان
Digoxin	Digitalis lanata	دردهای قلبی
Pyrethrin	Chrysanthemum cinerariaefolium	آفت‌کش برای غلات
Morphine	Papaver somniferum	آرام‌بخش، خواب‌آور
Quinine	Cinchona officinalis	ضد مالاریا
Taxol	Taxus spp.	ضدسرطان
Vincristine	Cathranthus roseus	ضدسرطان
Scopolamine	Datura stramonium	ضد فشار خون

جدول ۴-۱: تعدادی از محصولات بیولوژیک حاصل از سلول‌های گیاهی و موارد استفاده‌ی آن‌ها

فصل دوم

اجرای تکنیک کشت سلولی



مقدمه

کشت سلولی نیاز به فراهم آوردن امکانات و تمهیدات مخصوصی دارد. انجام آزمایشات در فضاهای استریل، محیط‌های کشت حاوی تمامی نیازهای رشد سلول و البته کارشناسانی آگاه از تکنیک‌های کشت سلولی و آشنا به رفتارهای سلول‌ها، متضمن انجام و اجرای صحیح و موفق تکنیک‌های کشت سلولی می‌باشد. در ادامه به طور مفصل به این تمهیدات شامل فضای انجام کار، وسایل و سخت‌افزارهای اصلی، مواد شیمیایی و محیط کشت‌ها و روش کارهای مورد نیاز پرداخته می‌شود. جدول ۱-۲ لیستی از وسایل ضروری یک آزمایشگاه کشت سلولی مستقل و کوچک را نشان می‌دهد.

شماره	وسیله
۱	اتوکلاو
۲	ترازوی الکترونیک
۳	هود Class II
۴	سانتریفوژ با سرعت کم، یخچال دار و درب شفاف
۵	شمارشگر سلولی، لام هموسایتومتر یا نتوبار
۶	پیپت‌های استریل یکبار مصرف ۱ و ۱۰ و ۲۵ ml
۷	پیپتور قابل شارژ
۸	فلاسک‌های استریل کشت ۲۵ و ۷۵ cm ²
۹	لوله‌های مخصوص کشت یکبار مصرف
۱۰	ویال‌های کرایو (کرایوتیوب) ۲ و ۴ ml
۱۱	پلیت‌های کشت سلولی استریل ته صاف ۲۴ و ۴۸ و ۹۶ حفره
۱۲	فریزر -۲۰ سانتیگراد
۱۳	انکوباتور CO ₂
۱۴	تانک ازت ۲۵-۲۰ لیتری
۱۵	سیستم فیلتراسیون قابل اتوکلاو به همراه پمپ خلاء
۱۶	pH متر
۱۷	میکروسکوپ معکوس
۱۸	میکسر و ورتکس
۱۹	فور برای استریل کردن با حرارت خشک
۲۰	یخچال
۲۱	همزن مغناطیسی و مغنت‌های قابل استریل و ضد زنگ
۲۲	آب مقطرگیری دوبار تقطیر مجهز به دیونیزه‌کننده

جدول ۲-۱: لیست وسایل ضروری یک آزمایشگاه کشت سلولی



۱-۲) طراحی آزمایشگاه کشت سلولی

یکی از مهم‌ترین ارکان کشت سلولی، ایجاد مکان مناسب و مجهز به دستگاه‌های ضروری است. فضا و مکان کشت سلولی معمولاً باید به‌طور جداگانه و ایزوله از سایر آزمایشگاه‌ها تعریف شود که حداقل رفت و آمد و جریان هوا در آن باشد تا از آلودگی‌های میکروبی ممانعت گردد. نتیجه‌ی عدم توجه به رعایت شرایط استاندارد و ضروری در اتاق‌های کشت سلول، اتلاف وقت و هزینه است.

در این‌جا با بهره‌گیری از الگوی پیشنهادی بانک جهانی سلولی اروپا^۱، الگویی برای طراحی مناسب آزمایشگاه کشت سلولی ارائه می‌شود تا در فضایی استاندارد بهترین کارایی حاصل گردد.

نکات مهم برای طراحی محل مناسب کشت سلول به ترتیب اهمیت عبارتند از:

۱. نیاز به حفظ شرایط سترونی با استفاده از هودهای استریل
۲. فضای حداقل 6×8 متر مربع
۳. تقسیم‌بندی فضای موجود به سه فضای مستقل 3×2 متر مربع، این تقسیم‌بندی می‌تواند مجازی باشد.
۴. تجهیز آزمایشگاه به لامپ‌های UV
۵. تهیه فضای مناسب به ابعاد 4×3 متر مربعی برای شستشو، بسته‌بندی

1. ECACC: European Collection of Cell Culture



و استریل لوازم

۶. محلی برای شستشوی دست‌ها

۷. ایجاد سیستم فشار منفی، برای این که آزمایشگاه تحت تأثیر هوای بیرونی نباشد.

لازم به ذکر است رعایت شرایط نور، دما، نوع سطوح کار و کف در محیط آزمایشگاه از دیگر نکات ضروری است که البته در هر آزمایشگاه استاندارد رعایت می‌شود. بهتر است میزهای کار حتماً ضد آب و مقاوم به مواد شیمیایی باشند.

برای پیشگیری از هر نوع آلودگی بهتر آن است که برای نگهداری مواد و سلول‌هایی که به تازگی دریافت می‌شوند، یک ناحیه‌ی قرنطینه تعبیه گردد. ضمناً برای کشت رده‌های مختلف سلولی، انکوباتورهای متفاوتی در آزمایشگاه در نظر گرفته شود و نیز جایگاه نگهداری مواد و ظروف استریل و غیراستریل از هم جدا باشد. در صورت فراهم‌نشدن این شرایط استاندارد، زمان‌بندی باید طوری طراحی شود که امکان آلودگی به حداقل ممکن برسد.

یکی از نکات بسیار حائز اهمیت، پاکیزه‌سازی و کنترل آلودگی سطوح کار در بین فعالیت‌های مختلف است. آلودگی این سطوح و مواد آزمایشگاه کشت سلول، به قارچ‌ها، باکتری‌ها و مایکوپلاسما به صورت منظم باید مورد بررسی قرار گیرد. ضمناً جهت کنترل آلودگی باید محدودیت‌هایی برای حضور افراد غیرمسئول و غیرکارشناس قائل شد.



چیدمان وسایل و در دسترس بودن وسایل در اتاق کشت سلولی از اهمیت زیادی برخوردار است. با چیدن صحیح و منطقی وسایل می‌توان جابه‌جاشدن در آزمایشگاه و در نتیجه ایجاد آئروسل‌ها را به حداقل رساند.

۲-۲) هود

از مهم‌ترین ابزار کشت سلولی هود یا کابینت ایمن میکروبیولوژی می‌باشد که محیط کار تمیزی را برای کشت فراهم نموده، ضمن آن‌که اپراتور را از آئروسل‌های تولید شده‌ی حین کار محافظت می‌کند. در واقع این کابینت‌ها اتاقک‌هایی استریل هستند که سبب فراهم‌شدن کار کشت سلول در محیط سترون می‌شوند. در این کابینت‌ها، اپراتور و مواد با استفاده از فیلترهایی به نام هپا^۱ محافظت می‌شوند و سطح آلودگی بر اساس دسته‌بندی کابینت استفاده شده تعریف می‌گردد.

۱-۲-۲) انواع هودها

هودها ابزارهایی هستند که برای یک یا چند هدف از اهداف زیر استفاده می‌شوند:

۱. حفاظت فرد آزمایشگر از خطرات مانند مواد و بخارات سمی
۲. حفاظت محصول یا آزمایش از آلودگی و تخریب‌شدن
۳. حفاظت محیط از متصاعدشدن گازهای سمی

1. HEPA: High-Efficiency Particulate Air

هودها به صورت معمول به صورت کابینت‌ها یا اتاقک‌هایی هستند که دارای پنج وجه بوده و در مقابل یک وجه آن، آزمایشگر می‌تواند ایستاده یا نشسته به کار بپردازد. هودها به دو دسته‌ی اصلی هودهای مخصوص خروج بخارات^۱، که به آن هودهای شیمیایی نیز گفته می‌شود و لایه‌ای یا لامینار^۲ تقسیم می‌شوند.

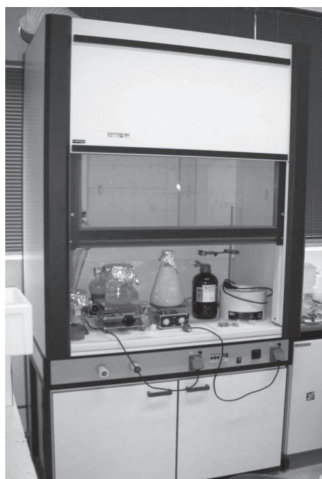
۲-۲-۲) هودهای شیمیایی

هود شیمیایی در واقع یک ابزار تخلیه‌ی موضعی است که خطر در معرض قرار گرفتن به انواع بخارها و گازهای سمی و ذرات گرد و غبار را به حداقل می‌رساند. این انواع می‌توانند دارای کانال‌های خروج هوا و یا بدون مجرا باشند که هوا به صورت گردش کننده باشد. در هر دو حالت، هوا از وجه آزاد به درون کابینت کشیده شده و از طریق کانالی به خارج ساختمان هدایت می‌گردد (مانند هودهای آشپزخانه) و یا در هودهای فاقد مجرا، هوا مجدداً از طریق فیلتراسیون به فضای آزمایشگاه برمی‌گردد (شکل ۲-۱).

کار دیگر این نوع هودها، ممانعت از انتشار آلودگی‌ها و متصاعد شدن گازهای قابل اشتعال و انفجار است.

1. Fume Hood

2. Laminar Hood



شکل ۱-۲: هود شیمیایی. هودهای شیمیایی می توانند به شکل های مختلف بسته، بدون اتاقک و لوله ای باشند. در هر سه نوع، گازها و بخارات از محیط کار دور می شوند.

۳-۲-۲) هودهای لامینار

در هودهای لامینار، جریان هوا از فیلترهای مطبقی عبور کرده و در واقع جریان هوا به صورت لایه ای است. به عبارتی هوا به صورت لایه های موازی حرکت کرده بدون آن که این لایه ها با یکدیگر مخلوط شوند. در این هودها، هوا از بین فیلترهای هپا عبور می کند و به سمت فرد آزمایشگر و یا سطح پایینی کابینت حرکت می کند و خارج می شود. جنس این هودها از استیل ضدزنگ است و طوری ساخته می شوند که فضای داخلی کابینت فاقد اتصالات و برجستگی

باشد تا از نشستن ذرات و اسپورها در آن ممانعت شود.

۴-۲-۲) فیلترهای هپا

یک فیلتر هپای استاندارد می‌تواند 99.97% ذرات بزرگتر از 0.3 میکرونی را که از هوای درون آن می‌گذرد حذف کند.

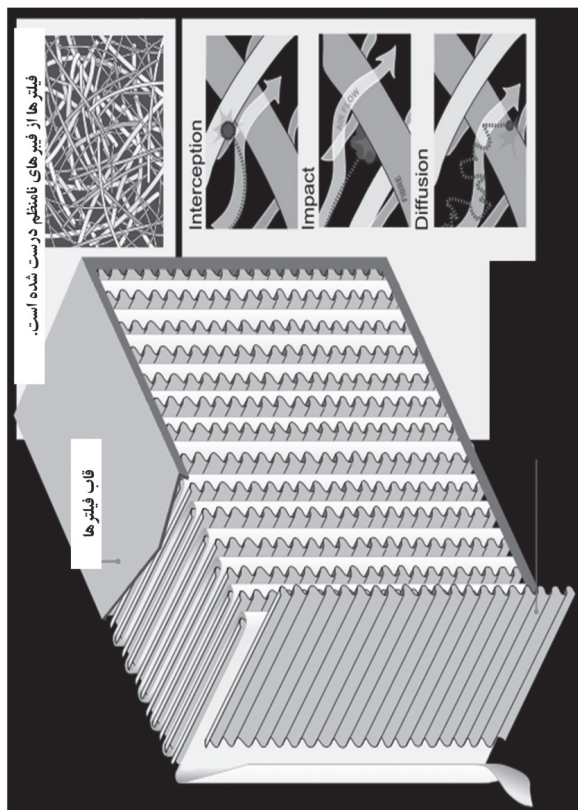
فیلترهای هپا از رشته‌های فیبری نامرتب تشکیل شده‌اند. این فیبرها معمولاً از جنس فیبروگلاس بوده و قطرشان حدود 0.5 تا 2 میکرومتر و فاصله‌ی بین رشته‌ها حدود 0.3 میکرون است (شکل ۲-۲). تصور عمل این فیلترها مانند یک غربال، نادرست است. مکانیسم‌های به دام افتادن ذرات در فیلترهای هپا به واسطه‌ی مکانیسم‌های زیر است:

۱. جلوگیری از حرکت ذرات^۱، در طی حرکت ذرات به درون فضای فیلترها، به آنها چسبیده و ثابت می‌شوند.

۲. گیرافتادن ذرات^۲، به‌خصوص برای ذرات بزرگتر اتفاق می‌افتد.

۳. انتشار^۳، نتیجه‌ی برخورد مولکول‌های گاز یا هوا با ذرات بسیار کوچک حدود 0.1 میکرونی است که سبب انتشار و انحراف حرکت ذرات در طی مسیر می‌شود.

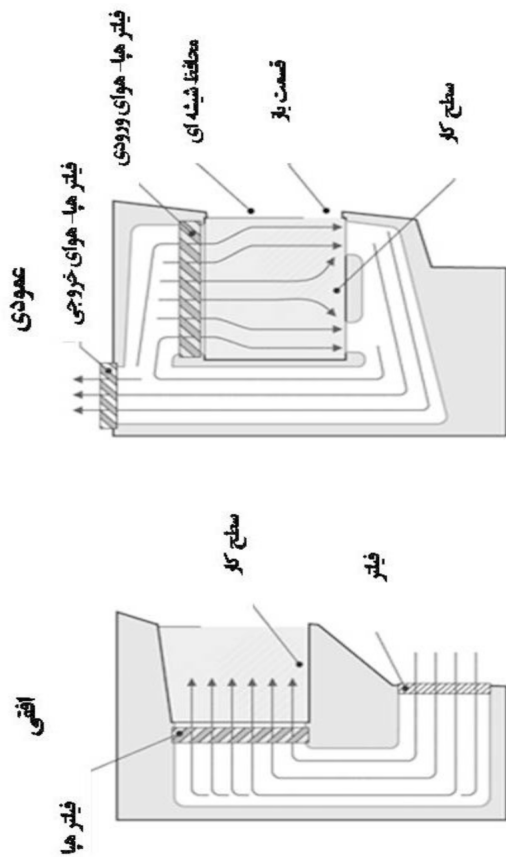
-
1. Interception
 2. Impact
 3. Diffusion



شکل ۲-۳: فیلتر هپا. این فیلترها در واقع متشکل از تارهای به هم تنیده‌ی فیبری هستند که مانع عبور ذرات از آن می‌شوند.

هودهای لامینار بر اساس جهت حرکت هوا به دو صورت افقی و یا عمودی طراحی می گردند (شکل ۳-۲).

♦ در هودهای افقی هوای استریل و تصفیه شده از پایین و از اطراف محیط کار، مکش شده و پس از عبور از فیلترها و استریل شدن، به طرف خارج یعنی صورت و بدن اپراتور حرکت می کند. در این هودها، آلودگی از طرف فرد آزمایشگر به محل کار و داخل هود جریان نخواهد داشت. اما این گونه هودها برای کار با ویروس ها، مواد رادیوایزوتوپ و سلول های آلوده به ویروس، به هیچ وجه توصیه نمی شوند زیرا ممکن است آلودگی را به فرد آزمایشگر منتقل نمایند.



شکل ۲-۳: هودهای افقی و عمودی لامینار. در نوع افقی، جریان هوا به صورت افقی به طرف بیرون هود جریان دارد. در هود عمودی، جریان هوا به صورت عمودی از بالا به پایین حرکت می کند.



هودهای عمودی از بهترین نوع هودها می‌باشند چرا که هوای داخل از بالا با فشار مناسب به پایین آمده و از اطراف به داخل کشیده می‌شود و پس از آن از فیلترهای هپا عبور نموده، استریل شده و دوباره این گردش هوا تکرار می‌گردد. به این نوع هودها، هودهای بیولوژیکی ایمن یا BSC^۱ نیز اطلاق می‌شود. زیرا هم سبب حفاظت افراد و هم مواد و سلول‌های مورد آزمایش می‌شوند.

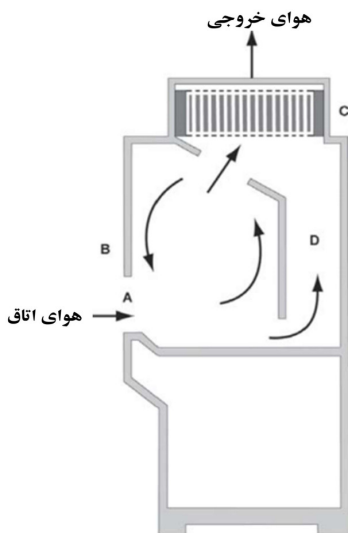
۲-۳) انواع BSCها

BSCها به سه گروه اصلی تقسیم می‌شوند:

۱- ۲-۳-۱) نوع ۱ (Class I)

این نوع هودها تحت فشار منفی بوده و قسمتی از وجه روبه‌رویی کابینت باز است. هوای کابینت پس از عبور از فیلتر هپا، به بیرون و یا محیط آزمایشگاه وارد می‌شود. این هود برای کار با عوامل میکروبی، دارای ریسک متوسط و یا کم و نیز جهت استفاده‌ی مخلوط‌کن‌ها، خردکننده‌ها و سایر وسایل مناسب است. این نوع هودها برای کار با عوامل میکروبی خطرناک، به دلیل برگشت هوا به آزمایشگاه مناسب نمی‌باشد. در این نوع هودها ثابت است (شکل ۲-۴).

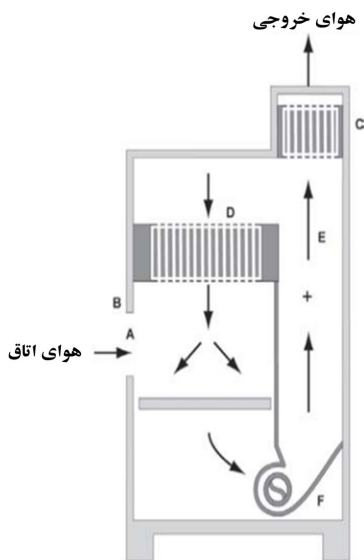
1. BSC: Biological safety cabinets



شکل ۲-۴: هود BSC Class I. A. قسمت باز هود، B. محافظ شیشه‌ای، C. فیلتر هپا، D. قسمت خروجی هوا.

۲-۳-۲) نوع ۲ (Class II)

این نوع هودها، دارای برگشت هوا بوده و هوا پس از فیلتر شدن و عبور از هپا به وسایل آزمایش و مواد، برخورد و مجدداً از فیلتر عبور کرده و به محیط وارد می‌شود. هوای خروجی نیز تصفیه شده و برای انسان و محیط خطری ندارد. درب این نوع هودها یا متحرک و یا ثابت است. این نوع از هودها به زیر گروه‌هایی تقسیم می‌شوند (A1, A2, B1 و B2) (شکل ۲-۵).

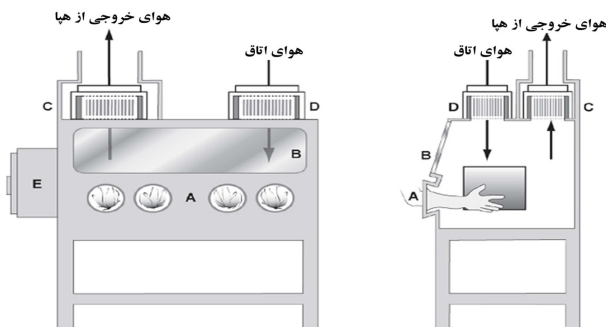


شکل ۵-۲: هود A1. BSC Class II Type A1. قسمت باز هود، B. محافظ شیشه‌ای،
C. فیلتر هپا، D. فیلتر هپای اضافی، E. قسمت مشترک، F. دمنده‌ی هوا.

۳-۳-۲) نوع ۳ (Class III)

این هودها کاملاً مسدود بوده و بالاترین درجه‌ی حفاظت افراد، مواد آزمایشگاهی و محیط زیست را تأمین می‌کنند. این هودها مجهز به دستکش‌های بلندی هستند که می‌توان دست را تا بازو وارد آن نمود و در زیر هود، آزمایش را انجام داد. این هودها به اتوکلاوهای دارای تانک‌هایی حاوی مواد شیمیایی، برای قراردادن وسایل و مواد آلوده و کانال‌هایی برای ورود وسایل استریل و

لوازم کار به هود، مجهز هستند. معمولاً چندین هود از این نوع به هم متصل هستند و به صورت سری استفاده می شوند (شکل ۶-۲).



شکل ۶-۲: هود BSC Class III. A. قسمت دستکش ها و محل کار، B. محافظ شیشه ای، C. فیلتر هیا، D. فیلتر هپای اضافی، E. قسمت ورود وسایل و مواد استریل.

❖ نکات مهم در مورد کار با هودها

- ✓ قبل از شروع و بعد از پایان کار، هود را به مدت ۲۰-۱۰ دقیقه روشن بگذارید.
- ✓ در حین کار در داخل هود، حرکت سریعی انجام ندهید تا جریان هوا مختل نشود.
- ✓ از تکان دادن شدید محلول ها در داخل هود برای جلوگیری از تولید آئروسول ها ممانعت کنید.



- ✓ هرگز با بیش از یک رده‌ی سلولی در داخل هود کار نکنید.
- ✓ سطح کار در زیر هود طوری منظم شود که مواد استریل با ظرف‌های کشت در کنار هم نباشند. بهتر است ظرف کشت در مرکز، مواد استریل در سمت چپ و مواد غیراستریل و ظرف جمع‌آوری‌کننده‌ی پسماندها در راست قرار گیرند.
- ✓ وسایل اضافی در زیر هود قرار نگیرند و هرگز در حین کار درب هود بسته نشود.
- ✓ از گذاشتن کاغذهای یادداشت یا کتاب در زیر هود خودداری کنید زیرا به جریان هوا آسیب رسانده، ضمناً احتمال آلودگی وسایل با مواد سمی و آلوده وجود دارد.
- ✓ هود را طوری در اتاق کشت قرار دهید که از درب ورودی فاصله داشته و جریان هوا به سمت آن نباشد.
- ✓ معمولاً در داخل هودها، لامپ‌اشعه‌ی ماورای بنفش جهت استریل کردن فضای کابینت وجود دارد. این لامپ را می‌توان در مواقعی که با هود کار نمی‌شود، روشن نمود. در حین کار با هود، این لامپ باید خاموش گردد زیرا باعث سوختگی و صدمه به بینایی شده و حتی احتمال ایجاد سرطان نیز وجود دارد.
- ✓ معمولاً در زیر این هودها نیازی به روشن کردن شعله‌ی حرارت نیست و بهتر است از لوازم استریل و یکبار مصرف استفاده کرد. روشن کردن



- شعله سبب آسیب به فیلترها و اختلال در جریان هوا می‌گردد.
- ✓ برای استریل کردن و شستشوی فضای داخل کابینت، از مواد اسیدی و خورنده (مانند وایتکس) استفاده نشود.
- ✓ برای جلوگیری از احتمال آلودگی و دوام فیلتر هپا توصیه می‌شود که حتماً قبل و بعد از انجام کار، محیط داخل هود با الکل ۷۰٪ استریل شده و نیز به مدت ۱۵ دقیقه لامپ UV روشن بماند.
- ✓ در بعضی هودها قسمتی از سطح روبرویی با شیشه یا طلقی پلاستیکی پوشانده می‌شود که ممکن است با استفاده از الکل صدمه ببیند.
- ✓ بررسی محیط کار با قراردادن پلیت‌های بلاد آگار^۱ که به این منظور حداقل ۴ ساعت در هود قرار می‌گیرند، شاخص خوبی جهت بررسی ضریب اطمینان هود مورد استفاده می‌باشد، عدم رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها در سطح پلیت، نشانه کارکرد خوب هود می‌باشد.
- ✓ علاوه بر نکات گفته شده بایستی هر شش ماه یکبار از سالم بودن فیلترها، تنظیم فشار هوا و مؤثر بودن اشعه‌ی ماورای بنفش با انجام تست‌های لازم، اطمینان حاصل نمود. این کار معمولاً بر عهده‌ی واحدهای کنترل کیفی می‌باشد.

۴-۲) سانتریفوژها

سانتریفوژها معمولاً در کشت سلول بسیار کاربرد دارند. به خصوص در طی مراحل تجدید حیات کشت سلولی، پاساژ سلولی یا در مواقعی که نیاز به افزایش غلظت با حذف مایع کشت اضافی و یا شستشوی سلول‌ها است. با توجه به این که سانتریفوژها، آئروسول تولید می‌کنند لازم است که خطر تولید آئروسول‌ها به حداقل برسد، بدین منظور باید سانتریفوژی تهیه گردد که دارای محفظه‌ای کاملاً بسته با درپوش شفاف باشد، به طوری که محتویات داخل آن بدون بازکردن درب آن مشاهده شود. این کار سبب کاهش خطر در مواقع کار با مواد خطرناک خواهد گردید. سرعت سانتریفوژ نیز باید معادل ۸۰۰-۱۰۰۰ g باشد. استفاده از سرعت‌های بالاتر موجب آسیب دیدن و تجمع سلول‌ها به صورت رسوب متراکم می‌گردد که باعث ایجاد مشکل خواهد شد.

۱- ۴-۲) نکات مهم در مورد کار با سانتریفوژ

✓ بهتر است سانتریفوژ در جایی قرار گیرد که برای نظافت و تعمیر به آسانی در دسترس باشد و البته نباید زیاد جاگیر باشد. این دستگاه بایستی به طور منظم برای بررسی علائم خوردگی توسط کارشناسان بررسی گردد.

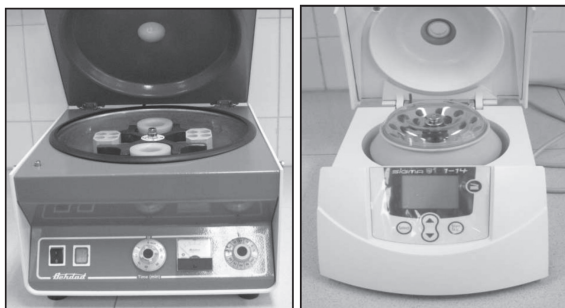
✓ نباید لوله‌های سانتریفوژ در ابتدا کاملاً پر گردند و بهتر آن است که به دقت به صورت حجمی و وزنی موازنه شده و در درون دستگاه روبه‌روی یکدیگر قرار داده شوند.

✓ چنانچه در هنگام کار با لوله‌های شکسته شده مواجه شدیم رعایت

اصول ایمنی و ضد عفونی کردن دستگاه می تواند ریسک تولید آئروسول ها را کاهش دهد.

✓ بهتر است سانتریفوژ در کنار هود باشد تا فرد آزمایش کننده به راحتی بدون جابه جاشدن به آن دسترسی داشته باشد و سلول ها را در سانتریفوژ بگذارد.

✓ سانتریفوژ بر روی میزی محکم و جدای از میزهای دیگر قرار گیرد تا لرزش احتمالی آن به ابزار دیگر آسیب نرساند.



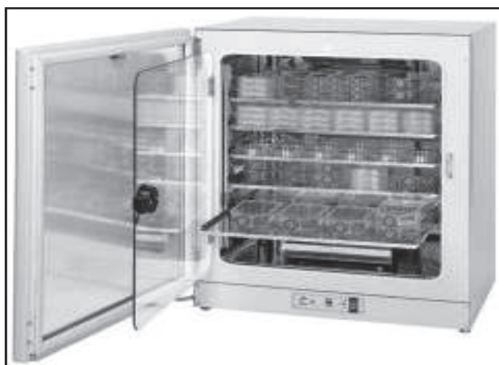
شکل ۷-۲: دو نوع سانتریفوژ رومیزی

۵-۲) انکوباتور CO₂ دار

کشت های سلولی به محیط کاملاً تحت کنترل برای رشد نیاز دارند و البته انکوباتورهای تخصصی طوری طراحی شده اند که بهترین شرایط رشد شامل دما، درجه حرارت، تنظیم جریان هوا، تنظیم میزان CO₂ و رطوبت را فراهم نمایند. این شرایط بایستی کاملاً تحت کنترل باشند به عنوان مثال

دامنه تنظیم حرارت از ۲۸ درجه سانتی گراد (برای سلول‌های حشرات) تا ۳۷ درجه سانتی گراد (برای سلول‌های سلولی پستانداران) و یا میزان درصد CO_2 می‌تواند بین ۵٪ تا ۱۰٪ تنظیم شود. البته برخی از انکوباتورها قادرند که میزان درصد اکسیژن موجود در انکوباتور را نیز به‌طور اتوماتیک کنترل نمایند. در حال حاضر انکوباتورهایی با پوشش داخلی مسی در دسترس می‌باشند که به‌دلیل اثر ممانعتی فلز مس بر روی میکروب‌ها، خطر آلودگی میکروبی را کاهش می‌دهند. ظرفی که در کف انکوباتورها تعبیه شده است برای تأمین رطوبت فضای انکوباتور می‌باشد که با پر کردن آن با آب استریل، تبخیر محیط کشت به حداقل ممکن رسیده و غلظت‌های نمکی محیط کشت، کمتر دستخوش تغییر می‌شوند. قراردادن موادی نظیر سدیم آزید یا پرمنگنات سدیم در سینی‌های آب انکوباتور نیز می‌تواند سبب کاهش رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها گردد، با این وجود هیچ چیز جایگزین نظافت منظم داخل انکوباتور نمی‌گردد.

انکوباتورها معمولاً دارای دیواره‌های دو جداره هستند و آب موجود در بین دو جداره سبب می‌شود که فضای داخل انکوباتور دارای درجه حرارت ثابت باشد. علاوه بر آن پنکه‌ای که داخل انکوباتور تعبیه گردیده در یکنواخت نمودن گرما و رطوبت نقش به‌سزایی را ایفا می‌کند. از آن‌جا که فضای داخل انکوباتورهای کشت سلول دارای رطوبت زیاد و دمای مناسب هستند لذا محیط مناسبی را جهت رشد قارچ‌ها و میکروب‌ها فراهم می‌آورد، بنابراین استفاده از مواد گندزدا و تمیز نگاه داشتن انکوباتور به‌طور جدی توصیه می‌گردد (شکل ۸-۲).


 شکل ۸-۲: انکوباتور CO₂

(۲-۶) اتوکلاو (استریلیزر)

در واقع اتوکلاو ابزاری برای استریل کردن وسایل و محلول‌ها با استفاده از بخار تحت فشار می‌باشد. چهار عامل اصلی در استریل کردن با بخار مهم هستند که شامل بخار، فشار، دما و زمان می‌باشند. طول زمان مورد نیاز برای استریل کردن بستگی به دما، خلا و فشار دارد. برای اتاق‌های کشت، تهیه‌ی یک اتوکلاو که بتواند حدود یک اتمسفر (۱۵ پوند بر اینچ مربع) فشار ایجاد نموده و زیاد جاگیر نباشد ضروری و کافی است. از مزایای این گونه اتوکلاوها کم‌حجم‌بودن، گرم و سرد شدن سریع و مقرون به‌صرفه‌بودن قیمت آن‌ها می‌باشد (شکل ۹-۲).



شکل ۹-۲: نمایی از یک اتوکلاو کوچک

۷-۲) فور خشک (آون)

با این که می‌توان از اتوکلاو برای استریل لوازم نیز استفاده کرد ولی بهتر است که برای استریل لوازم شیشه‌ای و فلزی و یا سایر مواردی که برای بخار غیرقابل نفوذ هستند از یک فور الکتریکی با حرارت بالا (۱۸۰-۲۰۰ درجه سانتی‌گراد) و مجهز به پنکه برای پخش حرارت استفاده نمود. از مزایای این روش می‌توان به راه‌اندازی آسان و غیررسمی بودن آن اشاره نمود، اما یکی از معایب این روش، طولانی و کندبودن زمان گرم‌شدن و استریلیزاسیون (حدود دو ساعت) است (شکل ۱۰-۲).

در حال حاضر انواع کوچکی از فورها به نام دستگاه‌های استریل خشک در دسترس هستند که می‌توان آن‌ها را در داخل هود جای داد و برای وسایل فلزی کوچک مانند پنس و استریل کردن فوری استفاده کرد.



شکل ۱۰-۲: دستگاه فور برای استریل خشک

۸-۲) یخچال و فریزر

اکثر معرف‌ها و محیط‌های کشت سلولی را می‌توان در یخچال و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمود و بعضی از آن‌ها به دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نیاز دارند. با این وجود بعضی از داروها و مشتقات کشت سلولی باید در حرارت پایین‌تر یعنی ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند.

۹-۲) تانک ازت (دستگاه انجماد سلولی)

سلول‌ها را می‌توان به مدت طولانی در دماهای زیر صفر نگهداری کرد. تهیه‌ی یک عدد تانک ازت با برآورد نیاز آزمایشگاه که بتواند حداقل ۳۵ لیتر ازت را در خود ذخیره نموده و با ظرفیت حدود ۵۰۰ کرایوتیوب، برای آزمایشگاه در حد متوسط کافی است. ضمناً باید دقت گردد که تبخیر ازت این تانک‌ها کم باشد. معمولاً برای جابه‌جایی سلول‌های منجمد نیاز به یک تانک کوچک قابل حمل نیز می‌باشد (شکل ۱۱-۲).

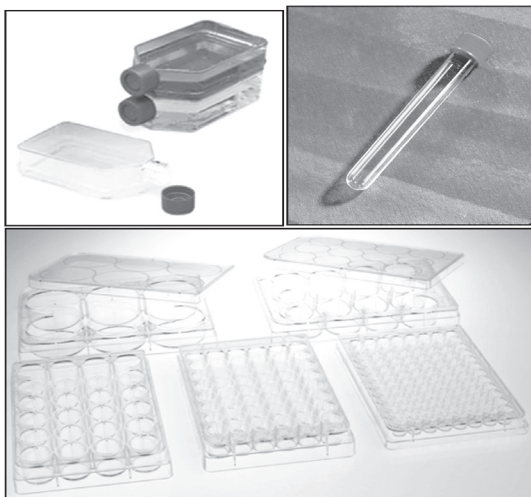


شکل ۱۱-۲: تانک‌های ازت در اندازه‌های مختلف

۱۰-۲) فلاسک، پلیت و سایر ظروف کشت سلول

امروزه در اغلب آزمایشگاه‌ها فلاسک و پلیت‌های پلاستیکی یکبار مصرف از جنس پلی‌استایرن مورد استفاده قرار می‌گیرند که برای تولید سطح مورد نیاز اتصال و رشد سلول بسیار مناسب هستند. این فلاسک‌ها معمولاً به وسیله تابش

گاما استرلیزه شده‌اند. اکثر این ظروف سطح صافی را برای اتصال سلول فراهم می‌کنند، هرچند سلول‌ها ممکن است به صورت سوسپانسیون و یا متصل به سطوح رشد کنند. رایج‌ترین انواع ظرف‌های کشت، به صورت پلیت‌های چندخانه‌ای، پتری‌ها و فلاسک‌های T مانند هستند (شکل ۱۲-۲).



شکل ۱۲-۲: انواع ظروف کشت سلول. فلاسک، لوله و انواع پلیت‌های چندخانه

برای کشت سلول در مقیاس گسترده، ظروف دیگری به نام بطری‌های چرخان طراحی شده‌اند. بطری‌های چرخان فلاسک‌های شیشه‌ای با کناره‌های صاف و دارای یک پرده تفلونی آویزان در مرکز هستند. برخی از این بطری‌ها دارای یک مگنت هستند که هنگامی که روی همزن مغناطیسی قرار می‌گیرند می‌چرخند و محیط کشت را به هم می‌زنند. این نوع فلاسک‌ها

برای سلول‌های معلق در محیط کشت طراحی شده‌اند و برای جلوگیری از اتصال ناخواسته، با سیلیکون پوشیده شده‌اند. برای رشد سلول‌های چسبنده، بطری‌های چرخان دیگری طراحی شده‌اند، که سطح بیشتری برای رشد فراهم می‌کنند. این بطری‌های چرخان، ظروف پلاستیکی استوانه‌ای شکلی هستند که بر روی چرخاننده‌های مکانیکی جای می‌گیرند. سیستم بطری‌های چرخان، سبب افزایش بازدهی کشت سلول‌های متصل‌شونده شده و معمولاً برای تولید تجاری واکسن‌های ویروسی استفاده می‌شوند.

۱۱-۲) میکروسکوپ

به‌منظور کنترل سلول‌ها در محیط کشت دو نوع میکروسکوپ معکوس^۱ و معمولی استفاده می‌شوند. میکروسکوپ معکوس برای بررسی سلول‌ها در فواصل زمانی منظم و کنترل سلامتی و رشد آن‌ها ضروری می‌باشد. طراحی این میکروسکوپ با شرایطی چون: منبع نور از بالا و کندانسوری که فاصله زیادی با نمونه دارد، اجازه می‌دهد سلول‌ها در فلاسک‌ها یا حتی بطری‌های رولر قابل مشاهده باشند (شکل ۱۳-۲). تغییر در شکل ظاهری سلول‌ها، گرانول‌های درون آن‌ها و میزان پهن‌شدگی سلول‌ها با بررسی میکروسکوپی منظم باید کنترل شوند. برای شمارش سلول‌های یک نمونه کشت که در هموسایتومتر ریخته شده‌اند میکروسکوپ معمولی، لازم است که دارای وسیله‌ای برای نگه‌داشتن و حرکت دادن اسلاید باشد. علاوه بر این موضوع، بررسی نمونه‌های

1. Invert

کشت زیر میکروسکوپ، برای تعیین هرگونه تغییر عمده در ظاهر سلول بسیار ارزشمند است. در صورت تجهیز این میکروسکوپ به دوربین عکاسی دیجیتال می‌توان در شرایط خاص از سلول‌ها عکس گرفت که برای ثبت داده‌ها و آرشیوسازی از شرایط مختلف کشت بسیار حایز اهمیت است.



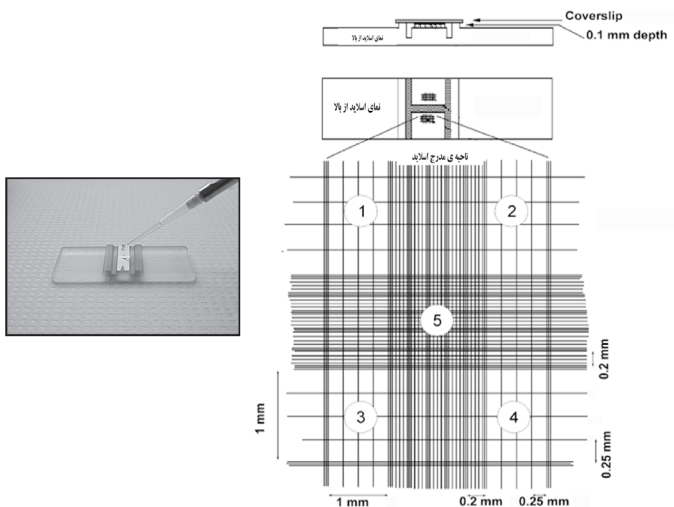
شکل ۱۳-۲: میکروسکوپ معکوس

۱۲-۲) شمارشگر سلولی

این وسیله، یک لام شیشه‌ای ضخیم است که بر روی صفحه‌ی درجه‌دار میکروسکوپ قرار می‌گیرد (شکل ۱۴-۲). مدل‌های مختلفی از آن در دسترس است که کاربردی‌ترین آن، لام نئوبار است. در این روش که رایج‌ترین ارزیابی برای بررسی حیات سلولی است از رنگ تریپان بلو استفاده می‌شود. تریپان بلو، یک رنگ حیاتی است و مرگ سلول‌ها را به‌دنبال ندارد. مبنای این رنگ‌آمیزی، عدم نفوذ رنگ به درون سلول‌های زنده و نفوذ آن به درون سلول‌های مرده است. شمارش سلول‌ها در مربع‌های مشبک هموسایتومتر صورت می‌گیرد. صفحه



هموسایتومتر دارای ۹ مربع بزرگ با ابعاد ۱ mm است. با توجه به ارتفاع بین لام و لامل حجم قرار گرفته در هریک از مربع‌ها 1 mm^3 است. برای به‌دست‌آوردن تعداد سلول‌ها در یک میلی‌لیتر، تعداد سلول‌های شمارش شده در یک مربع در زیر میکروسکوپ را در 10^4 ضرب نموده تا تعداد واقعی سلول‌ها به‌دست‌آید. اگر سلول‌ها رقیق شده باشند باید در فاکتور رقت نیز ضرب کرد. اگر هم حجم سلول‌ها، رنگ افزوده شده باشد فاکتور رقت ۲ محسوب می‌شود.



شکل ۱۴-۲: لام نئوبار جهت شمارش سلولی و نمای بزرگ شده‌ی سطح درجه‌بندی شده‌ی آن

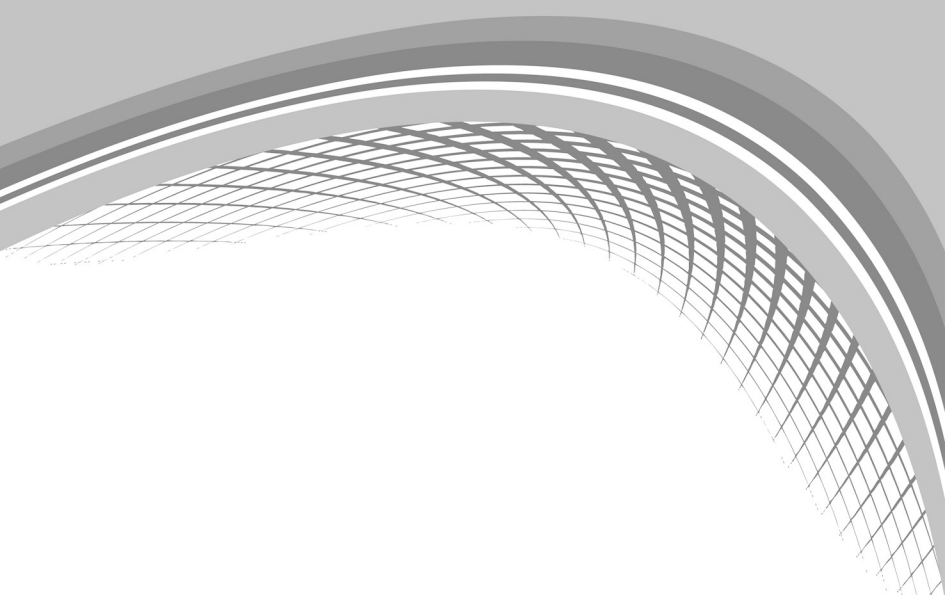


در واقع عدد ۲ ضریب رقت سلول با رنگ تریپان بلو بوده و عدد شمارش سلول در یک مربع هم می‌تواند شمارش سلول‌های یک مربع یا متوسط شمارش سلول‌های چند مربع باشد.

از سایر ابزارهای مورد نیاز، می‌توان به سمپلر، pH متر، ترازوی آزمایشگاهی، فیلتر هولدر، پمپ خلاء، دستگاه شستشوی شیشه آلات و پیپت شور، پیپتور برقی و لوله‌های آزمایش و دستگاه تولید آب مقطر خالص یا دو بار تقطیر اشاره نمود که بیشتر جنبه عمومی در آزمایشگاه‌ها دارند.

فصل سوم

**عوامل فیزیکی – شیمیایی اصلی
برای کشت سلول**



مقدمه

برای رشد سلول‌ها توجه به چهار عامل اساسی ضروری است که عبارتند از:

۱. ترکیبات گازی (اکسیژن و دی‌اکسید کربن)
۲. حرارت لازم برای نگهداری و رشد سلول‌ها
۳. ترکیبات مغذی (محلول غذایی استریل) که محیط کشت نامیده می‌شود.
۴. بستری مناسب که سلول‌ها بتوانند بر روی آن رشد کنند. البته این بستر می‌تواند با توجه به رده سلولی به سه شکل تهیه شود که عبارتند از:

- ♦ جامد: نظیر فلاسک‌های پلاستیکی
- ♦ نیمه جامد: نظیر ایجاد یک قشر کلاژنی و یا آگار در کف بستر کشت
- ♦ مایع: نظیر محیط سلول‌های خونی و سایر سلول‌هایی که تمایل



دارند به صورت شناور رشد کنند.

لازم به ذکر است که برای رشد سلول‌ها در *In vitro* باید شرایط تا حدود زیادی شبیه *In vivo* باشد، و این فاکتورها نظیر ترکیبات گازی و غذا و غیره نقش بسیار اساسی در رشد سلول ایفا می‌کنند. حرارت لازم و گازهای مورد نیاز در کشت سلول توسط انکوباتور تنظیم می‌گردند. نقش این گازها در تنظیم سیستم بافری نیز توضیح داده خواهد شد.

۱-۳) محیط‌های کشت سلول

محیط کشت مهم‌ترین فاکتور در کشت سلول می‌باشد. غذایی که به صورت یک محلول شیمیایی وارد سلول می‌شود، بایستی بتواند تمامی نیازهای سلول را بر طرف نماید. اغلب محیط‌های کشت به تنهایی نمی‌توانند تمامی شرایط رشد را به طور کامل فراهم نمایند و لازم است که افزودنی‌هایی نظیر سرم و یا سایر مایعات بیولوژیکی به آن‌ها اضافه شود. البته در طی ۳۰ سال گذشته انواع محیط‌های کشت پایه، توسعه یافته‌اند و در حال حاضر به صورت تجاری در دسترس می‌باشند. دقت در انتخاب و شناخت فرمولاسیون محیط، کمک مؤثری در رشد مناسب سلول‌ها خواهد داشت. به طور کلی مواد تشکیل دهنده یک محیط کشت عبارتند از اسیدهای آمینه، انواع ویتامین‌ها و اسیدهای چرب. بعضی از محیط‌های پایه، طوری فرموله شده‌اند که فقط اجزای ضروری برای کشت سلولی را دارا هستند مانند BME و برخی نیز مانند TC199 کلیه اجزای پلازما را دارا هستند و حاوی اجزای متعدد و متنوعی هستند. محیط‌های پایه‌ی مناسب تجاری برای سلول‌های حشرات و



جانوران خونسرد شامل موارد زیر می‌باشند:

Grace, Schneider, Mitsushashi and Maaramorosch, IPL-41,
Chiu and Black, D-22

مثال‌هایی از انواع محیط‌های کشت مرسوم پستانداران و کاربرد آن‌ها در جدول ۳-۱ ارائه گردیده است. جدول شماره‌ی ۲-۳ نیز محتویات و ترکیب پیچیده‌ی یک محیط کشت (BME) را به عنوان مثال نشان می‌دهد.

محیط کشت	موارد استفاده
RPMI 1640 <i>Roswell Park Memorial Institute</i>	لنفوسیت‌ها و هیبریدوماها
EMEM <i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>	برای انواع مختلفی از سلول‌ها
BME <i>Eagle's Basal Medium</i>	سلول‌های موشی و سلول‌های HeLa
GMEM <i>Glasgow's Modification of Eagle's Medium</i>	میزان اسید آمینه و ویتامین‌هایش دو برابر BME است.
DMEM <i>Dulbemo's Modification of Eagle's Medium</i>	دارای ترکیبات پیچیده‌ای است که برای انواع سلول‌ها مانند CHO همراه و یا بدون سرم مناسب می‌کند.
Ham's F-12	فاقد سیستم بافری بی‌کربنات بوده و بنابراین در انکوباتورهای بدون CO ₂ قابل استفاده است.
L15 <i>Leibovitz</i>	دارای فرمولاسیون پیچیده‌ای با ۶۱ ترکیب است و رشد سلول‌ها را بدون سرم مهیا می‌سازد.
M199	بدون سرم برای کشت سلول‌های اولیه و با سرم برای انواع سلول‌ها استفاده می‌شود.

جدول شماره ۳-۱: فهرستی از انواع محیط‌های کشت متداول و موارد استفاده آن‌ها



اجزای شیمیایی	Mg/Lit
اسید آمینه	
L-Arginine HCl	21.00
L-Cystine 2HCl	15.65
L-Glutamine	292.30
L-Histidine HCl H ₂ O	15.00
L-Isoleucine	26.00
L-Leucine	26.00
L-Lysine HCl	36.47
L-Methionine	7.50
L-Phenylalanine	16.50
L-Threonine	24.00
L-Tryptophan	4.00
L-Tyrosine 2Na 2H ₂ O	25.95
L-Valine	23.50
ویتامین	
Biotin	1.00
Choline Chloride	1.00
D-Calcium Pantothenate	1.00
Folic Acid	1.00
myo-Inositol	2.00
Nicotinamide	1.00
Pyridoxine HCl	1.00
Riboflavin	0.10
Thiamine HCl	1.00
نمک‌های غیر آلی	
Calcium Chloride [CaCl ₂]	200.00
Magnesium Sulfate [MgSO ₄]	97.67
Potassium Chloride [KCl]	400.00
Potassium Phosphate Monobasic [KH ₂ PO ₄]	0.00
Sodium Chloride [NaCl]	6800.00
Sodium Phosphate Dibasic [Na ₂ HPO ₄]	0.00
Sodium Phosphate Monobasic [NaH ₂ PO ₄ H ₂ O]	140.00
Monohydrate	
سایر	
Dextrose	1000.00
Phenol Red Sodium Salt	10.00

جدول شماره ۲-۳: فرمولاسیون محیط کشت BME



ترکیبات موجود در محیط‌های پایه^۱ عبارتند از موارد زیر، که هر کدام از این ترکیبات در محیط کشت نقش خاصی را ایفا می‌کنند که به ترتیب توضیح داده خواهد شد.

- | | |
|-------------------|------------------------------|
| ۱. نمک‌های غیرآلی | ۷. هورمون‌ها و فاکتورهای رشد |
| ۲. سیستم بافری | ۸. مواد معدنی |
| ۳. کربوهیدرات‌ها | ۹. آنتی‌بیوتیک‌ها |
| ۴. اسیدهای آمینه | ۱۰. پروتئین‌ها و پپتیدها |
| ۵. ویتامین‌ها | ۱۱. سرم |
۶. اسیدهای چرب و چربی‌ها

۲-۳) نمک‌های غیر آلی^۲ (BSS)

نمک‌های غیر آلی به‌طور عمده عبارتند از سدیم، کلسیم، منیزیم، کلرورها، سولفورها، فسفات‌ها و بی‌کربنات‌ها. به سه دلیل عمده این نمک‌ها به محیط کشت افزوده می‌شوند که عبارتند از:

- ♦ کمک به موازنه اسمزی سلول‌ها و محیط
- ♦ کمک به تنظیم پتانسیل غشا برای مبادله یون‌های سدیم و کلسیم
- ♦ ایفای نقش به عنوان کوفاکتورهای آنزیمی

1. Basal media

2. Balanced Salt Solution



مهم‌ترین یون‌های غیرآلی مورد استفاده در محلول‌های نمکی متعادل عبارتند از: سدیم، پتاسیم، کلسیم، کلر، منیزیم، بی‌کربنات، فسفات و سولفات. محلول‌های نمکی ممکن است برای رشد بهتر حاوی گلوکز نیز باشند. چهار گروه اصلی از نمک‌های غیرآلی عبارتند از:

1. (EBSS) Earls Balanced Salt Solution
2. (DPBS) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
3. (HBSS) Hanks Balanced Salt Solution
4. (ESSS) Eagles Spinner Salt Solution

دو محلول HBSS و DPBS در هوای معمولی و بدون احتیاج به CO_2 متعادل می‌شوند اما EBSS و ESSS برای متعادل شدن و به منظور حفظ pH صحیح نیاز به فاز گازی حاوی حدود ۵٪ CO_2 دارند. البته این نمک‌ها باید به اندازه‌ای وارد کشت شوند که محلول ایزوتونیک ایجاد کنند و نباید موازنه محیط محتویات سلولی را برهم زنند.

۳-۳) سیستم‌های بافری (محلول‌های متعادل نمکی)

محیط‌های کشت به دلیل از دست دادن CO_2 و تولید اسید لاکتیک ناشی از متابولیسم کربوهیدرات‌ها نیاز به بافر دارند. اغلب محیط‌های کشت با استفاده از بی‌کربنات، بافری می‌شوند زیرا سیستم بافری به دلیل وجود بی‌کربنات و CO_2 حل شده در محیط کشت تشکیل می‌شود. رشد سریع سلول‌ها، به اندازه کافی CO_2 تولید می‌کند تا بتواند pH محیط را حفظ کند. ولی وقتی رشد



سلول‌ها آهسته است و یا دانسیته سلول‌ها کم است میزان CO_2 تولید شده برای ایجاد بافر کافی نیست و به همین دلیل محیط کشت در محیط حاوی ۵-۱۰٪ CO_2 قرار می‌گیرد. بیشتر سلول‌ها به pH در دامنه‌ای (۷/۲-۷/۴) نیاز دارند و کنترل دقیق pH برای رشد مطلوب، از مهم‌ترین فاکتورهای کشت سلول محسوب می‌شود. البته تفاوت‌هایی در حد مطلوب pH برای انواع سلول‌ها وجود دارد. به عنوان مثال فیبروبلاست‌ها به $\text{pH} > 7.4$ نیاز دارند در حالی که رده‌های سلولی ترانسفورم شده، پیوسته به شرایط اسیدی نیاز دارند. گزارش‌هایی نیز وجود دارد که می‌توان سلول‌های اپیدرم را در $\text{pH} \sim 5.5$ نیز نگهداری نمود. ولی در هر صورت چنین به نظر می‌رسد که بهترین $7.4 \sim \text{pH}$ باشد، زیرا اغلب سلول‌ها در این pH به خوبی رشد می‌کنند. تنظیم pH هنگامی که یک محیط کشت جدید ساخته می‌شود بسیار مهم می‌باشد. معمولاً سیستم‌های بافری به دو شکل گازی و شیمیایی وجود دارند.

۱- ۳-۳) سیستم بافری گازی

سیستم بافر گازی با استفاده از CO_2 موجود در انکوباتور و یون‌های $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^+$ موجود در محیط کشت موازنه شده، pH مطلوب را ایجاد می‌کند.

۲- ۳-۳) سیستم بافری شیمیایی

این گونه سیستم‌ها با استفاده از یک بافر دوقطبی به نام HEPES^۱ (به مقدار ۵-۲۰ میلی مول) در محیط کشت، pH مورد نظر را تأمین می‌کنند.

1. (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin ethane sulfonic acid



HEPES یک بافر بسیار مؤثر بوده و می‌تواند بدون نیاز به دی‌اکسید کربن شرایط بافری را برای سلول‌ها فراهم نماید، همچنین افزودن پیروات به محیط کشت، سلول‌ها را قادر می‌سازد تا تولید CO_2 داخلی خودشان را افزایش داده و مستقل از CO_2 و HCO_3^- خارجی به بقای خودشان ادامه دهند. با وجود این که افزودن پیروات و استفاده از بافرهای شیمیایی باعث عدم احتیاج به CO_2 می‌گردد، اما ذکر این نکته ضروری است که وجود بی‌کربنات برای سلول‌ها بدون در نظر گرفتن خاصیت بافری، به عنوان یک ماده غذایی مستقل لازم بوده و حذف کامل آن باعث کاهش رشد می‌شود. ضمناً با اینکه استفاده از آن مقرون به صرفه بوده و برای سلول‌ها غیرسمی است اما چون $\text{pKa} \sim 1/6$ می‌باشد در نتیجه ظرفیت بافری آن کم می‌باشد.

کشت‌هایی که از سیستم گازی استفاده می‌کنند نیاز به اتمسفر حدود ۵ تا ۱۰ درصد CO_2 دارند که معمولاً در انکوباتور در اختیار سلول قرار می‌گیرد، اما بافرهای شیمیایی احتیاجی به CO_2 نداشته و در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ mM بسیار سمی بوده و ضمناً گران هستند. این بافرها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، pKa حدود ۳/۷ دارند که سبب می‌گردد در pH حدود ۷/۲-۷/۷ ظرفیت بافری بسیار بالایی داشته و نسبت به تغییرات pH بسیار مقاوم باشند. امروزه در اغلب محیط‌های کشت هر دو نوع بافر مورد استفاده قرار می‌گیرند. جدول ۳-۳، درصد CO_2 و بی‌کربنات مورد نیاز در محیط کشت‌های مختلف، جهت حفظ pH را نشان می‌دهد.

در اکثر محیط‌های کشت تجاری فنل رد به عنوان یک شناساگر pH افزوده شده است که تغییرات pH را به وسیله رنگ مشخص می‌نماید.



متداولترین شناساگر، فنل رد است که معمولاً در pH اپتیمم رشد سلول‌ها، به رنگ قرمز آلبالویی است. فنل رد در $\text{pH} = 7.4$ قرمز، در ۷ نارنجی، در ۶/۵ زرد، در ۷/۶ قرمز آلبالویی و در $\text{pH} \sim 7.8$ ارغوانی است. این شناساگر، شاخص خوبی برای زمان تعویض محیط کشت به‌شمار می‌آید به عنوان مثال در صورت مشاهده رنگ زرد محیط اسیدی است و باید حتماً محیط تعویض شده و از محیط تازه استفاده گردد.

باید توجه داشت که بیشتر فنل ردهای تجاری دارای ناخالصی بوده و اغلب دارای فعالیت استروژنی هستند، بنابراین وقتی اثرات استروئیدها بر رشد سلولی بررسی می‌شود باید از محیط کشت عاری از فنل رد استفاده شود. علاوه بر این فنل رد با بعضی از رنگ‌های فلورسنس تداخل می‌کند.

محیط کشت	NaHCO_3 (mM)	% CO_2
EMEM	4	اتمسفر
Graces	4	اتمسفر
IPL 41	4	اتمسفر
TC100	4	اتمسفر
Schneider's	4	اتمسفر
IMDM	36	5
TC199	26	5
DMEM/Ham's F12	29	5
RPMI 1640	24	5
Ham's F12	14	5
DMEM	44	10

جدول ۳-۳: غلظت پیشنهادی CO_2 و بی کربنات در محیط‌های کشت مختلف جهت تنظیم pH



۴-۳) کربوهیدرات‌ها

کربوهیدرات‌ها منبع اصلی انرژی بوده و گلوکز پر مصرف‌ترین کربوهیدرات در محیط‌های کشت است، با این وجود قندهای دیگر مانند گالاکتوز، مالتوز، فروکتوز، مانوز، سوکروز و همچنین گلوتامین می‌توانند قسمت عمده نیاز سلول‌ها را برآورده نمایند و به محیط کشت اضافه می‌شوند. در برخی رده‌های سلولی تا ۵۰٪ ATP تولید شده، حاصل از اکسیداسیون گلوتامین است. فرآیند تولید انرژی در کشت به دو صورت گلیکولیز و چرخه تری کربوکسیلیک اسید (TCA)^۱ است. محصول عمده گلیکولیز، اسید لاکتیک است، ضمن این که در اغلب کشت‌ها مقدار کمی گلوکز از طریق چرخه TCA اکسیده می‌شود. فروکتوز و گالاکتوز نسبت به گلوکز، اسید لاکتیک کمتری تولید می‌کنند و pH محیط کشت در حضور آن‌ها از پایداری بیشتری برخوردار است.

معمولاً غلظت قندها در یک محیط پایه، ۱ گرم در لیتر بوده ولی این مقدار می‌تواند تا ۴/۵ گرم در لیتر در محیط‌های پیچیده افزایش یابد. محیط‌های حاوی غلظت بالای کربوهیدرات می‌توانند رشد سلول‌ها را تسریع و قسمت عمده‌ی انرژی مورد نیاز سلول‌ها را تأمین نمایند. علاوه بر این، برخی کربوهیدرات‌ها در بیوسنتز مورد استفاده قرار می‌گیرند مانند قند ریبوز که در بیوسنتز اسیدهای نوکلئیک حیاتی است.

1. Three Carboxylic acid



۵-۳) اسیدهای آمینه

اسیدهای آمینه نیز با غلظت $0.2-1.0$ mM و به عنوان پیش ماده‌ی سنتز پروتئین در محیط‌های کشت حضور دارند. طبیعتاً گلوتامین که پیش ماده میانجی‌های چرخه TCA می‌باشد باید با غلظت بیشتر $4-2$ mM وارد محیط شود. هرچند از شکستن گلوتامین، آمونیاک تولید می‌شود که می‌تواند در برخی کشت‌ها مهارکننده رشد باشد. آمونیاک حاصل از گلوتامین به‌وسیله تجزیه گرمایی در محیط یا متابولیسم سلولی تولید می‌شود. در مورد استفاده از گلوتامین باید دقت داشت که نیمه عمر گلوتامین موجود در محیط کشت در دمای 4°C ، حدود سه هفته است.

بیشتر سلول‌های حیوانی نیاز به اسید آمینه‌هایی دارند که بدن آن‌ها را نمی‌سازد^۱. در انسان این اسید آمینه‌ها عبارتند از: آرژنین، سیستئین، هیستیدین، ایزولوسین، لوسین، متیونین، ترئونین، فنیل آلانین، تریپتوفان و والین. گاهی تیروزین نیز به این گروه اضافه می‌شود تا جبران تولید کم آن را بکند.

۶-۳) ویتامین‌ها

ویتامین‌ها در محیط کشت نقش به‌سزایی ایفا می‌کنند. سرم جنین گاو یا FCS^۲ یک منبع غنی از ویتامین در محیط کشت می‌باشد، اما برای بسیاری از رده‌های سلولی لازم است، ویتامین‌ها به‌صورت افزودنی به محیط کشت وارد

1. Essential amino acids

2. FCS: Fetal Calf Serum



شوند، به عنوان مثال ویتامین‌های گروه B برای رشد و تکثیر سلول‌ها ضروری هستند و از طرفی دیگر این ویتامین‌ها به عنوان کوفاکتورها عمل می‌کنند. ویتامین‌هایی که به طور وسیع در محیط‌های کشت اضافه می‌شوند عبارتند از: پارا آمینوبنزوئیک، بیوتین، کولین، اسید فولیک، اسید نیکوتینیک، اسید پانتوتینیک، پیرودوکسال، ریبوفلاوین، تیامین، اینوزیتول. همچنین مقادیر زیادی از ویتامین‌های A و B12 (سیانوکوبالامین) در محیط کشت وجود دارند. وجود این ویتامین‌ها برای رشد و تکثیر سلول‌ها ضروری است. به عنوان مثال ویتامین B12 در محیط کشت F12 وجود دارد. نقش سایر ویتامین‌های محلول در آب و برخی ویتامین‌های محلول در چربی، در کشت سلولی کمتر بررسی شده است و اطلاعات کمتری از آن‌ها در دسترس می‌باشد.

۷-۳ پروتئین‌ها و پپتیدها

منبع اصلی و غنی پروتئین‌ها، سرم جنین گاو یا FCS است که به محیط کشت افزوده می‌شود. آلبومین‌ها و گلوبولین‌ها جزء عمده‌ترین پروتئین‌های مفید محسوب می‌شوند. فتوئین موجود در سرم جنین گاو که موجب چسبندگی سلول‌ها می‌شود و ترانسفرین که باعث پیوند آهن و نیز کاهش سمیت آن می‌گردد از جمله پروتئین‌های لازم در محیط‌های کشت هستند. علاوه بر این موارد، فیبرونکتین نیز موجب افزایش چسبندگی می‌گردد و آلفا-۲ ماکروگلوبولین (بازدارنده ترپسین) نیز یکی دیگر از موارد مهم و ضروری در کشت سلول است. با وجود بررسی‌های دقیق، هنوز هم به‌طور



کامل تأثیرات پروتئین‌ها در بسیاری از رده‌های سلولی نامشخص باقی مانده است و ممکن است پروتئین‌های دیگری نیز برای رشد و یا چسبندگی سلول‌ها ضروری باشند که هنوز نقش آن‌ها کاملاً آشکار نشده است. اگرچه نیاز واقعی به پروتئین‌ها و پپتیدها در محیط‌های کشت اثبات نشده است اما تنها تعداد معدودی محیط کشت بدون پروتئین و پپتید طراحی شده‌اند که رشد و تکثیر سلول را حمایت می‌کنند و فرمولاسیون‌های بدون پروتئین و پپتید موفقیت چندانی در بر نداشته است.

۸-۳) اسیدهای چرب

اسیدهای چرب در محیط کشت‌ها به‌خصوص در محیط‌های فاقد سرم، همانند شبه پروتئین‌ها و پپتیدها نقش بسیار اساسی را ایفا می‌کنند. به عنوان مثال کلسترول و هورمون‌های استروئیدی برای رشد بعضی سلول‌های تخصصی ضروری می‌باشند. از آن‌جا که اغلب استروئیدها به طور طبیعی در سرم موجود هستند با افزودن سرم جنین گاو تقریباً به اندازه مورد نیاز این مواد در اختیار سلول‌ها قرار داده می‌شود.

۹-۳) هورمون‌ها و فاکتورهای رشد

هورمون‌ها و فاکتورهای رشد اثرات مختلفی را بر روی رشد سلول‌ها اعمال می‌کنند، اگرچه اغلب، شناخت نحوه عمل دقیق آن‌ها مشکل است. به عنوان مثال انسولین باعث مصرف گلوکز و اسیدهای آمینه می‌شود، البته امکان دارد که این خاصیت مربوط به اثرات میتوژنیک آن نیز باشد. معمولاً



هورمون‌های رشدی در سرم جنین گاو وجود دارد و در اغلب محیط‌های فاقد سرم، افزودن هورمون‌ها و فاکتورهای رشد با غلظت‌های نسبتاً کم، لازم و ضروری به نظر می‌رسد. انسولین و هیدروکورتیزون دو هورمون اصلی هستند که به محیط‌های کشت سلولی اضافه می‌شوند. از فاکتورهای رشد می‌توان به فاکتور رشد سلول‌های عصبی یا NGF^۱ و فاکتور رشد سلول‌های اپیدرمی یا EGF^۲ اشاره نمود. با وجود این که هورمون‌ها و فاکتورهای رشد می‌توانند بر سرعت تکثیر سلول‌ها بسیار مفید باشند اما در برخی از شرایط خاص (مثل تراکم زیاد سلول‌ها) ممکن است باعث توقف رشد سلول‌ها شوند. از سویی دیگر برخی اینترلوکین‌ها، فاکتورهای تحریک کننده کلنی و فاکتورهای رشد فیبروبلاست نیز برای رشد سلول‌ها استفاده می‌شوند.

از عصاره‌ی صاف‌شده‌ی جنین‌های موشی نیز می‌توان به عنوان منبع رشد برای بعضی از سلول‌ها استفاده نمود.

۱۰-۳) ریز عناصر^۳

این عناصر عبارتند از: روی (Zn)، مس (Cu) و سelenium (Se) که حدواسط چرخه تری کربوکسیلیک اسید می‌باشند. سelenium یک سم زدا بوده و به حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن کمک می‌کند، البته این مواد در سرم به مقدار کم ولی کافی وجود دارند.

-
1. Nerve Growth Factor
 2. Epidermal Growth Factor
 3. Microelements



۱۱-۳) آنتی بیوتیک‌ها

ایده آل آن است که از آنتی بیوتیک‌ها در کشت سلولی استفاده نشود ولی برای حفظ استریلیتی کشت، استفاده از آن‌ها توصیه می‌گردد. معمولاً مخلوطی از پنی سیلین (100 IU/ml)، استرپتومایسین (50 µg/ml) و جنتامایسین (50 µg/ml) استفاده می‌شود. یک ضد قارچ نظیر آمفوترپیسین B با غلظت 25 mg/ml نیز استفاده می‌گردد. یک نوع دیگر از آنتی بیوتیک‌های معمول در محیط کشت، آنتی بیوتیک‌های ضد مایکوپلازما^۱ است که اغلب با نام تجاری پلاسموسین^۲ در بازار وجود دارند. در استفاده از آنتی بیوتیک‌ها برای کشت‌های مجدد یا کشت‌های اصلی باید احتیاط کرد، زیرا ممکن است میزان اندکی از آلودگی‌های قارچی پنهان بمانند و بعدها مشکل ساز شوند. علاوه بر آن استفاده‌ی مداوم از آنتی بیوتیک‌ها ممکن است سبب پیدایش سوش‌های میکروبی مقاوم به آنتی بیوتیک شود.

۱۲-۳) سرم

به نظر می‌رسد تاریخچه استفاده از سرم به منظور تقویت و رشد سلول‌ها به کشت بافت در مایعات بدن حیوانات مانند لثف بر می‌گردد. البته هنگامی که Eagle و همکارانش در اواخر ۱۹۵۰ محیط پایه حاوی اسیدهای آمینه، کربوهیدرات، ویتامین‌ها و نمک‌ها معدنی را تهیه کردند، مشخص شد که

1. Mycoplasma Removal Agent

2. plasmocin



افزودن مایعات بدن برای فراهم کردن زمینه رشد بهتر، کاملاً ضروری است، از این رو ۲۰٪ سرم حیوانی به محیط کشت پایه اضافه نمودند. سرم، مخلوط پیچیده‌ای از انواع فاکتورهای رشد، آلبومین‌ها و ... می‌باشد و به احتمال قوی از مهم‌ترین اجزای محیط کشت سلول به شمار می‌آید. سرم جنین گاو (FCS) و سرم خون گوساله تازه متولد شده (FBS) به مقدار بسیار زیادی در تهیه مواد بیولوژیک استفاده می‌شوند. علاوه بر این سرم‌ها، سرم اسب نیز به صورت رایج در محیط کشت مورد استفاده قرار می‌گیرد. از آن‌جا که کیفیت و غلظت سرم یک فاکتور اساسی در رشد سلول‌ها است، بنابراین بررسی ویژگی‌های بچه‌های هر سرم تولیدی برای میزان توانایی آن سرم در رشد و حمایت سلول‌ها بسیار مهم است. البته آزمایشاتی وجود دارد که می‌تواند در انتخاب نوع بچه تولید شده سرم، کمک مؤثری نماید. از جمله این آزمایشات می‌توان به بازده کلنی، بازده فرش کردن سلول‌ها و نگهداری خصوصیات سلول‌ها و همچنین قدرت بافری سرم اشاره نمود. در حال حاضر از FCS به عنوان سرم استاندارد (به میزان ۱۰٪) استفاده می‌گردد اگرچه این مقدار می‌تواند بسته به نیاز سلول‌ها متفاوت باشد. مزایای استفاده از سرم را می‌توان به شرح زیر خلاصه نمود:

۱. سرم حاوی مخلوطی از اغلب فاکتورهای مورد نظر برای تکثیر و رشد سلول‌ها است.



۲. استفاده از سرم در جهت تسریع در رشد بسیار مؤثر بوده، بنابراین از اتلاف وقت جلوگیری می‌گردد.
۳. با استفاده از سرم، سلول‌ها را می‌توان در برابر عوامل مختل‌کننده رشد نظیر توکسین‌ها، نوسان pH، یون‌های فلزات سنگین، فعالیت پروتئولیتیک یا اندوتوکسین‌ها محافظت نمود.
۴. سرم همچنین قدرت بافری محیط کشت را افزایش می‌دهد. معایب استفاده از سرم عبارتند از:
۱. به دلیل تفاوت در بچ‌های تولیدی، استاندارد کردن روش کار، مشکل بوده لذا امکان تفاوت در کشت وجود دارد و ممکن است تکرارپذیری آزمایشات تحت تأثیر قرار گیرد.
 ۲. به علت استفاده از سرم، امکان ریسک آلودگی در کشت سلولی بالا می‌باشد و برای به حداقل رساندن این ریسک، پیشنهاد می‌شود که سرم از منابع تجاری مشهور تهیه گردد که تست‌های کنترل کیفی را انجام داده و گواهی آن را ضمیمه محصول کرده‌اند.
 ۳. به علت وجود احتمالی ویروس‌ها به خصوص ویروس اسهال گاوی (BVDV) و یا مایکوپلازما و همچنین زنجیره‌های بزرگ پروتئینی، غیرفعال کردن سرم توسط گرما (انکوباسیون در ۶۵ درجه به مدت ۳۰ دقیقه) به کاهش ریسک آلودگی و رشد سریع‌تر سلول‌ها کمک می‌کند.



زیرا در طی حرارت دادن، اکثر ویروس‌ها و کمپلمان‌های پروتئینی غیرفعال می‌شوند.

با شناسایی انسفالوپاتی اسفنجی شکل گاوی (BSE)^۱ در سال ۱۹۸۶ و متعاقب آن انتشار آن به قاره اروپا و نیز هشدار ارتباط بین BSE و نوع جدید بیماری جاکوب - کورتزفیلد^۲ در انسان‌ها، تمام جوامع علمی برآن شدند که در مصرف مواد حاصل از گاو توجه خاص را به عمل آورند. در سال ۱۹۹۳ سازمان FDA^۳ (سازمان غذا و دارو) در مورد مصرف مواد مشتق از گاو در کشورهای آلوده به BSE هشدار داد و توصیه شد که محصولات پزشکی برای مصرف انسانی مانند واکسن‌ها از موادی با منشأ حیوانی تولید نشوند. استفاده از سرم در پروسه تولید فرآورده‌های پزشکی در صورتی قابل قبول است که دارای مستندات خوب و قابل قبولی از نظر سن حیوان، منبع تهیه و آزمایشاتی برای عدم حضور عوامل خطرناک از قبیل ویروس‌ها و ... باشند. در حال حاضر کشورهای آمریکا، کانادا، فنلاند و دانمارک نیازی به این گونه بررسی‌ها ندارند در صورتی که کشورهای استرالیا، مکزیک، آمریکای جنوبی بسته به منشأ جغرافیایی که سرم از آن‌جا جمع‌آوری می‌شود نیاز به ارائه تست‌هایی دارند که بی‌خطر بودن محصول را ثابت کند. به هر حال سرم تهیه شده توسط سازندگان بایستی سریعاً منجمد شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شود که از زمان تهیه حداکثر به مدت ۲ سال قابل مصرف می‌باشد.

1. Bovine Spongial Encephalopathy

2. Creutzfeldt - Jacob Disease

3. Food & Drug Administration



زمانی که نیاز به استفاده از سرم باشد باید سرم را به سرعت از حالت انجماد خارج نمود و در این شرایط با هم زدن سرم می توان از اثرات تخریبی پروتئین ها پیشگیری نمود. با قراردادن ظرف حاوی سرم، در حمام آب گرم با دمای ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه می توان پروتئین های کمپلمان را غیرفعال کرد. باید توجه نمود که اگر برای ذوب کردن از حمام آب گرم استفاده شود به محض ذوب شدن آن را به یخچال منتقل کرد. سرم ذوب شده باید کاملاً شفاف بوده و هیچ اثری از رسوب در آن دیده نشود. هنگامی که سرم از انجماد خارج شد برای ۲ الی ۳ هفته می توان آن را در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری نمود و باید توجه داشت که برای بار دوم منجمد نگردد. بنابراین بهتر است به مقدار مورد نیاز در یخچال نگهداری نمود.

♦ در پایان این مبحث از آن جا که همه محیط ها از اجزاء پایه ساخته می شوند و تهیه محیط زمان بر بوده و معمولاً همراه با آلودگی می باشد، لذا توصیه می شود که از محیط های آماده شده به صورت پودر و یا مایع ۱X و یا ۱۰X استفاده شود.

♦ به طور کلی برای کشت سلول و تهیه مواد کشت نظیر محیط کشت و بافرها باید از آب مقطر با درجه خلوص بسیار بالا و بدون یون های اضافی (دیونیزه) و مواد سمی استفاده نمود که حتی قابلیت تزریق در بدن را داشته باشد. این گونه آب ها به صورت تجاری در دسترس هستند. با داشتن دستگاه های آب مقطرگیری دوبار تقطیر مجهز به سیستم رزینی دیونیزه کننده می توان آب مناسب را تهیه نمود. آب استفاده



شده برای تهیه محیط باید عاری از هر گونه آلاینده‌های معدنی، آلی و میکروبی بوده و همچنین فاقد مواد تب‌زا باشد. بنابراین توصیه می‌شود که ابتدا آب از ستون‌های رزینی عبور داده شود که همه‌ی سختی آب گرفته شده و از طرفی آب را فاقد یون نماید. در ادامه به کمک دستگاه آب مقطرگیری دو بار تقطیر، آب را خالص و بعد pH آن را حدود ۷/۲ تنظیم کرده و در نهایت توسط دستگاه اتوکلاو و یا فیلتر استریل گردد. این آب باید تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شود و دارای مقاومت نهایی $16 \Omega\text{m/cm}$ تا ۱۸ باشد.

۱۳-۳) محیط‌های کشت فاقد سرم

با افزایش بهای سرم به عنوان مکمل محیط کشت، همچنین نامشخص بودن ترکیبات آن و احتمال انتقال آلودگی‌ها، محققین بر آن شدند که محیط‌های فاقد سرم تهیه نمایند، زیرا استفاده از این گونه محیط‌های کشت سلولی، تحت شرایط تعریف شده و تا حد امکان فاقد متغیرهای پیچیده صورت می‌گیرد. اغلب فرمولاسیون‌های موفق محیط‌های پایه، حاوی شرایط ایزواسمتیک، pH، مخلوط متعادل نمکی، اسیدهای آمینه، قندها، ویتامین‌ها و سایر مواد ضروری دیگر می‌باشند. با این وجود سلول‌ها هنوز برای رشد خود نیاز به سرم دارند. در اواسط سال ۱۹۵۰ تخمین زده شد که حدود ۱۰۰۰ فاکتور در سرم وجود دارد که باعث رشد سلول می‌گردد. با ادامه‌ی تحقیقات ثابت گردید که تحت شرایط خاصی، می‌توان محیط سنتتیک را جایگزین محیط‌های دارای سرم نمود. معمولاً محیط‌های بدون سرم حاوی پروتئین‌های طبیعی و نوترکیب



خالص، فاکتورهای رشد، عصاره بافتی و یا عضو هستند. فواید استفاده از محیط‌های فاقد سرم را می‌توان به صورت زیر خلاصه نمود:

♦ سهولت و تکرارپذیری کار با این گونه محیط‌ها به دلیل مشخص بودن فرمولاسیون محیط کشت

♦ حذف فاکتورهای ناشناخته نظیر ویروس‌ها و بازدارنده‌های رشد

♦ آسان تر شدن خالص سازی فرآورده‌های سلولی و امکان ردیابی مدیاتورهای سلول

♦ کنترل پاسخ‌های فیزیولوژیک سلول و افزایش ضریب دقت در بررسی عملکرد سلول

۱۴-۳) میتوزن‌ها^۱

در آزمایشگاه کشت سلولی، برای تحریک تکثیر سلول‌ها به خصوص لنفوسیت‌ها از میتوزن‌ها استفاده می‌گردد. میتوزن‌ها معمولاً انواعی از پروتئین‌ها هستند. میتوزن در واقع ماده شیمیایی است که تحریک کننده آغاز تقسیم سلولی است و میتوزن فرآیند القای (القاکننده) میتوز از طریق یک میتوزن است.

میتوزن‌ها در کشت سلول اغلب به منظور تحریک لنفوسیت‌ها و بررسی عملکرد آن‌ها استفاده می‌شوند. مؤثرترین و متداول‌ترین میتوزن در

1. Mitogen



آزمایشگاه‌های فیزیولوژی، فاکتور رشد شبه انسولین انسانی (IGF1)^۱ است. مهم‌ترین میتوژن‌های مورد استفاده در کشت سلول عبارتند از:

- **فیتوهماگلوتنین (PHA):**^۲ لکتینی است که در گیاهان به‌خصوص در بنشن‌ها^۳ مانند دانه لوبیا، نخود، عدس و ... یافت می‌شود. PHA در واقع از دو پروتئین به شدت مرتبط تشکیل شده است. فیتوهماگلوتنین به‌صورت اختصاصی به کربوهیدرات‌ها متصل شده و یک الیگوساکارید پیچیده مشتمل بر گالاکتوز، N استیل گلوکز آمین و مانوز می‌سازد. PHA در تحقیقات پزشکی استفاده می‌شود و دوز بالای آن سمی است. به‌طور کلی لکتین‌ها از طرق متعددی بر متابولیسم سلولی اثر می‌گذارند مانند القای میتوز و بر غشای سلول‌ها تأثیراتی همانند تغییر رفت و آمد و نفوذپذیری پروتئین‌ها دارند. PHA توانایی آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز بیشتر پستانداران را دارد. در تحقیقات ایمنی‌شناسی به‌عنوان یک میتوژن برای تحریک لنفوسیت‌ها و در تحقیقات علوم اعصاب برای ردیابی مسیرهای اکسونی مورد استفاده قرار می‌گیرد.
- **لیپوپلی ساکارید:**^۴ متداول‌ترین میتوژن آزمایشگاه‌های پزشکی لیپوپلی ساکارید است که از باکتری‌های گرم منفی گرفته شده و به‌طور مستقیم لنفوسیت‌های B را صرف نظر از نوع آنتی‌ژن‌های اختصاصی

-
1. Insulin like Growth Factor 1
 2. Phytohemagglutinin
 3. legumes
 4. Lipopolysaccharide



آن‌ها فعال می‌کند. پلاسماسل‌ها به لحاظ تمایزی در آخرین مرحله هستند و از این رو تقسیم میتوز را نخواهند داشت، اما سلول‌های خاطره‌ای B با تحریک به کمک میتوزن می‌توانند تکثیر شوند و سلول‌های خاطره و پلاسماسل‌ها را تولید کنند.

• **یونومایسین:**^۱ یک یونوفور است که به وسیله باکتری استرپتومایسیس کنگلوباتوس^۲ تولید می‌شود و از آن در تحقیقات برای افزایش سطح کلسیم Ca^{2+} درون سلولی و به عنوان ابزاری برای درک رفت و آمد Ca^{2+} در غشاهای زیستی استفاده می‌شود. همچنین از آن برای تحریک تولیدات درون سلولی مانند سیتوکین‌ها، اینترفرون‌ها، پرفورین، IL-2 و IL-4، معمولاً به صورت کونژوگ با PMA، مورد استفاده قرار می‌گیرد. این سیتوکین‌ها در پاسخ التهابی نقش بسیار مهمی دارند.

• **PMA:**^۳ یک ماده تومورزا است که اغلب در تحقیقات پزشکی، برای فعال کردن سیگنال القاکننده آنزیم پروتئین کیناز C (PKC) مورد استفاده قرار می‌گیرد. تأثیرات PMA بر PKC، نتیجه شباهت آن به یکی از فعال‌کنندگان طبیعی ایزوفرم‌های PKC کلاسیک یعنی دی‌آسیل گلیسرول است. PMA کاربرد ویژه‌ای در تشخیص سرطان دارد و به عنوان یک میتوزن لنفوسیت‌های B به کار می‌رود. برای مشاهده

1. Ionomycin

2. *Streptomyces conglobatus*

3. Phorbol Myristate Acetat



کروموزوم‌ها در یک تست سیتوژنتیک نیاز به سلول‌های تقسیم شونده است. از PMA برای تحریک فرآیند تقسیم سلول‌های B برای تشخیص سلول‌های B سرطانی مانند لوکمی لنفوسیتیک مزمن استفاده می‌شود.

- **کانکاوالین A:** کانکاوالین A که به اختصار Con A نیز نامیده می‌شود یک میتوزن گیاهی است که دارای توانایی تحریک لنفوسیت‌های T و تبدیل به سلول‌های عملکردی است. این محرک اولین لکتینی است که به صورت تجاری به بازار عرضه شد و در تحقیقات زیست شناسی و بیوشیمی به منظور تعیین ویژگی گلیکوپروتئین‌ها و سایر مولکول‌های قنددار سطح سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این میتوزن در بررسی نقش سلول‌های مختلف ایمنی در سیستم ایمنی کاربرد فراوان دارد.
- **CPG:** CPG یک الیگودی اکسی نوکلئوتید سنتتیک است که به یک گیرنده شبه Toll یعنی TLR9 که بر روی لنفوسیت‌های B حضور دارد متصل شده و سبب فعالسازی لنفوسیت‌های B می‌گردد.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

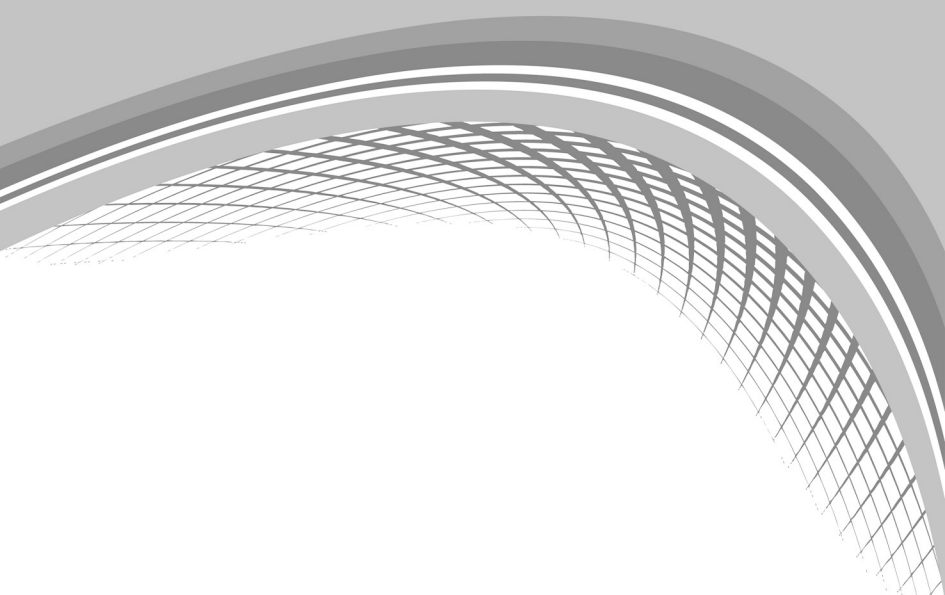
.....

.....

.....

فصل چهارم

انواع کشت سلولی



مقدمه

با توجه به تنوع ساختاری و فیزیولوژیک سلول‌ها، عمر و تعداد تقسیمات آن‌ها با انواع الگوهای رشد مواجه می‌شویم. در این فصل به انواع کشت‌ها و سلول‌ها پرداخته می‌شود.

۴-۱) کشت‌های اولیه

تثبیت و نگهداری سلول‌های رشد داده شده، (در ظروف پلاستیکی یا شیشه‌ای حاوی محیط کشت) که از بافت‌های اصلی مانند کلیه، جگر و با استفاده از روش‌های مکانیکی یا آنزیمی جدا شده‌اند، به نام کشت اولیه‌ی سلولی گفته می‌شود.

به‌طور کلی به دو روش می‌توان سلول اولیه را تهیه نمود. در روش اول،

قطعه‌هایی از بافت مورد نظر را در محیط کشت سلول قرار داده تا این‌که سلول‌های تشکیل‌دهنده‌ی آن نسج، مهاجرت کرده و به تدریج به کف ظرف حاوی محیط کشت سلول بچسبند. در روش دوم، نسج مورد استفاده به‌وسیله هضم آنزیمی و یا مکانیکی متلاشی شده و بدین ترتیب سلول‌های آن نسج، در محیط کشت سلول شناور می‌شوند و یا به کف ظرف چسبیده و به رشد خود ادامه می‌دهند. معمولاً کشت‌های اولیه، مشتق از بافت‌های حیوانی، در ابتدا ناهمگن هستند اما بعد از مدتی فیروبلاست‌ها بر سایر سلول‌ها غلبه کرده و به رشد خود ادامه می‌دهند. تهیه کشت‌های اولیه سخت بوده و به زحمت زیادی نیاز دارد و معمولاً در محیط *In vitro* یا خارج از بدن برای مدت محدودی باقی می‌مانند و در طی این مدت عمر محدود سلول‌های اولیه، بسیاری از خصوصیات تمایز سلولی در *In vivo* را از خود نشان می‌دهند. سلول‌ها با توجه به نحوه‌ی اتصال و شکل سلول‌های اولیه در محیط کشت به دو گروه تقسیم می‌شوند:

۱-۱-۴) سلول‌های معلق / سلول‌های مستقل از بستر^۱

سلول‌هایی هستند که برای رشد، به اتصال به بستر نیاز ندارند و یا در حین رشد، به بستر متصل نمی‌شوند و آزادانه در محیط کشت شناورند. همه‌ی سلول‌های مشتق از سلول‌های خونی از این دسته هستند. این سلول‌ها در حالت عادی در بدن نیز به‌صورت معلق هستند.

1. Suspension Culture/Anchorage Independent Cells

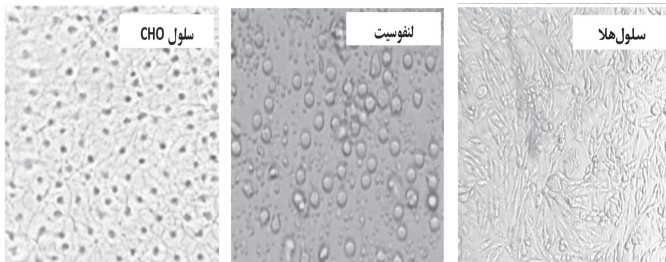


۲-۱-۴) سلول‌های چسبنده یا وابسته به بستر^۱

این سلول‌ها برای رشد، به بستری نیاز دارند. سلول‌های چسبنده معمولاً از بافت‌هایی مانند کلیه به دست می‌آیند که سلول‌هایشان در بافت همبند قرار گرفته‌اند. (جدول ۱-۴)

معمولاً تصویر موجود از سلول‌ها در زیر میکروسکوپ، نمایانگر رده سلولی و بافتی است که سلول‌ها از آن مشتق شده‌اند. رده‌های سلولی مشتق شده از خون (لوکمایا، لمفوما)، تمایل دارند که به صورت آزاد و معلق رشد کنند در حالی که سلول‌های مشتق از بافت‌هایی نظیر ریه و یا کلیه تمایل دارند که به صورت تک‌لایه و چسبیده به کف فلاسک کشت، رشد کنند. رده‌های سلولی چسبیده می‌توانند به انواع اندوتلیال مانند BAEC-1، اپی‌تلیال مانند HeLa، عصبی مانند SH-SY5Y و یا فیبروبلاستی مانند MRC-5 و لنفوتیدی تقسیم‌بندی شوند و از مورفولوژی آن‌ها می‌توان منشأ بافت آن‌ها را مشخص نمود (شکل ۱-۴). نوع فیبروبلاستی به صورت سلول‌های کشیده و چسبیده به کف رشد می‌کنند. نوع اپیتلیالی نیز به صورت چسبیده رشد می‌کند اما شکل سلول‌های آن چند وجهی هستند. سلول‌های لنفوتیدی به صورت کروی و اغلب به صورت سوسپانسیون رشد می‌کنند.

1. Anchorage Dependent /Adherent Cells



شکل ۱-۴: مثال‌هایی از مورفولوژی سلولی. الف) سلول CHO، اپیتلیالی ب) لنفوسیت، لنفوئیدی ج) سلول‌های هلا، اپیتلیالی

بعضی از رده‌های سلولی مانند B95-8 به صورت نیمه چسبان در محیط کشت رشد می‌کنند و در مشاهده‌ی میکروسکوپی به نظر می‌رسد به صورت جمعیت مخلوطی از رده‌های سلول‌های معلق و چسبیده هستند، برای این انواع لازم است که هر دو نوع سلول پاساژ داده شوند. در جدول ۱-۴ انواع سلول‌ها از لحاظ چسبندگی به بستر فهرست شده‌اند.



سلول‌های متصل به بستر		
مرفولوژی	منشاء بافت و گونه	نام رده‌ی سلولی
HeLa	Human cervix	Epithelial
Vero	African green monkey kidney	Epithelial
NIH 3T3	Mouse embryo	Fibroblast
L929	Mouse connective tissue	Fibroblast
CHO	Chinese Hamster Ovary	Fibroblast
BHK-21	Syrian Hamster Kidney	Fibroblast
HEK 293	Human kidney	Epithelial
Hep G2	Human liver	Epithelial
BAE-1	Bovine aorta	Endothelial
SH-SY5Y	Human neuroblastoma	Neuroblast
رده‌های سلولی معلق		
N50	Mouse myeloma	Lymphoblastoid-like
U937	Human Histiocytic Lymphoma	Lymphoblastoid
Namalwa	Human Lymphoma	Lymphoblastoid
HL60	Human Leukemia	Lymphoblastoid-like
WEHI 231	Mouse B-cell Lymphoma	Lymphoblastoid
YAC 1	Mouse Lymphoma	Lymphoblastoid
U 266B1	Human Myeloma	Lymphoblastoid

جدول ۱-۴: مثال‌هایی از رده‌های سلولی مختلف از دو نوع متصل به بستر و معلق، منشاء و مرفولوژی آن‌ها

۲-۴) بستر کشت سلولی

سلول‌های متصل به بستر برای ادامه حیات، تکثیر یا بروز خصوصیات، نیاز به چسبیدن به یک سطح (سوبسترا) دارند. در حالت عمومی، وابسته به چسبندگی به معنی نیاز به چسبندگی برای تکثیر می‌باشد. بیشتر سلول‌های طبیعی نرمال برای تکثیر باید به سطح بچسبند. جایگزین وابسته به چسبندگی، توانایی تکثیر در حالت سوسپانسیون یا در ماتریکس‌های نیمه جامد سه بعدی مثل محیط آگار نیمه جامد است. بسیاری از سلول‌های ترانسفورم شده قادر به تشکیل کلونی در آگار نرم هستند که این توانایی به همراه فقدان «ممانعت دانسیته‌ی سلولی» به عنوان «کنترل رشد تغییر یافته^۱» شناخته می‌شود. وابسته به چسبندگی بودن به معنای نرمال بودن رده سلولی نمی‌باشد زیرا بیشتر سلول‌های ترانسفورم شده بر روی سطوح سخت به خوبی رشد می‌کنند.

۱-۲-۴) ممانعت تماسی^۲

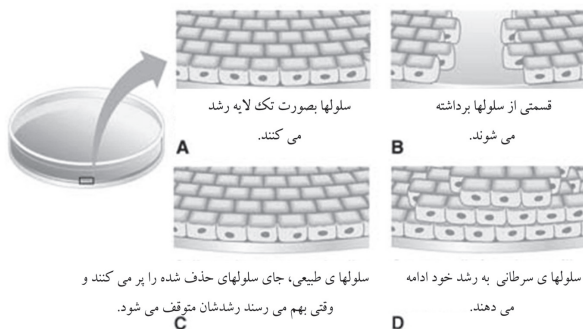
ممانعت تماسی یک پدیده‌ی طبیعی است که وقتی دو سلول در حال رشد با یکدیگر تماس پیدا می‌کنند، رشد آن‌ها متوقف می‌شود. سلول‌های سرطانی، این خاصیت خود را از دست می‌دهند. در کشت سلولی، اکثر رده‌های سلولی این خاصیت را حفظ می‌کنند و در نتیجه‌ی انتقال از یک فلاسک کوچک به فلاسک بزرگ‌تر، سبب فراهم کردن فضای بیشتر برای رشد سلول‌ها می‌شود (شکل ۲-۴).

1. Altered growth control

2. Contact inhibition

۲-۲-۴) ممانعت دانسیته‌ی سلولی

وقتی جمعیت سلول‌ها به دانسیته‌ی خاصی می‌رسند میزان فاکتورهای رشد و مواد غذایی در دسترس برای هر سلول کاهش یافته و در نتیجه تقسیمات و رشد سلول‌ها کاهش می‌یابد.



شکل ۲-۴: ممانعت تماسی. رشد سلول‌های طبیعی پس از برخورد و تماس به یکدیگر متوقف می‌شود اما سلول‌های سرطانی این خاصیت را از دست داده و به رشد خود ادامه می‌دهند.

فاکتورهای چسبندگی، عواملی هستند که چسبندگی سلولی را به سوبستراهای (شیشه و یا پلاستیک) کشت سلولی تسهیل می‌کنند. بسیاری از این عوامل، پخش شدن سلولی و تکثیر سلولی را بهتر می‌کنند و به همین دلایل به صورت روتین، برای افزایش کارایی کشت به کار می‌روند. پلیمرهای بازی مانند پلی‌لیزین از مهمترین فاکتورهای چسبندگی می‌باشند که برای افزایش بار سطح سوبسترا و در نتیجه پیوند شدن سوبسترا به سطح سلول‌ها

و همچنین تعدادی از اجزا خالص شده اجزای خارج سلولی (مثل فیبرونکتین، لامینین و یا کلاژن I و IV) نیز به این منظور استفاده می‌شوند. بسیاری از فاکتورهای چسبندگی و بیوسوبستراها به صورت تجاری در دسترس هستند. ماتریژل^۱ یک سوبسترای پرمصرف است که در واقع نوعی غشا پایه است که توسط نوعی تومور (EHS)^۲ تولید می‌شود. ماتریژل به صورت مایعی استریل است و برای تشکیل یک سوبسترای نازک به کار می‌رود. ماتریژل دارای فاکتورهای رشد نیز می‌باشد.

سلول‌ها بر روی انواعی از سوبستراهای غیرمعمول شامل فیلم‌های کائوچوی سیلیکونی، صفحات استیل زنگ‌زن، تیتانیوم و پالادیوم نیز کشت می‌شوند. تغییر نوع سوبسترا، توانایی انجام کاربردهای اختصاصی را ممکن می‌سازد. برای مثال محققین، از صفحات سیلیکونی قابل کشش به عنوان سوبسترا برای تحت کشش قراردادن میوسیت‌های قلبی و در نتیجه مدل سازی دینامیک فیزیکی قلب در حال تکامل، استفاده کرده‌اند.

انواعی از ماتریکس‌های سه بعدی شامل ژل‌های کلاژن، اسفنج‌های پوشش داده شده با کلاژن هیدراته و فیبرین یا لخته پلاسما^۳، به عنوان سوبسترا برای کشت سلول‌های نرمال و مداوم به کار رفته‌اند. ژل‌های کلاژن متنوع هستند و به طور وسیعی در مطالعه تداخلات سلول - سلول و سلول -

-
1. Matrigel
 2. Engelbreth-Holm-Swarm
 3. Plasma clot



ماتریکس، تحرک سلولی و تهاجمی بودن سلول‌های توموری مورد استفاده قرار گرفته‌اند. سوبستراهای کلاژنی خشک شده، تشکیل شبکه سه بعدی می‌نمایند که در آن محیط کشت اطراف فیبریل‌ها را در برمی‌گیرند. ژل‌های کلاژن معمولاً از کلاژن به‌دست آمده از تاندون دم موش که توسط اسید حل شده است تهیه می‌شوند. مخلوط محیط کشت و کلاژن وارد ظرف شده به طوری که کف ظرف را بپوشاند. (به قطر ۲-۱ میلی‌متر) پس از جامدشدن ژل، بر روی آن محیط کشت ریخته می‌شود. این چنین ژلی بسیار شکننده است و باید با آن به دقت کار کرد تا ژل پاره نشود و یا از سطح ظرف جدا نشود. سلول‌ها را می‌توان بر روی سطح ژل جامد شده، تلقیح کرد و یا آن‌ها را با محیط کشت و کلاژن قبل از انتقال به درون ظرف، مخلوط کرد. سلول‌هایی که بر روی سطح کلاژن رشد می‌کنند می‌توان با جدا کردن قطعه‌هایی از آن و سپس مخلوط کردن آن با محیط کشت مایع پاساژ داد. سلول‌ها از لبه بریده این قطعات کوچک، به خارج مهاجرت می‌کنند و بنابراین پاساژ را می‌توان بدون در معرض قراردادن سلول‌ها در برابر آنزیم‌های پروتئولیتیک انجام داد.

۳-۴) کشت‌های ثانویه

وقتی یک کشت اولیه، کشت مجدد^۱ یا پاساژ^۲ داده می‌شود، کشت ثانویه اطلاق می‌شود. پاساژ، در واقع انتقال سلول‌ها از یک ظرف کشت به ظرف جدید است. برای پاساژ، نیاز به تأمین محیط کشت تازه‌ی حاوی مواد غذایی

1. Sub culture

2. Passage

و فضای بیشتر برای رشد پیوسته‌ی سلول‌ها می‌باشد. پاساژ، شامل شستن سلول است. جداسازی سلول‌های متصل شده، معمولاً با استفاده از آنزیم‌ها انجام می‌شود.

کشت‌های پیوسته یا ثانویه در حقیقت یک نوع سلول منفرد هستند که به‌طور پشت سر هم تکثیر می‌شوند و تعداد تکثیر در آن‌ها محدود به ۳۰-۵۰ پاساژ می‌باشد. معمولاً رده‌های سلولی با عمر محدود دیپلوئید هستند. تا سال‌ها پیش اغلب کشت‌های سلولی به سختی در محیط کشت رشد می‌کردند، اما با تغییراتی که در روش کشت سلول صورت گرفته است به‌عنوان مثال استفاده از محیط‌های استاندارد و شرایط انکوباسیون مناسب، شرایط مشابه *In vivo* فراهم گردیده است. در حال حاضر، امکانات رشد انواع سلول‌های مشتق از حیوانات با عمر محدود و یا نامحدود در شرایط آزمایشگاه فراهم شده است. این سلول‌ها از اجزای مختلف بافت‌های همبند مانند فیبروبلاست‌ها، بافت‌های استخوانی و غضروفی، یا از عضلات صاف، مخطط و یا قلبی و ... تهیه شده‌اند.

البته این واقعیت وجود دارد که این قبیل سلول‌ها بعد از تقریباً ۳۰ پاساژ سلولی پیر شده و دیگر قادر به تکثیر نیستند. اما بعضی از رده‌های سلولی پیر که به‌طور نامشخص بعد از ۳۰ پاساژ هنوز هم قادر به تکثیر هستند، این توانایی را دارند که به سلول‌های توموری تبدیل شوند و در حقیقت اغلب سلول‌های توموری از تومورهای بالینی واقعی مشتق شده‌اند، اما تغییر و تبدیل (ترانسفورماسیون)، با استفاده از انکوژن‌های ویروسی و یا مواد شیمیایی نیز می‌توانند در سلول‌ها باعث ایجاد تومور شوند. باید توجه داشت که سلول‌های ترانسفورم شده این



مزیت را دارند که به طور نامحدود کشت داده می‌شوند اما از معایب مهم آن‌ها، این است که خصوصیات اصلی *In vivo* را به میزان بسیار کم حفظ می‌نمایند.

۴-۴) رده یا دودمان سلولی^۱

یک رده‌ی سلولی عبارت از سلولی است که دارای قابلیت رشد پیوسته‌ی محدود یا نامحدود می‌باشد. بر اساس محدودیت یا نامحدود بودن رشد و تکثیر، سلول‌ها به دو گروه با عمر محدود و نامحدود یا جاودان تقسیم می‌شوند:

۱-۴-۴) رده‌های سلولی با عمر محدود^۲

معمولاً ۲۰-۸۰ بار تقسیم می‌شوند و خصوصیات ممانعت تماسی، محدودیت دانسیته و وابستگی به بستر را نشان می‌دهند. سرعت رشد آهسته بوده و در طی حدود ۲۴-۹۶ ساعت تقسیم می‌شوند.

۲-۴-۴) رده‌های سلولی پیوسته یا جاودان

این نوع سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی تغییر ماهیت داده یا ترانسفورم شده و به رده‌های سلولی پیوسته تبدیل می‌شوند. این رده‌ها معمولاً دارای خصوصیات غیرطبیعی پلئوئیدی (هتروپلئوئیدی یا آنوپلئوئیدی)، فقدان ممانعت تماسی و اتصال به بستر هستند. رشد آن‌ها سریع‌تر بوده و در طی ۱۲-۲۴ ساعت تقسیم می‌شوند.

1. Cell Line

2. Infinite

۳-۴-۴) کشت‌های سلولی تک‌لایه^۱

وقتی ضخامت کشت سلولی به قطر یک سلول است به آن کشت‌های سلولی تک‌لایه گفته می‌شود. اصطلاح کشت تک‌لایه، پخش شدن سلول‌ها را به صورت تک‌لایه بر روی یک سطح (سوبسترا) مثل شیشه یا پلاستیک، توصیف می‌کند. توانایی سلول‌ها در رشد به صورت تک‌لایه لزوماً به معنی طبیعی بودن و یا وابسته به چسبندگی آن‌ها نمی‌باشد. بیشتر رده‌های سلولی نرمال یک کاهش مشخص در فعالیت تکثیر را نشان می‌دهند که در ارتباط با "رسیدن به نقطه‌ی تلاقی سلول‌ها به هم"^۲ یعنی اشغال کلیه‌ی سطوح چسبنده است. در بیشتر موارد، این یک اثر ناشی از دانسیته جمعیتی است و مهار تکثیر وابسته به دانسیته^۳ نام دارد و مربوط به اثر تماس سلول - سلول (یعنی مهار ناشی از تماس) نمی‌باشد.

۴-۴-۴) کشت‌های معلق

اکثر سلول‌ها به صورت تک‌لایه، گسترش یافته و به سطوح شیشه‌ای یا پلاستیکی بستر کشته لنگر انداخته و می‌چسبند ولی تعداد زیادی از سلول‌ها به خصوص سلول‌های سرطانی با منشاء خون و مغز استخوان می‌توانند در محیط کشت، بدون اتصال و به صورت شناور تکثیر یابند. استفاده از کشت‌های معلق، تکنیکی مناسب برای مراکز تولید واکسن‌های ویروسی و نیز مراکز تحقیقاتی می‌باشد. البته برای رشد این گونه سلول‌ها در حجم‌های زیاد، باید از فلاسک‌های

1. Monolayer culture

2. Confluency

3. Density-dependent inhibition of proliferation



چرخان^۱ یا بیوراکتور استفاده شود، که در آن‌ها محیط به‌طور مداوم وارد شده و به‌وسیله میکسر، محیط یکنواخت گردیده و از ایجاد رسوب سلولی، جلوگیری می‌شود. البته تنظیم و کنترل محیط در کشت سوسپانسیون، مشکلات تکنیکی خاصی را به همراه دارد.

مزایای کشت‌های معلق در مقایسه با سلول‌های متصل به بستر عبارتند از:

۱. رشد سلول‌ها سریع است.
 ۲. محیط کشت کمتری جهت جایگزینی و عوض کردن لازم است.
 ۳. فاز تأخیری رشد سلول‌ها کمتر است.
 ۴. برای پاساژ نیاز به تریپسین نیست.
 ۵. سوسپانسیون همگن و یکنواختی از سلول‌ها حاصل می‌شود.
 ۶. نگهداری و تولید آن‌ها، در حجم انبوه آسان‌تر است.
- برای نامگذاری هر رده‌ی سلولی، نکات زیر در نظر گرفته می‌شود:
- الف) کدی برای سلول که نشان‌دهنده‌ی منشاء سلول است مانند NHB
برای Normal Human Brain.
- ب) اگر از یک کشت سلولی چندین رده‌ی سلولی منشاء گرفته باشد به آن شماره‌ای تعلق می‌گیرد. مانند NHB1 و NHB2.
- ج) شماره‌ی از تقسیم‌های سلولی مثلاً NHB2/2 که نشان‌دهنده‌ی این است که سلول دو بار تقسیم شده است.

۵-۴) خصوصیات اصلی کشت سلولی در طی رشد و تکثیر رده‌ی سلولی

خصوصیات رده‌های سلولی به واسطه‌ی کاربوتایپینگ کردن و تعیین منحنی رشد مشخص می‌شوند. با کاربوتایپینگ، منشاء سلول و نیز تغییرات کروموزومی مانند انوپلوئیدی مشخص می‌شود.

۱- ۵-۴) انوپلوئیدی^۱

حالت غیرطبیعی کروموزوم‌ها است. سلول‌های طبیعی در حالت عادی دیپلوئید هستند، یعنی دو مجموعه‌ی مشابه (پلوئید در انسان ۲۳ است) از کروموزوم‌ها در سلول وجود دارد. وقتی سلول‌ها تقسیم می‌شوند اگر کروموزوم‌ها به درستی در دو سلول دختری از هم جدا نشوند انوپلوئیدی اتفاق می‌افتد و دیگر در سلول‌ها، تعداد کروموزوم‌ها برابر نیست.

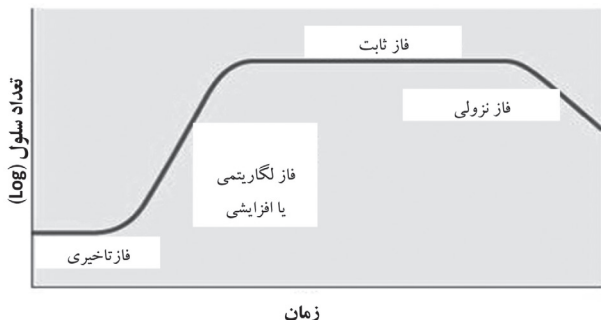
۶-۴) مراحل رشد سلول^۲

۱- ۶-۴) سرعت رشد

منحنی رشد سلول‌های طبیعی در کشت به‌طور تئوریک یک الگوی سیگموئیدی است که منعکس‌کننده انطباق با کشت، مساعدبودن محیط اطراف سلول و در دسترس‌بودن بستر فیزیکی و منبع غذایی کافی و لازم برای حمایت از تولید سلول‌های جدید است (شکل ۳-۴).

1. Aneuploidy

2. Cell Growth Phases



شکل ۳-۴: منحنی رشد سلول. دارای چهار مرحله‌ی تأخیری، لگاریتمی، ثابت و نزولی است. سرعت رشد یک سلول دارای چهار مرحله‌ی اصلی است:

۱-۱-۶-۴) فاز تأخیری^۱

به دنبال وارد کردن سلول‌ها به محیط کشت جدید، سلول‌ها تأخیری را در رشد نشان می‌دهند که در طی این مرحله تقسیمی صورت نمی‌گیرد. طول فاز تأخیری، وابسته به حداقل دو فاکتور است که شامل فاز رشد سلول‌ها یا وضعیت سلول‌ها در هنگام پاساژ و تعداد سلول‌های تلقیح شده می‌باشد. کشت‌هایی که با تعداد کم سلول انجام می‌شوند، فاز تأخیری طولانی‌تری داشته و دیرتر با محیط منطبق می‌شوند. وقتی از سلول‌هایی که به‌طور فعال در حال تقسیم هستند پاساژ تهیه می‌شود فاز تأخیری کوتاه‌تری مشاهده می‌شود. مرحله‌ی تأخیری، در واقع زمانی است که سلول با محیط سازگاری پیدا کرده و به سطح بستر چسبیده و گسترده می‌شود. در پایان این مرحله، سلول آماده‌ی تقسیم می‌شود.

۲-۱-۶-۴) فاز رشد لگاریتمی^۱

این فاز، یک دوره تکثیر فعال است که در طی آن تعداد سلول‌ها به صورت لگاریتمی افزایش می‌یابد. در فاز لگاریتمی ممکن است درصد سلول‌های در حال تقسیم ۹۰ تا ۱۰۰٪ باشد. به عنوان یک قانون کلی در طی فاز لگاریتمی، سلول‌ها عموماً در بهترین وضعیتشان در نظر گرفته می‌شوند و بنابراین طبیعی است که هنگام مطالعه در مورد عملکرد سلول، از سلول‌های فاز لگاریتمی استفاده می‌شود. کینتیک تکثیر سلول در طی فاز لگاریتمی، جزو خصوصیات رده‌های سلولی است و در این فاز، زمان دو برابر شدن تعیین می‌شود. فاکتورهای که طول فاز لگاریتمی را تحت تأثیر قرار می‌دهند، شامل تراکم سلول‌های تلقیح شده، میزان رشد سلول و دانسیته اشباع رده سلول می‌باشد.

۳-۱-۶-۴) فاز ثابت^۲

هنگامی که جمعیت سلول‌ها زیاد شد یا در مورد سلول‌های چسبیده به بستر، فضا کاملاً پر گردید، میزان تکثیر سلول‌ها کند شده و کاهش می‌یابد. این مرحله فاز ثابت یا پلاتو نامیده می‌شود. در فاز پلاتو تقسیم سلول با مرگ سلول متعادل می‌شود و درصد سلول‌هایی که در چرخه تقسیم سلولی قرار دارند ممکن است به ۰ تا ۱۰٪ برسد. برای برخی از رده‌های سلولی اگر محیط تجدید شود امکان طولانی‌تر شدن فاز ثابت وجود دارد. این فاز، دوره پایداری برای اغلب رده‌های سلولی نیست و اغلب سلول‌ها در این فاز آسیب‌پذیرترند. سلول‌هایی

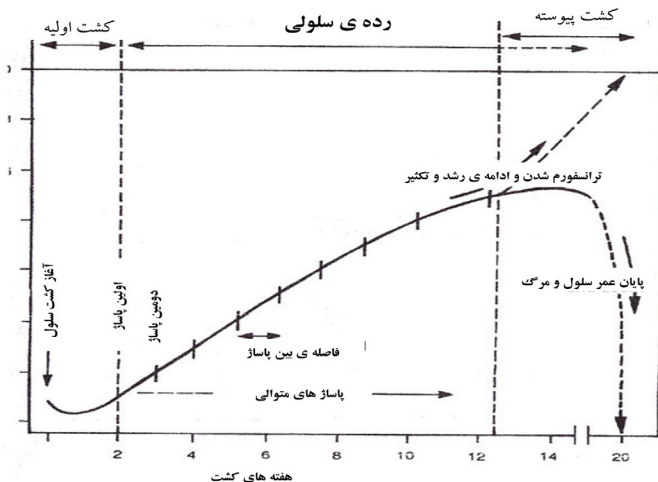
1. Logarithmic Growth Phase

2. Plateau Phase or Stationary Phase

که در حالت سوسپانسیون رشد می‌کنند، نیز به فاز ثابت می‌رسند که تا حدودی به فراهم‌بودن غذا وابستگی دارد.

۴-۱-۶) مرحله کاهش رشد^۱

فاز ثابت به دوره‌ای از رکود در تعداد سلول‌ها ختم می‌شود که مربوط به عدم تعادل در رشد و مرگ سلول‌ها است. این مرحله به منبع تغذیه سلول‌ها مربوط نمی‌شود. شکل ۴-۴ مراحل رشد سلول در طی پاساژهای متوالی را نشان می‌دهد.



شکل ۴-۴: روند رشد یک سلول در محیط کشت و پاساژهای متوالی و تبدیل به یک رده‌ی سلولی با عمر محدود یا نامحدود

1. Decline Phase

۷-۴) اصطلاحات خاص برای رده‌های سلولی

۱-۷-۴) نسبت تقسیم^۱

رقتی از کشت سلولی اولیه که برای پاساژ استفاده می‌شود.

۲-۷-۴) شماره‌ی پاساژ Pn^۲

شماره‌ی دفعاتی که کشت، پاساژ داده می‌شود.

۳-۷-۴) شماره‌ی نسل Gn^۳

شماره‌ی دوتایی‌شدن سلول‌ها است.

۸-۴) انطباق با کشت^۴

سلول‌ها در طی تثبیت یک کشت اولیه و یا در پاساژ، ممکن است دچار استرس قابل توجهی شوند. برای مثال می‌توان از تجزیه آنزیمی قطعات بافتی و شکستن سلول وابسته به بستر و برهم‌کنش‌های سلول با سلول و بستر با سلول نام برد. سلول‌های جدا شده معمولاً شکلشان تغییر یافته و کروی می‌شوند، قطبیت فنوتیپی خود را از دست داده و تغییراتی را در توزیع پروتئین‌های غشاء پلاسمایی نشان می‌دهند. همه سلول‌ها، دستکاری‌های کشت را تحمل نمی‌کنند و آن‌هایی هم که تحمل می‌کنند ممکن است دچار

-
1. Split ratio
 2. Passage number
 3. Generation number
 4. Adjustment



آسیب‌های فیزیکی یا تغییر در سطح سلول شوند. یک سلول برای زنده ماندن و از سرگیری رشد، بیان، عملکرد و تمایز باید قادر به ترمیم آسیب‌های وارد شده باشد و بتواند خود را با تغییرات محیطش منطبق سازد. انطباق با کشت، زمان‌بر بوده و تحت تأثیر شرایط کشت قرار می‌گیرد. ثابت شده که سلول‌ها محیط خود را به وسیله ترشح موادی ناشناخته برای رشد و اتصال به بستر مساعد می‌کنند. اگر محیط به وسیله تماس با سلول‌هایی که به‌طور فعال رشد می‌کنند مساعد شود بعضی از رده‌های سلولی ممکن است سریع‌تر منطبق شده و سریع‌تر و بهتر رشد و تمایز یابند.

در صورت استفاده از محیط‌های مساعد شده باید محیط به وسیله فیلتر استریل شده و یا سلول‌های شناور آن جدا شده و سپس به‌صورت منجمد نگهداری شود. روش دیگر مساعد ساختن محیط کشت، کاشت یا تلقیح سلول‌ها در ظرف‌هایی است که حاوی سلول‌های زنده‌ای می‌باشند که قدرت تکثیر ندارند. این سلول‌ها که لایه مغذی^۱ نامیده می‌شوند معمولاً از فیبروبلاست‌های جنینی نظیر رده 3T3 است که تحت اشعه گاما و یا تحت تأثیر میتومايسين C قرار گرفته‌اند. باید در نظر داشت که بعضی از رده‌های سلولی به‌دنبال اتصال به بستر، برای تثبیت عملکرد تمایزی خود، به زمان احتیاج دارند.

۹-۴) سیستم‌های کشت سلولی در مقیاس بالا

بیشتر کشت‌های سلولی در مقیاس کوچک انجام می‌شود و معمولاً تعداد کمی از سلول‌ها برای آزمایش‌ها کافی هستند. در مقیاس کم (پایین) معمولاً سلول‌ها را در فلاسک T شکل با وسعت ۲۵ سانتی‌متر مکعب تا ۱۷۵ سانتی‌متر مکعب رشد می‌دهند. بازده سلولی در فلاسک‌های T شکل با حجم ۱۷۵ سانتی‌متر مکعب برای سلول‌های چسبنده حدود 10^7 و برای سلول‌های معلق 10^8 می‌باشد. گرچه بازده دقیق معمولاً به رده سلولی بستگی دارد اما تولید در مقادیر بالای سلولی با استفاده از فلاسک‌های T استاندارد عملی نیست. زیرا مواردی همچون تعداد دفعات پاساژ سلولی، فضای انکوباتور و هزینه، چند عامل محدودکننده کار کشت سلولی تلقی می‌گردند. برای کار کشت سلولی در مقیاس بالا باید پارامترهای متعددی را در نظر گرفت تا بتوان مقیاس رشد سلولی را به حد مطلوب رسانده و بهترین نتیجه حاصل گردد. برخی عوامل کاهش رشد در مقیاس بالا عبارتند از:

۱. کاهش مواد غذایی
۲. نبود تبادل گازی مطلوب به خصوص کاهش شدید اکسیژن
۳. ساخته‌شدن مواد سمی در محیط کشت مانند آمونیاک و اسید لاکتیک

۱۰-۴) کشت با استفاده از بطری‌های غلطان

استفاده از بطری‌های غلطان روشی است که معمولاً برای بالا بردن میزان سلول‌های چسبنده و یا سلول‌های وابسته به سطح در مقیاس تجاری استفاده می‌شود. بطری‌های غلطان به شکل استوانه هستند که به آهستگی در هر ساعت ۵ تا ۶۰ دور می‌چرخند و سلول‌ها در این زمان فرصت آن را دارند که به سطح داخلی بطری متصل گردند (شکل ۵-۴).



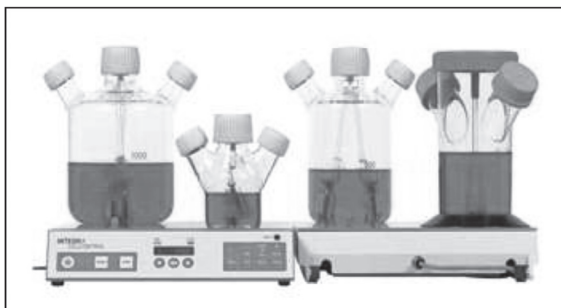
شکل ۵-۴: بطری‌های غلطان

از معایب این بطری‌ها اندازه آن‌ها است که با توجه به فضای محدود کابینت‌های ایمن (هودها) باعث ایجاد مشکل می‌گردد. یک اشکال دیگر در مورد استفاده از این بطری‌ها، عدم اتصال بعضی از رده‌های سلولی به سطح داخلی آن‌ها می‌باشد؛ مانند سلول‌های اپیتلیال. البته این مشکل را می‌توان با بهینه‌کردن سرعت چرخش (کاهش سرعت) مرتفع کرد. در حال حاضر

بطری‌های جدیدی با سطح داخلی افزایش یافته نیز وجود دارند که با این افزایش سطح می‌توان بازده کشت سلولی را افزایش داد.

۱۱-۴) فلاسک‌های کشت چرخان

فلاسک‌های چرخان برای رده‌های سلولی معلق و به‌خصوص هیبریدوما و نیز رده‌های چسبنده مورد استفاده قرار می‌گیرند، که به رشد معلق عادت داده شده‌اند مانند: (HeLa.SB) و یا (HeLa.S3). این گونه فلاسک‌ها هم به‌صورت بطری‌های پلاستیکی و هم شیشه‌ای می‌باشند که دارای یک استوانه مغناطیسی چرخنده و دو بازو برای اضافه کردن، حذف سلول‌ها و محیط، عبور گاز و هوای غنی شده با CO_2 می‌باشند (شکل ۶-۴). فلاسک‌های پر شده روی یک همزن مغناطیسی و در شرایط مناسب کشت برای سلول قرار داده می‌شوند. کشت‌ها باید با سرعتی حدود ۱۰۰ تا ۲۵۰ دور در دقیقه هم زده شوند. این سیستم برای کشت‌هایی با حجم ۱ تا ۱۲۰۰۰ لیتر طراحی شده است.



شکل ۶-۴: بطری‌های چرخان



مرحله بعدی افزایش مقیاس برای کشت سلول‌های معلق و چسبنده، استفاده از بیوراکتورها می‌باشد که برای حجم‌های بالا در حد ۱۰۰ تا ۱۰۰۰۰ لیتر استفاده می‌شود. برای رده‌های سلولی معلق، سلول‌ها در محلولی نگهداری می‌شوند و در قاعده این تانک بیوراکتور، پروانه‌ای وجود دارد که با چرخش و ایجاد حباب‌های هوا در درون بیوراکتور، سلول‌ها به‌صورت معلق رشد داده می‌شوند. با وجود چرخش و همچنین ایجاد حباب‌های هوا در بیوراکتور دو مشکل اساسی در مورد رشد سلول‌ها وجود دارد:

۱. استرس مکانیکی به سلول‌ها

۲. پایین بودن دانسیته حاصل (حدود 2×10^6 سلول در هر میلی‌لیتر)

البته برای رده‌های سلولی چسبنده می‌توان با اضافه‌نمودن گلوله‌های پلاستیکی کوچک^۱ دانسیته سلولی را افزایش داد.

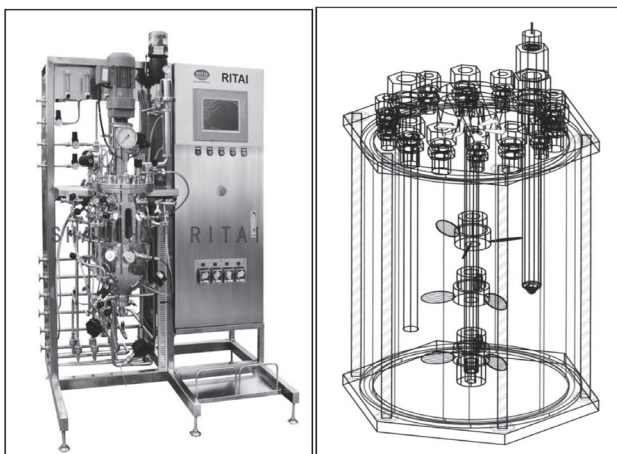
این گلوله‌های کوچک حدود ۳۰ تا ۱۰۰ میلی‌متر قطر دارند و از جنس دکستران، سلولز، شیشه و یا سیلیکا هستند و به‌طور قابل توجهی سطح اتصال سلولی را افزایش می‌دهند. با استفاده از این روش می‌توان انواع مختلفی از سلول‌ها را رشد داد.

پیشرفت‌های اخیر در توسعه و تهیه حامل‌های کوچک متخلخل می‌باشد که سطح اتصال سلولی را تا حدود ۱۰ تا ۱۰۰ برابر افزایش می‌دهد. سطح روی ۲ گرم از این حامل‌ها معادل ۱۵ بطری غلطان می‌باشد. از این روش به‌خصوص

1. Bead



در کارخانه‌های تولید فرآورده‌های بیولوژیک به واسطه‌ی کشت سلولی و بیوراکتورها استفاده می‌شود (شکل ۷-۴).



شکل ۷-۴: بیوراکتور برای حجم زیاد کشت سلول. سمت راست نمای داخلی و سمت چپ نمای واقعی یکی از این بیوراکتورها را نشان می‌دهد.

۱۲-۴) کشت انبوه سلولی در مقیاس تجاری

کشت انبوه سلولی، به‌خصوص سلول‌های حیوانی^۱ یکی از مهم‌ترین دامنه‌های تحقیقاتی امروز محسوب می‌شود. سلول‌ها برای بقا نیازمند تبادل با محیط خود می‌باشند. در حضور محیط کشت، سلول‌های تک‌لایه‌ای می‌توانند تا حدودی تبادلات لازم خود را حفظ کنند. ولی با بالا رفتن تعداد

1. Mass culture of animal cell lines

سلول‌ها و افزایش تعداد لایه‌ها این عمل بیش از پیش مشکل می‌شود. برای کشت انبوه، معمولاً از سیستم‌های دینامیک استفاده می‌شود. برای نشان دادن اهمیت سیستم‌های دینامیک کافی است که به حل شدن قند در یک لیوان آب، دقت کرد. اگر لیوان آب کاملاً ساکن باشد، سال‌ها لازم است که قند در آب کاملاً حل شده و غلظت آن در تمام لیوان یکنواخت شود. در حالی که با هم‌زدن آب، این مدت را می‌توان به کمتر از یک دقیقه کاهش داد. در بدن، سیستم خون‌رسانی از طریق مویرگ‌ها، تبادلات سلولی را به راحتی امکان‌پذیر ساخته است.

هدف یک سیستم کشت دینامیک، نزدیک شدن هرچه بیشتر به شرایط داخل بدن (In vivo) می‌باشد. برای این کار باید پدیده‌ی "مانع انتشار"^۱ را تا حد ممکن کاهش داد. مشکل بزرگ کشت انبوه، ضعیف بودن جداری سلول‌های حیوانی است. با توجه به این مسئله باید موانع انتشار را با در نظر گرفتن نیروهای برشی^۲ تا حد ممکن کاهش داد. سیستم‌های متعددی تا به حال به بازار آمده که به‌طور کلی بر مبنای هم‌زدن یا حرکت چرخشی محیط کشت با سلول‌ها عمل می‌کنند. این مدل‌ها اکثراً پیچیده و عملکرد محدودی دارند. برای گسترش دادن دامنه‌ی استفاده از آن‌ها تلاش زیادی به عمل آمده است. سعی می‌شود که استفاده از این سیستم‌ها تا حد ممکن آسان شود. با ابداع چند مدل جدید، امکان دسترسی خیلی آسان به تمام فضای کشت سلولی و در نتیجه به تمامی بافت تولید

1. Diffusion Barriers

2. Shearing force

شده، امکان پذیر شده است. با وارد شدن این سیستم‌ها به بازار انتظار می‌رود که پیشرفت‌های مهمی در این زمینه حاصل شود.

۱۳-۴) کشت بافت^۱

در ده سال گذشته، با پیشرفت‌هایی که در مهندسی بافت^۲ حاصل شده است مقدمات بازسازی و ترمیم بافت‌های انسانی مهیا شده و پیشرفت‌های بزرگی در این زمینه پیش‌بینی می‌شود.

استفاده از تکنولوژی پلیمرها، در کشت بافت، امکان ساختن بافت‌های مورد نیاز با اندازه‌های مختلف در خارج یا داخل بدن را به‌وجود آورده است. امروزه برای تولید پروتزهای صنعتی، تحقیقات فراوانی در سراسر دنیا در حال انجام است و مهندسی بافت روز به روز از اهمیت بیشتری برخوردار می‌شود. برای نمونه می‌توان از بافت‌های غضروف‌های مفصلی که قدرت خود ترمیمی ضعیفی دارند، نام برد. دردهای مفصلی یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها از سن ۵۰ سال به بالا می‌باشد. استفاده از تکنولوژی ترمیم بافت می‌تواند در آینده نقش بسیار مهمی در ترمیم و بازسازی این بافت‌ها ایفا نماید.

۱۴-۴) سلول بنیادی

سلول‌های بنیادی توانایی تبدیل و تمایز به انواع مختلف سلول‌های دیگر را دارند. منابع اصلی آن‌ها مغز استخوان، بندناف و جفت می‌باشند. از این

-
1. Tissue culture
 2. Tissue engineering



سلول‌ها می‌توان در تولید بافت‌های مختلف استفاده کرد. استفاده از سلول‌های بنیادی، برای کاربردهای درمانی، به تولید انبوه سلولی در بیوراکتور و در شرایط کاملاً کنترل شده نیاز دارد. سلول‌های بنیادی می‌توانند با توجه به شرایط کشت، هم نوع‌سازی کرده یا به سلول‌های دیگری متمایز گردند. به این جهت، تولید انبوه این سلول‌ها نیاز به کنترل کامل شرایط کشت، مانند شرایط فیزیکی (فشار و حرارت)، شرایط ملکولی و نوع بستر دارد.

۱۵-۴) تکنولوژی کشت دینامیک

تکنولوژی کشت دینامیک سلول‌های حیوانی، از اصول فرماتورهای باکتریولوژی مشتق شده است. اولین بیوراکتورها، از دهه‌ی ۱۹۶۰ مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این سیستم‌ها در واقع فرماتورهای باکتریولوژی تبدیل شده به بیوراکتور بودند که حجم خیلی بزرگ، دانسیته‌ی کم، عملکرد پیچیده و هزینه‌ی بسیاری داشتند. این سیستم‌ها، امروزه بعد از تغییرات متعدد، بازده خیلی بالاتری داشته و می‌توانند در حجم کم، مقدار زیادی سلول تولید کنند. به‌طور کلی این بیوراکتورها بر اساس یکی از تکنولوژی‌های زیر توسعه یافته‌اند:

۱. همزن پره‌ای، مانند فلاسک‌های چرخان

۲. چرخاندن مستقیم مخزن کشت مانند بطری‌های غلتان

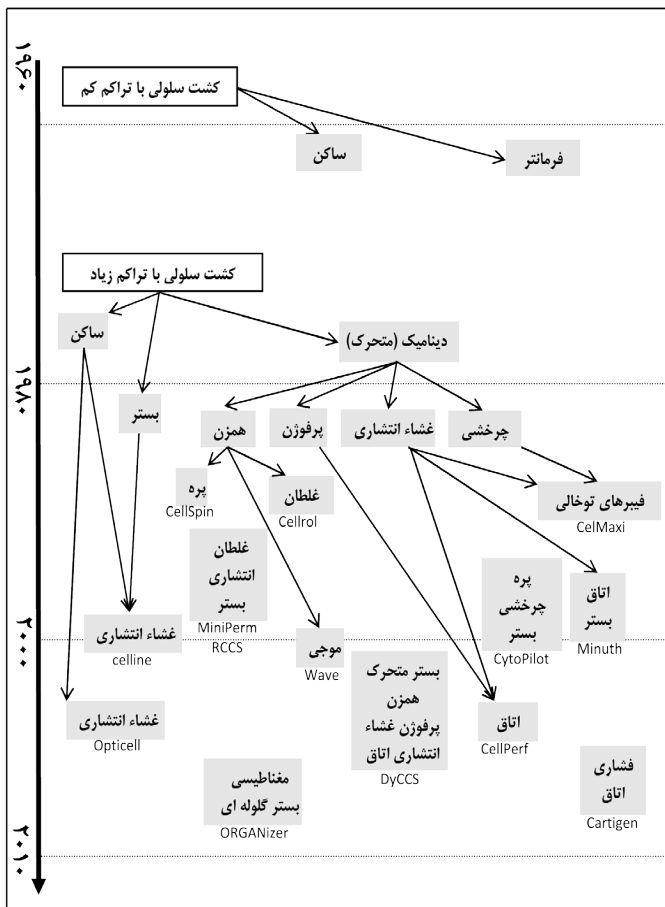
۳. فیبرهای توخالی یا هالوفایبر

شکل ۸-۴ تحولات پیشرفت‌های کشت سلولی را نشان می‌دهد.

۱۶-۴) فیبرهای توخالی (هالوفایبرها)^۱

هالوفایبرها از تعداد زیادی فیبرهای توخالی تشکیل شده‌اند که در یک محفظه قرار گرفته‌اند (شکل ۹-۴). معمولاً سلول‌ها را در فضای خارجی فیبرها قرار می‌دهند و با به جریان انداختن محیط کشت در فضای داخلی فیبرها، نیاز رشد و فعالیت سلول‌ها تأمین می‌شود (شکل‌های ۱۰-۴ و ۱۱-۴). با انتخاب نوع جداری فیبرها می‌شود بعضی از ترشحات سلولی مانند آنتی‌بادی را در قشر خارجی فیبرها نگه داشت و در نتیجه غلظت این محصولات را در حد قابل ملاحظه‌ای بالا برد. این تکنولوژی برای تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال در سطح وسیعی مورد استفاده قرار گرفته است. پاره‌ای از امتیازات این سیستم در زیر بیان شده است:

۱. ضایعات ترشحاتی به وسیله‌ی دیالیز، با راندمان بالایی تخلیه می‌شود.
۲. در اثر چگالی بالای سلولی، نیاز محیط کشت به سرم، در حد قابل توجهی کاهش می‌یابد.
۳. pH محیط رشد در حد فیزیولوژیکی ثابت است.



شکل ۸-۴: تاریخچه کشت انبوه سلولی و سیستم‌های موجود

۴. سطح وسیعی برای متصل شدن سلول‌ها و انتقال گازها و ملکول‌ها وجود دارد.

۵. امکان تولید پروتئین‌ها به خصوص آنتی‌بادی‌های مونوکلونال با غلظت خیلی زیاد وجود دارد.

۶. ۱۰^{۱۰}-۱۰^۵ سلول قابل کشت است.

۷. سلول‌ها در این سیستم خیلی پایدار بوده و می‌توان تا ۶ ماه کشت را ادامه داد.

با وجود این مزایا، در اثر بسته‌بودن این سیستم، دسترسی به بافت تولیدی در فضای خارجی فیبرها مشکل است و به همین دلیل برای کشت بافت، کاربرد کمتری دارد.

۱۷-۴) لومیزن^۱ یا بیوراکتور تولید عروق

این سیستم همان‌طور که از اسمش پیدا است، به‌خصوص برای تولید رگ‌ها و وریدها استفاده می‌شود (شکل ۱۲-۴). در این مدل با ایجاد فشار بر جداره‌ی سلول‌ها، می‌توان مدل بافت وریدی را تولید کرد (شکل ۱۳-۴).



۱۸-۴) کارتیژن^۱ یا بیوراکتور تولید غضروف

از این سیستم می‌توان با ایجاد فشار بر روی سلول‌ها، برای تولید سلول‌های غضروفی و سلول‌های مفصلی که معمولاً برای تمایز احتیاج به فشار زیاد دارند، استفاده کرد (شکل‌های ۱۴-۴ و ۱۵-۴ و ۱۶-۴).

۱۹-۴) سل لاین^۲

سیستم سل لاین، از یک بستر سه بعدی استفاده می‌کند که دارای دو قسمت مجزای کشت می‌باشند (شکل ۱۷-۴). به این ترتیب می‌توان سلول‌ها را در یک طرف قرار داده و محیط کشت را از طرف دیگر، وارد و خارج کرد. در عین حال در بخشی از جداری این بیوراکتور، از موادی استفاده شده است که اجازه عبور اکسیژن را می‌دهد (شکل ۱۸-۴) و در نتیجه نیاز اکسیژن سلول‌ها، در مقیاس بالایی تأمین می‌شود.

۲۰-۴) مینی پرم^۳

این سیستم از تکنولوژی بطری‌های غلتان که در صفحه‌های قبل توضیح داده شده است، استفاده می‌کند. فضای داخلی با استفاده از یک فیلتر به دو قسمت نامساوی تقسیم شده است (شکل ۱۹-۴). قسمت بزرگ، با محیط کشت پر می‌شود و در قسمت دوم علاوه بر محیط کشت، سلول‌ها

1. CartiGen, Cartilage Bioreactor

2. CELLline

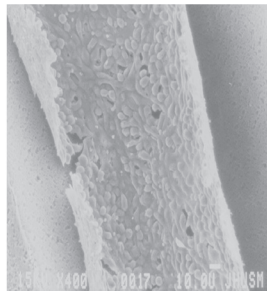
3. MiniPERM bioreactor

تزریق می‌شوند. این فضا که فضای کشت نامیده می‌شود از طرف انتهایی، تبادل اکسیژن و از طرف فیلتر، مواد لازم برای رشد و تولید فرآورده‌های سلولی را تأمین می‌کند.

از این سیستم برای تولید پروتئین‌ها و به خصوص آنتی‌بادی‌های مونوکلونال استفاده می‌شود.

۲۱-۴) بیولیواتور^۱

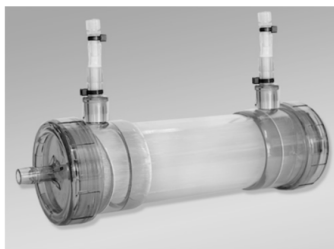
در این سیستم از میدان مغناطیسی برای به حرکت درآوردن سلول‌ها در محیط کشت استفاده می‌شود (شکل ۲۰-۴). سطح گلوله‌های فلزی با مواد مناسبی به عنوان بستر برای اتصال سلول‌ها پوشانده می‌شود و با ایجاد میدان مغناطیسی، گلوله‌ها در محیط کشت حرکت کرده و به این ترتیب تبادلات بین سلول‌های متصل به بستر، با محیط کشت به مقدار قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد.



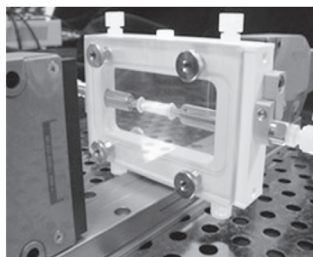
شکل ۹-۴: یک فیبر توخالی و سلول‌های سطحی، بزرگنمایی ۴۰۰



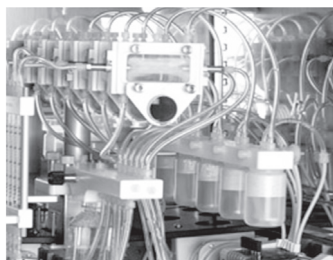
شکل ۱۰-۴: رآکتور هالوفایبر با پمپ و تانک محیط کشت. این مجموعه در داخل یک انکوباتور قرار می گیرد.



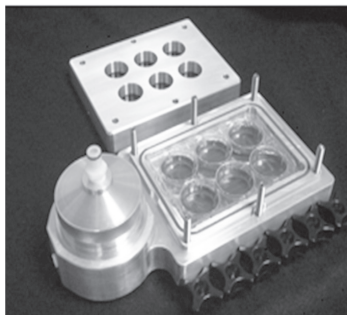
شکل ۱۱-۴: هالوفایبر با لوله ورودی و خروجی به فضای داخلی و خارجی فیبرها



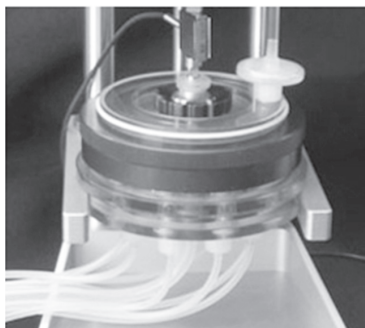
شکل ۱۲-۴: یک اتاق لومیشن که بافت وریدی در وسط آن دیده می‌شود.



شکل ۱۳-۴: یک واحد لومیشن با تعداد زیادی اتاق کشت که هر کدام به‌طور انفرادی تغذیه می‌شوند.



شکل ۱۴-۴: اطاق کشت ۶ تایی که از یک مخزن محیط کشت استفاده می‌کند.



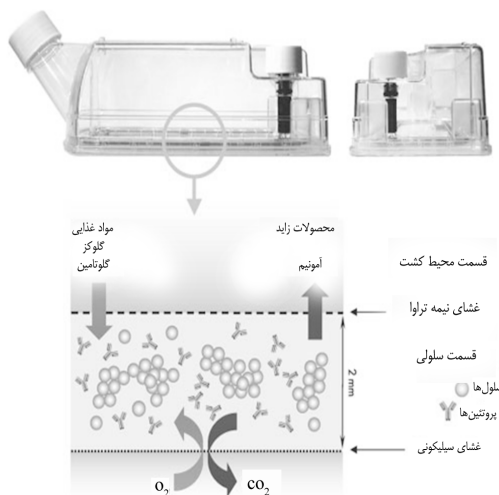
شکل ۱۵-۴: اطاق‌های کشت انفرادی با تغذیه جداگانه برای هر اطاق



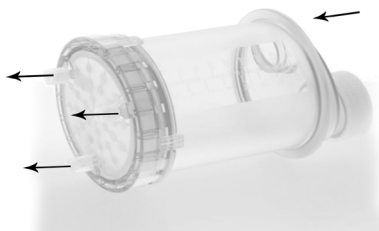
شکل ۱۶-۴: اطاق ۱۲ تایی کارتیژن



شکل ۱۷-۴: یک واحد سل لاین که در آن دو ورودی دیده می شود. ورودی بزرگتر برای وارد و خارج کردن محیط کشت و ورودی کوچکتر برای وارد و خارج کردن سلول ها استفاده می شود.



شکل ۱۸-۴: فضای سلولی از طرف بالا با محیط کشت و از طرف پایین مستقیماً با هوا در تبادل می‌باشد به این ترتیب اکسیژن لازم به سلول‌ها می‌رسد.



شکل ۱۹-۴: یک واحد مینی‌پرم، از ورودی راست محیط کشت وارد می‌شود و سه ورودی طرف چپ برای ارتباط با فضای سلول است.

مخازن کشت
سلولی



شکل ۲۰-۴: یک واحد کامل بیولوژیاتور با چهار مخزن کشت مستقل

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

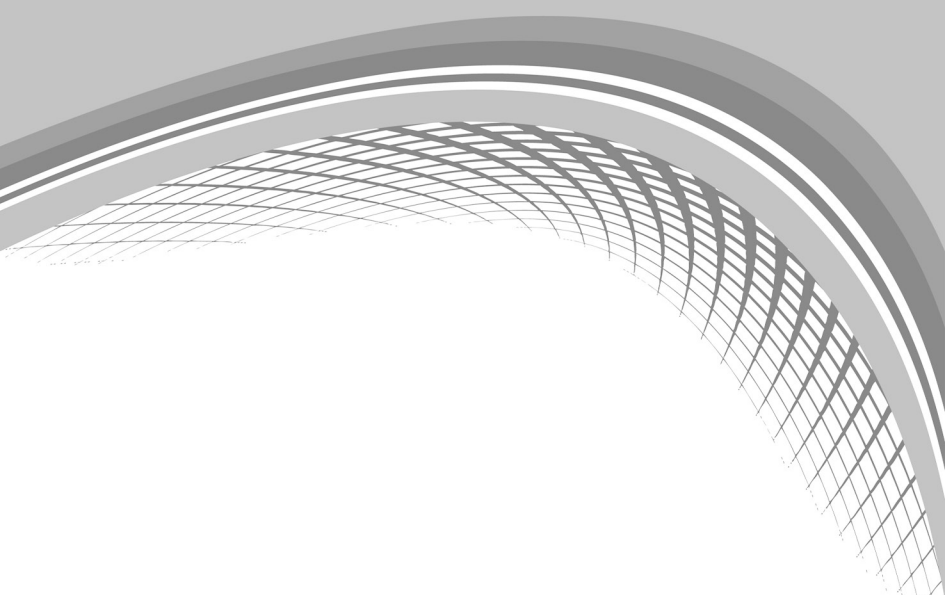
.....

.....

.....

فصل پنجم

نگهداری مناسب سلول‌ها



مقدمه

نگهداری یک رده سلولی، در محیط کشت برای مدت طولانی، به دلایل گوناگونی مناسب نمی‌باشد که برخی از این دلایل عبارتند از:

۱. خطر آلودگی میکروبی
۲. از دست رفتن خصوصیات مورد نظر (آنتی‌ژن‌های سطحی یا بیان آنتی‌بادی مونوکلونال)
۳. تغییر ژنتیکی در سلول‌ها
۴. از بین رفتن رده سلولی به دلیل پایان عمر سلول (مانند سلول‌های MRC-5 دیپلوئید انسانی)

۵. خطر آلودگی متقاطع با سایر رده‌های سلولی

۶. افزایش هزینه‌های مصرفی و پرسنلی

لذا برای به حداقل رساندن فاکتورهای ذکر شده استفاده از سیستم ذخیره‌سازی سلولی راه و روش مناسبی است.

۱-۵) ایجاد بانک سلولی^۱

بانک سلولی، یک سیستم مناسب ذخیره‌سازی سلول‌ها، به‌خصوص برای مراکز فعال و بزرگ کشت سلولی است. زمانی که یک رده‌ی سلولی جدید وارد آزمایشگاه می‌شود باید به نکات آلودگی باکتریایی، قارچی و میکوپلاسما توجه و آن رده سلولی را در شرایط قرنطینه نگهداری نموده و تمامی تست‌های لازم را اعمال نمود تا از نظر عدم آلودگی میکروبی، قارچی و همچنین میکوپلاسمایی تأیید شود. سپس اجازه داده شود تکثیر اولیه صورت پذیرد و پس از تکثیر اولیه، ۳ تا ۵ آمپول به‌عنوان یک ذخیره اولیه آماده شود و در ادامه یکی از آمپول‌ها را بازیابی نموده و به منظور تولید ذخیره اصلی در حد ۱۰ تا ۲۰ آمپول تکثیر شود. کلیه آمپول‌های ذخیره شده در سیستم ذخیره افقی، بایستی از نظر کیفی کاملاً بررسی گردند و موارد ذیل در آن‌ها مورد توجه قرار گیرند:

۱. شمارش سلولی و تعداد سلول‌های زنده

۲. عاری بودن از نظر آلودگی باکتریایی، قارچی و میکوپلاسما

1. Master Cell Banking



۳. بررسی عدم آلودگی ویروسی

۴. تجدید حیات خوب و مطمئن

چنانچه کلیه آزمایشات رضایتبخش بوده و تأیید شدند لازم است یکی از آمپولها را به بانک جاری^۱ فرستاده تا آنجا ذوب گردیده و برای تکثیر استفاده گردد. به کارگیری این روش حفظ و نگهداری سلولی، این اطمینان را به وجود می آورد که رده های سلولی از نظر ژنتیکی و آزمایشات کنترلی صحت لازم و کافی را دارند. از دیگر مزایای این سیستم ذخیره سازی، می توان به موارد ذیل اشاره نمود:

۱. مواد مصرفی دارای کیفیت مناسب هستند.

۲. آزمایشات با استفاده از کشت ها و شماره پاساژ معین انجام می شوند.

۳. سلول ها فقط وقتی مورد نیاز باشند در کشت، فعال هستند.

۴. خصوصیات اولیه رده سلولی، ثابت می ماند.

ذکر چند نکته در پایان این مبحث ضروری به نظر می رسد و توجه به آنها باعث کیفیت بهتر کار می گردد:

۱. تعداد آمپول هایی که برای بانک های اصلی و جاری تهیه می شوند، باید نسبت مناسبی با میزان درخواست سلول داشته باشند.

۲. تعداد آمپول هایی که برای کنترل کیفی استفاده می شوند وابستگی مستقیمی به اندازه بانک سلولی دارد و به طور ایده آل توصیه می شود

۵ تا ۱۰٪ بانک قبل از استفاده آزمایش شوند.

۳. آمپول‌های بانک سلولی در حال کار (جاری)، بهتر است برای کشت‌های متوالی و از پیش تعیین شده استفاده شوند و برای سلول‌ها با عمر محدود، بهتر است تعداد آن‌ها کمتر باشد.

۴. همیشه بانک جاری از طریق بانک اصلی تأمین شود.

۵. برنامه ذخیره سازی طوری تنظیم شود که وقتی تعداد آمپول‌های ذخیره به ۵ عدد رسید به ذخیره‌سازی مجدد اقدام گردد.

۶. تست‌های کنترلی، بسته به هدف استفاده، برنامه‌ریزی شوند برای مثال تست‌های اضافی بررسی ویروس‌ها و یا مطالعات کاربوتایی.

۲-۵) انجماد و نگهداری رده‌های سلولی

هدف از انجماد سلولی، نگهداری سلول‌ها برای مدت طولانی می‌باشد. سلول‌ها در شرایط انجماد، نیازی به مواد غذایی و سایر مواد لازم برای رشد ندارند. به این ترتیب علاوه بر نگهداری سلول‌ها، در مصرف محیط کشت نیز صرفه‌جویی می‌شود. فواید انجماد سلولی عبارتند از:

۱. کاهش ریسک آلودگی

۲. کاهش آلودگی متقاطع با سایر رده‌های سلولی دیگر

۳. حفظ خصوصیات ژنتیکی و مورفولوژیکی سلول‌ها و کاهش احتمال

تغییرات ژنتیکی و مورفولوژیکی



۴. کاهش هزینه‌ها (مواد مصرفی، زمان و وقت کارکنان)

۵. انجام کار با سلول‌هایی که شماره پاساژ آن‌ها مشخص است.

انجماد سلولی برای سلول‌هایی با عمر کوتاه و محدود مناسب نمی‌باشد و ترجیحاً برای سلول‌هایی انجام می‌شود که مصرف عمومی و دائمی داشته و یا این که یک رده سلولی اختصاصی بوده که مشخصات آن کاملاً شناسایی شده و عاری از هر گونه آلودگی باشد. دلایل انجماد سلولی ممکن است بسیار متنوع و گوناگون باشد. به عنوان مثال در زمان خرابی انکوباتور، فراهم نبودن مواد و وسایل کار و یا حفظ یک رده سلولی خاص مانند سلول‌های هیبرید، می‌توان از انجماد سلولی استفاده نمود.

برای یک انجماد موفق سلولی لازم است که کارهای زیادی صورت پذیرد تا بتوان از موفقیت انجام آن، اطمینان لازم را کسب نمود. دو اصل اساسی و مهم در انجماد سلولی و ذوب سلولی عبارتند از انجماد با سرعت آهسته و ذوب کردن با سرعت بالا. هر چند که این اصول در مورد سلول‌های رده‌های گوناگون ممکن است متفاوت باشد ولی به طور کلی بایستی سلول‌ها با سرعت ۱ تا ۳ درجه در دقیقه سرد شوند و در انکوباسیون در حمام آب^۱ گرم ۳۷ درجه، برای ۳ تا ۵ دقیقه به سرعت ذوب شوند. علاوه بر نکات گفته شده بایستی شرایط دیگری نیز اعمال گردد تا سلول‌ها به طور موفق، منجمد گردیده و همچنین بازیابی شوند.

۱. باید توجه کافی شود که کشت‌ها سالم بوده و درصد سلول‌های زنده

بالای ۹۰٪ باشد.

۲. سلول‌ها، بایستی در مرحله رشد لگاریتمی و تصاعدی باشند بدین منظور بایستی محیط کشت سلول، ۲۴ ساعت قبل از فریز کردن تعویض شود.

۳. هیچ‌گونه علامتی از آلودگی در کشت، مشاهده نشود.

۴. در هنگام فریز کردن، از غلظت بالاتر از ۹۰٪ استفاده شود.

۵. برای جلوگیری از تخریب سلول‌ها به‌وسیله تشکیل کریستال‌های یخ بهتر است از دی‌میتیل سولفوکسید DMSO^۱ و یا گلیسرول استفاده شود (غلظت نهایی ۱۰٪). البته در مورد بعضی از رده‌های سلولی مانند HL60 استفاده از DMSO مناسب نمی‌باشد، زیرا این ماده سبب القای تمایز آن‌ها می‌شود. بنابراین در چنین مواردی توصیه می‌شود که از گلیسرول استفاده گردد.

نگهداری و ذخیره سلول‌ها در ازت مایع، تاکنون موفق‌ترین روش شناخته شده است. در صورتی که ازت مایع در دسترس نباشد می‌توان سلول‌ها را در فریزر -۷۰- درجه نگهداری نمود. البته بایستی به این نکته توجه شود که حتی دمای پایین تا -۷۰- درجه نیز باعث آسیب به سلول‌ها می‌گردد. لذا بهترین دمای نگهداری -۱۹۶- درجه بوده که توسط ازت مایع ایجاد می‌شود و در این دما آسیب سلولی در حداقل ممکن خواهد بود. رده‌های سلولی تحت شرایط انجماد، با حضور مواد نگهدارنده سلولی، در یک وضعیت معلق

1. Dimethyl sulfoxide



برای مدت طولانی قابل نگهداری بوده و حفظ می‌شوند. امروزه فریزرهای الکتریکی با حداقل دمای ۱۳۵- و به صورت تخصصی که سلول‌ها را در بخار ازت مایع نگهداری می‌کنند به بازار عرضه شده‌اند. معایب و مزایای فریزکردن، در جدول ۱-۵ ذکر گردیده است تا در صورت لزوم بهترین روش برای کار اتخاذ شود.

مزایا	معایب	روش
آسانی و سهولت نگهداری	به پشتیبانی نیتروژن مایع نیاز دارد.	فریزر الکتریکی (۱۳۵-)
دمای متعادل (ثابت)	پیچیدگی مکانیکی دارد.	
هزینه پایین	ثبات دماهای نگهداری، شدیداً به نیتروژن مایع وابستگی دارد.	
در دماهای پایین بسیار ثابت می‌ماند (۱۹۶۰-)	نیاز به پرکردن تانک‌های ازت (نیتروژن) دارد.	نیتروژن فاز مایع
سهولت و سادگی ابزار مورد استفاده	به هزینه بالا نیاز دارد.	
عدم ریسک آلودگی متقاطع	ریسک آلودگی متقاطع از طریق نیتروژن مایع وجود دارد.	
رسیدن به دمای پایین	نیاز به پرکردن نیتروژن مایع به‌طور منظم دارد.	نیتروژن فاز بخار
سهولت و اطمینان	هزینه بالا نیاز دارد.	
	دما بین ۱۳۵- تا ۱۹۰- درجه در نوسان است.	

جدول ۱-۵: فهرست معایب و مزایای دو روش مختلف فریزکردن سلول‌ها (انجماد الکتریکی و تانک ازت)



با توجه به جدول ۱-۵، ذخیره در فاز نیتروژن مایع این اجازه را می‌دهد که سلول‌ها در ثابت‌ترین دمای ممکن یا ثابت مطلق نگهداری شوند اما در مقابل به حجم‌های بالایی از نیتروژن مایع نیاز داشته و همچنین آمپول‌های حاوی سلول‌ها بایستی کاملاً عایق‌بندی شده باشند. در صورت عدم رعایت دقیق نکات گفته شده، خطرانی را برای اپراتور، در هنگام بازیافت سلولی در بردارد. از جمله امکان ترکیدن آمپول‌ها و از طرفی مستنداتی وجود دارد مبنی بر این که از طریق نیتروژن مایع، احتمال انتقال ویروس‌های پاتوژن وجود دارد.

مخزن نگهداری نیتروژن مایع، نباید کمتر از نصف حجم کلی آن قبل از پرکردن باشد. رعایت این مسئله سبب می‌شود که خطرات در هنگام کار با تانک ازت به حداقل برسد چرا که در صورت افت دما در تانک ازت، امکان ترکیدن تانک و نابودی سلول‌ها وجود دارد. در سیستم ذخیره سلولی با دمای بسیار پایین، نظم بخشیدن به محتویات تانک ازت بسیار حائز اهمیت است. به منظور حفظ اطلاعات صحیح آمپول‌های داخل تانک ازت بایستی:

۱. هر آمپول به صورت مجزا، برچسب‌دار شود.
۲. برچسب‌ها باید مقاوم به ازت مایع باشند.
۳. بر روی هر برچسب باید مشخصات کامل سلول (شماره، تاریخ انجماد) آن ثبت شود.
۴. محل هر آمپول در یک بانک اطلاعاتی الکترونیکی و همچنین بر



روی کاغذ ثبت گردد.

۵. توصیه می‌شود که یک سیستم کنترلی وجود داشته باشد تا کلیه

آمپول‌های مصرف شده و فریزر شده در آن ثبت شود.

ملاحظات ایمنی کار با ازت مایع، نحوه استفاده از نیتروژن مایع و نحوه

صحیح پر کردن تانک ازت، بایستی حتماً به کارکنان آزمایشگاه، آموزش داده شود تا احتمال خطرات به حداقل برسد.

۳-۵) خطرات کار با ازت مایع

۱. ریسک کاهش اکسیژن، چون کاهش اکسیژن سبب از دست رفتن

هوشیاری بدون علامت می‌شود.

۲. احتمال سرمازدگی در دست و پا

۳. احتمال ترکیدن آمپول‌های حاوی سلول‌ها

۴. احتمال ترکیدن تانک‌های ذخیره سلولی، به دلیل عدم دقت در

میزان ازت مایع آن‌ها

معیارهای پیشگیری از خطرات عبارتند از:

۱. استفاده از هشدار دهنده‌های درصد اکسیژن هوا (که باید به صورت

۱۸ درصد حجمی اکسیژن تنظیم شده باشند).

۲. آموزش کارکنان

۳. در هنگام کار با ازت مایع بهتر است کارکنان، دوفری با هم کار کنند.

۴. محل کار با ازت مایع، دارای سیستم‌های تهویه مناسب باشد.

۵. استفاده از نیتروژن در خارج از وقت اداری ممنوع گردد.

۴-۵) تهیه رده‌ها یا دودمان‌های سلولی

دودمان‌های سلولی در ظاهر و در ابتدای امر بسیار شبیه به یکدیگر به نظر می‌رسند در حالی که هر کدام از آن‌ها به تنهایی دارای خصوصیات بیولوژیکی متفاوتی بوده و از منابع مختلفی تهیه می‌شوند، لذا نمی‌توان صرفاً آن‌ها را بر اساس مورفولوژی شناسایی نمود. عواملی از قبیل عفونت یا آلودگی با یک ویروس (خارجی) و یا مایکوپلاسما گاه می‌تواند به‌طور کاملاً مشخص ویژگی‌های سلول‌ها را تغییر داده و این آلودگی‌ها متأسفانه اغلب مخفی هستند. علاوه بر این، دودمان‌های سلولی در طی پاساژهای زیاد و نگهداری به مدت طولانی در محیط کشت دچار برخی تغییرات می‌شوند.

عدم دقت کار پرسنل آزمایشگاه نیز می‌تواند سبب ایجاد خطاهای جبران‌ناپذیری در شناسایی دودمان‌های سلولی گردد، به‌عنوان مثال در آزمایشگاه‌های سلولی پرکار، امکان برچسب‌زدن اشتباه وجود دارد که خطا ایجاد می‌نماید. همچنین در آزمایشگاه با پرسنل زیاد، امکان آلودگی متقاطع بین سلول‌ها وجود دارد، به هر حال امکان خطا چه عمدی و یا سهوی در هنگام کار با سلول‌ها وجود دارد هر چند که این خطاها بسیار نادر و محدود باشد. به دلیل طبیعت علوم، اگر خطایی وارد کار شود می‌تواند به سرعت گسترش یافته و منتشر گردد.



با توجه به حساسیت کار کشت سلولی، توجه دقیق به خصوصیات بیولوژیکی هر سلول و نیز لزوم تأیید صحت آن‌ها، لازم است که یک سازمان معتبر دارای سیستم بسیار دقیق و منظم اصول ذخیره‌سازی سلول‌ها، مسئول این امر مهم باشد و آزمایشات لازم برای تأیید صحت دودمان سلولی را با کیفیت و حساسیت بسیار بالا انجام دهد. انجام چنین سیستم کنترلی فقط در آزمایشگاه‌های سلولی مجهز دارای کارشناسانی خبره و یا در بانک‌های سلولی قابل اجرا می‌باشد که بتواند سلول‌ها را در طی چندین سال بدون تغییر نگهداری نماید و یک آزمایشگاه تحقیقاتی کوچک با امکانات محدود نمی‌تواند این کار را انجام دهد.

بنابراین با توجه به دلایل ذکر شده، توصیه می‌شود که برای تهیه سلول جدید فقط از مجموعه‌های کشت سلولی مشهور، سلول‌های مورد نظر تهیه شوند. در صورت اجبار به استفاده از یک رده سلولی موجود در آزمایشگاه بهتر است که به تاریخچه گزارشات کشت سلولی در آزمایشگاه مراجعه نموده و بررسی دقیق انجام گردد و چنان‌چه کوچک‌ترین شکی در صحت آن رده وجود داشته باشد، منطقی و مقرون به صرفه خواهد بود که آن رده‌ی سلولی از یک مؤسسه معتبر تهیه شود.

وقتی یک رده سلولی جدید ایجاد می‌شود با استفاده از تکنیک‌های دقیق آزمایشگاهی نظیر آنالیز ایزوآنزیمی و یا پروفایل DNA شناسایی کامل آن انجام شده و به عبارتی هویت آن تعریف می‌گردد و سپس در شرایط بسیار ایده‌آل نگهداری می‌گردد. ضمن آن‌که از نظر آلودگی‌های میکروپلاسمایی و



غیره کاملاً بررسی می‌گردند. به این ترتیب هر مشتری می‌تواند سلول موردنظر خود را با اطمینان از این مراکز تأمین نماید.

در حال حاضر برای اطمینان از توزیع استاندارد دودمان‌های سلولی مختلف، بانک‌های کشت سلولی معتبر جهانی وجود دارند و بسیار جای مباحثات است که در کشور ایران سه مرکز پاستور، رازی و رویان به این مهم پرداخته و هم‌اکنون جزء بانک‌های معتبر محسوب می‌شوند.

♦ بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (NCBI)^۱

♦ بانک سلول و ژن مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی (CGBRI)^۲

در جدول ۲-۵ نام چند بانک سلولی جهانی همراه با آدرس آن ذکر گردیده است.

1. National Cell Bank of Iran

2. Cell and Gene Bank of Razi Institute



نام بانک سلولی	آدرس اینترنتی
General Cell Bank; Institute of Physical and Chemical Research of RIKEN; Saitama, Japan	http://www.brc.riken.jp/inf/en/index.shtml
The University of Michigan Human Breast Cancer Cell Lines	http://www.cancer.med.umich.edu/breast_cell/Production/index.html
The CORIELL CELL REPOSITORIES	http://mlr.coriell.org/
German Collection of Cell Cultures	www.dsmz.de
Human Embryonic Stem Cell Database	http://www.stemcellcommunity.org/metadot/index.pl?id=2181&isa=Category&op=show
HyperCLDB	http://www.biotech.ist.unige.it/interlab/cldb.html
The Interlab Cell Line Collection (ICLC)	http://www.sql.iclc.it/test/iclc/
Prokaryotic Growth Temperature database (PGTdb)	http://pgtdb.csie.ncu.edu.tw/
Tubafrost	http://www.tubafrost.org/
The European Searchable Tumour line Database (ESTDAB)	http://www.ebi.ac.uk/ipd/estdab/
The European Collection of Cell Cultures (ECAML)	http://ecaml.org.uk/
American Type Culture Collection (ATML)	www.atml.org

جدول ۲-۵: معرفی چند بانک سلولی معتبر دنیا

در هر صورت به عنوان یک اصل کلی، معمولاً ترجیح داده می‌شود که سلول اولیه همیشه از یک منبع معتبر که کلیه کنترل‌های کیفی را انجام می‌دهند تهیه گردد و کشت‌های سلولی با ارزش را نیز علاوه بر فریز کردن در آزمایشگاه، بایستی به یک بانک سلولی معتبر ارسال نموده و برای نگهداری سلول‌ها اقدام گردد.

۵-۵) جنبه‌های حفاظتی و امنیتی کشت سلولی

قبل از شروع کار در آزمایشگاه کشت سلول به منظور هر نوع فعالیت، لازم است که کلیه پرسنل شاغل از انواع خطرات ناشی از کار در آزمایشگاه، قوانین و استانداردهای کار مربوط به سلامتی و حفاظت کار، کاملاً آگاه بوده و با مراجعه به اصول ISO 9001 و GMP اطلاعات خود را به روز نمایند.

هدف اصلی ما از این مبحث، ارزیابی خطرات، ممانعت از صدمات، حفاظت صحیح و اجتناب از آسیب به افراد و محیط می‌باشد، به عنوان مثال در خصوص بهداشت شخصی و این سؤال که آیا شستن دست‌ها باعث کاهش آلودگی می‌گردد یا خیر مباحث زیادی وجود دارد. اما به اجمال می‌توان به این مطلب اشاره نمود که شستشوی دست‌ها موجب مرطوب شدن و کاهش باکتری‌های چسبیده به دست‌ها گردیده و از طرفی مانع از انتشار آلودگی در درون محیط کشت می‌گردد، لذا انجام آن بسیار توصیه می‌شود. استفاده از کلاه، روپوش، ماسک و همچنین دستکش در کشت سلولی اکیداً توصیه می‌شود. علاوه بر این موارد، کار در زیر هود لامینار و عدم صحبت کردن هنگام کار و سایر موارد ایمنی دیگر را بایستی حتماً لحاظ نمود.

۵-۶) تشخیص و بررسی خطرات

میزان خطر برای کشت سلول‌های حیوانی به نوع سلول مورد استفاده و میزان صدمه‌ای که آن سلول به انسان وارد می‌سازد بستگی داشته و با توجه به این موارد برای آن تعاریف دقیقی وجود دارد. انواع خطرات را می‌توان به موارد



زیر طبقه‌بندی نمود:

۱- ۶-۵) خطرات ضعیف

شامل انواع سلول‌های غیرپریمات‌ها و تعدادی از دودمان‌های دیپلوئیدی انسانی با طول عمر محدود که به‌طور کامل شناخته شده‌اند مانند: MRC-5.

۲- ۶-۵) خطرات متوسط

دودمان‌های سلولی و جانوری که به خوبی شناسایی نشده‌اند.

۳- ۶-۵) خطرات شدید

➤ دودمان‌های سلولی مشتق از بافت‌های انسانی، پریمات‌ها یا خون آن‌ها

➤ دودمان‌های سلولی حاوی پاتوژن‌های اندوژنوس بسته به نوع پاتوژن

➤ دودمان‌های سلولی که در پی آزمایشات تجربی عفونی شده‌اند.

البته بانک‌های سلولی جهانی توصیه می‌کنند که حداقل آلودگی برای سلول‌ها، بر اساس ارزیابی خطریشان در نظر گرفته شود. بنابراین برای بیشتر سلول‌ها، سطح آلودگی در دسته ۲ قرار می‌گیرد و با توجه به نوع عملیات انجام شده بر روی سلول و یا کشت در حجم‌های بالای، بایستی سطح ۳ در نظر گرفته شود. به عنوان مثال برای دودمان‌های سلولی مشتق شده از بیماران آلوده به HIV و یا HTLV-1 حتماً بایستی سطح ۳ آلودگی را در نظر گرفت.



آلودگی مهم‌ترین دغدغه در کشت سلولی می‌باشد. بنابراین استفاده از روش‌ها و تکنیک‌های مناسب آزمایشگاهی، داشتن محیط کار منظم، محدود کردن حرکت کارکنان در آزمایشگاه کشت سلولی، عدم جابه‌جایی لوازم کشت سلول به خارج و داخل آزمایشگاه، همچنین برچسب‌زدن دقیق موادی که در آزمایشگاه ساخته و یا انبار می‌گردند برای کاهش خطرات و ایجاد یک محیط ایمن از مهم‌ترین و ضروری‌ترین مواردی می‌باشد که باید رعایت گردد. به علاوه آموزش کارکنان، استفاده از روش‌های استاندارد و دستورالعمل‌های اجرایی (SOP)^۱ تهیه شده و ارزیابی خطرات، آسیب‌رسانی را به حداقل می‌رساند. برخی از موارد خطرآفرین در آزمایشگاه کشت سلول در زیر فهرست شده‌اند:

۱. بریدگی‌ها، یکی دیگر از صدمات ناشی از کارهای کشت سلولی بریده‌شدن دست‌ها توسط لوازم شیشه‌ای و یا فرورفتن نوک سرنگ‌ها به دست افرادی است که کار آن‌ها شستشو و حذف زباله‌ها می‌باشد. با توجه به چنین دلایلی نبایستی تا حد امکان از ظروف شیشه‌ای و سرنگ در کار استفاده نمود. چنان‌چه حتماً لازم است که از این وسایل استفاده شود، بسیار ضروری است که برای مواد دور ریختنی برنده و شیشه‌های شکسته، از ظروف مجزا استفاده شود. همچنین بعد از استفاده از سرنگ‌های یکبار مصرف، حتماً نوک آن‌ها را خم نموده و یا این که آن‌ها را در درون غلاف مربوطه قرار دهید. لازم به

1. Short Operating Protocols



ذکر است که این ظروف باید بعد از استفاده توسط زباله‌سوز معدوم گردند.

۲. مسمومیت با مواد شیمیایی در کشت سلولی، این مواد در کشت سلولی فراوان نبوده اما به‌طور کلی می‌توان آن‌ها را به سه دسته طبقه‌بندی نمود:

الف) ضد عفونی‌کننده‌ها و شوینده‌ها: از جمله این مواد می‌توان از هیپوکلریت نام برد که یک ضد عفونی‌کننده قوی بوده و موجب تحریک پوست و حتی تخریب ظروف فولادی می‌شود. بنابراین در هنگام کار با این‌گونه مواد باید احتیاط لازم صورت پذیرد.

ب) حلال‌ها: یکی از موادی که در کشت سلول بسیار استفاده می‌شود دی‌میتیل سولفوکساید (DMSO) است، که یک حلال قوی بوده و به‌راحتی در درون پوست نفوذ می‌کند. (حتی با وجود دستکش) لذا توصیه می‌شود که هنگام کار با آن تمامی مسائل ایمنی مدنظر قرار گیرد.

ج) موتاژن‌ها (مواد تغییردهنده عوامل ارثی و سرطان‌زا): هنگام کار با این مواد علاوه‌بر استفاده از ماسک و هودهای شیمیایی، دقت کار بایستی بسیار بالا باشد و رعایت تمامی نکات ایمنی، حائز اهمیت است.



۳. سوختگی‌ها، اصولاً گازهایی که در کشت سلولی به کار می‌روند در مقادیر کم، خطری نداشته، اما در صورتی که همین مقادیر اندک، درست مصرف نشوند می‌توانند خطرهای جبران‌ناپذیری را وارد نمایند. به عنوان مثال گاز انیدرید کربنیک در سیلندرهای تحت فشار برای انکوباتورها استفاده می‌شود اگر به‌طور کامل پیچ سیلندر محکم بسته نشده باشد خطر خفگی را به‌دنبال خواهد داشت، از طرفی اگر از گاز اکسیژن درست استفاده نشود خطر آتش‌سوزی وجود دارد. بنابراین وجود کپسول‌های آتش‌نشانی در محیط کار از ضروری‌ترین ملزومات کاری می‌باشد.

استفاده از ازت مایع برای نگهداری سلول‌های فریز شده، از دیگر خطرات کار در آزمایشگاه کشت سلولی به‌حساب می‌آید چرا که در هنگام کار مواردی نظیر سرمازدگی، خفگی، آتش‌گرفتن، سوختگی‌های با سرمای شدید و یا ترکیدن آمپول‌های حاوی سلول‌های فریزر شده همیشه وجود دارد، لذا توصیه می‌شود در مواقع کار با ازت مایع ضمن استفاده از دستکش‌های ضخیم و قابل انعطاف، از تهویه هوای بیشتر استفاده شود. از طرفی برای ذوب کردن آمپول‌های فریز شده، الزامی است این کار در زیر سرپوشی ضخیم از جنس پلاستیک انجام گردد.

آتش‌سوزی هنگام کار با الکل ۷۰٪، در زمان ضد عفونی هود لامینار و یا روشن کردن شعله گاز در آزمایشگاه، از دیگر خطرات عمومی در آزمایشگاه کشت سلولی به حساب می‌آید و لازم است تا جایی که امکان دارد از تبخیر



الکل جلوگیری به عمل آید و تا حد امکان، الکل مصرفی دور از شعله، در ظروف درب بسته و یا دارای دهانه تنگ و پلاستیکی نگهداری گردد.

از دیگر مخاطرات جاری در آزمایشگاه کشت سلولی می‌توان از تشعشع اشعه ماورای بنفش که معمولاً برای سترون کردن اتاق کشت استفاده می‌گردد نام برد، لذا حفاظت از پوست و چشم‌ها و رعایت استانداردهای موجود بسیار ضروری می‌باشد. ضمن آنکه روشن ماندن لامپ‌های اشعه‌ی ماورای بنفش به مدت طولانی سبب تجزیه‌ی مولکول‌های هوا و ایجاد رادیکال‌های فعال می‌شود که خطرناک می‌باشند.

۷-۵) راه‌های مقابله با خطرات و یا اجتناب از آنها

همان‌طور که قبلاً گفته شد این خطرات را به سه دسته تقسیم‌بندی می‌کنند که این دسته‌بندی بر اساس دو عامل عمده می‌باشد:

۱. منشاء مواد

۲. نوع دودمان‌های سلولی مورد بررسی

در هر دو صورت جدول ۳-۵ می‌تواند راهنمای خوبی برای کار با مواد بیولوژیک محسوب شود.



احتیاطات	روش‌ها
استفاده از هود مناسب	تهیه محیط کشت
استفاده از روش‌های متداول میکروبیولوژی	
استفاده از هودهای شیمیایی با جریان افقی هوا	
استفاده از هود مناسب	کار با سلول‌های غیرانسانی و پستانداران
استفاده از روش‌های متداول میکروبیولوژی	
استفاده از هودهای درجه ۲ که دارای سیستم پالایش هوا بوده و مجهز به محافظ جلو و صافی در مسیر خروجی هوا باشند. این هودها بایستی با جریان عمودی کار کنند.	کشت اولیه و کشت‌های متوالی
استفاده از هودهای درجه ۲ با جریان عمودی هوا و مجهز به محافظ هوا در جلو و صافی در مسیر خروجی هوا	تهیه سلول‌های هیبرید (نوترکیب)
استفاده از هودهای مجهز به دستکش	کار مشترک ویروس و سلول
استفاده از هودهای درجه ۳	
استفاده از هودهای مجهز به ورودی پالایش شده هوا	
استفاده از هودهایی مجهز به خروجی پالایش شده هوا	
استفاده از هودهایی مجهز به صافی هپا و با قدرت جذب عوامل بیماری‌زا	
سترون نمودن تمامی زباله‌ها	
اتاق بایستی دارای هوای خروجی باشد که از صافی هوا مخصوص عبور نماید.	
آزمایشگاه باید مستقلاً دارای اتکوباتور، سانتریفوژ، هموسایتمتر و دیگر تجهیزات باشد.	
استفاده از هودهای بسته از نوع درجه ۳	
	کشت سلول‌های حاوی عوامل بیماری‌زا

جدول ۳-۵: احتیاطات برای رعایت جنبه‌های پیشگیری از خطرات در حین کار با مواد

بیولوژیک در آزمایشگاه کشت سلولی



۸-۵) ضد عفونی و آلودگی زدایی

روش های طراحی شده برای ضد عفونی نمودن، آلودگی زدایی، حذف زباله های کشت سلولی و سطوح کار و لوازم یکی از مهم ترین راه های به حداقل رسانی خطرات می باشند. ضد عفونی کننده ها بر اساس تأثیر آن ها در چهار گروه طبقه بندی می شوند که عبارتند از:

۱-۸-۵) هیپوکلریت ها

اثرات عمومی این ضد عفونی کننده ها عبارتند از:

- ♦ ضد عفونی کننده عمومی مناسب
- ♦ فعالیت علیه ویروس ها
- ♦ اثر خوردگی بر فلزات، بنابراین نبایستی برای سطوح فلزی از جمله سانتریفوژ و امثال آن به کار رود.
- ♦ به آسانی به وسیله مواد آلی غیر فعال شده و بنابراین بایستی روزانه تهیه شود.

بهتر است در حد ۱۰۰۰ PPM برای سطوح عمومی، ۲۵۰۰ PPM در ظروف مخصوص برای شستشوی پیت ها و ۱۰۰۰۰ PPM برای شستشوی ظروف و ضد عفونی زباله های کشت استفاده شود. یک نکته بسیار مهم و قابل توجه این است که باید دقت شود زمانی که یک اتاق کشت و یا هود با بخار فرمالدئید ضد عفونی می گردد، تمامی هیپوکلریت ها قبلاً حذف شده زیرا این مواد با یکدیگر ترکیب شده و محصولات سرطانی تولید می کنند.



۲-۸-۵) فنلیک‌ها

جابجایی این ضدعفونی کننده‌ها، مانند هایکولین، فعالیت ضد ویروسی ندارند و در حضور مواد آلی فعال باقی می‌مانند. این گروه از ضدعفونی کننده‌ها به دلیل عدم تأثیر بر ویروس‌ها، کاربرد زیادی در کشت سلول ندارند.

۳-۸-۵) الکل‌ها (اتانول - ایزو پروپانول)

الکل‌های خالص اغلب خاصیت ضدعفونی کنندگی ندارند بلکه با مکانیسم دهیدراتاسیون باعث فیکس شدن میکروب‌ها می‌گردند، لذا باید با آب مقطر رقیق شوند. غلظت‌های مؤثر برای اتانول، ۷۰٪ و برای ایزو پروپانول، ۶۰-۷۰٪ می‌باشد. فعالیت این ضدعفونی کننده‌ها از طریق آبگیری (فیکس نمودن) باکتری‌ها می‌باشد. الکل‌ها بر علیه باکتری‌ها مؤثر هستند. اتانول فقط روی ویروس‌های پوشش دار مؤثر است و بر روی ویروس‌های فاقد غشا اثر ندارد. اما ایزو پروپانول علیه ویروس‌ها مؤثر نمی‌باشد. از الکل ۷۰٪ به صورت روتین جهت ضدعفونی و استریل نمودن دست‌ها و سطوح کار استفاده می‌شود، بهتر است اتانول ۷۰٪ به صورت هفتگی تهیه گردد و حداکثر تا دو هفته استفاده شود تا از آلودگی قارچی جلوگیری شود.

۴-۸-۵) آلدئیدها (مانند گلو تار آلدئید، فرمالدهید)

آلدئیدها تحریک کننده‌ی تنفسی و پوستی هستند و با توجه به این مشکلات، لازم است در استفاده از آن‌ها محدودیت قائل شد. گلو تار آلدئید می‌تواند جایگزین خوبی برای هیپوکلریت باشد. البته در مواقعی که استفاده از



هیپوکلریت مناسب نمی‌باشد، به عنوان مثال در تمیز کردن ظروف فلزی که از استیل ساخته شده و یا سانتریفیوژها، از گلاتارآلدهید استفاده می‌گردد چرا که هیپوکلریت باعث خوردگی و خرابی آن‌ها می‌شود.

۹-۵) دفع پسماندها و زباله‌های آزمایشگاه کشت سلولی

راه‌های آلودگی زدائی و حذف ضایعات و زباله‌های کشت سلولی نیز از مهم‌ترین کارهایی است که باعث کاهش آلودگی‌ها می‌گردد. یکی از مهم‌ترین جنبه‌های مدیریت، حذف زباله‌های تولید شده در آزمایشگاه و دورانداختن زباله به‌طور منظم می‌باشد، تا از انباشته شدن ضایعات به مقدار زیاد جلوگیری شود. پیشنهاد می‌شود که زباله‌ها به‌طور مداوم و با توجه به نوع آلودگی و درجه آلودگی معدوم گردند.

۱. حذف محیط‌های کشت، توصیه می‌شود که ابتدا محیط‌های کشت در محلول هیپوکلریت PPM ۱۰۰۰، به مدت یک شبانه‌روز غیرفعال شده و سپس در فاضلاب با حجم زیادی از آب حذف گردد.

۲. پپیت‌های آلوده بایستی در محلول هیپوکلریت PPM ۲۵۰۰، به مدت یک شبانه‌روز قرار گرفته و سپس با اتوکلاو استریل شوند.

۳. زباله‌های جامد نظیر فلاسک، لوله‌های سانتریفیوژ، دستکش‌های آلوده و غیره ابتدا در داخل کیسه‌های زباله‌ی کاملاً مطمئن ریخته شده، اتوکلاو شده و سپس حذف شوند. البته توصیه می‌شود که در نهایت، این ضایعات در زباله‌سوز، کاملاً سوخته و معدوم گردند.

۱۰-۵) جنبه‌های کنترل کیفی در کشت سلولی

در آزمایشگاه کشت سلول مهم‌ترین نکته، بررسی و کنترل کیفیت در همه جوانب می‌باشد. به‌عنوان مثال کیفیت مواد مصرفی در کشت سلولی تأثیر مستقیم بر روی کیفیت کشت و محصولات متنوع آن دارد. دو وظیفه‌ی اصلی کنترل کیفیت عبارتند از:

۱. صحت و سلامت رده‌های سلولی
۲. اجتناب از آلودگی‌های میکروبی، قارچی و ویروسی

۱۱-۵) مواد مصرفی در کشت سلولی و کنترل کیفیت آن‌ها

یکی از منابع آلودگی مهم در کشت سلولی، سرم است. یکی از مهم‌ترین آلودگی‌ها که از سرم منتقل می‌شود، ویروس اسهال گاوی (BVDV) است. تریپسین نیز می‌تواند منبع آلودگی مایکوپلاسما بوده و برای کشت سلولی ایجاد خطر نماید. بنابراین استفاده از مواد، با کیفیت خوب و تضمین شده در بالابردن کیفیت کشت سلول بسیار حائز اهمیت است.

مواد خوب و با کیفیت را می‌توان از سازندگان معتبر کشت سلولی تهیه نمود، هر چند که سازندگان مواد، گواهی‌های آنالیز محصولات را ضمیمه محصول خود می‌کنند اما باز هم توصیه می‌شود در مورد مواد کلیدی نظیر FBS دقت و بررسی شده و برای اطمینان از این که کیفیت هر بچ تولیدی جهت کار مناسب است، توجه کافی شود. در مورد سایر وسایل کشت سلولی نظیر لوازم پلاستیکی استریل (فلاسک، پیپت‌ها، لوله‌های سانتریفوژ) که برای



کشت سلولی خریداری می‌شوند گواهی آنالیز وسایل بایستی ضمیمه گردد.

۱۲-۵) صحت رده‌های سلولی

منشاء رده‌های سلولی در کیفیت کار سلولی اثر مهمی دارد، زیرا رده‌های سلولی که جدید تهیه می‌شوند می‌توانند منبع اصلی آلودگی باشند. مزایای استحصال رده‌های سلولی از یک منبع معتبر و شناخته‌شده عبارتند از:

♦ رده‌های سلولی عاری از آلودگی می‌باشند.

♦ از نظر پروفایل DNA و منشاء کاملاً شناخته شده هستند.

♦ همراه با برگه‌های اطلاعات می‌باشند.

زمانی که رده‌های سلولی از منابع معتبر تهیه می‌شوند اطمینان از انجام مراحل کنترل کیفی مانند تست‌های بررسی آلودگی‌های میکروبی و تأیید صحت کشت‌ها وجود دارد. منابع آلودگی در یک آزمایشگاه کشت سلولی می‌تواند بسیار متنوع باشد. به‌طور خلاصه این منابع آلودگی در جدول ۴-۵ آمده است.

منبع آلودگی‌ها	راه انتقال یا علت	راه پیش‌گیری
دست‌کاری‌ها	سطوح و وسایل غیراستریل	استریل و ضدعفونی محل و میز کار با الکل ۷۰٪ اطمینان از استریل وسایل کار
تقسیم کردن	وسایل غیراستریل	اطمینان از شستشو و استریلیزاسیون کامل فیلتراسیون
محلول‌ها	معرف‌ها و محلول‌های غیرسترون	اتوکلاو
	شرایط نگهداری غیر استاندارد	آزمایش محلول‌ها پس از استریلیزاسیون
	خرید از سازندگان تجاری غیرمعتبر	در تمیز نگه‌داشتن انکوباتور دقت شود. ضدعفونی انکوباتور
رشد قارچ‌ها و باکتری‌ها		
رده‌های سلولی	آلودگی قبل از ورود	بعد از اطمینان کامل از عدم آلودگی سلول را به انکوباتور اصلی منتقل کنید.

جدول ۴-۵: معرفی منابع آلودگی در آزمایشگاه‌های کشت سلولی، راه‌های انتقال و پیشگیری از آلودگی‌ها

با توجه به جدول ۴-۵ می‌توان گفت که استفاده از سلول‌هایی با منشأ شناخته شده و موادی با کیفیت مناسب، به تنهایی کیفیت یک محصول (کشت سلولی) خوب را تضمین نمی‌کنند و بررسی مرتب و مداوم شناسایی آلودگی، ضروری است. سه نوع آلودگی در کشت سلولی را باید دائماً تحت نظر داشت که شامل آلودگی‌های باکتریایی - قارچی، ویروسی و مایکوپلاسمایی می‌باشند.

۱۳-۵) آلودگی باکتری‌ها و قارچ‌ها

آلودگی‌های باکتریایی در مراحل اولیه با چشم غیر مسلح، غیر قابل تشخیص



هستند اما در مراحل بعدی با یک افزایش ناگهانی در نتیجه pH، کدورت و تغییر رنگ در محیط کشت، مشاهده می‌شود. به این ترتیب کشت سلولی برای مدت کوتاهی، زنده باقی مانده و سپس تمامی سلول‌ها می‌میرند. بررسی روزانه میکروسکوپی کشت‌ها و بررسی ظهور اولیه آلودگی کمک بزرگی به تشخیص نموده و سبب تصمیم‌گیری مناسب در کوتاه‌ترین زمان ممکن می‌شود. علاوه بر این بهتر است تست‌های خاصی که برای تشخیص باکتری‌ها و قارچ‌ها هستند به عنوان قسمتی از کنترل کیفیت، به صورت منظم انجام گردد.

۱۴-۵) آلودگی مایکوپلاسمایی

مایکوپلاسم‌ها کوچک‌ترین پروکاریوت‌ها هستند که به صورت آزاد در طبیعت زندگی می‌کنند و توانایی تکثیر خودشان را دارند. این موجودات فاقد دیواره سلولی بوده و در واقع نمی‌توانند آن‌را سنتز کنند. قطر آن‌ها ۰/۳۵ میلی‌متر بوده و به اشکال مختلف همچون رشته‌ای و یا کروی دیده می‌شوند. پنج‌گونه مختلف از آن‌ها در آلودگی‌های کشت سلولی دخالت دارند که به ترتیب عبارتند از:

◆ *Acholeplasma Laidlawii*

◆ *M. Fermentans*

◆ *M. orale*

◆ *M. arginini*

◆ *M. hyorhina*

(*M. mycoplasma*)

اثرات آلودگی با میکوپلازما بسیار خطرناک‌تر از آلودگی باکتریایی و قارچی می‌باشد و سبب ایجاد اثرات طولانی مدت می‌گردد که شامل موارد زیر می‌باشد:

۱. کاهش سرعت رشد

۲. تغییرات مرفولوژیکی

۳. اختلالات کروموزومی

۴. تغییر متابولیسم اسیدهای آمینه (اسیدهای نوکلئیک)

علی‌رغم این آثار مشخص، حضور میکوپلازما اغلب بررسی نمی‌شود. زیرا تشخیص آلودگی میکوپلازمایی نیاز به استفاده از تکنیک‌های تخصصی دارد مانند: جداسازی و رنگ‌آمیزی DNA. در گذشته فقط بانک‌های سلولی این کار را انجام می‌دادند اما در حال حاضر کیت‌های تجاری در دسترس بوده و توصیه می‌شود از این تست‌ها به عنوان قسمتی از روش کنترل کیفی منظم استفاده گردد.

۱۵-۵) آلودگی ویروسی

بعضی از رده‌های ویروسی حاوی ویروس اندوژنوس هستند و ذرات ویروس را ترشح می‌کنند و یا آنتی‌ژن‌های ویروس را در سطح خود بیان می‌کنند مانند رده‌های سلولی که با ویروس EBV ترانسفورم شده‌اند که این رده‌های سلولی معمولاً آلوده در نظر گرفته نمی‌شوند. سرم گاوی بایستی به عنوان یک منبع آلودگی دیگر در نظر گرفته شود مخصوصاً در مورد ویروس



اسهال گاوی (BVDV). استفاده از سرم آلوده سبب آلوده شدن سایر رده های سلولی با ویروس (BVDV) می گردد و این آلودگی با تغییراتی در سرعت رشد ظهور پیدا می کند. از آن جا که این ویروس آثار سیتوپاتیک ندارد به راحتی قابل تشخیص نمی باشد.

۱۶-۵) بررسی آلودگی های محیطی

بررسی دقیق آزمایشگاه و محیط آن در کاهش آلودگی یکی از فاکتورهای بسیار ضروری محسوب می گردد. به عنوان مثال مکان هایی که در آن کشت سلولی انجام می شود (نظیر هودها)، بهتر است هر شش ماه از نظر درستی کار بررسی گردند. به علاوه، قراردادن پلیت های میکروبیولوژی برای ارزیابی آلودگی میکروبی هوا در اطراف آزمایشگاه توصیه می شود. برای دستیابی به این هدف، پلیت ها برای حدود ۴ ساعت به صورت درب باز قرار داده شده و بعد از این زمان باید درب آن ها بسته شود و در دمایی بین ۲۲ تا ۳۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ روز نگهداری شوند. در انتهای این دوره، پلیت ها باید از نظر حضور رشد میکروبی بررسی شوند.

۱۷-۵) اقدامات لازم در زمان مواجهه با آلودگی

یکی از مخاطره آمیزترین مشکلات کشت سلولی، استفاده مداوم از آنتی بیوتیک ها است. استفاده پیوسته از آنتی بیوتیک ها غیر ضروری است و می تواند منجر به گسترش سویه های مقاوم شود که ریشه کنی آن ها مشکل خواهد بود و ممکن است نیاز به آنتی بیوتیک هایی را پدید آورد که بر روی



سلول‌ها اثر سمی داشته باشند. بهتر خواهد بود که در هنگام مواجهه با آلودگی (باکتریایی، قارچی، مایکوپلاسمایی) اقدام به حذف کشت نموده و کار را با سایر سلول‌های عاری از آلودگی ادامه داد. در صورتی که حذف سلول امکان‌پذیر نباشد استفاده از آنتی‌بیوتیک توصیه می‌گردد.

تقریباً غیرممکن است که آلودگی‌های ویروسی از کشت سلولی حذف شوند زیرا به آنتی‌بیوتیک‌ها پاسخ نمی‌دهند و حذف آن‌ها با سانتریفوژ یا سایر تکنیک‌های جداسازی ممکن نیست. اگر منابع عاری از ویروس، در دسترس نباشد می‌توان کار با سلول‌های آلوده را با رعایت کامل جنبه‌های ایمنی ادامه داد.

۱۸-۵) مستندسازی رده‌های سلولی

به‌منظور صحت کار کشت سلول، لازم است که گاهی در حین انجام کار بازنگری گردد که آیا کار با مواد صحیح انجام گرفته است یا خیر. این نکته برای کشت‌های سلولی بسیار حائز اهمیت است زیرا اگر نتیجه کشت سلولی آن‌چنان که گزارش شده است نباشد کار، کاملاً بی‌ارزش بوده و اتلاف هزینه می‌باشد. در حال حاضر شواهدی دال بر آلودگی متقاطع رده‌های سلولی وجود دارد، به خصوص برای HeLa که بالغ بر ۱۶ رده سلولی به بانک سلولی اروپا ارائه شده است که پروفایل DNA آن مشابه HeLa می‌باشد. آزمایشاتی که برای مستندسازی (معتبرسازی) سلول‌ها استفاده می‌شود عبارتند از:



۱-۱۸-۵) بررسی‌های ایزوآنزیمی

ایزو آنزیم‌ها گروهی از آنزیم‌ها هستند که در گونه‌های متفاوت جانداران وجود دارند و دارای خصوصیات کاتالیتیکی مشابه هستند اما به لحاظ ژنتیکی و ساختمانی متفاوت می‌باشند. با مطالعه ایزوآنزیم‌های موجود در رده‌های سلولی، امکان شناسایی گونه‌هایی که رده‌های سلولی از آن‌ها مشتق شده‌اند وجود دارد. تکنیک آنالیز ایزوآنزیمی همچنین به عنوان ابزار شناسایی آلودگی‌های متقاطع رده‌های سلولی استفاده می‌شود. با استفاده از تکنیک‌های کروماتوگرافی و یا الکتروفورز، می‌توان فعالیت آنزیمی سلول‌ها را بررسی و از نظر کیفی آن‌ها را با هم مقایسه نمود. اصول کار بر اساس نحوه مهاجرت مولکول آنزیم‌های سلول‌ها بر روی ژل الکتروفورز می‌باشد که به زیموگرام مشهور است. با مطالعه ایزوآنزیمی تیره‌های مختلف سلولی می‌توان منشاء بافتی و حتی گونه جانوری سلول را تعیین کرد. در این میان بررسی ایزوآنزیم‌های استراز، پورین نوکلئوتید فسفوریلاز، گلوکز شش فسفات دهیدروژناز و لاکتات دهیدروژناز اهمیت بیشتری دارند. اصول آنالیز ایزوآنزیمی شامل موارد ذیل می‌باشد:

۱. هر ایزوآنزیم دارای جایگاه چندگانه ژنی می‌باشد که برای پلی‌پپتیدهای متفاوت با فعالیت آنزیمی مشابه، کد خاصی را ایجاد می‌کند، به عنوان مثال: لاکتات دهیدروژناز.
۲. تغییر در سرعت مهاجرت الکتروفورزی به ترکیب زیر واحدهای آنزیم بستگی دارد. لاکتات دهیدروژناز دارای ۵ ایزوآنزیم می‌باشد.

۳. گونه‌های متفاوت، ترکیبات متفاوتی از این ایزوفرم‌ها را دارا هستند.
۴. با استفاده از مجموعه خاصی از ۴ ایزوآنزیم می‌توان گونه‌هایی که از یک منبع منشاء گرفته‌اند را شناسایی نمود.

۲-۱۸-۵) بررسی‌های سیتوژنیک و کاریوتایپینگ

شکل و تعداد کروموزوم‌های سلول‌های یک موجود، کاریوتایپ نامیده می‌شود. کاریوتایپ گونه‌های مختلف موجودات، کاملاً با هم متفاوت بوده و از این اختلاف می‌توان برای تعیین هویت رده‌های مختلف سلولی استفاده نمود. با تجزیه تحلیل کروموزوم‌ها می‌توان جنسیت و حتی سرطانی بودن سلول‌ها را مشخص کرد. برای بررسی کروموزوم‌ها بایستی چرخه‌ی سلولی در مرحله متافاز میتوز، متوقف شوند. در این مرحله، کروموزوم‌ها از دو کروماتید خواهری تشکیل شده‌اند. از این کروموزوم‌ها عکس برداری شده و سپس عکس‌ها بر اساس شکل کروموزوم و جایگاه سانترومر طبقه‌بندی شده و مورد بررسی قرار می‌گیرند.

۳-۱۸-۵) شاخص‌های آنتی‌ژنیک

بسیاری از سلول‌ها، دارای شاخص‌های سطحی اختصاصی هستند. از سال ۱۹۷۵ با معرفی تکنیک آنتی‌بادی منوکلونال شناسایی اختصاصی این شاخص‌ها بسیار آسان شده است. این آنتی‌بادی‌ها به صورت اختصاصی به مولکول‌های هدف خود متصل می‌شوند و می‌توانند به صورت غیرمستقیم به مولکول‌های نشان‌دار نظیر مواد فلورسنت متصل شوند. تکنیک‌های



ایمونوفلورسنت کاربرد زیادی در شناسایی مولکول‌های سطحی و آنتی‌ژن‌ها دارند.

۴-۱۸-۵) پروفایل DNA

مقدار DNA در سلول‌هایی نظیر فیبروبلاست‌ها و گلیای انسانی، فیبروبلاست جوجه و هامستر چینی معمولاً پایدار است ولی در بعضی از رده‌های سلولی مانند سلول‌های سرطانی و یا سلول‌های موش، متغیر می‌باشد. مقدار DNA را می‌توان با اندازه‌گیری رده‌های سلولی رنگ‌آمیزی شده با فولژن^۱ از طریق میکرودانسیتومتري، با استفاده از اتیدیوم بروماید و میکروفوتومتري و یا با استفاده از فلوسایتومتري تعیین نمود. با استفاده از این تکنیک‌ها می‌توان موارد زیر را انجام داد.

۱. شناسایی رده‌های سلولی متفاوت از گونه‌های مشابه

۲. تأیید هویت رده‌های سلولی موجود در بانک‌های سلولی در مقایسه با ذخایر اصلی مرجع

۳. شناسایی آلودگی‌های متقاطع

هم‌اکنون انگشت نگاری DNA^۲ از چندین جایگاه و تهیه پروفایل DNA، متدهای رایجی در بانک‌های سلولی معتبر می‌باشند. در این روش‌ها از مجموعه‌ای از پرایمرها برای شناسایی میکروساتالایت‌ها، با استفاده از

1. Feulgen

2. Finger Printing

PCR و تکنیک‌های سکوانس کردن DNA استفاده می‌شود. پرایمرها منحصر به گونه‌ها هستند و فقط برای رده‌های سلولی انسانی استفاده می‌شوند. الگوهای حاصل به کد دیجیتالی ترجمه شده و می‌توان به آسانی یک بانک اطلاعاتی درست نمود و با سایر پروفایل‌ها مقایسه کرد.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

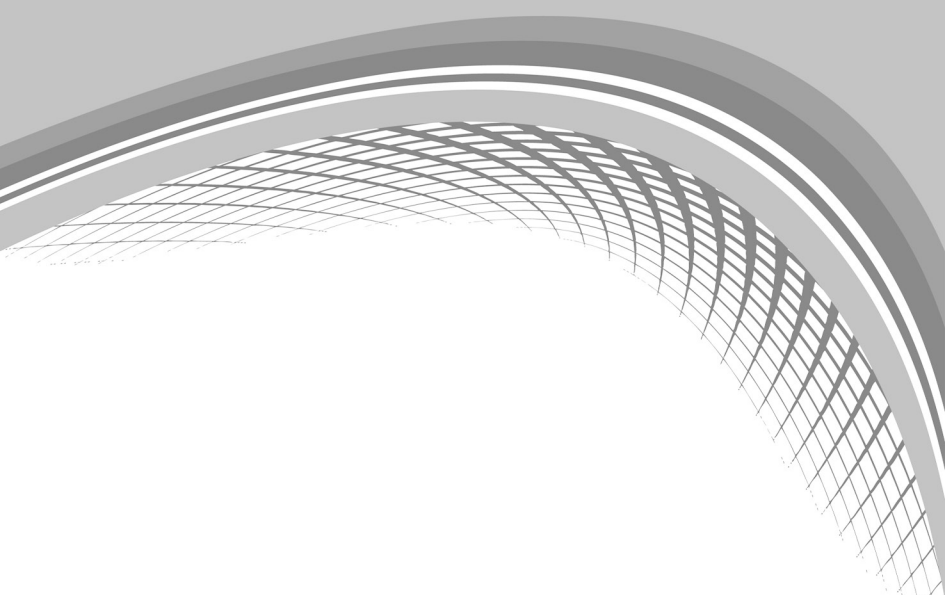
.....

.....

.....

فصل ششم

دستورالعمل‌ها



۱-۶) استریل کردن محلول‌ها و وسایل کار

یکی از مهم‌ترین اقدامات در آزمایشگاه کشت سلولی، استریل کردن وسایل، مواد شیمیایی و محلول‌هاست. بسیاری از مواد و وسایل به‌صورت استریل تهیه می‌شوند اما برای استریل کردن بافرهایی که در آزمایشگاه تهیه می‌شوند و وسایل شیشه‌ای و فلزی چند بار مصرف، باید به نکاتی توجه کرد:

۱. برای وسایل و موادی که به حرارت مقاوم هستند می‌توان از روش استریل کردن با حرارت استفاده کرد. برای وسایل شیشه‌ای مقاوم به حرارت و فلزی بهترین روش استفاده از حرارت خشک و فور است. وسایل درون فویل آلومینیم پیچیده شده و یا در



ظروف استیل قرار گرفته و سپس به مدت ۲ ساعت در ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده می‌شوند. وسایل پس از سرد شدن از فور خارج و استفاده می‌شوند.

۲. برای وسایل و محلول‌های شیمیایی مقاوم به حرارت، از حرارت مرطوب یا اتوکلاو استفاده می‌شود. حرارت ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در فشار ۱۵ psi برای محلول‌ها و برای وسایلی که در پلاستیک‌های مخصوص اتوکلاو قرار گرفته‌اند، دمای ۱۲۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه کافی است. باید به حجم محلول‌ها و میزان تبخیر که در غلظت نمک‌ها اثر می‌گذارند توجه شود. درب ظروف حاوی محلول‌ها، درون اتوکلاو نباید به صورت محکم گذاشته شود زیرا در اثر فشار زیاد احتمال شکستن و ترکیدن ظروف وجود دارد. زمانی که که دمای اتوکلاو به ۸۰ درجه سانتی‌گراد رسید می‌توان درب اتوکلاو را باز نمود و وسایل را خارج نمود. قبل از استفاده، وسایل و محلول‌ها باید سرد شوند.

۳. برای محلول‌های حساس به حرارت، برای استریل کردن از فیلتراسیون استفاده می‌شود. فیلترهای با اندازه منافذ $0.2 \mu m$ به صورت سرنگی و یا برای استفاده در پمپ‌های خلاء وجود دارند که بسته به حجم محلول انتخاب می‌شوند. فیلتراسیون در زیر هودهای استریل BSC انجام می‌شود.

۴. بعضی محلول‌ها مانند محلول‌های گلوکز دارای مقاومت نسبی به



حرارت هستند و بهتر است در دمای پایین‌تری حرارت داده شوند. مثلاً ۱۱۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ دقیقه در فشار ۱۰ psi و یا از فیلتراسیون استفاده شود.

۵. باید تاریخ استریل کردن بر روی وسایل و محلول‌هایی که استریل می‌شوند قید شود.

۶. بافرهای تهیه شده، در شرایط مناسب نگهداری شوند مانند نگهداری در یخچال و دور از نور مستقیم آفتاب و UV تا از ایجاد مواد سمی احتمالی جلوگیری شود.

۷. پس از استریل کردن محلول‌ها، باید از استریل بودن آن‌ها مطمئن شد. می‌توان مقدار کمی از آن را در ظرف کوچکی و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری نمود. ایجاد کدورت نشانه‌ی آلودگی است.

۸. هیچ‌گاه تمام محلول‌های استریل شده را در یک ظرف نگهداری نکنید. بهتر است در ظرف‌های با حجم کمتر تقسیم کرده تا از آلودگی احتمالی همه‌ی محلول در حین کار کردن جلوگیری شود.

۹. برای استریل کردن فضای آزمایشگاه از لامپ‌های UV عمودی قابل حرکت می‌توان استفاده کرد.

۱۰. افزودن آنتی‌بیوتیک‌ها به محلول‌های کشت برای حفظ استریلیتی و نیز شستشوی سلول‌ها و بافت‌های اولیه با مخلوط آنتی‌بیوتیک‌ها



- در کنترل آلودگی‌ها مهم هستند.
۱۱. قبل از شروع کار، سطح هود باید با الکل ۷۰٪ تمیز گردد (طلق هود در اثر الکل کدر و خراب می‌شود).
۱۲. دستکش‌ها با الکل ۷۰٪ تمیز شود و بعد از ۳۰ ثانیه و خشک‌شدن شروع به کار شود.
۱۳. در هنگام کار دستکش و یا دست خود را به وسایل بیرون از هود و نیز صورت و موهایتان نزنید و در صورت تماس، مجدداً با الکل ۷۰٪ ضدعفونی شود. دستکش‌ها پس از کار حذف شوند.
۱۴. از حرکات سریع که باعث اختلال در جریان هوای هود می‌شود ممانعت گردد.
۱۵. از صحبت کردن، عطسه و سرفه خودداری شود.
۱۶. بعد از اتمام کار تمام وسایل و مواد قبل از خروج از زیر هود، ضدعفونی شوند و سطح هود با الکل ۷۰٪ اسپری و با دستمال تمیز شود.
۱۷. با روشن‌گذاشتن لامپ UV زیر هود به مدت ۳۰-۱۰ دقیقه، هود استریل گردد. وسایل پلاستیکی اگر به مدت زیاد در معرض نور UV باشند ترک برداشته و می‌شکنند.



۶-۲) تهیه محلول‌ها و محیط‌های مورد استفاده در کشت سلول

قبل از انجام کشت سلولی، نیاز به فراهم کردن موادی است که یا به صورت آماده در بازار وجود دارند و یا این که این مواد را باید به صورت اجزاء جداگانه‌ای تهیه نمود و سپس طی دستورالعمل از پیش تعیین شده‌ای آن‌ها را به صورت مورد نیاز درآورد.

بهتر است بافرها و مواد به صورت غلیظ و استریل تهیه شده و در ظرف‌های کوچک‌تر تقسیم و در شرایط مناسب دمایی نگهداری شوند. ضمناً مشخصات کامل محلول و حتی دستور مصرف نهایی آن بر روی ظروف نوشته شود. این کار ضمن صرفه‌جویی در زمان، سبب کاهش احتمال آلودگی و یکنواخت شدن شرایط آزمایش‌ها می‌شود.

در این جا به نحوه‌ی تهیه برخی از مواد و محلول‌هایی که جهت استفاده در محیط کشت نیاز هستند اشاره می‌شود:

۱-۲-۶) آنتی‌بیوتیک‌ها

جدول ۶-۱ تعدادی از پرمصرف‌ترین آنتی‌بیوتیک‌ها و شرایط حلالیت و غلظت پیشنهادی محلول‌های آن‌ها را نشان می‌دهد. توجه به نیمه‌عمر آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار مهم است. معمولاً در آزمایشگاه مخلوطی از چند آنتی‌بیوتیک به صورت غلیظ تهیه و با فیلتر استریل شده و با توجه به رقت آن به محیط کشت اضافه می‌شود. مشخصات برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها و راهنمای استفاده از آن‌ها در جدول ۶-۱ آمده است.

غلظت پیشنهادی نهایی	مکانیسم عمل	نوع میکروب‌های تحت تأثیر	پایداری در محیط کشت (روز)	حالات	آنتی‌بیوتیک
۲.۵ mg/l	با نفوذپذیری غشاهای قارچ‌ها با اتصال به استرول‌ها تداخل می‌کند.	قارچ‌ها و کپک‌ها	۳	DMSO	Amphotericin B
۱۰۰ mg/l	با مرحله‌ی آخر سنتز دیواره‌ی سلولی باکتری‌ها تداخل می‌کند.	باکتری‌های گرم مثبت و منفی	۳	H ₂ O	Ampicillin
۵۰ mg/l	با نفوذپذیری غشاهای قارچ‌ها با اتصال به استرول‌ها تداخل می‌کند.	قارچ‌ها و کپک‌ها	۵	H ₂ O (سوسپانسیون)	Nystatin
۱۰۰۰۰۰ unit/l	با مرحله‌ی آخر سنتز دیواره‌ی سلولی باکتری‌ها تداخل می‌کند.	باکتری‌های گرم مثبت	۳	H ₂ O	Penicillin G
۱۰۰ mg/l	به جزء S _{۳۰} ریبوزوم‌ها چسبیده و سبب اشتباه خوانده‌شدن کدها می‌شود.	باکتری‌های گرم مثبت و منفی	۳	H ₂ O	Streptomycin sulfate
۵ µg/ml	مانع از طول‌شدن پروتئین‌ها می‌شود.		۵	H ₂ O+NaOH	Chloramphenicol
۵۰ mg/l	به جزء S _{۳۰} ریبوزوم‌ها چسبیده و مانع سنتز پروتئین‌ها می‌شود.	باکتری‌های گرم مثبت و منفی، مایکوپلاسماها	۵	H ₂ O	Gentamicin

جدول ۱-۶: راهنمای مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در کشت سلولی



۶-۲-۲) بافر فسفات نمکی (PBS) ۱ مولار

مقدار	نام ماده	نکات
۸۰ گرم	NaCl	مواد ذکر شده را در حدود ۸۰۰ ml آب مقطر دیونیزه و با استفاده از همزن حل نموده و pH آن، حدود ۷/۴ تنظیم شود. حجم آن به ۱ لیتر رسانده شود. برای تهیه ۱۲۵/۰ مولار که غلظت مناسب برای کشت سلولی است باید بافر تهیه شده را ۸:۱ رقیق نمود. این بافر را در اتوکلاو، استریل نموده، در ظرف‌های کوچک‌تر تقسیم و در یخچال نگهداری شود.
۲ گرم	KCl	
۱۱/۵ گرم	Na ₂ HPO ₄	
۲ گرم	KH ₂ PO ₄	

جدول ۶-۲

۶-۲-۳) تریپان بلو

۰/۴ گرم تریپان بلو را در ۱۰۰ ml محلول PBS ۱۲۵/۰ مولار حل نموده و سپس با فیلتر استریل نمود. بهتر است در ظرف‌های کوچک‌تر تقسیم شود و از آلودگی در حین کار جلوگیری شود.

۶-۲-۴) تریپسین

مقدار	نام ماده	نکات
۲/۵ گرم	پودر تریپسین	مواد ذکر شده به حجم یک لیتر رسانده و بر روی همزن مغناطیسی حل شود. سپس محلول آماده شده را با فیلتر ۲۰۰ استریل کرده و در ظروف کوچک تقسیم کرده و در ۲۰°C- نگهداری شوند.
۲ گرم	EDTA ^۲	
۸/۵ گرم	NaCl	

جدول ۶-۳

1. Phosphat Buffer Saline
2. Ethylenediaminetetraacetic acid

۵-۲-۶) محلول غلیظ L- گلوتامین ($100 \times$)

۳ گرم پودر گلوتامین را در ۱۰۰ ml آب مقطر دیونیزه حل نموده و با فیلتر ۰/۲ استریل و در حجم‌های کم تقسیم شده و در فریزر نگهداری شود.

۶-۲-۶) محلول انجماد سلولی

مقدار	نام ماده	نکات
۹۰ ml	FCS	محلول انجماد در شرایط استریل تهیه شده و به حجم‌های کمتر تقسیم شود و در فریزر نگهداری گردد.
۵ ml	محیط کشت RPMI کامل	
۵ ml	DMSO ^۱	

جدول ۴-۶

۷-۲-۶) آماده‌سازی محیط کشت

محیط‌های کشت را می‌توان به صورت محلول آماده و یا پودر خریداری نمود. در هر دو صورت باید به دستورالعمل شرکت، توجه دقیقی نمود و مخصوصاً نیاز به افزودنی‌هایی مانند گلوتامین و بی‌کربنات سدیم و نیز درجه‌ی غلظت آن توجه کرد. در این جا طرز تهیه‌ی محیط RPMI از پودر آن آورده می‌شود.

1. Dimethyl sulfoxide

۸-۲-۶ محیط RPMI 1640

مقدار ۱۰/۴۴ گرم پودر RPMI 1640 را به ۶۰۰ ml آب مقطر دیونیزه استریل اضافه کرده و با همزن مغناطیسی همزده و سپس ۲ گرم بی کربنات سدیم^۱ به محلول اضافه شود. سپس pH محیط به کمک (۱ M) NaOH یا (۱ M) HCl در حدود ۷ تا ۷/۲ تنظیم می شود. حجم محیط کشت با آب مقطر دیونیزه به یک لیتر رسانده شده و از فیلتر با منفذ ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده و استریل شود. در حین فیلتراسیون، pH محلول کمی افزایش یافته و به ۷/۴ می رسد.

سپس به این محیط، آنتی بیوتیک های مورد نظر و در صورت نیاز محلول L-گلوتامین استریل شده با فیلتر، با غلظت نهایی ۰/۳ g/l می افزاییم. برای تهیه ی محیط کامل حاوی سرم ۱۰٪، به ۹۰ ml از این محیط ۱۰ ml سرم FCS که قبلاً کمپلمان آن غیرفعال شده افزوده می شود. بهتر است محیط کامل به مقدار نیاز تهیه شود زیرا احتمال آلودگی وجود داشته، ضمن آن که آنتی بیوتیک ها غیرفعال می شوند. محیط کشت در یخچال و دور از نور نگهداری شود.

جهت کنترل آلودگی، مقدار ۵ میلی لیتر از محیط کشت آماده را در درون یک لوله استریل ریخته و در انکوباتور ۳۷°C به مدت ۲ روز نگهداری می کنیم تا اطمینان حاصل شود که آلودگی وجود ندارد.

1. NaHCO₃



۳-۶) احیای سلول‌های منجمد^۱

۱. محیط کشت کامل را به مقدار لازم درون فلاسک ریخته و به مدت

۲ ساعت درون انکوباتور CO_2 قرار داده تا pH بافری آن متعادل گردد.

۲. با حفظ کلیه‌ی شرایط ایمنی و با دستکش، کرایوتیوب حاوی سلول‌های منجمد شده را از مخزن انجماد (تانک ازت) خارج کرده و فوری وارد حمام آب گرم 37°C درجه سانتی‌گراد گردد تا در طی ۱ تا ۱/۵ دقیقه عمل ذوب انجام پذیرد. دقت شود که فقط نیمه‌ی پایین کرایوتیوب در آب قرار گیرد.

۳. ویال حاوی سلول با اتانول 70° شسته شود و به آرامی در آن باز شود.

۴. سوسپانسیون سلولی با پپیت استریل به یک لوله آزمایش استریل حاوی حدود ۱۰ ml محیط کشت وارد شود. دقت شود که سلول‌ها به آرامی به محیط اضافه شوند. هرگونه شدت عمل، سبب آسیب‌رسیدن به سلول‌ها می‌شود.

۵. سپس محتویات لوله سانتریفیوژ و قسمت رویی آن دور ریخته شود. این عمل، DMSO موجود در محلول انجماد را که برای سلول سمی است از محیط خارج می‌کند.



۶. سلول‌های ته‌نشین شده در مقداری از محیط کامل، معلق و وارد فلاسک کشت گردد.

بهتر است قبل از ورود به فلاسک، با رنگ تریپان بلو، درصد سلول‌های زنده و مرده و تعداد سلول‌ها را مشخص نمود.

۷. فلاسک در انکوباتور CO_2 نگهداری شده و روز بعد، از نظر کدورت و آلودگی بررسی گردد. اگر محیط کشت کدر به‌نظر رسید معمولاً نشانه‌ی آلودگی است و فلاسک باید سریعاً حذف گردد. اگر رنگ محیط کشت به زردی گراییده باشد نشانه‌ی اسیدی‌شدن محیط کشت بوده که نیاز به تعویض محیط کشت و یا پاساژ سلولی می‌باشد. اگر در بررسی میکروسکوپی، مشخص شد که سطح فلاسک کاملاً از سلول‌ها پوشیده شده است و "سلول‌ها به همدیگر رسیده‌اند"^۱ نیاز به تقسیم سلول‌ها و پاساژ آن‌ها می‌باشد.

✓ **میزان تلاقی سلول‌ها:** در کشت سلولی سلول‌های چسبنده، وقتی سطح ظرف کشت به‌طور کامل از سلول‌ها پوشیده شده باشد و فضای خالی موجود نباشد میزان تلاقی سلول‌ها ۱۰۰٪ محسوب می‌شود. برای برخی آزمایشات مانند بررسی آثار سیتوپاتیک ویروس‌ها، این میزان باید ۱۰۰٪ باشد و سپس ویروس اضافه شود.

-
1. Confluent
 2. Confluency



۴-۶) تعویض محیط کشت و پاساژ سلول‌های چسبنده

تعویض محیط کشت سلول‌های چسبنده، تنها با حذف محیط رویی و افزودن محیط جدید میسر است. نکته‌ی مهم این است که محیط کشت قبل از اضافه‌شدن، باید در انکوباتور CO_2 از نظر دما و قدرت بافری، به تعادل رسیده باشد تا از وارد آمدن شوک به سلول‌ها ممانعت شود.

برای پاساژ سلول‌های نوع چسبنده، ابتدا محیط کشت رویی سلول‌ها را خارج کرده و در شرایط استریل با افزودن ۳ ml سرم فیزیولوژی یا PBS، سلول‌ها شسته می‌شوند. شستشو باید کامل انجام شود. باقی‌ماندن حتی مقادیر جزئی از محیط کشت حاوی سرم، سبب غیرفعال شدن تریپسین می‌شود.

سپس به هر فلاسک کوچک (25 Cm^2) ۱ ml تریپسین اضافه کرده، درب فلاسک را بسته و به مدت ۱۰-۲ دقیقه در انکوباتور قرار می‌دهیم. مدت انکوباسیون به نوع سلول‌ها بستگی دارد. برخی از سلول‌ها به زمان بیشتری نیاز دارند و باید توجه داشت تریپسین می‌تواند به سلول‌ها آسیب برساند. وقتی محیط کشت، به‌نظر کدر شد و یا سلول‌ها به‌صورت لایه‌ای در حال جداشدن و ترک‌خوردن دیده شدند، زمان غیرفعال کردن تریپسین است. می‌توان فلاسک را زیر میکروسکوپ نیز کنترل نمود. زمانی که حدود ۴۰٪ سلول‌ها از کف فلاسک جدا شدند می‌توان با ضربات انگشت به فلاسک، بقیه‌ی سلول‌ها را از سطح جدا نمود.

برای غیرفعال کردن تریپسین و ممانعت از آسیب سلول‌ها، FCS یا محیط



کشت حاوی FCS به سلول‌ها اضافه می‌شود. سپس سلول‌ها را با پیپت از فلاسک به لوله‌ای استریل منتقل می‌کنیم. سلول‌ها را با دور ۱۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ نموده و شستشو می‌دهیم و سپس به روی سلول‌ها ۱ ml محیط کشت اضافه نموده، شمارش نموده و با محاسبه‌ی تعداد سلول‌ها، با افزودن محیط کشت، رقت مناسبی از سلول‌ها را تهیه کرده و به فلاسک‌های جدید منتقل می‌نماییم. برای سنجش تعداد سلول‌های زنده نیز می‌توان تست تریپان بلو را انجام داد.

۵-۶) پاساژ سلول‌های معلق

در مواردی که تنها نیاز به تعویض محیط کشت می‌باشد سلول‌ها سانتریفوژ شده و سپس محیط جدید به همان مقدار اولیه افزوده می‌شود. پاساژ سلول‌های معلق مانند لنفوسیت‌ها، تنها شامل جمع‌آوری با سانتریفوژ، شمارش سلولی و رقیق نمودن سلول‌ها با افزودن محیط کشت می‌باشد. میزان سلول وارد شده به فلاسک جدید، به مساحت فلاسک، نوع ظرف و نوع سلول بستگی دارد.

۶-۶) انجماد سلول‌ها

۱. برای انجماد و نگهداری سلول‌ها، باید سلول‌ها شاداب و در فاز لگاریتمی باشند.
۲. سلول‌ها، جمع‌آوری و شمارش شده و غلظت سلول‌ها را محاسبه کرده و سپس به هر ml از محیط انجماد، تعداد 10^6 - 10^7 عدد سلول



زنده اضافه شود.

۳. درب هر کرایوتیوب را محکم بسته و بر روی آن مشخصات سلول و تاریخ و یا کد شناسایی سلول، ذکر شود.

۴. کرایوتیوب به مدت ۱۵ الی ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شود.

۵. کرایوتیوب‌ها حدود ۳ ساعت در فریزر ۲۰- نگه‌داری شوند.

۶. کرایوتیوب‌های منجمد شده برای چند ساعت در گاز نیتروژن (قسمت بالایی تانک ازت) و یا ۱۲ تا ۲۴ ساعت در فریزر ۷۰- قرار داده شوند.

۷. کرایوتیوب‌ها سپس به داخل مایع نیتروژن منتقل گردند.

✓ انجام سلولی به آرامی و ذوب کردن سلول‌ها به سرعت انجام می‌شود.

۶-۷) حمل و نقل سلول‌ها

ظروف مخصوص برای انتقال کرایوتیوب‌های مختلف، حاوی سلول‌های منجمد، موجود هستند. این ظروف حاوی ماده جاذبی است که با نیتروژن مایع اشباع شده است. انتقال سلول‌های منجمد، به وسیله‌ی تانک‌های کوچک نیتروژن که به راحتی قابل حمل هستند نیز انجام می‌شود.

حمل سلول‌های تازه‌ی معلق، در لوله‌های کشت و حمل سلول‌های تازه‌ی چسبنده در همان فلاسک رشد پیدا کرده نیز انجام می‌گردد. در هر دو حالت، ظروف کشت، از محیط کشت تازه پر شده و درب آن محکم و با پارافیلیم مسدود



می‌شود. بهتر است سلول‌ها در حال لگاریتمی برای انتقال، انتخاب شوند.

۸-۶) بررسی کیفیت سلول‌ها

کیفیت سلول‌ها با بررسی مرفولوژی، میزان چسبندگی بر بستر و میزان گرانوله شدن سیتوپلاسم و هسته، مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. سلول‌های شاداب در زیر میکروسکوپ، ظاهری درخشان دارند و سیتوپلاسم آن‌ها شفاف و فاقد گرانول می‌باشد. سلول‌های وابسته به بستر، اگر شادابی خود را از دست بدهند از کف جدا می‌شوند و درصد سلول‌های شناور آن زیاد می‌شود. برای بررسی سلول‌ها، داشتن اطلاعاتی مانند نوع سلول، میزان چسبندگی و معلق بودن آن ضروری است.

۹-۶) بررسی کمیت سلول‌ها به روش MTT assay^۱

۱-۹-۶) بافر گلیسین

مقدار	نام ماده	نکات
۰/۵۸۴ g	NaCl	مواد ذکر شده در ۹۰ ml آب مقطر حل شده
۰/۷۵ g	گلیسین	و pH آن با استفاده از NaOH در ۱۰/۵ تنظیم شود و سپس به حجم نهایی ۱۰۰ ml رسانده شود.
۱۰۰ ml	آب مقطر دیونیزه	

جدول ۵-۶

1. [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide]

۲-۹-۶) سوسپانسیون MTT

۵ mg از پودر MTT به یک ml محلول PBS افزوده شده و با همزن مغناطیسی تا حد امکان حل می‌شود. برای جلوگیری از تبخیر حتماً در ظرف دربسته این کار انجام شود. محلول حاصل از فیلتر ۰/۲۲ عبور داده شده و سپس در حجم‌های کم تقسیم و در 20°C - نگهداری شوند. با توجه به حساسیت MTT به نور بهتر است در لوله‌های تیره نگهداری شوند و یا سطح لوله‌ها با فویل آلومینیمی پوشیده شوند.

MTT نمک زرد رنگ تترازولیوم محلول در آب است. وقتی این ترکیب در محیط محلول نمکی فاقد فنل رد قرار گیرد محلول زرد رنگی حاصل می‌شود. این ترکیب در میتوکندری سلول‌های زنده، توسط آنزیم دهیدروژناز تبدیل به ترکیب نامحلولی به نام فرمازان می‌شود که این محصول توسط حلال‌هایی مانند ایزوپروپانل اسیدی یا DMSO حل شده و رنگ ارغوانی-بنفش را ظاهر می‌سازد. جذب این رنگ در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر یا دستگاه قرائت‌کننده‌ی پلیت الیزا اندازه گرفته می‌شود. فاکتورهای مؤثر در MTT عبارتند از:

۱. **تعداد سلول:** تعداد سلول بر حسب نوع سلول متفاوت است. معمولاً برای انواع سلول‌های هیبریدوما، سلول‌های توموری و فیبروبلاست، تعداد 5×10^3 سلول برای هر حفره استفاده می‌شود. اما به کارگیری سلول کمتر تا حدود ۱۰۰۰ سلول نیز قابل قبول است. هرچه تعداد سلول بیشتر باشد جذب نوری بالاتر خواهد بود



و باید دقت کرد که اگر تعداد سلول بالاتر از حد لازم باشد باعث خطا در آزمایش خواهد شد.

۲. **غلظت MTT:** غلظت رنگ بسته به نوع سلول متفاوت است. بنابراین بسته به نوع سلول، غلظت باید ارزیابی شود. معمولاً غلظت ۱-۵ mg/ml مورد مصرف قرار می گیرد.

۳. **مدت انکوباسیون:** معمولاً ۲-۴ ساعت انکوباسیون سلول ها همراه با رنگ کافی است.

۴. **نوع حلال:** معمولاً از حلال ایزوپروپانل اسیدی و یا از حلال DMSO همراه با بافر گلیسین NaCl و $\text{pH} = 7.4$ استفاده می شود. حالیت فرمازان تولید شده با ایزوپروپانل کمتر بوده و همچنین رنگ حاصل به دلیل تبخیر سریع ایزوپروپانل پایدار نیست. در صورتی که حالیت با DMSO بسیار بیشتر و رنگ حاصل نیز پایدارتر است.

۵. **اثر بافر NaCl- گلیسین بر افزایش حالیت:** مطابق مطالعات، جذب نوری در حضور بافر گلیسین همراه با DMSO بیشتر از DMSO، به تنهایی است.

۶. **اثر pH بافر گلیسین بر حالیت فرمازان:** اگر فرمازان تنها در DMSO حل شود دارای دو جذب ماکزیمم است و در صورتی که pH افزایش یابد منحنی به سمت راست متمایل می شود و فقط یک جذب ماکزیمم می دهد.



روش کار

تست MTT به صورت تکرار سه تایی مطابق مراحل زیر انجام می‌شود:

۱. تهیه سوسپانسیون سلولی در رقت مناسب از سلول‌ها که با شمارش سلولی حاصل می‌شود.

۲. افزودن مقدار $200 \mu\text{l}$ از سوسپانسیون سلولی به هر حفره از پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت سلولی. برای این که در هر حفره تحقیقاً تعداد 5×10^3 سلول قرار گیرد، انجام تست تریپان بلو و شمارش تعداد سلول‌ها ضروری است.

۳. انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت برای اطمینان از چسبیدن سلول‌ها به بستر در انکوباتور $5\% \text{CO}_2$ و با رطوبت 100% .

۴. پس از ۲۴ ساعت محیط کشت را از حفرات خارج کرده و اگر سلول‌ها به حفرات چسبیده باشند می‌توان با وارونه کردن پلیت این کار را انجام داد و اگر سلول‌ها، معلق باشند با استفاده از سانتریفوژهای مخصوص پلیت این کار انجام می‌شود. سپس $200 \mu\text{l}$ محیط کشت تازه به هر حفره اضافه شود.

۵. به هر حفره $20 \mu\text{l}$ رنگ MTT اضافه می‌شود. پلیت در فویل آلومینیومی پوشیده شده و به مدت چهار ساعت در انکوباتور انکوبه می‌شود.



۶. پس از طی زمان، محیط کشت سلول‌ها را خالی کرده و به هر حفره $100 \mu\text{l}$ از DMSO و $10 \mu\text{l}$ بافر گلايسين اضافه می‌کنیم.

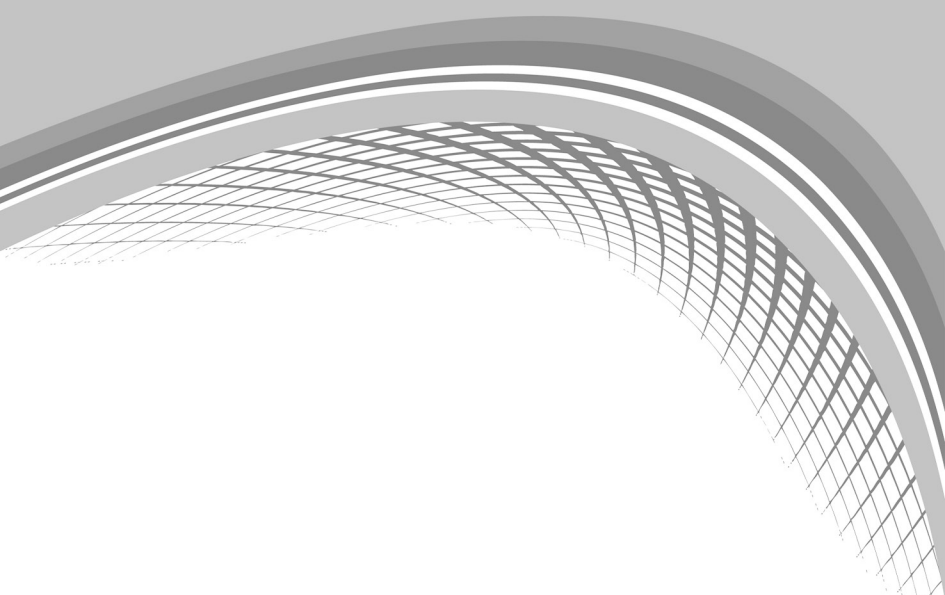
۷. با سمپلر، محیط و سلول‌ها را خوب مخلوط می‌کنیم تا رنگ‌های تولید شده حل شوند.

۸. جذب نوری هر حفره، توسط اسپکتروفتومتر در طول موج 570 nm قرائت می‌شود.

۹. در مقایسه با شاهد و کنترل‌های مثبت و منفی می‌توان منحنی‌های مربوطه را رسم نمود.

✓ این روش به‌خصوص برای بررسی آثار سمی مواد و داروها بر روی سلول‌ها کارآیی دارد.

منابع

- 
1. ECACC Handbook – Fundamental Techniques and Protocols for ECACC Cell Lines.
 2. Cell culture Basics handbook, Gibco Company.
 3. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 4th Edition, R. Ian Freshney.
 4. Introduction to plant tissue culture, M. K. Razdan.
 5. Principles of Animal Cell Culture , B. K. Sinha, R. Kumar.

۶. روش‌های بنیادی کشت یاخته‌های جانوری، نعمت الله خوانساری و مرتضی شمشیری

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

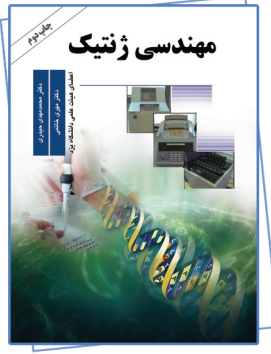
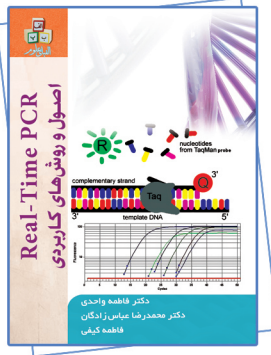
.....

.....

.....

.....

بخشی از سایر عناوین منتشره



شماره اثر ۲۹

ABC of Cell Culture

www.varamed.com

ISBN: 978-600-6252-19-3



انتشارات وارسنگان

انتشارات ورامد