

فهرست:

۱	معرفی مرکز تحقیقات سلولی مولکولی
۱	تاریخچه مرکز
۱	اهداف مرکز
۱	فعالیت های مرکز
۱	الویت های پژوهشی مرکز
۳	مقدمه
۷	سفارش رده سلولی
۷	وسایل مورد نیاز برای کشت سلولی
۹	محیط کشت
۱۳	چگونه یک محیط کشت مناسب را برای کار انتخاب کنیم؟
۱۵	سرم
۱۵	آنتی بیوتیک
۱۸	منحنی رشد سلول (Cell growth curve)
۲۱	چگونگی اندازه گیری تعداد سلول و درصد زنده ماندن (Viability)
۲۲	لام هموسیتومتر (Neubauer Slide)
۲۶	پاساژ دادن (Sub culturing)
۲۷	پاساژ دادن سلول های چسبنده
۲۸	پاساژ دادن سلول های غیر چسبنده
۳۱	فریز کردن (Cryopreservation)
۳۵	دفریز کردن سلول ها

معرفی مرکز تحقیقات سلولی مولکولی:

تاریخچه مرکز

مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند در تاریخ ۹۲/۴/۱ شروع به کار کرده است، همچنین این مرکز در مورخ ۹۵/۷/۲۵ به تصویب شورای گسترش دانشگاه های علوم پزشکی وزارت بهداشت رسیده است. این مرکز امیدوار است با بهره گیری از پتانسیل های اعضای هیئت علمی و سایر محققین بتواند در آینده به عنوان مرکز پیشرو، خلاق و معتبر در زمینه انجام پژوهش های بنیادی و کاربردی در حوزه شناخت اساس سلولی و مولکولی بیماری ها مطرح گردد. همچنین امید است با تربیت پژوهشگران مجرب در زمینه فناوری های نوین نظیر بیوتکنولوژی، نانو تکنولوژی، ژن درمانی، سلول درمانی و ... بتواند در پیشبرد اهداف نقشه جامع علمی کشور مشرک باشد.

اهداف مرکز

- الف) توسعه و بکارگیری دانش محققان در تحقیقات سلولی و مولکولی
- ب) انجام پژوهش های علمی (بنیادی- کاربردی)، به منظور گسترش شناخت بیماری ها و کاربرد روش های درمانی مناسب
- ج) ایجاد بانک اطلاعاتی (جمع آوری، تنظیم، طبقه بندی اسناد، مقالات و مدارک) مرتبط با تحقیقات سلولی و مولکولی
- د) جذب و استفاده از استعداد های بالفعل و بالقوه تحقیقاتی
- ه) کوشش در جلب همکاری و ارتباط با سایر مراکز آموزشی و تحقیقاتی داخل و خارج کشور
- م) که در زمینه های آموزشی و تحقیقاتی سلولی و مولکولی فعالیت می کنند
- و) تربیت نیروی انسانی محقق در مقاطع کارشناسی ارشد (M.Sc) و دکتری تخصصی (Ph.D) مرتبط با فعالیت مرکز

فعالیت های مرکز

- برگزاری ژورنال کلاب و کارگاه ها
- همکاری نزدیک با آزمایشگاه جامع تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی بیرجند
- همکاری با مرکز تحقیقات بن یاخته

الویت های پژوهشی مرکز

- کاربرد بیوانفورماتیک در علوم پزشکی
- پیشگیری، تشخیص و درمان سرطان ها
- تشخیص و درمان مولکولی انواع بیماری ها

مقدمه



مقدمه :

برای نخستین بار در سال ۱۹۰۷ کشت بافت توسط Harrison ابداع و به کار گرفته شد. در این روش مطالعه رفتار و سلولهای جانوری به صورت مستقل از تغییرات ناشی از هموستاز طبیعی بدن و یا استرسهای ناشی از آزمایش صورت گرفت.

کشت سلول به کشت حاصل از سلولهای جدا شده از بافت اولیه اطلاق می شود که از طریق تجزیه شیمیایی، مکانیکی یا آنزیمی حاصل می شود. در حالی که اصطلاح کشت اندام بیانگر کشت سه بعدی بافت است که تمام یا برخی از ویژگیهای بیولوژیکی بافت در *in vivo* را دارا می باشد. اصطلاح کشت بافت گونه *Histotypic culture* به مجموعه سلولی اطلاق می شود که مجدداً ساختمان سه بعدی شبیه بافت را ایجاد کرده اند کشت اندام گونه یا *Organotypic culture* نیز ساختمان مشابه بافت می باشد که عناصر تشکیل دهنده آن از رده های سلولی متفاوت می باشد. نظیر کشت کراتینوسیت های اپیدرم به همراه فیبروبلاست های پوست. هر چند *Harrison* به دلیل عدم نیاز به انکوباسیون، بافت قورباغه را برای کشت انتخاب کرد ولی به زودی کشت بافت حیوانات خونگرم نظیر جوجه، موش و غیره جهت ایجاد رده های سلولی مد نظر قرار گرفت. با پی بردن به این نکته که می توان از تومورهای انسان رده های سلولی پایدار بدست آورد (برای مثال رده سلولی *Hela* که توسط *Gey* و همکارانش در سال ۱۹۵۲ ایجاد شد) کشت سلولهای انسانی آغاز و با تهیه محیط های کشت اختصاصی و عاری از سرم رونق بیشتری گرفت. به دنبال کشت سلولهای پستانداران، امروزه به دلیل امکان بیان ژن توسط وکتورهای ویروسی در سلولهای حشرات و نیز مطالعات به عمل آمده در خصوص محیط زیست دریایی کشت سلولهای حشرات و ماهیان نیز مورد توجه خاص قرار گرفته است، هر چند محیط کشت اختصاصی اینگونه سلولها هنوز به اندازه کافی و به صورت تجاری در دسترس نمی باشد. در حال حاضر روشهای کشت سلول در زمینه های مختلف علوم بیولوژی، بیوتکنولوژی و نانوتکنولوژی مورد بهره برداری قرار می گیرد که از آن جمله می توان به مطالعات مربوط به سرطان، ویروس شناسی، تولید واکسن های سلولی، تولید آنتی بادیهای منوکلونال، تولید رده های سلولی از پیش سازهای سلولهای خونی، انتقال و بیان ژن، مطالعه مکانیسم واکنشهای داخل سلولی و بین سلولی، تولید و تمایز سلولهای بنیادی، تولید لایه های اپیدرم و سلولهای آندوتلیال که نوع اخیر می تواند به مویرگها تبدیل شود و بالاخره ایجاد تغییرات ژنتیکی در سلولهای خودی و بازگرداندن آنها

به فرد بیمار اشاره نمود .

استفاده از روش های کشت سلول برای انجام مطالعات مختلف از مزایای چندی برخوردار است که از جمله می توان موارد زیر را نام برد :

- امکان کنترل فیزیکی و شیمیایی محیط شامل pH، دما، فشار اسمزی و فشار O_2 , CO_2 و نیز کنترل سایر شرایط فیزیولوژیک
- همگن سازی سلولها و امکان دسترسی مستقیم سلولها به مواد مورد نظر
- عدم وجود محدودیتهای کار بامدلهای حیوانی
- امکان ایجاد مدلهای In vivo به صورت Organotypic و Histotypic



اولین دوره کارگاه تئوری و عملی آشنایی با اصول کشت سلول
مدرس دکتر الهام چمنی
۱۹ آبان ۱۳۹۵



دانشگاه علوم پزشکی
معاونت تحقیقات و فناوری

سفارش رده سلولی



سفارش رده سلولی:

برای سفارش سلول، پس از تعیین رده سلولی با توجه به نوع کار پژوهشی، به سایت انستیتو پاستور به آدرس <http://fa.pasteur.ac.ir/pages.aspx?Id=743> مراجعه و درخواست آنلاین خرید سلول توسط استاد مربوطه کامل می گردد. به دلیل این که فرم قبول مسئولیت سلول با پاتوژنیسیته باید حتماً ارسال گردد، این درخواست تنها توسط استاد مربوطه و یا از طرف ایشان، باید کامل شود. معمولاً سلول ها به دو صورت: در حال رشد (فلاسک سلولی)، سلول منجمد (کرایوپال) به گیرنده تحویل داده می شود. با توجه به زمانی که محقق در اختیار دارد، اولویت تحویل را مشخص می کند. اولویت بعضی از اساتید برای دانشجوی تازه کار، این است که ابتدا سلول را به صورت در حال رشد تحویل بگیرند. در این حالت معمولاً بسته به نوع رده سلولی درخواستی، بین سفارش و تحویل سلول مدت زمانی حداکثر دو تا سه ماه طول می کشد، زیرا کارشناسان مجرب مرکز بانک سلولی پاستور سلول ها را از حالت ذخیره در می آورند، و بعد از چند بار پاساژ که سلول وارد فاز تکثیر شده است (اصطلاحاً به این حالت، بالا آمدن سلول اطلاق می شود) برای تحویل آماده می کنند. به محض این که سلول تحویل گرفته شد برای ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده می شود سپس سانتریفیوژ، و بخشی از آن، ذخیره (فریز شدن) می گردد و بخش دیگر پاساژ داده می شود. اما اگر سلول را به صورت منجمد سفارش دهید، هم از نظر هزینه، هم از نظر زمان تحویل صرفه جویی می گردد و معمولاً بین زمان ارسال درخواست سلول و زمان تحویل گرفتن به صورت منجمد حداکثر یک هفته طول می کشد. بعد از تحویل در شرایط استریل باید سلول از حالت منجمد خارج شوند که به آن اصطلاحاً دفریز کردن اطلاق می گردد و در بخش های دیگر به صورت کامل توضیح داده می شود.

وسایل مورد نیاز برای کشت سلولی:

۱. فلاسک کشت سلولی که شرایط استریلی را برای رشد سلول ها فراهم می آورد، فلاسک ها بر اساس سطحی که دارند 25 cm^2 یا 75 cm^2 باشند. فلاسک ها اغلب دارای درب فیلتردار هستند (بهترین نوع آنهاست) که موجب کنترل تبادل CO_2 و مانع ورود باکتری ها و عامل عفونی می شود. فلاسک های ساده و بدون فیلتر را باید هنگام قرار دادن در انکوباتور، درب آن را کمی شل کنیم تا ورود و خروج CO_2 امکان پذیر باشد و هنگام خروج، درب انکوباتور را کمی باز کرده و درب فلاسک را همان جا سفت می کنیم و سپس بیرون می آوریم تا مانع ورود هر گونه آلودگی به داخل آن شویم.

همچنین طرز قرار گرفتن فلاسک در دست باید به صورت مایل باشد زیرا در حالت افقی ماندن مایع در ناحیه ی گردن فلاسک باعث آلودگی می شود، البته به صورت مایل گرفتن به مدت طولانی هم صحیح نیست زیرا سلول ها نمی توانند به خوبی تغذیه شوند و می میرند، در نهایت سطح فلاسک را استریل کرده و زیر میکروسکوپ شرایط آن را بررسی می کنیم.



شکل ۱- نمای کلی از فلاسک های فیلتر دار و بدون فیلتر 25 cm^2 یا 75 cm^2

۲. پیپت: یک سری شیشه ای هستند برای کشیدن محیط کشت و هر گونه مایع، که قابل شست و شو و استریل هستند و بعد از شست و شو و خشک کردن، پنبه ای سر آن می گذارند تا هوایی که می کشد هوای استریلی باشد، یک سری هم از نوع پیپت پاستور شیشه ای یک بار مصرف هستند.



شکل ۲- پیپت: معمولاً برای خارج کردن محیط کشت از فلاسک از پیپت استفاده می شود

محیط کشت

محیط کشت: اصلی ترین بستری که برای فراهم آوردن شرایط لازم و رشد سلول ها استفاده می کنیم. محیط کشت دارای تمام مواد غذایی ضروری برای رشد سلول های در حال تقسیم می باشد، مانند اسیدهای چرب (مقدار کمی لیپیدهای پیچیده مانند کلسترول)، آمینواسیدها (آمینو اسیدهای ضروری و غیر ضروری)، یون ها، قند (به عنوان منبع انرژی و تنظیم کننده اسمولاریته)، عناصر کمیاب، ویتامین ها (نیاسین، ریبوفلاوین، نیکوتینیک اسید) و کوفاکتورها. از سوی دیگر محیط کشت حاوی یک سیستم بافری مناسب (که اکثراً HCO_3^- بیکربنات) می باشد. در بعضی از کارهای تحقیقاتی علاوه بر استفاده از بافر بی کربنات از سیستم بافری HEPES استفاده می شود (مانند کار کردن با سلول های T درموش، یا سلول های اپی تلیوم ریه)، زیرا بافر HCO_3^- کاملاً وابسته به CO_2 محیط است. بنابراین اگر مدت زمان طولانی (بیش تر از ۶ ساعت) بیرون از انکوباتور کار کنید pH محیط عوض می شود به همین دلیل نیاز به یک سیستم بافری قوی تر دارید و بنابراین HEPES نیز به بافر بی کربنات اضافه می گردد (۲۰ mM - ۱۰ mM).

در نهایت تمامی محیط های کشت دارای معرف pH هستند که در اغلب موارد از فنول رد (phenol-Red) که معرف اسیدی یا قلیایی بودن است استفاده می شود. انواع مختلفی از محیط کشت وجود دارند که در جدول شماره ۱، رایج ترین انواع محیط کشت و کاربردهای متداول آن ها به اختصار آمده است.



شکل ۳- همه انواع محیط کشت به دلیل داشتن معرف فنول رد، به دلیل حضور رنگ های مختلف، pH

محیط را انعکاس می دهد (pH ۷/۴ = ۱، pH ۷ = ۲، pH ۶/۸ = ۳)

انواع محیط کشت: **MEM- DMEM – RPMI 1640** که بر اساس نوع اسید آمینه با هم متفاوتند .



شکل ۴- محیط کشت هایی که به طور متداول استفاده می گردد، محیط کشت DMEM و RPMI-1640 می باشد. که می توان به صورت آماده خریداری کرد، یا پودر آن را خرید و محیط کشت را تهیه و بعد فیلتر کرد.

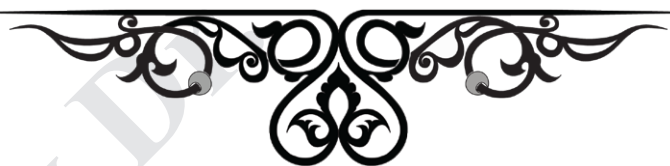


اولین دوره کارگاه تئوری و عملی آشنایی با اصول کشت سلول
مدرس دکتر الهام چمنی
۱۹ آبان ۱۳۹۵



دانشگاه علوم پزشکی
معاونت تحقیقات و فناوری

**چگونه یک محیط کشت مناسب
را برای کار انتخاب کنیم؟**



چگونه یک محیط کشت مناسب را برای کار انتخاب کنیم؟

تعیین درست نوع محیط کشت مورد استفاده یکی از اصلی ترین گام های اولیه در کشت سلولی است. بهترین راه برای تعیین محیط کشت مناسب، استفاده از مقالاتی است که از همان رده سلولی استفاده کردند. معمولاً با مراجعه به این مقالات و به بخش روش های آن (Methods)، محیط کشت مورد استفاده توسط آن ها بررسی می گردد. لازم است به یک مقاله اکتفا نکرده و مقالات متعدد را مورد بررسی قرار دهید و در نهایت تصمیم گیری درست را اتخاذ کنید. همچنین می توانید به سایت ATCC (سایت مرکز منابع بیولوژیکی) مراجعه کرده و با جستجوی نام رده سلولی مورد نظرتان، صفحه ای باز می شود که اطلاعات کلی در زمینه رده سلولی، تاریخچه، نوع محیط کشت، شکل ظاهری سلول ها را در اختیار شما قرار می دهد.

اما گاهی اوقات با توجه به نوع پروپوزال طراحی شده و نوع رده سلولی، نوع محیط کشت مشخص نیست و لازم است دانشجو بهترین محیط کشت را تعیین کند و در این حالت بهتر است در ابتدا با یک محیط کشت پایه کشت سلولی را آغاز و بعد از دو بار پاساژ به بررسی تعداد سلولها، درصد زنده ماندن و مورفولوژی آن ها بپردازد. در صورتی که روند کاهشی مشاهده کرد از عوامل تغذیه کننده محیط کشت استفاده کند و به ترتیب مرحله به مرحله جلو رود و در هر مرحله یک عامل را مورد بررسی قرار دهد تا بتواند بهترین ترکیب از محیط کشت را برای مطالعه خود تعیین کند.

محیط کشت	موارد مورد استفاده
Basal Media Eagle	برای رشد سلول ها همراه با سرم
Minimal Essential Media (ME)	سلول های در حال رشد همراه با سرم دیالیز شده
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	سلول های ترانسفکت شده با ویروس، رشد سلول هایی با تراکم زیاد، رشد سلول های مغز استخوان
Hams F10 Media	
Hams F12 nutrient mixture	سلول های CHO، سلول هایی با تراکم کم، سرم با میزان پایین پروتئین
F12 CDME: (1:1) mixture	انواع سلول ها، رشد سلول ها بدون سرم
William's Media E	رشد سلول های اپی تلیال کبد موش
RPMI 1630	رشد سلول های لوکمیای موشی
RPMI 1640	رشد انواع سلول های لوکمیای انسانی و بسیاری از رده های سلول انسانی
Neurobasal Medium	رشد سلول های نورونی CNS
CMRL Media	سلول های L و سلول های کلیه میمون

جدول ۱- مواردی از رایجترین محیط های کشت مورد استفاده

محیط کشت ها هم به صورت محلول های تجاری و هم به صورت پودر وجود دارند. با توجه به این که ترکیبات محیط کشت با گذر زمان تخریب می شوند، معمولاً خرید محیط کشت محلول توصیه نمی شود. اما در بعضی از آزمایشگاه ها به دلیل نبودن فیلترهای ویژه محیط کشت که به پمپ های خلأ متصل هستند، از محلول محیط کشت تجاری استفاده می گردد. در این موارد لازم است در هنگام خرید محیط کشت، به تاریخ تولید و انقضاء آن دقت گردد. اگر محیط کشت را در محیط آزمایشگاه تهیه و بعد در شرایط استریل و زیر هود، فیلتر کرده، سپس در دمای 4°C نگه داری کنید. معمولاً محیط کشت را فریز نمی کنند زیرا در هنگام یخ زدایی و رساندن دمای آن به 37°C ، مقداری از ترکیبات آن رسوب می کند.

بهترین زمان برای استفاده از محیط کشت تهیه شده، تا دو هفته می باشد. بنابراین بهتر است میزان

محیط کشت مورد استفاده محاسبه و به همان میزان و یا کمی بیشتر تهیه گردد. محیط کشتی که در یخچال نگه داری می شود در زمان استفاده باید در بن ماری گذاشته شده تا دمای آن به 37°C برسد، زیرا استفاده از محیط کشت سرد برای سلول، شوک حرارتی را به دنبال داشته و سبب مرگ سلول ها می گردد.

سرم:

معمولاً برای رشد سلول ها، لازم است به محیط کشت سرم اضافه گردد بسته به نوع رده سلولی مورد استفاده از محیط کشت حاوی سرم (۲۰٪ یا ۱۰٪) استفاده می گردد. سه نوع سرم معمولاً استفاده می شود: سرم گاوی (Fetal جنینی، New Born، adult)، سرم انسانی، سرم اسب هر سرم با توجه به نوع مورد استفاده و حتی از یک نوع از فصلی به فصل دیگر محتویات پروتئینی و فاکتورهای آن متفاوت است. از بین سرم هایی، رایج ترین سرم هایی که استفاده می شود FCS (فرم جنین گوساله) و FBS (سرم جنین گاو) می باشد. معمولاً در بعضی از موارد، لازم است سرم را غیرفعال کنیم چون برای بعضی از رده های سلولی، سرم فعال به دلیل داشتن پروتئین های سیستم کمپلمان، دارای اثرات سمی می باشد. به منظور غیرفعال کردن سرم، لازم است سرم فعال به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری با دمای 56°C قرار داده شود سپس مورد استفاده قرار گیرد. آلودگی با سرم یکی از اصلی ترین آلودگی های رایج در محیط کشت است. بنابراین لازم است سرم از شرکت های معتبر خریداری شود (GibCo، Biosera)، شرکت بهار در تهران از جمله تولید کنندگان داخلی سرم می باشد که خیلی معتبر است، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران).

آنتی بیوتیک:

در صورت مناسب نبودن شرایط استریلیتی (برای مثال: نبودن هودهای لامینار) استفاده از آنتی بیوتیک ها و آنتی مایکوتیک ها در محیط کشت ضروری به نظر می رسد. طیف وسیعی از آنتی بیوتیک های نسبتاً خاص وجود دارد از جمله محلول های پنی سیلین و استروپتومایسین، که به منظور عریض تر نمودن طیف، از مواد آنتی باکتریال و آنتی مایکوتیکال دیگر مثل کانامایسین یا آمفوترین B استفاده می شوند. آنتی بیوتیک انتخابی باید مشخصاً فاقد اثرات سمی برای سلول کشت شده باشد و بسته به نوع آلودگی انتخاب می شود.



اولین دوره کارگاه تئوری و عملی آشنایی با اصول کشت سلول
مدرس دکتر الهام چمنی
۱۹ آبان ۱۳۹۵



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
معاونت تحصیلات و فارسی

منحنی رشد سلول

Cell growth curve

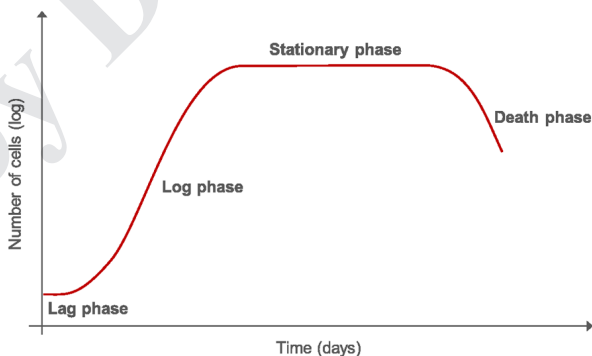


منحنی رشد سلول (Cell growth curve)

Lag Phase: هنگامی که سلول ها از بافت جدا می گردند و در محیط کشت، کشت داده می شوند یا دفریز می گردند و در محیط کشت رشد داده می شوند، سلول ها با سرعت خیلی کم رشد می کنند، به اصطلاح گفته می شود سلول ها در **Lag Phase** هستند. این دوره زمانی از چند ساعت تا ۶۸ ساعت طول می کشد و در این مدت سلول ها دوباره خود را باز سازی می کنند: اسکلت سلولی خود را می سازند، ماتریکسی برای اتصال ترشح می کنند تا قادر باشند به سطح فلاسک بچسبند و دوباره فاز تکثیر سلولی گردند.

Log Phase: در این مرحله سلول ها وارد فاز تکثیری شدند و قادرند خود را تکثیر دهند به این مرحله، اصطلاحاً مرحله رشد نمایی (**Exponential growth**)، همچنین بالا آمدن سلول نیز اطلاق می گردد. مدت زمانی که در آن تعداد سلول ها دو برابر می شود را زمان دوبرابر شدن یا به اصطلاح علمی **doubling time** می گویند که در این مرحله مشخص می گردد. زمان دوبرابر شدن برای هر رده سلولی مشخص است و یکی از اصلی ترین فاکتورهایی است که توسط محقق در محیط کشت باید تعیین گردد. پاساژ یا تعویض کردن محیط در این مرحله انجام می شود.

Stationary Phase: در این مرحله، تعداد سلول ها به حداکثر خود رسیده است و سرعت رشد سلول آهسته یا متوقف می شود. بعضی از سلول ها در این مرحله تمایز پیدا می کنند، بعضی از آن ها وارد فاز **G0** می شوند. معمولاً تعویض محیط در این مرحله انجام نمی شود و سلول ها از کشت سلول خارج می شوند.



شکل ۵- منحنی رشد سلولی



اولین دوره کارگاه تئوری و عملی آشنایی با اصول کشت سلول
مدرس دکتر الهام چمنی
۱۹ آبان ۱۳۹۵



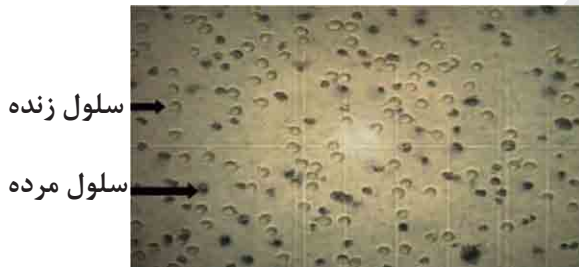
دانشگاه علوم پزشکی
معاونت تحصیلات و فارسی

**چگونگی اندازه گیری تعداد
سلول و درصد زنده ماندن
(Viability)**



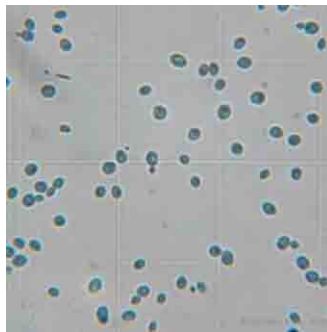
چگونگی اندازه گیری تعداد سلول و درصد زنده ماندن (Viability)

معمولاً برای تعیین درصد زنده ماندن از رنگ آمیزی با تریپان بلو استفاده می شود. تریپان بلو از جمله رنگ های حیاتی است که سلولهای زنده به دلیل وجود غشای سلولی وارد آن ها نمی شود اما سلول های مرده به دلیل نفوذپذیری غشای سلولی رنگ وارد آن ها شده و به صورت تیره در زیر میکروسکوپ مشاهده می شوند.



شکل شماره ۶- رنگ آمیزی با تریپان بلو، سلول های سالم به رنگ روشن و سلول های مرده به رنگ تیره مشخص می شوند.

برای تعیین تعداد سلول، رنگ آمیزی متیلن بلو یک رنگ آمیزی کارآمد است. اما در بعضی از موارد رنگ آمیزی با متیل گرین بیش تر توصیه می شود. در رنگ آمیزی متیل گرین سلول های زنده رنگ را جذب کرده و هسته و هستک سلول ها خوبی مشخص می شود و به همین دلیل سلول های سالم با دقت بیشتری جدا می گردند و شمارش دقیق تری از تعداد سلول ها را در اختیار محقق قرار می دهد.

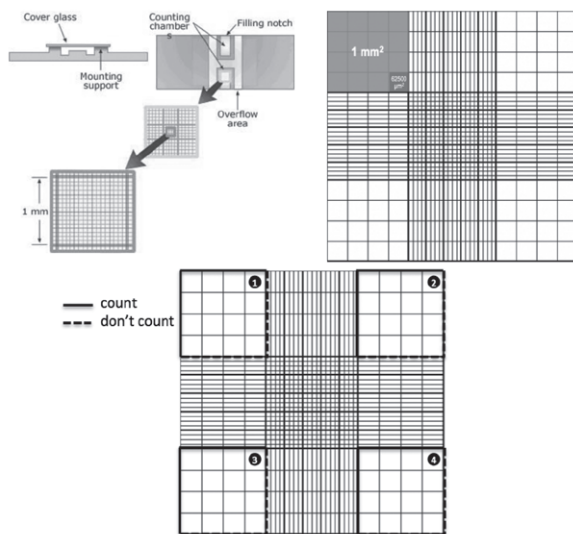


شکل ۷- رنگ آمیزی با متیل گرین، هسته و هستک سلول های سالم به خوبی مشخص است.

لام هموسیتومتر (Neubauer Slide)

شمارش سلولی با کمک لام هموسیتومتر یکی از ارزان ترین تکنیک های شمارش سلولی است. لام هموسیتومتر از ۹ مربع ۱ mm تشکیل شده است که هر کدام به ۲۵ مربع کوچکتر تقسیم شده اند. حجم هر کدام از مربع های ۱ mm، 1 mm^2 یا 0.1×10^{-4} میلی لیتر است. برای گرفتن درصد زنده ماندن، چهار مربع A، B، C و D را در نظر بگیرید. تعداد سلول های زنده (که رنگ تریپان بلو وارد آن ها نشده است) را در هر کدام از مربع ها بشمارید، سپس تعداد سلول های مرده را که رنگ تریپان بلو وارد آن ها شده است را در هر کدام از مربع های فوق محاسبه کنید. برای تعیین درصد زنده ماندن: ۱- سپس برای هر کدام از مربع ها، تعداد کل سلول ها (سلول های مرده + سلول های زنده) را محاسبه کنید.

۲- همچنین تعداد سلول های زنده را نیز در هر کدام از مربع ها به صورت جداگانه محاسبه کنید.
۳- برای تعیین میزان زنده ماندن: معمولاً میزان زنده ماندن به صورت درصد محاسبه می شود بنابراین می کنیم و به منظور گزارش دادن باید حتماً بین درصد های زنده ماندن هر چهار مربع میانگین بگیریم.



شکل ۸- نمای کلی از لام هموسیتومتر و مربع هایی که معمولاً برای شمارش سلولی مورد استفاده قرار می گیرند.



به منظور تعیین تعداد سلول ها، باید تعداد سلول ها را تقسیم بر حجم بکنیم تا cell/ml بدست بیاریم.
باتوجه به این که حجم هر مربع 10^{-4} میلی لیتر است، بنابراین فرمول تعیین تعداد سلول به صورت
زیر در می آید:

$$\text{Average of Viable cell} \times 10,000 \times \text{Dilution factor} = \text{Number of cell}$$



اولین دوره کارگاه تئوری و عملی آشنایی با اصول کشت سلول
مدرس دکتر الهام چمنی
۱۹ آبان ۱۳۹۵



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران
معاونت تحصیلات و فناوری

پاساژ دادن

Sub culturing



پاساژ دادن (Sub culturing):

پاساژ دادن اصطلاحی است که به فرایند انتقال سلول ها به محیط جدید که برای حفظ و رشد بقای سلولی لازم است اطلاق می گردد.

چهار عامل تعیین کننده زمان تعویض محیط کشت می باشد:

الف) کاهش در pH: رشد سلول ها در pH کمتر از ۷ تا ۶/۵ شروع به کم شدن می کند و درصد زنده ماندن آن ها نیز بین pH ۶/۵ تا ۶ به میزان قابل توجهی کم می شود. به دلیل وجود معرف فلر رد در محیط کشت، زرد شدن محیط کشت بیانگر کاهش pH می باشد.

ب) تراکم سلولی: هنگامی که در محیط کشت تعداد سلول های بیشتری قرار دادید، نیاز دارید محیط کشت را سریع تر عوض کنید.

ج) نوع سلول: سلول نرمال سرعت رشد آن آهسته است و معمولاً این سلول ها در فاز G0 چرخه سلولی هستند بنابراین زمان پاساژ آن ها ممکن است هر دو یا سه هفته باشد. این در حالی است که سلولهای سرطانی بسته به نوع آن ها معمولاً هر دو یا سه روز نیاز به تعویض محیط کشت دارند.

د) تغییر مورفولوژیکی: لازم است سلول ها هر روز از نظر مورفولوژی زیر میکروسکوپ توسط محقق بررسی شود تا در صورت مشاهده تغییر، نسبت به تعویض محیط کشت اقدام گردد.

به منظور پاساژ دادن بسته به نوع سلول (از نظر چسبنده و غیر چسبنده بودن) پروتکل انجام کار متفاوت است.

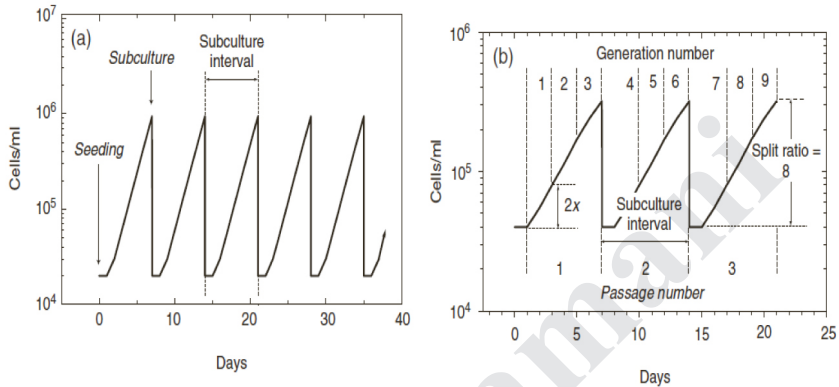
دو حالت کلی برای پاساژ دادن وجود دارد:

۱- سلول های بعد از جمع آوری سانتریفوژ و سپس تعداد مشخصی از سلول ها (برای هر رده سلولی متفاوت است اما محدوده متداول آن غلظت 1×10^4 و 1×10^5 می باشد، برداشته و در محیط جدید کشت داده می شوند) در بیشتر موارد از این روش استفاده می شود به خصوص در مورد سلول های چسبنده).

۲- سلول های فلاسک قبلی بین فلاسک های جدید که شامل محیط کشت جدید هستند تقسیم می گردند (در مورد سلول های سوسپانس کاربرد دارد).

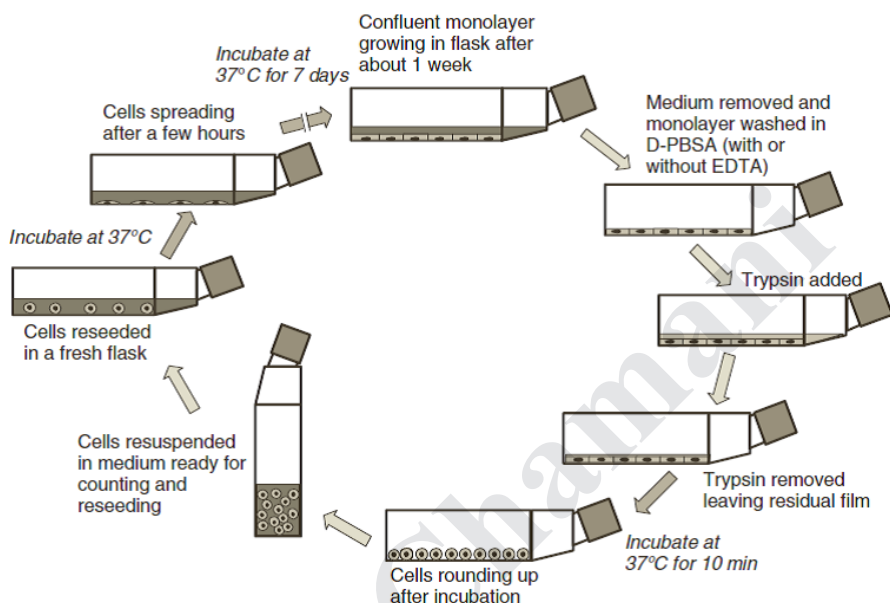
نکته: اگر در یک دوره زمانی با سلول های مختلفی کار می کنید، برنامه ریزی را به گونه ای انجام دهید تا هر روز را مختص پاساژ دادن فقط یک نوع رده سلولی قرار دهید و از پاساژ دادن سلول های مختلف

در یک زمان اجتناب کنید.



پاساژ دادن سلول های چسبنده

سلول های چسبنده (Adherent cells) سلول هایی هستند که با اتصالات سلولی به کف ظرف می چسبند. به منظور پاساژ دادن، ابتدا محیط کشت را برداشته سلول های چسبیده به ته فلاسک را در معرض غلظت مناسبی از تریپسین رقیق شده قرار داده، برای ۱۵ تا ۳۰ ثانیه در انکوباتور انکوبه می کنیم. سپس اثر تریپسین را با محیط کشت سرم دار خنثی می کنیم و پس از آن این محلول را از فلاسک خارج کرده و سلول ها را در محیط بدون سرم سوسپانسی می کنیم، شمارش سلولی انجام داده و غلظت مشخصی از سلول را به محیط کشت جدید منتقل می کنیم.



شکل ۹ - پاساژ سلول های چسبنده

پاساژ دادن سلول های غیر چسبنده

سلول های غیر چسبنده بر خلاف سلول های چسبنده به سطح فلاسک وابسته نیستند و عامل محدود کننده رشد آن ها، حجم سلول است با توجه به این که تبادل CO_2 را انجام می دهند. از سوی دیگر مکانیسم مهاری تماس سلول به سلول که در مورد سلول های چسبنده نقش زیادی دارد در مورد سلول های غیر چسبنده نقش چندانی ایفا نمی کند.

به منظور پاساژ دادن سلول های غیر چسبنده، سلول ها جمع آوری، سپس سانتریفوژ می شوند. سوپ رویی دور ریخته می شود و پلیت سلولی در حجم مشخصی محیط کشت بدون سرم سوسپانسیون می گردد و شمارش سلولی انجام می گردد. سپس حجم مشخصی از سلول در محیط کشت جدید، دوباره کشت داده می شوند.

❖ در مورد هر پاساژ، لازم است بر روی هر فلاسک شماره پاساژ، نام رده سلولی و تاریخ پاساژ ذکر شود.



اولین دوره کارگاه تئوری و عملی آشنایی با اصول کشت سلول
مدرس دکتر الهام چمنی
۱۹ آبان ۱۳۹۵



دانشگاه علوم پزشکی
معاونت تحقیقات و فناوری

فریز کردن

Cryopreservation



فریز کردن (Cryopreservation)

هنگامی که سلول ها در محیط کشت رشد داده شوند و در شرایط مطلوب رشد و تکثیر بودند یکی از ضروری ترین مراحل، گرفتن Back up از سلول های تازه و ذخیره کردن بخشی از آن ها می باشد. آلودگی، پیر شدن سلول ها، القای آپوپتوز، شوک سلولی از موارد اجتناب ناپذیر در کشت سلولی است که سبب از دست دادن ناگهانی سلول ها می گردد. از آن جایی که سفارش دادن و آماده کردن دوباره سلول ها یک کار هزینه بر و مستلزم صرف زمان می باشد بهتر است در زمانی که سلول ها در شرایط مطلوب هستند (معمولاً در پاساژهای پایینین ≤ 5) نسبت به ذخیره بخشی از آن اقدام کنید. برای رسیدن به این هدف، پس از تهیه سوسپانسیون سلولی، شمارش سلولی و تعیین درصد زنده ماندن انجام می شود. سپس بر اساس تعداد سلول ها تصمیم گیری می شود که نیاز به چند کرایوویال می باشد. سپس سلول ها با درصد زنده ماندن بالا و معمولاً چگالی سلول 1×10^6 تا 2×10^6 برای ذخیره شدن در نظر گرفته می شود.

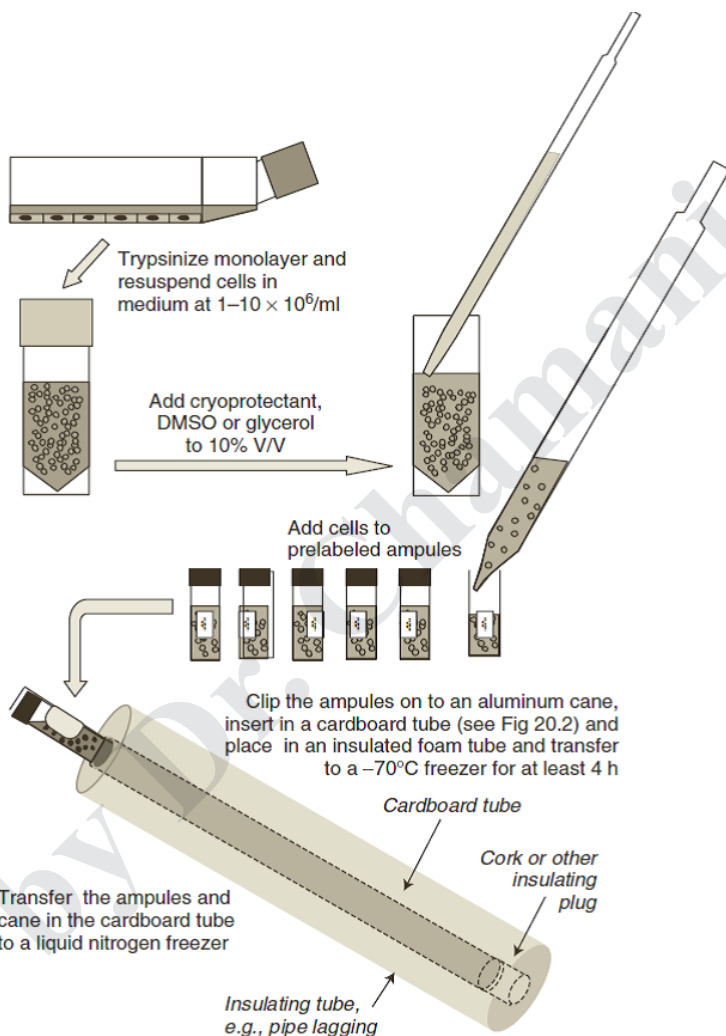
۱- در یک ویال جداگانه FBS حاوی میزان مشخصی از ۱۰٪ DMSO تهیه می شود.
۲- به ازای هر 1×10^6 تا 2×10^6 ، میزان $500 \mu\text{l}$ از FBS شامل ۱۰٪ DMSO به آن اضافه می کنیم. پس از پیپتاژ تقسیم و به فریزر منتقل می کنیم.
۳- کرایو حاوی سوسپانسیون سلولی به مدت دو ساعت در فریزر -20°C - و سپس به فریزر -80°C منتقل می شود.

۴- بعد از گذشت ۶ ساعت (این زمان می تواند ۱۲ تا ۴۸ ساعت هم ادامه داشته باشد) سلول ها به تانک ازت -196°C منتقل می شوند.

▪ بر روی کرایوویال تاریخ، نوع رده سلولی، تراکم سلولی، از پاساژ با چه شماره ای استفاده شده است باید حتماً ذکر گردد.



شکل ۱۰- قرار دادن کرایوویال در تانک ازت



شکل ۱۱- فریز کردن سلول ها



اولین دوره کارگاه تئوری و عملی آشنایی با اصول کشت سلول
مدرس دکتر الهام چمنی
۱۹ آبان ۱۳۹۵



دانشگاه علوم پزشکی
معاونت تحقیقات و فناوری

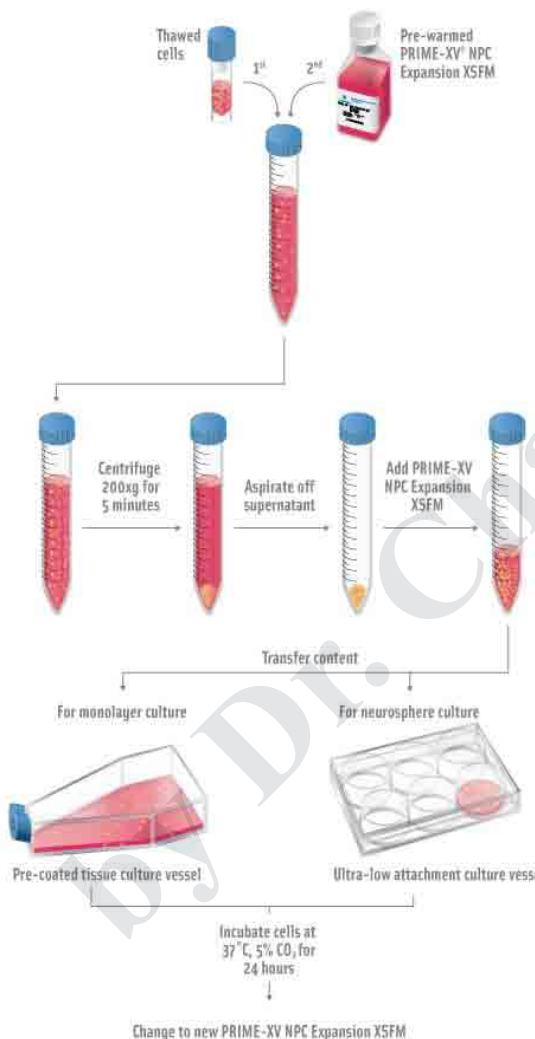
دفریز کردن سلول ها



دفریز کردن سلول ها:

سلول ها در نیتروژن مایع نگه داری و در زمان مورد نظر مجدداً ذوب شده و تحت کشت قرار می گیرند. در این فرایند، دو نکته اهمیت کلیدی دارد. سرعت عمل و کار کردن در شرایط استریل. سلول هایی که از تانک ازت $^{\circ}\text{C} 196$ - خارج می شوند بسیار حساسند. و بسیاری از سلول ها در همین مرحله می میرند. مراحل کار به شرح زیر است:

- ۱- در یک فالكون ۱۵ ml، ۵ ml محیط کشت حاوی FBS می ریزیم.
- ۲- کرایوپوئال مربوطه از تانک خارج و در آن تا حدی باز می گردد تا گاز ازت خارج گردد. پس از خروج گاز، در کرایوپوئال مجدد بسته می شود.
- ۳- انتهای کرایوپوئال منجمد حاوی سلول ها در بن ماری $^{\circ}\text{C} 37$ قرار داده می شود.
- ۴- ویال به آرامی حرکت دورانی داده می شود.
- ۵- پس از آن که بلور منجمد از دیواره ویال جدا شد، ویال به زیر هود منتقل می شود.
- ۶- ابتدا در ویال با پنبه آغشته به الکل ۷۰٪ تمیز و سپس باز می شود. سوسپانسیون سلولی به صورت قطره قطره در لوله حاوی محیط کامل ریخته و به آرامی پیپتاژ می کنید. سپس دیواره کرایوپوئال با ۱ ml محیط کشت شسته و مجدداً به لوله منتقل می گردد.
- ۷- سپس لوله حاوی سلول ها به مدت ۵ دقیقه با سانتریفوژ ۱۳۰ g (تا ۲۰۰ g می تواند باشد) سانتریفوژ می گردد.
- ۸- پس از خارج نمودن محیط رویی، رسوب سلولی در محیط کشت سوسپانسیون و شمارش سلولی و تعیین درصد زنده ماندن انجام می شود (خیلی از مواقع تعیین تعداد سلول ها و درصد زنده ماندن توصیه نمی شود. چون باعث شوک به سلول ها می شود و ارزیابی سلول ها را ۲۴ ساعت بعد از کشت انجام می دهند و به سرعت مرحله بعد انجام می گردد).
- ۹- پس از شمارش، محیط کشت حاوی ۲۰٪ سرم به سلول اضافه و سوسپانسیون تهیه شده در داخل فلاسک ریخته و در انکوباتور قرار داده می شود.



شکل ۱۲- خارج کردن کرایویال
منجمد از تانک ازت

شکل ۱۳- دفریز کردن سلول ها



اولین دوره کارگاه تئوری و عملی آشنایی با اصول کشت سلول
مدرس دکتر الهام چمنی
۱۹ آبان ۱۳۹۵



دانشگاه علوم پزشکی
معاونت تحقیقات و فناوری